

Université de Montréal

**Caractérisation de la pharmacocinétique de formulations
sensibles au pH et de formulations destinées au
traitement des intoxications médicamenteuses**

par

NICOLAS BERTRAND

Technologie Pharmaceutique

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté de Pharmacie
en vue de l'obtention du grade de Philosophæ Doctor
en Sciences Pharmaceutiques
option Technologie Pharmaceutique

Avril 2011

© Nicolas Bertrand, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Caractérisation de la pharmacocinétique de formulations sensibles au pH et de formulations destinées au traitement des intoxications médicamenteuses

Présentée par :

NICOLAS BERTRAND

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Prof. Albert Adam, président-rapporteur

Prof. Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche

Prof. France Varin, membre du jury

Prof. Chantal Simard, examinateur externe

Prof. Albert Adam, représentant du doyen de la FES

Résumé

La préparation de formulations à libération contrôlée est le domaine des sciences pharmaceutiques qui vise à modifier l'environnement immédiat des principes actifs pour en améliorer l'efficacité et l'innocuité. Cet objectif peut être atteint en modifiant la cinétique de circulation dans le sang ou la distribution dans l'organisme. Le but de ce projet de recherche était d'étudier le profil pharmacocinétique (PK) de différentes formulations liposomales. L'analyse PK, généralement employée pour représenter et prédire les concentrations plasmatiques des médicaments et de leurs métabolites, a été utilisée ici pour caractériser *in vivo* des formulations sensibles au pH servant à modifier la distribution intracellulaire de principes actifs ainsi que des liposomes destinés au traitement des intoxications médicamenteuses.

Dans un premier temps, la PK d'un copolymère sensible au pH, à base de *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) et d'acide méthacrylique (MAA) a été étudiée. Ce dernier, le p(NIPAM-*co*-MAA) est utilisé dans notre laboratoire pour la fabrication de liposomes sensibles au pH. L'étude de PK conduite sur les profils de concentrations sanguines de différents polymères a défini les caractéristiques influençant la circulation des macromolécules dans l'organisme. La taille des molécules, leur point de trouble ainsi que la présence d'un segment hydrophobe à l'extrémité des chaînes se sont avérés déterminants. Le seuil de filtration glomérulaire du polymère a été évalué à 32 000 g/mol. Finalement, l'analyse PK a permis de s'assurer que les complexes formés par la fixation du polymère à la surface des liposomes restaient stables dans le sang, après injection par voie intraveineuse. Ces données ont établi qu'il était possible de synthétiser un polymère pouvant être adéquatement éliminé par filtration rénale et que les liposomes sensibles au pH préparés avec celui-ci demeuraient intacts dans l'organisme.

En second lieu, l'analyse PK a été utilisée dans le développement de liposomes possédant un gradient de pH transmembranaire pour le traitement des intoxications médicamenteuses. Une formulation a été développée et optimisée *in vitro* pour capturer un médicament modèle, le diltiazem (DTZ). La formulation liposomale s'est avérée 40 fois plus performante que les émulsions lipidiques utilisées en clinique. L'analyse PK des liposomes a permis de confirmer la stabilité de la formulation *in vivo* et d'analyser l'influence des liposomes sur la circulation plasmatique du DTZ et de son principal métabolite, le desacétyldiltiazem (DAD). Il a été démontré que les liposomes étaient capables de capturer et de séquestrer le principe actif dans la circulation sanguine lorsque celui-ci était administré, par la voie intraveineuse. L'injection des liposomes 2 minutes avant l'administration du DTZ augmentait significativement l'aire sous la courbe du DTZ et du DAD tout en diminuant leur clairance plasmatique et leur volume de distribution. L'effet de ces modifications PK sur l'activité pharmacologique du médicament a ensuite été évalué. Les liposomes ont diminué l'effet hypotenseur du principe actif administré en bolus ou en perfusion sur une période d'une heure. Au cours de ces travaux, l'analyse PK a servi à établir la preuve de concept que des liposomes possédant un gradient de pH transmembranaire pouvaient modifier la PK d'un médicament cardiovasculaire et en diminuer l'activité pharmacologique. Ces résultats serviront de base pour le développement de la formulation destinée au traitement des intoxications médicamenteuses.

Ce travail souligne la pertinence d'utiliser l'analyse PK dans la mise au point de vecteurs pharmaceutiques destinés à des applications variées. À ce stade de développement, l'aspect prédictif de l'analyse n'a pas été exploité, mais le côté descriptif a permis de comparer adéquatement diverses formulations et de tirer des conclusions pertinentes quant à leur devenir dans l'organisme.

Mots clés : liposomes, poly(éthylène glycol); détoxication; émulsion lipidique; biodistribution; poly(*N*-isopropylacrylamide); sensibilité au pH; chargement actif; pharmacocinétique

Abstract

Drug delivery is the field of pharmaceutical sciences which focuses on altering the immediate environment of drug molecules to improve their efficacy and safety. Drug delivery systems can potentiate the effect of active principles or alleviate their side effects by modifying their circulation profiles and/or biodistribution. The objective of this research project was to investigate the role of pharmacokinetic (PK) analysis in the development of novel drug delivery systems. PK analysis is generally applied to describe and predict the blood concentration profiles of low molecular weight drugs and their metabolites. Nevertheless, it is herein used to characterize the circulation of 2 liposomal formulations: pH-sensitive liposomes designed to alter the intracellular distribution of drugs and liposomes with transmembrane pH gradient for drug detoxification.

The first series of experiments were designed to study the circulation kinetics of a pH-sensitive polymer prepared with *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) and methacrylic acid (MAA). The copolymer p(NIPAM-*co*-MAA) is used in our laboratory to prepare serum-stable, PEGylated, pH-sensitive liposomes. The circulation profiles of polymers with different characteristics were characterized. The parameters which impacted the fate of the macromolecules were the length of the polymer chain, its cloud point and the presence of a hydrophobic anchor at one extremity of the molecule. The glomerular filtration cut-off of the polymer was determined to be around 32,000 g/mol. PK analysis allowed to conclude that the complexes prepared by anchoring the polymer on the surface of the liposomes remained stable in the bloodstream. This data established that pH-sensitive vesicular formulations could be produced using a polymer which could be excreted through renal filtration. It also confirmed that the formulation remained intact in the bloodstream.

The second part of this work involved the development of liposomes with a transmembrane pH gradient designed to treat cardiovascular drug intoxications. Liposomes were designed and optimized *in vitro* to capture a model cardiovascular drug, diltiazem

(DTZ). *In vitro*, the liposome uptake capacity was 40-fold higher than the lipid emulsion used in the clinic. PK analysis was used to verify the stability of the formulation *in vivo*, and to assess the impact of the liposomes on the plasma concentration of DTZ and its principal active metabolite, deacetyl-diltiazem (DAD). It was shown that the vesicles were able to capture and sequester DTZ and DAD. Injection of liposomes 2 min prior to administration of DTZ significantly increased the area under the plasma-concentration vs. time curve of both DTZ and DAD, while lowering their clearance and volume of distribution. The impact of the changes in PK on the pharmacological effect of the drug was also investigated. Liposomes tempered the hypotensive effect of the drug when the latter was administered *via* an intravenous bolus or a 1-h perfusion. Throughout this work, PK analysis proved to be an efficient tool to study the ability of transmembrane pH gradient liposomes to alter the blood circulation profiles of a cardiovascular drug, and to reduce its pharmacological effect. This proof of concept establishes firm ground for the further development of this colloidal formulation to treat drug intoxications.

This work pointed out the relevance of PK analysis for the development of multi-purpose, colloidal drug delivery systems. At this stage, the predictive nature of the analysis was not exploited, but its descriptive properties allowed objective comparison of the circulation profiles of distinct systems and pertinent conclusions concerning their fate *in vivo*.

Keywords : liposomes, poly(ethylene glycol); detoxification; lipid emulsion; biodistribution; poly(*N*-isopropylacrylamide); pH-sensitivity; active loading; pharmacokinetic.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	x
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et abréviations	xvii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	3
1.1. Les vecteurs colloïdaux.....	3
1.1.1 Principes généraux	3
1.1.2 Les différents types de vecteurs colloïdaux.	5
1.1.2.1 Les conjugués polymères.....	5
Les conjugués à base de poly(éthylène glycol)	7
Les conjugués à base d'autres polymères.....	10
1.1.2.2 Les structures cœur-couronne	12
Les micelles	12
Les nanoparticules de polymères	15
1.1.2.3 Les vecteurs vésiculaires.....	16
Les liposomes.....	16
Les vésicules polymères et nanocapsules.....	20
1.1.3. Objectifs de la vectorisation.....	21
1.1.3.1 Augmenter la solubilité du principe actif.....	21
Étude de cas du paclitaxel.....	22
1.1.3.2 Protéger le principe actif	23
Étude de cas des acides nucléiques.....	24
1.1.3.3 Modifier la pharmacocinétique et la distribution d'un principe actif.....	26

Étude de cas de la doxorubicine.....	26
1.1.3.4 Cibler le site thérapeutique du principe actif.....	29
L'effet EPR ou le ciblage passif des tumeurs solides.....	30
L'utilisation de ligands ou le ciblage actif.....	33
La sensibilité au pH ou le ciblage intracellulaire.....	35
1.1.4. Au-delà de la vectorisation, la détoxication.....	38

1.2 Article de revue : The journey of a drug-carrier in the body: the physiological challenges of nanomedicine. 41

1.2.1 Abstract.....	42
1.2.2. Introduction.....	42
1.2.3. Entering the systemic circulation.....	45
1.2.4. Interactions with blood.....	47
1.2.4.1. Blood cells.....	47
1.2.4.2. Plasma proteins and the opsonin/dysopsonin system.....	48
Albumin.....	48
Lipoproteins and apolipoproteins.....	50
Proteins of the complement.....	50
Other plasma proteins.....	52
1.2.5. Filtration by the kidney.....	55
1.2.5.1. Kidney Morphology.....	55
1.2.5.2. Glomerular filtration.....	57
1.2.5.3. Tubular reabsorption.....	59
1.2.6. Capture by the liver.....	59
1.2.6.1. Morphology.....	59
1.2.6.2. Phagocytosis in Kupffer cells.....	60
1.2.6.3. Targeted delivery to the liver.....	64
1.2.6.4. Biliary excretion.....	65
1.2.7. Sieving through the spleen.....	66
1.2.7.1. Morphology and function.....	66
1.2.7.2. The ABC phenomenon.....	69
1.2.8. Perspectives.....	70
1.2.9. Acknowledgements.....	71

CHAPITRE 2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	72
2.1. Objectifs généraux et hypothèse de recherche	72
2.2 Objectifs spécifiques	72
2.2.1 Étude de la pharmacocinétique de poly(NIPAM-co-MAA) pour la mise au point de formulations liposomales sensibles au pH.....	72
2.2.2 Développement d'une formulation liposomale à gradient de pH transmembranaire pour le traitement des intoxications médicamenteuses.	74
CHAPITRE 3. PHARMACOKINETICS AND BIODISTRIBUTION OF N-ISOPROPYLACRYLAMIDE COPOLYMERS FOR THE DESIGN OF PH-SENSITIVE LIPOSOMES.....	76
3.1. Abstract.....	77
3.2. Introduction	77
3.3. Experimental	79
3.3.1. Materials.....	79
3.3.2. Polymer synthesis.....	79
3.3.3. Polymer characterization	80
3.3.4. Determination of the critical association concentration (CAC).....	81
3.3.5. Preparation of dual-labelled, PEGylated, liposomes	81
3.3.6. PK studies	82
3.3.7. Calculations of PK parameters.....	82
3.3.8. Determination of the glomerular filtration cut-off	83
3.3.9. Statistical analysis.....	84
3.4. Results	84
3.4.1. Polymer synthesis and characterization.....	84
3.4.2. PK profiles and biodistribution of [¹⁴ C]-DODA-P(NIPAAm-co-MAA)	85
3.4.3. Determination of the glomerular filtration cut-off	90
3.4.4. PK profiles and biodistribution of pH-sensitive liposomes.....	91

3.5. Discussion	93
3.6. Conclusion	96
3.7. Acknowledgements	97
3.8 References	97
CHAPITRE 4. TRANSMEMBRANE PH-GRADIENT LIPOSOMES FOR CARDIOVASCULAR DRUG DETOXIFICATION: MAKING THE OLD NEW ..	102
4.1. Abstract	103
4.2. Introduction	103
4.3. Experimental methods	106
4.3.1. Preparation of PEGylated liposomes with transmembrane pH gradient	106
4.3.2. <i>In vitro</i> uptake studies	107
4.3.3. PK studies	108
4.3.4. Calculations of PK parameters.....	108
4.3.5. DTZ extraction and high performance liquid chromatography (HPLC)	109
4.3.6. Pharmacological activity of DTZ	109
4.3.7. Statistical analysis.....	110
4.4. Results and Discussion	110
4.4.1. Preparation and characterization of liposomes	110
4.4.2. Uptake of DTZ and comparison with other formulations.....	112
4.4.3. Impact of liposomes on the PK of DTZ and DAD	114
4.4.4. Impact of liposomes on the pharmacological activity of DTZ.....	117
4.5. Conclusions	119
4.5.1. Acknowledgements	119
4.5.2. Supporting Information Available:	120

4.6. Supporting information	120
4.6.1 Supplementary Methods.....	120
4.6.1.1 Synthesis of deacetyl-diltiazem and determination of pK_a s	120
4.6.1.2. Interaction of bromophenol blue (BPB) with DTZ	121
4.6.1.3. Determination of captured volume of liposomes	121
4.6.1.4. Stability of transmembrane pH gradient	122
4.6.1.5. Pharmacokinetics of liposomes and encapsulated citrate buffer	122
4.6.1.6. <i>In vitro</i> bupivacaine capture study.	122
4.6.1.7. Deacetylation of encapsulated DTZ in blood	123
4.6.1. 8. Supplementary secondary pharmacokinetic parameters.....	123
4.6.2 Supplementary results.....	124
4.7 References	137
CHAPITRE 5. DISCUSSION GÉNÉRALE	142
5.1 Le choix de l'analyse non-compartmentale.	142
5.2 La PK du poly(NIPAM-co-MAA).	144
5.3 Les liposomes à gradient de pH transmembranaire pour le traitement des intoxications médicamenteuses.	151
CHAPITRE 6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	159
CHAPITRE 7. BIBLIOGRAPHIE	I
ANNEXE 1. Serum-stable, long-circulating, pH-sensitive PEGylated liposomes	xx
ANNEXE 2: Articles tel que publiés (en date du 4 juillet 2011):	Erreur ! Signet non défini.

Liste des tableaux

Table 1.1 Comparative values of organ weight, blood flow and cycle time in different species. The total animal weight and total blood volume are given in parentheses.....	47
Tableau 1.2 The glomerular filtration cut-offs of different polymers.....	58
Table 3.1 Physicochemical characteristics of NIPAAm copolymers	85
Table 3.2 PK parameters of NIPAAm copolymers.....	86
Tableau 3.3 PK parameters of liposomes and anchored P-10k.....	93
Tableau 4.1 PK parameters for DTZ and DAD in the presence and absence of liposomes.	114
Tableau 4.2 Liposome formulations tested.....	124
Table 4.3 Supplementary secondary PK parameters.....	135
Table 4.4 Hemodynamic parameters after DTZ injection in the presence and absence of liposomes.	135
Tableau 4.5 Statistical tests used in figures and tables.	136
Tableau 5.1 Paramètres PK calculés en omettant les valeurs sous LLOQ (à comparer avec le tableau 4.1).....	154
Tableau 5.2 Paramètres PK secondaires calculés en omettant les valeurs sous LLOQ (à comparer avec le tableau 4.3).....	155

Liste des figures

- Figure 1.1 Exemples de vecteurs en cours de développement clinique ou préclinique. Le type de formulation utilisé dépend des propriétés du principe actif à vectoriser..... 4
- Figure 1.2 Conjugaison d'un polymère à un principe actif. A. Les différents conjugués polymériques pouvant être fabriqués dépendent du type de polymère et du nombre de fonctions pouvant réagir sur le principe actif. B. Lorsque plusieurs fonctions sont réactives et que la méthode de conjugaison n'est pas sélective, le nombre de produits augmente rapidement. 7
- Figure 1.3 Structures des différents polymères employés pour la fabrication de conjugués. 9
- Figure 1.4 Les structures cœur-couronne. A. Les micelles polymères résultent de l'autoassemblage de polymères amphiphiles ou de la complexation de polyions blocs de charges opposées. Leur cœur ou leur couronne peut être réticulé. B. Les nanoparticules de polymères se distinguent par leur cœur hydrophobe solide de type matriciel où des principes actifs peuvent être incorporés. 14
- Figure 1.5 Influence de la forme des phospholipides sur la structure de l'agencement supramoléculaire. La bicouche lipidique des liposomes est formée par des phospholipides cylindriques..... 18
- Figure 1.6 Le chargement des drogues dans les liposomes par chargement actif..... 19
- Figure 1.7 L'assemblage d'un duplex d'oligonucléotides au sein de divers complexes polyioniques diminue sa susceptibilité à la dégradation par l'ADNase type I, *in vitro*. À droite, l'effet des différentes formulations sur la cinétique de dégradation..... 25
- Figure 1.8 Pharmacocinétique de 2 doses de doxorubicine libre (n=4) ou sous forme liposomale (n=14). L'effet de l'encapsulation du principe actif sur la PK est clairement visible..... 27
- Figure 1.9 Schématisation des principes de ciblage des cellules cancéreuses. Le ciblage passif des tumeurs solides repose sur la perméation accrue des vaisseaux dans les tumeurs et sur le drainage lymphatique déficient. Le ciblage actif (dans l'inséré)

repose sur la reconnaissance des cellules malades par des molécules de reconnaissance à la surface des vecteurs.....	30
Figure 1.10 L'effet EPR chez l'homme. Accumulation de liposomes PEGylés marqués au ^{111}In -DTPA en fonction du temps chez un patient sidatique atteint du sarcome de Kaposi. Les vésicules sont détectables jusqu'à 7 jours après la dernière administration dans les tumeurs identifiées par les flèches noires.....	32
Figure 1.11 Différentes molécules de reconnaissance pouvant fonctionnaliser la surface d'un vecteur.....	33
Figure 1.12 Ciblage intracellulaire après l'endocytose médiée par un récepteur.	36
Figure 1.13 Les copolymères de NIPAM en solution possèdent une transition de phase abrupte lorsque la température passe au dessus de leur point de trouble (LCST). Si un des monomères est ionisable (<i>e.g.</i> , MAA), cette transition de phase devient dépendante du pH.....	38
Figure 1.14 Le principe de détoxification par des colloïdes injectables. Les colloïdes séquestrent les molécules de drogue dans la circulation sanguine pour limiter leur distribution vers les tissus. MTL : niveau toxique minimum (« <i>minimum toxic level</i> »).	39
Figure 1.15 Distribution of blood flow in the pulmonary and systemic circulations. Values in parentheses represent the percentage of total blood flow in each organ.....	46
Figure 1.16 Comparison of the pharmacokinetic profiles of different long-circulating formulations in mice.	54
Figure 1.17 Blood filtration in the kidney. A. The kidney. The kidney parenchyma is separated between the cortex and the medulla. B. The nephron. Approximately one million nephrons span both regions and are responsible for blood filtration. Blood filtration occurs in the glomerulus. Bowman's capsule collects the filtrate before its transit through the tubules where it can be concentrated. The collecting duct gathers urine from multiple nephrons for exit to the ureter. C. The glomerular capillary. The glomerular capillaries are composed of a highly-fenestrated endothelium, the glomerular basal membrane (GBM) and the podocytes. D. The filtration apparatus.	

Three distinctive structures of the component together exert qualitative and quantitative restrictions over the filtrate. The white squares delimit the zones zoomed in the following panel.	56
Figure 1.18 Structure of the liver. A. The liver. The liver is perfused by the hepatic artery and portal vein. Blood exits through the hepatic vein into the inferior vena cava, and bile drains into the gall bladder. B. The liver lobules. The liver parenchyma is composed of hexagonal lobules containing hepatocyte plates and the sinusoids. The blood in each lobule comes from the portal vein and hepatic arteries; it drains out through the central vein and into the inferior vena cava. C. The liver sinusoid. Fenestrated hepatic sinusoids where the arterial and portal veins merge. . The white squares delimit zones zoomed in the following panel.	62
Figure 1.19 Different biliary elimination processes of colloids by hepatocytes: 1) Fluid phase endocytosis (pinocytosis), 2) Direct receptor-mediated transcytosis, and 3) Receptor-mediated transcytosis followed by passage through lysosomes.....	65
Figure 1.20 Structure of the spleen. A. The spleen parenchyma is protected by a fibrous capsule and is composed of the white and red pulps. B. From the trabecular circulation, the arteries empty into the splenic sinusoids (closed circulation) or directly into the parenchyma (open circulation). C. Reticular fibres confer a highly-tortuous architecture to the red pulp, and blood components must squeeze through the 200-nm wide fenestration of the sinusoids. The white squares delimit zones zoomed in the following panel.....	68
Figure 3.1 Blood circulation profiles of polymers	86
Figure 3.2 Cumulative polymer excretion in urine (A) and in faeces (B) excretion over 48 h.....	88
Figure 3.3 Organ distribution of polymers 48 h after injection.	90
Figure 3.4 Polymer size distribution profiles of polymers relative to glomerular filtration cut-off.....	91

- Figure 3.5 Blood circulation profiles (A) and organ distribution 48 h post dosing (B) of pH-responsive liposomes labelled with the non exchangeable lipid probe 3H-CHE (■) and 14C-P-10-k (□)..... 92
- Figure 4.1 Rationale behind the use of transmembrane pH-gradient liposomes as antidotes. Similarly to IFE, the vesicles act as sinks to scavenge circulating free drugs. The transmembrane pH gradient maximizes the quantities that can be captured. Sequestration of the drug by vesicles in the blood decreases the amounts of pharmacologically-active free drug. In the equations, C_{int} , C_{ext} , D_{drug} , pH_{int} , and pH_{ext} represent the concentration of drug captured, the external drug concentration, the drug distribution coefficient and internal and external pHs, respectively..... 106
- Figure 4.2 Internal buffer parameters influencing DTZ capture. (A). The greater the gradient between internal and external pHs, the more efficient the capture. (B). Capture increases with buffer strength until iso-osmolarity is reached..... 112
- Figure 4.3 DTZ capture by different formulations in the presence of plasma..... 113
- Figure 4.4 Plasma concentrations of DTZ and DAD in control and liposome-treated rats. (A). The influence of liposomes on DTZ is seen mostly during the distribution phase. (B). The liposomes also captured DAD, and the effect was more prolonged than with DTZ..... 116
- Figure 4.5 Influence of liposomes on the hypotensive effect of DTZ. (A). After a bolus injection of DTZ, the liposomes minimized the drop in blood pressure. (B). The effect of liposomes was more pronounced when higher DTZ doses were perfused over 1 h. 118
- Figure 4.6 Structures of Egg PC, citrate, DTZ and DAD. 126
- Figure 4.7 Influence of ionic strength on capture. With liposomes containing the same citrate concentration, buffers made iso-osmolar with NaCl are less efficient to take up DTZ than their hypo-osmolar counterpart. Ion concentration inside the liposomes affects drug capture. 127
- Figure 4.8 Interactions of DTZ with BPB inside the liposomes. (A). Schematic representation of the interaction between DTZ and BPB. (B). Absorbance spectra of

BPB with increasing DTZ concentrations. **(C)**. Ratio of absorbance (596 nm/496 nm) of BPB entrapped in liposomes with or without DTZ 1 mM. Interactions between the drug and the encapsulated probe show that DTZ is rapidly pumped inside the liposomes as a result of the transmembrane pH gradient. Solubilization of the liposomes with Triton® X-100 disrupts the interactions..... 128

Figure 4.9 Influence of entrapped volume in vesicles on DTZ uptake capacity. Full and empty circles represent vesicles with internal pH 3.0 and 4.0, respectively. Capture efficiency increases with the volume entrapped in vesicles..... 129

Figure 4.10 Stability of pH gradient in the presence of plasma. The pH gradient remains stable when incubated in HBS and increases by less than 0.6 pH units over 6 h when incubated in 80% plasma. Since the liposomes concentrations used in this experiments are comparable to those which could be achieved after intravenous injection, it can be concluded that the pH-gradient should remain stable under physiological conditions. 130

Figure 4.11 Stability of citric acid entrapment in blood. **(A)** Blood circulation profiles of [³H]-CHE-labelled transmembrane pH-gradient liposomes (full circles) and encapsulated [¹⁴C]-citrate buffer (empty circles). **(B)** Linear relationship between injected doses of vesicles and citrate. The parallel circulation profiles of both isotopes, as well as the linear relation between the circulating doses of vesicles and entrapped citrate buffer, indicate that minimal citrate leakage occurs in the bloodstream during the first 24 h. 131

Figure 4.12 Capture of bupivacaine by liposomes with transmembrane pH-gradient and IFE 20%. Despite the physicochemical differences *vs.* DTZ (pK_a and $\log D$ obtained from references^{10, 51}), the liposomes can efficiently capture bupivacaine. 132

Figure 4.13 *In vitro* capture of DTZ and DAD. Both DTZ and DAD are taken up to a similar extent *in vitro* in the presence and absence of 50% rat plasma. Incubation time in plasma was set at 30 min to minimize the *in situ* conversion of DTZ to DAD. The pK_a s of DTZ and DAD are 7.57 ± 0.05 and 7.68 ± 0.05 , respectively. 133

- Figure 4.14 Percentage of initial DTZ and DAD amounts in liposomes after incubation in HBS and blood. The quantities of DTZ and DAD in liposomes remain stable in HBS while the amount of DTZ present in liposomes incubated in blood decreases with the conversion of DTZ to DAD caused by esterases. 134
- Figure 5.1 La mesure de la taille de différents types de composés. A. Les molécules de DTZ possèdent une masse molaire et des dimensions strictement définies. B. Le polymère P-10K représente un ensemble de chaînes de polymères de tailles différentes. C. Le diamètre des vésicules formant une formulation de liposomes varie entre 70 et 450 nm. 143
- Figure 5.2 Structure du polymère et fonction de chaque composante. 145
- Figure 5.3 Profil de circulation des différents polymères (échelle logarithmique). 146
- Figure 5.4 Différences structurelles expliquant les conformations des polymères en solution. Pour les polymères alkylés, la longueur de la chaîne de polymère hydrophile varie alors que l'ancre hydrophobe demeure identique. L'hydrophilie globale de la molécule diminue avec la taille du polymère. En devenant moins hydrophiles, les chaînes s'agencent en structures polymoléculaires. P-5K-NA ne possède pas d'ancre hydrophobe et reste sous forme unimoléculaire. 148
- Figure 5.5 Profils de circulation plasmatique du DTZ et du DAD en omettant les valeurs sous la LLOQ. 154
- Figure 5.6 Pourcentage de la dose injectée (DTZ+DAD) dans le plasma en fonction du temps. Les liposomes séquestrent les molécules actives dans la circulation sanguine et limitent la quantité de principe actif pouvant se distribuer dans les tissus. 156

Liste des sigles et abréviations

°C	degré Celcius
[¹⁴ C]-DODA-P(NIPAAm-co-MAA)	copolymère alkylé à base de NIPAM et de MAA
[³ H]-CHE	[³ H]-cholesteryl hexadecyl ether
¹⁴ C-AAm	[¹⁴ C]-acrylamide
³ H-CHE	[³ H]-cholesteryl hexadecyl ether
AAm	acrylamide
ABC	phénomène de clairance accélérée, <i>accelerated blood clearance</i>
AUC	aire sous la courbe concentration sanguine vs. temps, <i>area under the blood concentration vs. time curve</i>
AUC _(0-60min)	aire sous la courbe tension artérielle moyenne vs. temps, <i>area under mean arterial blood pressure vs. time curve</i> (0 à 60 min)
AUC _(0-6h)	aire sous la courbe concentration sanguine vs. temps, <i>area under the blood concentration vs. time curve</i> (0 à 6 h)
AUC _(0-∞)	aire sous la courbe concentration sanguine vs. temps, <i>area under the blood concentration vs. time curve</i> (0 à l'infini)
AUMC	<i>area under the first moment curve</i>
BPB	bleu de bromophénol, <i>bromophenol blue</i>
CAC	concentration critique d'aggrégation, <i>critical aggregation concentration</i>
CCB	bloqueur des canaux calciques, <i>calcium channel blocker</i>
CDC	Vecteur colloïdal, <i>colloidal drug carrier</i>
C _{ext}	concentration à l'extérieur
Chol	cholestérol
C _{int}	concentration à l'intérieur
CL _{total}	clairance totale
C _{max}	concentration maximale
DAD	desacétyldiltiazem
DMPG	<i>dimyristoyl-sn-glycero-phosphoglycerol</i>
DODA-501	initiateur radicalaire, dioctadecylamine
DSPE-PEG	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanol-amine- <i>N</i> -monomethoxy-[poly(ethylene glycol)]
DTZ	diltiazem
EDC	<i>1-ethyl-3-3[3-(dimethylamino)-propyl]carbodiimide</i>
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
Egg PC	phosphatidylcholine d'oeuf, <i>egg phosphatidylcholine</i>
EPC	phosphatidylcholine d'oeuf, <i>egg phosphatidylcholine</i>

EPR	perméation et rétention soutenue, <i>enhanced permeation and retention</i>
HBS	tampon HEPES salin, <i>HEPES buffered saline</i>
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HPLC	chromatographie liquide à haute performance, <i>high performance liquid chromatography</i>
HPMA	hydroxypropylmethacrylamide
HPTS	trisodium 8-hydroxypyrene trisulfonate
i.v.	intraveineux
IFE	émulsion lipidique pour l'alimentation parentérale, <i>intravenous fat emulsion</i>
K_{el}	constante d'élimination terminale
LCST	température critique de solubilité ou point de trouble, <i>lower critical solubility temperature</i>
LLOQ	limite inférieure de quantification, <i>lower limit of quantification</i>
LMA	leucémie myéloïde aiguë
MAA	acide méthacrylique
MAP	tension artérielle moyenne, <i>mean arterial pressure</i>
M_n	<i>number-average molecular weight</i>
MPS	système des phagocytes mononucléés, <i>mononuclear phagocyte system</i>
MRT	temps de résidence moyen, <i>mean residence time</i>
M_w	<i>weight-average molecular weight</i>
NCS	néocarzinostatine
NHS	N-hydroxysuccinimide
NIPAM ou NIPAAm	N-isopropylacrylamide
PBS	tampon phosphate salin, <i>phosphate-buffered saline</i>
PdI	indice de polydispersité, <i>polydispersity index</i>
PEG	poly(éthylène glycol)
pH_{ext}	pH à l'extérieur
pH_{int}	pH à l'intérieur
PHPMA	poly(N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide)
PK	pharmacocinétique
PL	phospholipide
PNIPAAm	polymère de N-isopropylacrylamide
poly(NIPAM-co-MAA)	copolymère de NIPAM et de MAA
SD	écart-type, <i>standard deviation</i>
SEC	chromatographie d'exclusion stérique, <i>size exclusion chromatography</i>
SMA	poly(styrène-co-maleic acid/anhydride)

SMANCS	conjugué polymère à base de SMA et de NCS
$T_{1/2}$	temps de demi-vie d'élimination
$T_{1/2\beta}$	temps de demi-vie d'élimination
THF	tétrahydrofurane
V_{area}	volume de distribution apparent total
V_d	volume de distribution apparent, extrapolé
Vd_{area}	volume de distribution apparent total
Vd_{ss}	volume de distribution apparent à l'équilibre, <i>steady-state</i>
Δ Max	diminution de pression maximum

*À mes parents, et à mon petit Jules
d'amour...*

Remerciements

Merci à Jean-Christophe pour son encadrement, son implication et sa confiance. Il est difficile de décrire en quelques mots à quel point j'ai apprécié travailler avec vous.

Merci aux coauteurs des articles publiés au cours de ce doctorat. Ces collaborations ont été enrichissantes.

Merci aux membres du labo Leroux. Je me sens privilégié d'avoir fait partie d'une aussi chouette équipe.

Merci aux membres des autres laboratoires de la faculté (labos Hildgen, Moreau, Varin, Servant, Leclair, deBlois, Nekka, et cie). C'était super de savoir que je pouvais toujours trouver quelqu'un pour répondre à mes nombreuses questions.

Merci au personnel de soutien de la fac (Lucie Racine, Gilles de Gagné), et de l'animalerie (Mélanie Michaud). C'était très rassurant de savoir que du personnel compétent et dévoué était disponible pour nous aider.

Merci à mes amis (à la fac et ailleurs). J'ai eu de la chance de vous avoir pour me changer les idées.

Merci à mes parents et à ma sœur de m'avoir toujours supporté et poussé à réaliser mes rêves et mes aspirations.

Merci à Jules d'être aussi mignon.

Merci à Marie-Michelle de m'avoir supporté durant toutes ces années (et celles qui s'en viennent) et surtout de m'avoir fait un aussi beau fiston !

Avant-propos

Cette thèse porte sur le développement et l'évaluation de la pharmacocinétique de formulations liposomales. Le chapitre d'introduction (chapitre 1) met en relief le rôle des formulations colloïdales dans le développement de médicaments plus efficaces et moins toxiques. Ce chapitre comprend un article de revue portant sur les différents obstacles physiologiques qui limitent la circulation des colloïdes dans l'organisme. Les objectifs et hypothèses de recherche sont présentés dans le chapitre 2.

La partie expérimentale comporte deux chapitres distincts qui ont été publiés comme articles scientifiques dans des journaux avec comités de pairs. Le premier manuscrit (chapitre 3) traite de la pharmacocinétique et l'élimination de copolymères non biodégradables à base de *N*-(isopropylacrylamide) (NIPAM) et d'acide méthacrylique (MAA). Dans notre laboratoire, ces polymères sont à l'étude pour la préparation de liposomes sensibles au pH visant à améliorer le traitement de la leucémie myéloïde aiguë (LMA). En s'intéressant aux facteurs influençant l'excrétion des copolymères de NIPAM, ces travaux représentent une étape essentielle du développement préclinique de la formulation. L'article montre aussi la manière dont la circulation des polymères est affectée lorsque ceux-ci sont ancrés dans la membrane lipidique des liposomes. Ces travaux ont été menés en parallèle avec ceux du Dr Pierre Simard qui cherchait à démontrer l'avantage d'utiliser une formulation sensible au pH dans le traitement de la LMA. Des résultats préliminaires décevants obtenus au courant de ces recherches (Simard et al. 2010) nous ont forcé à abandonner la caractérisation de cette formulation. Par conséquent, le projet de recherche s'est réorienté vers l'étude de la PK d'une autre formulation.

Le deuxième manuscrit (chapitre 4) porte sur le développement et l'évaluation *in vivo* de liposomes à gradient de pH transmembranaire pour le traitement des intoxications aux médicaments. Les données préliminaires serviront de base pour l'élaboration de formulations colloïdales pouvant être utilisées dans cette indication.

L'ensemble de ces résultats sont discutés au chapitre 5 et sont suivis d'une brève conclusion (chapitre 6). En annexe figure un chapitre de livre sur la méthodologie employée pour la fabrication de liposomes sensibles au pH.

Corps de la these:

N Bertrand & JC Leroux, The journey of a drug carrier in the body: the physiological challenges of nanomedicine. Soumis à *ACS Nano*.

N Bertrand, J Fleischer, KM Wasan & JC Leroux, Pharmacokinetics and biodistribution of *N*-isopropylacrylamide copolymers for the design of pH-sensitive liposomes. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2598-2605.

N Bertrand, C Bouvet, P Moreau & JC Leroux, Transmembrane pH gradient liposomes to treat cardiovascular drug intoxication. *ACS Nano* **2010**, *4*, 7552-7558

Annexe:

N Bertrand, P Simard & JC Leroux. Serum-stable, long-circulating, pH-sensitive pegylated liposomes. In *Liposomes*, Weissig, V., Ed. Humana Press: Totowa, NJ, **2009**; Vol. 1, pp 545-558.

Chapitre 1. Introduction

1.1. Les vecteurs colloïdaux.

1.1.1 Principes généraux

Lorsqu'un principe actif est administré, il est confronté à de nombreux obstacles avant de pouvoir rejoindre son site d'action. Sa distribution dans les tissus, son métabolisme ou son élimination précoce peuvent l'empêcher d'exercer son effet pharmacologique et d'induire une réponse thérapeutique adéquate. Parallèlement, une distribution non spécifique du composé dans certains tissus peut entraîner une toxicité et des effets indésirables. La vectorisation du médicament est le domaine des sciences pharmaceutiques qui étudie les différents moyens de formuler une substance active afin d'éviter ces problèmes.

Les principes de vectorisation visent à modifier l'environnement immédiat des principes actifs pour changer leur comportement dans l'organisme et optimiser leur activité pharmacologique. Le greffage covalent d'une macromolécule sur un composé actif ou son encapsulation dans une particule colloïdale sont classiquement employés pour améliorer les propriétés de circulation du médicament. La nécessité de mettre au point des systèmes de vectorisation est stimulée par le développement de nouveaux composés actifs, puissants mais non-sélectifs ou instables dans les milieux physiologiques.

À la différence de beaucoup d'approches utilisées pour la voie orale, les vecteurs colloïdaux doivent atteindre la circulation sanguine intacts. Ils sont donc souvent destinés à une administration parentérale. Une fois dans l'organisme, ils peuvent ensuite se distribuer vers les tissus ciblés et/ou libérer leur contenu graduellement.

Depuis plus de 40 ans, les vecteurs colloïdaux se sont multipliés. Cependant, ils reposent essentiellement sur deux principes de vectorisation : la conjugaison covalente à un support macromoléculaire ou l'incorporation dans une structure colloïdale. Au sein de cette

classification sommaire, différents systèmes peuvent être exploités selon l'application recherchée ou les propriétés du principe actif à vectoriser (Figure 1.1). Certains systèmes ont déjà fait leurs preuves au niveau clinique et sont commercialisés et d'autres sont à un stade plus précoce de développement. Les systèmes sont présentés en détails dans la section suivante et une attention plus particulière est portée à ceux ayant été étudiés en clinique.

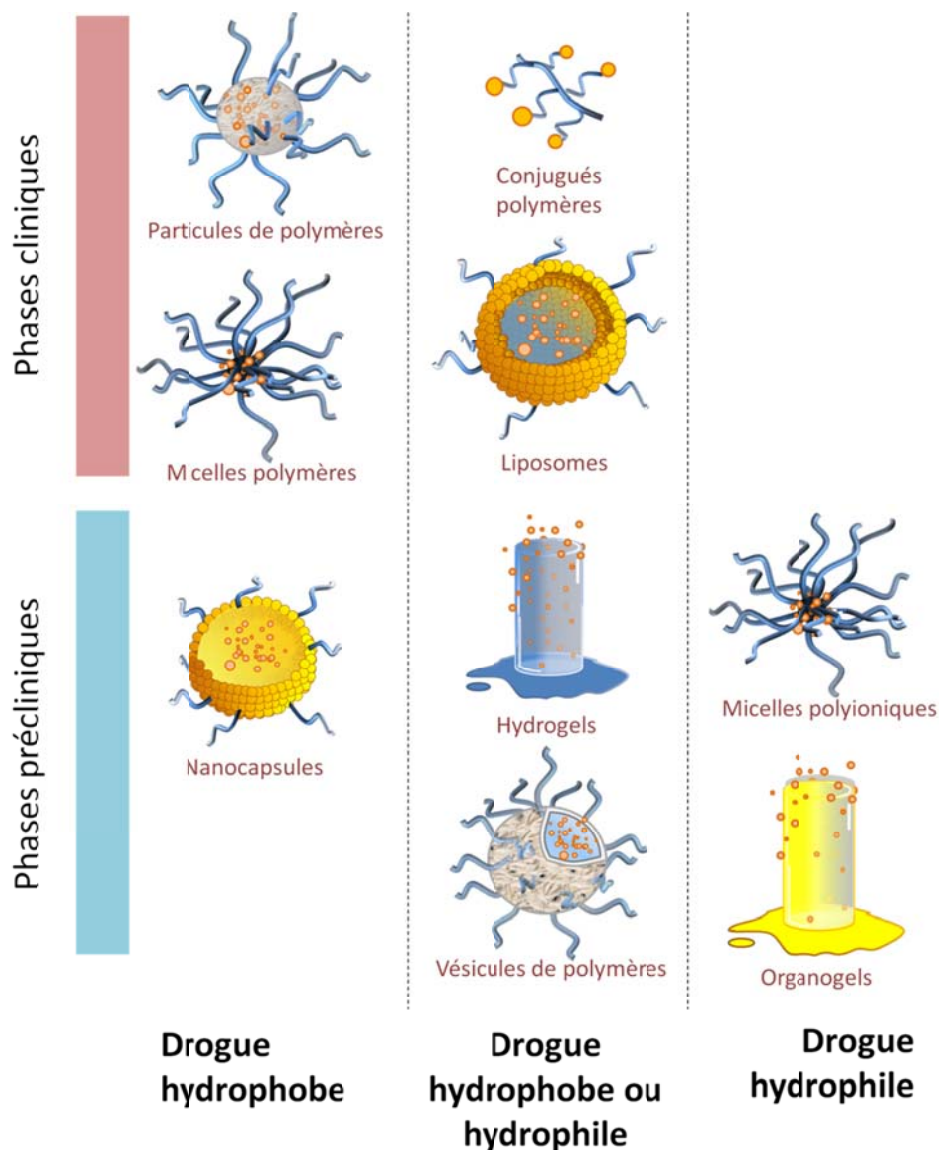


Figure 1.1 Exemples de vecteurs en cours de développement clinique ou préclinique. Le type de formulation utilisé dépend des propriétés du principe actif à vectoriser.

1.1.2 Les différents types de vecteurs colloïdaux.

1.1.2.1 Les conjugués polymères

Les conjugués polymères sont des macromolécules liées de manière covalente à un ou plusieurs principes actifs. Ces derniers peuvent être des composés de faible poids moléculaire (Rowinsky et al. 2003) ou des protéines (Bailon et al. 2001). La conjugaison vise à accroître l'encombrement stérique autour du principe actif et à augmenter son rayon hydrodynamique. Ainsi, l'accessibilité de la drogue aux enzymes qui pourraient l'inactiver (métabolisme) ou causer des réactions indésirables (réactions immunitaires) est diminuée. L'extravasation du vecteur (distribution vers les compartiments périphériques et filtration glomérulaire) est aussi limitée (Duncan 2003; Duncan 2006). La taille des conjugués polymères est du même ordre que celles des macromolécules endogènes, soit de l'ordre de 1 à 10 nm (Chiu et al. 2010).

Les caractéristiques du conjugué dépendent de l'architecture de la macromolécule utilisée. Selon l'objectif recherché, plusieurs stratégies de conjugaisons peuvent être employées (Fig 1.2.A). Une attention particulière devra être portée si plusieurs fonctions chimiques peuvent réagir avec le polymère et entraîner la formation de produits mono- ou polysubstitués (Fig 1.2.B). Plus le nombre de sites de greffage augmente, plus le produit final est hétérogène et plus le risque d'interférer avec l'activité pharmacologique est grand (Bailon et al. 2001; Gauthier et al. 2010). C'est ce qui justifie l'intérêt porté aux nouvelles méthodes de greffage plus sélectives (Schellenberger et al. 2009; Gao et al. 2010).

La liaison entre le principe actif et la macromolécule peut être stable *in vivo* pour conserver le conjugué intact ou être hydrolysable de manière à libérer l'agent actif graduellement (Duncan 2003; Duncan 2006). La première avenue est exploitée pour certains peptides et protéines qui maintiennent leur activité malgré la présence du polymère. La conjugaison du polymère peut toutefois modifier l'affinité du principe actif pour son site d'action et en altérer l'activité pharmacologique, même lorsque le site de greffage est éloigné de la partie active de la molécule (Bailon et al. 2001; Chiu et al. 2010;

Gauthier et al. 2010). Une diminution d'activité peut être compensée par une amélioration du profil pharmacocinétique (Bailon et al. 2001).

À l'opposé, les principes actifs de faible poids moléculaire doivent généralement être libérés avant de pouvoir exercer leur effet pharmacologique. Dans ce cas, les conjugués sont des prodrogues parce que le polymère empêche la drogue d'atteindre son site d'action ou parce que la macromolécule est greffée sur le pharmacophore (Rowinsky et al. 2003). Le médicament peut être libéré passivement par hydrolyse en milieu aqueux (*e.g.*, lien ester) (Rowinsky et al. 2003) ou clivé par les enzymes lysosomales (*e.g.*, séquence peptidique Gly-Phe-Leu-Gly) (Boddy et al. 2005; Duncan 2006; Mita et al. 2009). Alors que la première approche entraîne une libération graduelle du composé actif qui peut se traduire en une toxicité systémique ou locale non désirée (Schoemaker et al. 2002; Yurkovetskiy et al. 2009), la seconde nécessite une internalisation cellulaire et un passage par les lysosomes qui complexifient la thérapie (Duncan 2003; Duncan 2006). Ces obstacles peuvent expliquer en partie les difficultés rencontrées en clinique par les conjugués polymères véhiculant des composés de faible poids moléculaire (Duncan et al. 2010).

Par ailleurs, le développement d'un conjugué polymère entraîne l'apparition d'une (ou plusieurs) nouvelles entités chimiques (Gaspar et al. 2009). L'innocuité de l'ensemble des nouvelles molécules formées doit donc être évaluée (Webster et al. 2007; Gaspar et al. 2009; Webster et al. 2009). Finalement, le conjugué polymère et ses constituants doivent pouvoir être éliminés par biodégradation en des composés non-toxiques, par filtration rénale ou par excrétion dans les selles (Duncan 2003; Duncan 2006).

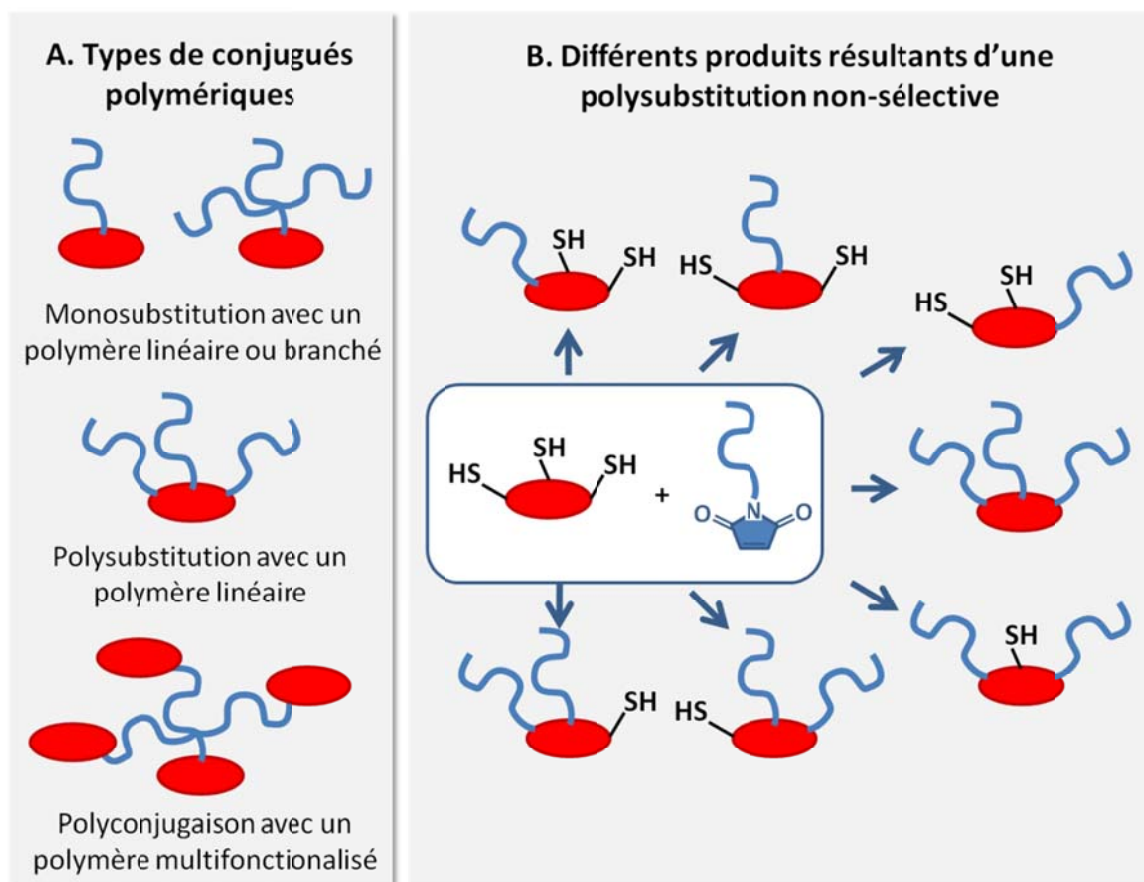


Figure 1.2 Conjugaison d'un polymère à un principe actif. A. Les différents conjugués polymériques pouvant être fabriqués dépendent du type de polymère et du nombre de fonctions pouvant réagir sur le principe actif. B. Lorsque plusieurs fonctions sont réactives et que la méthode de conjugaison n'est pas sélective, le nombre de produits augmente rapidement.

Les conjugués à base de poly(éthylène glycol)

Le greffage de molécules de poly(éthylène glycol) (PEG) à des protéines a été décrit pour la première fois à la fin des années 1970 par Abuchowsky et Davis. Leurs travaux ont démontré que l'ajout du polymère hydrophile réduisait l'antigénicité des protéines et

augmentait leur temps de résidence dans la circulation sanguine (Abuchowski et al. 1977a; Abuchowski et al. 1977b). Le procédé, nommé par la suite PEGylation, a été rapidement adopté par le domaine pharmaceutique et est aujourd'hui communément employé pour améliorer les caractéristiques d'une grande variété de composés pharmaceutiques (Harris et al. 2003; Veronese et al. 2005; Hamidi et al. 2006).

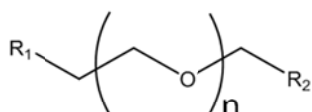
Le PEG est le polymère de référence pour beaucoup d'applications biomédicales et notamment la synthèse de conjugués polymères. D'un point de vue physico-chimique, il est chimiquement inerte et possède des caractéristiques idéales d'hydratation et de flexibilité. D'un point de vue biologique, il est considéré non-toxique, biocompatible et bien qu'il soit non-biodégradable, il est éliminé par filtration rénale lorsque sa masse molaire est inférieure à 30,000 g/mol (Murakami et al. 1997). Plusieurs conjugués polymères à base de PEG sont commercialisés ou en phase clinique. À titre d'exemple, on peut citer l'asparaginase (Oncaspar[®]), l'interféron α -2a (PEGasys[®]) et α -2b (PEGIntron[®]) et le facteur stimulant des colonies de granulocytes (PEGfilgrastim[®])

Afin de rendre un plus grand nombre de fonctions accessibles pour le greffage et augmenter le rendement de la PEGylation, plusieurs techniques ont été mises au point (Veronese et al. 2005; Knop et al. 2010). Il est possible de greffer le PEG (directement ou *via* un ligand), sur les amines (glycine, lysine, histidine), les thiols (cystéines), les amides (glutamine), les hydroxyls (sérines, thréonines), les groupements guanidinium (arginine) ainsi que les acides aminés glycosylés par réaction chimique ou enzymatique (Veronese et al. 2005; Knop et al. 2010).

Malgré qu'il reste encore très largement utilisé, le PEG linéaire possède le désavantage de n'avoir que 2 fonctions réactives à chaque extrémité de la chaîne (Fig. 1.3.A). Le chargement en principe actif reste donc très faible. Si cette approche est adéquate pour les peptides et protéines qui sont généralement très puissants d'un point de vue pharmacologique, c'est davantage un problème pour les molécules de faible poids

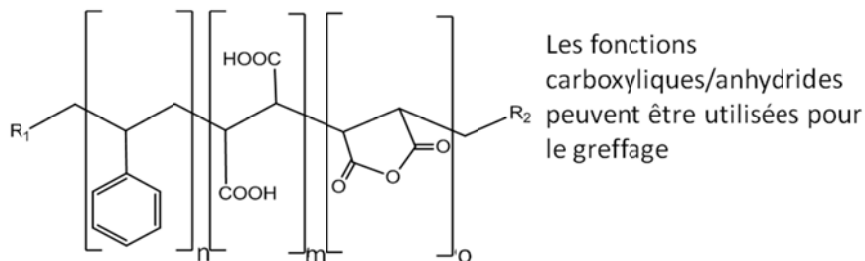
moléculaires. Le développement d'autres polymères pour la fabrication de conjugués a donc été encouragé pour remédier à cet inconvénient.

A. poly(éthylène glycol) (PEG):



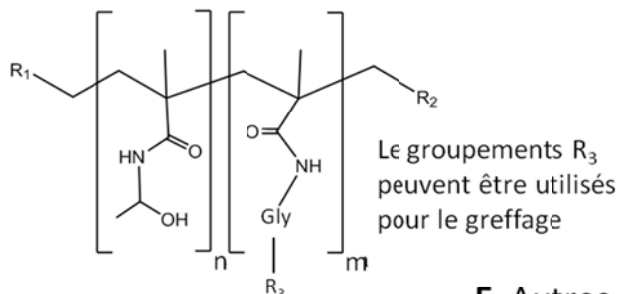
Les groupements R_1 et/ou R_2 peuvent être utilisés pour le greffage

B. poly(styrène-co-acide/anhydride maléique) (pSMA):

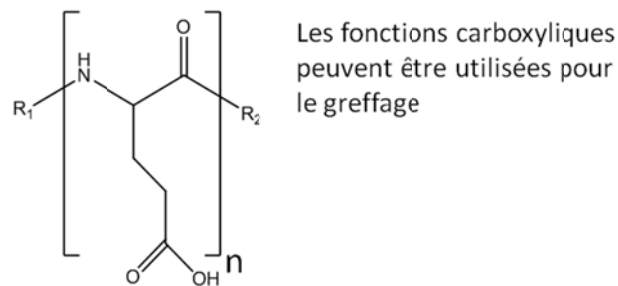


Les fonctions carboxyliques/anhydrides peuvent être utilisées pour le greffage

C. poly(*N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide) (pHPMA):

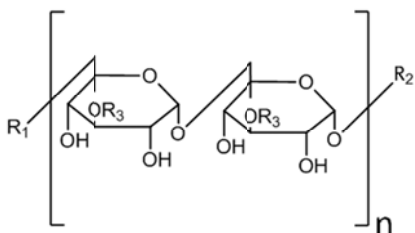


Le groupements R_3 peuvent être utilisés pour le greffage

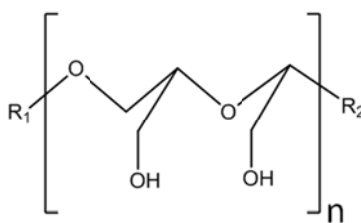


Les fonctions carboxyliques peuvent être utilisées pour le greffage

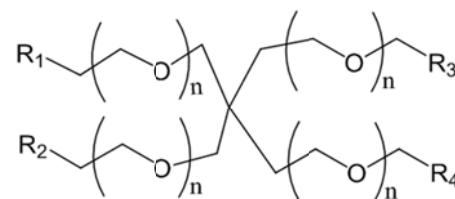
E. Autres polymères:



dextran



poly(acétal)



PEG-ramifié

Figure 1.3 Structures des différents polymères employés pour la fabrication de conjugués.

Le lettres n , m et o représentent le nombre de répétition pour chaque unité monomérique.

Les conjugués à base d'autres polymères

Le seul autre polymère à avoir été approuvé pour utilisation chez l'homme comme composante d'un conjugué thérapeutique est le copolymère de poly(styrène-*co*-acide/anhydride maléique) (pSMA, Figure 1.3B). Ce polymère est conjugué à la neocarzinostatine (NCS) dans le produit SMANCS (Zinostatin Silmalmer[®]). La NCS est une chromoprotéine d'environ 11 kDa formée d'un apo-peptide de 113 aminés et d'un chromophore possédant d'importantes propriétés antitumorales (Teplyakov et al. 1993). La conjugaison du polymère à la protéine sert à augmenter le temps de demi-vie de la NCS et à en diminuer la toxicité (Maeda 2001b). Dans ce produit, les chaînes de polymère ont une masse molaire de 1,6 kDa et leurs fonctions anhydrides réagissent par couplage peptidique avec les amines primaires présentes sur la protéine (alanine-1 et lysine-20). La contribution des chaînes de polymère à la taille finale du conjugué est faible. La masse molaire du conjugué de NCS est d'environ 16 kDa (Maeda 2001b). L'augmentation (par un facteur 10) du temps de demi-vie biologique peut s'expliquer par un autre phénomène qu'une simple augmentation du volume hydrodynamique. Lorsqu'elles se retrouvent dans le sang, les molécules de SMANCS interagissent de manière non-covalente avec l'albumine sérique. Ce serait donc sous la forme d'un complexe d'une taille proche de 80 kDa que l'anticancéreux circulerait dans l'organisme (Kobayashi et al. 1988; Maeda 2001b). Le SMANCS a été commercialisé en 1993 au Japon pour le traitement du carcinome hépatocellulaire. Bien que la méthode d'administration homologuée pour le traitement soit l'injection au niveau de l'artère hépatique, en amont de la tumeur, c'est en étudiant l'injection systémique de ce conjugué polymère que les phénomènes de perméation et de rétention accrue (effet EPR, pour *enhanced permeation and retention effect*) ont été observés pour la première fois pour un vecteur pharmaceutique (Matsumura et al. 1986; Maeda 2001a). Ce phénomène sera abordé plus en détail dans la section 1.1.3.4.

Le poly[*N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide] (pHPMA) (Fig. 1.3C) figure parmi les autres polymères ayant été étudiés en profondeur pour la préparation de conjugués thérapeutiques. De fait, des conjugués à base de pHPMA et de doxorubicine (un agent

anticancéreux de faible poids moléculaire) ont été les premiers vecteurs de ce type à entrer en phase clinique, en 1994 (Duncan et al. 2010). Par rapport au PEG, ce polymère hydrosoluble possède plusieurs fonctions disponibles pour le greffage de molécules actives (Duncan 2003). Des chargements en médicament allant jusqu'à 10 % (*p/p*) ont été réalisés (Duncan et al. 2010). Cet élément est particulièrement important pour la conjugaison de composés de faible poids moléculaire qui ne possèdent généralement pas la puissance pharmacologique des peptides et protéines. De plus, la présence de ces multiples sites réactifs permet le couplage simultané de plusieurs types de molécules actives (*e.g.*, un agent anticancéreux et un inhibiteur de l'aromatase pour le traitement des cancers hormono-dépendants) (Vicent et al. 2005) ou encore sa fonctionnalisation avec un ligand pour assurer son ciblage actif vers certains tissus (voir section 1.1.2.4) (Seymour et al. 2002). Bien que de nombreux conjugués à base de pHPMA aient été testés en phase clinique, très peu se sont avérés supérieurs aux traitements conventionnels.

Le poly(L-acide glutamique) (pGA) (Fig. 1.3.D) est un autre polymère présentement en étude clinique sous la forme d'un conjugué avec le paclitaxel (Opaxio[®], Cell Therapeutics) (Paz-Ares et al. 2008). La conjugaison du paclitaxel avec ce polymère permet d'éviter l'utilisation de surfactants toxiques généralement employés pour solubiliser les taxanes (voir section 1.1.2.1) et d'en améliorer la pharmacocinétique et la distribution tumorale (Boddy et al. 2005).

D'autres types de conjugués à base de polymères biodégradables ont été testés en clinique ou le sont actuellement (Fig. 1.3.E). Parmi eux, on trouve des polysaccharides naturels comme le dextran (Danhauser-Riedl et al. 1993), des poly(acétals) synthétiques (Yurkovetskiy et al. 2009) ou encore des polymères ramifiés (non-linéaires) à base de PEG (Sapra et al. 2008; Sapra et al. 2009).

Finalement, une pléthore de conjugués de différentes structures sont présentement en cours de développement préclinique. Celles-ci incluent les dendrimères (macromolécules branchées multifonctionnelles dont les unités de répétitions émanent d'un

point central) (Lee et al. 2005) et les macromolécules peptidiques (Schellenberger et al. 2009; Trussel et al. 2009). À l'heure actuelle, il est encore trop tôt pour savoir si ces molécules auront un réel impact comme vecteurs pharmaceutiques.

1.1.2.2 Les structures cœur-couronne

Les structures cœur-couronne résultent de l'auto-agencement de molécules amphiphiles en un colloïde possédant deux domaines aux polarités distinctes : une zone hydrophobe et une zone hydrophile. Lorsque la phase dispersante est une solution aqueuse, le cœur est formé d'une zone hydrophobe déshydratée, composée des segments ayant peu d'affinité pour l'eau. La couronne hydrophile stabilise le colloïde et empêche l'agrégation ou la coalescence des zones apolaires entre-elles (Letchford et al. 2007). Des structures inverses sont aussi possibles dans les cas, plus rares, où la phase externe est hydrophobe (Jones et al. 2010).

Les structures cœur-couronne conventionnelles (*i.e.* avec un cœur hydrophobe) permettent de solubiliser/disperser des principes actifs hydrophobes dans les environnements aqueux. Ces vecteurs peuvent aussi être utilisés pour leur capacité à protéger les principes actifs ou pour faire du ciblage actif (voir section 1.1.3). Le rayon hydrodynamique de ces vecteurs varie entre 10 et 200 nm. En général, les micelles possèdent une taille plus petite (10 à 50 nm) que celles des nanoparticules polymères (autour de 100 à 200 nm). Cependant, les limites entre les différentes classes de structure cœur-couronne sont souvent floues (Letchford et al. 2007).

Les micelles

De nombreuses molécules amphiphiles peuvent former des micelles. Le phénomène de micellisation survient lorsque la concentration de l'amphiphile dépasse la concentration micellaire critique (CMC) et que les molécules s'organisent d'elles-mêmes en structures cœur-couronne (Letchford et al. 2007). Les molécules qui forment la micelle sont en

équilibre thermodynamique avec celles en solution et l'intégrité du système colloïdal est assurée tant que la concentration totale est au-dessus de la CMC (Fig. 1.4).

La plupart des amphiphiles de faible poids moléculaire ont une CMC trop élevée pour être utilisés pour la vectorisation: la dilution survenant lors de l'injection déstabilise l'agencement. Les micelles employées pour la vectorisation sont donc formées de polymères multiblocs ayant des régions hydrophiles et hydrophobes bien définies. Ces polymères possèdent une CMC très faible (de l'ordre de quelques mg/L) ce qui leur permet de demeurer à l'état micellaire dans la circulation sanguine (Gaucher et al. 2005). Comme précédemment, le PEG ou ses dérivés restent les polymères de choix pour former la couronne hydrophile. Cependant, la nature du ou des segments composant le cœur peut varier. On retrouve par exemple, de nombreux polyesters hydrophobes (Yamamoto et al. 2001; Chen et al. 2008b) ou des poly(acides aminés) (Ma et al. 2010).

Bien que les micelles polymères soient généralement destinées à formuler des médicaments hydrophobes, elles peuvent aussi servir à véhiculer des acides nucléiques hydrophiles. Dans ce cas, il s'agit de micelles polyioniques (Katayose et al. 1998) (Fig. 1.4.A). Les acides nucléiques chargés négativement sont complexés au segment polycationique d'un polymère multibloc. La neutralisation électrostatique des charges entraîne la formation d'un complexe hydrophobe qui forme le cœur de la structure micellaire.

Dans les deux types de micelles précédents, les molécules de polymère formant la micelle sont en équilibre thermodynamique avec celles en solutions. L'incorporation du principe actif et le maintien de la structure se font donc grâce à des interactions hydrophobes de faible énergie. Il a été démontré récemment que lorsque ces micelles sont mises en présence de fluides biologiques, leur contenu peut être extrait par les composantes hydrophobes des cellules et des protéines (Chen et al. 2008a; Chen et al. 2008b). De plus, l'insertion de certaines protéines au cœur de la structure peut déstabiliser la micelle (Chen et al. 2008a). Bien que ces observations aient été effectuées *in vitro*, il est probable que le

phénomène contribue à diminuer la capacité de rétention de ce type de vecteurs *in vivo* et réduit leur efficacité (Burt et al. 1999).

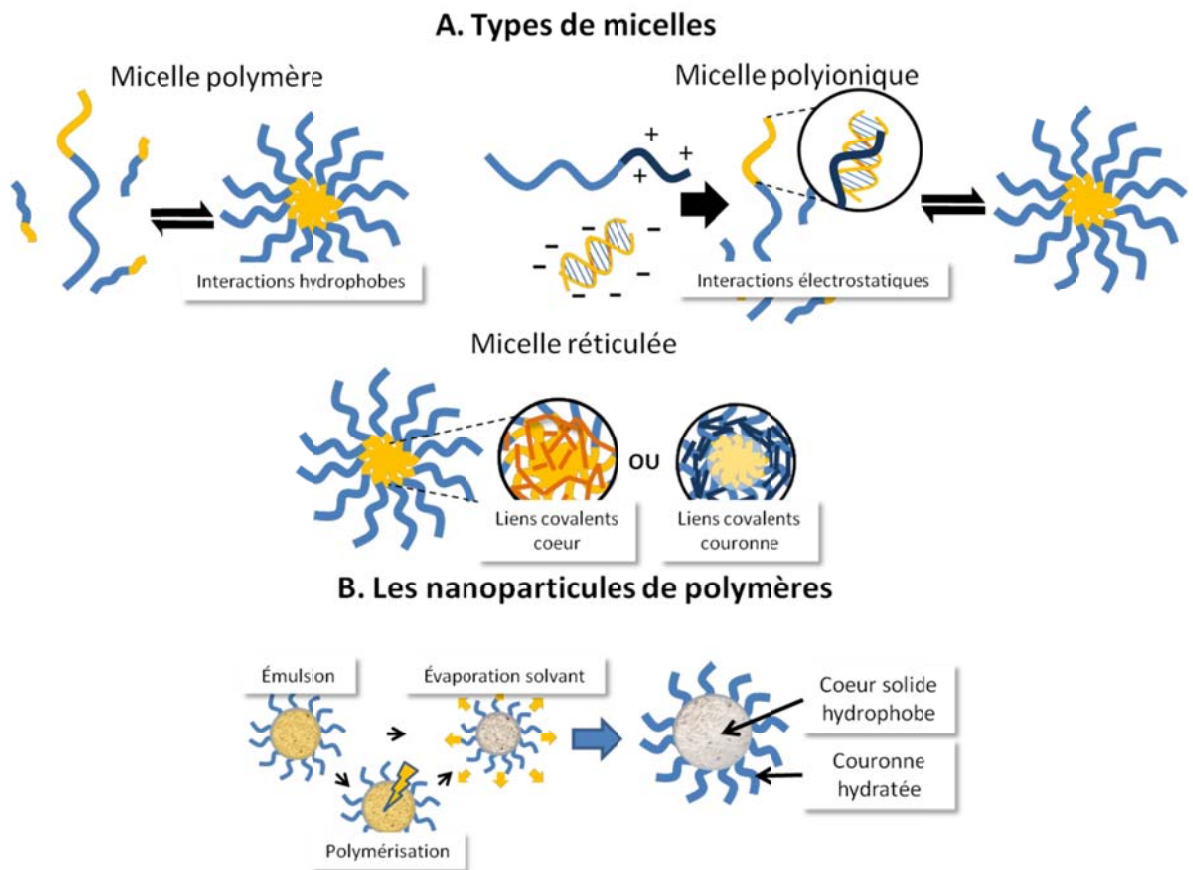


Figure 1.4 Les structures cœur-couronne. A. Les micelles polymères résultent de l'autoassemblage de polymères amphiphiles ou de la complexation de polyions blocs de charges opposées. Leur cœur ou leur couronne peut être réticulé. B. Les nanoparticules de polymères se distinguent par leur cœur hydrophobe solide de type matriciel où des principes actifs peuvent être incorporés.

Des micelles réticulées où un réseau de liens covalents entre les chaînes de polymère assure la stabilité du colloïde ont donc été mises au point (Gaucher et al. 2005). La réticulation permet de stabiliser les micelles indépendamment de la concentration en polymère. Elle peut se faire au niveau du cœur ou de la couronne. Cette technique possède cependant quelques inconvénients. Le plus souvent, la réticulation des molécules de la micelle ne se fait qu'après que le médicament ait été encapsulé. Il est donc impératif que les conditions de réaction n'altèrent pas le principe actif. De la même façon, la réticulation augmente considérablement la masse molaire des molécules formant la micelle. Cela peut nuire à leur élimination si le système n'est pas biodégradable. Enfin, bien que le procédé de réticulation permette de générer des colloïdes plus stables thermodynamiquement, il est à noter que l'effet bénéfique de la réticulation sur la rétention des molécules de principe actif reste encore à démontrer.

En terminant, bien que l'archétype de la micelle polymère soit de forme sphérique et composé de chaînes de polymères linéaires, plusieurs variantes ont été rapportées. Par exemple, l'utilisation de micelles cylindriques allongées s'est avérée bénéfique pour prolonger le temps de circulation sanguine de certains fluorophores (Geng et al. 2007; Christian et al. 2009). Également, l'étude de l'auto-agencement des polymères multiblocs a fourni une abondance de systèmes micellaires aussi complexes qu'insolites : de la micelle toroïde issue de polymères triblocs (Pochan et al. 2004) à la structure en forme de fleur composée de polymères cycliques (Honda et al. 2010). Bien que ces structures soient certainement intéressantes d'un point de vue fondamental, l'avenir déterminera leur place en thérapeutique humaine.

Les nanoparticules de polymères

Les nanoparticules de polymères sont des structures cœur-couronne où le centre du colloïde est formé d'une matrice rigide (Fig. 1.4.B). Selon le polymère employé et la méthode de synthèse utilisée, le degré d'organisation des molécules dans le cœur peut varier et le solide peut être amorphe, semi-cristallin ou cristallin (Park 1995; Liggins et al.

2004). La cinétique de libération de la drogue est modulée en variant les propriétés du cœur comme la vitesse de dégradation du polymère (Park 1994; Dunne et al. 2000; Zweers et al. 2004) ou la tortuosité de son réseau de pores (Sant et al. 2005; Klose et al. 2006). Il est aussi possible de co-incorporer plusieurs principes actifs différents aux propriétés pharmacologiques complémentaires (Hammady et al. 2009).

Bien que ces systèmes soient étudiés depuis longtemps, plusieurs désavantages ralentissent leur percée au niveau clinique. Tout d'abord, la surface du cœur étant rigide et hydrophobe, les mécanismes de reconnaissance de l'organisme sont très efficaces pour éliminer les particules de la circulation systémique (Alexis et al. 2008; Hickey et al. 2009). La nature du polymère formant la couronne joue donc un rôle très important pour protéger la particule contre les défenses de l'hôte (Gref et al. 2000; Gaucher et al. 2009). Malgré tous les efforts déployés, les temps de circulation demeurent relativement courts (<12 h) (Gref et al. 1994; Gaucher et al. 2009).

1.1.2.3 Les vecteurs vésiculaires

Les vésicules regroupent les vecteurs pharmaceutiques où une cavité interne liquide (aqueuse ou lipidique) est délimitée par une membrane hydrophobe. Les liposomes sont les premières structures vésiculaires synthétiques fabriquées à des fins de vectorisation (Gregoriadis et al. 1971), mais depuis, d'autres systèmes (comme les nanocapsules (Furtado Mosqueira et al. 2001) ou les polymersomes (Photos et al. 2003)) ont été rapportés.

Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules dont la membrane est composée de phospholipides. Les phospholipides sont des composés amphiphiles présents naturellement dans les systèmes biologiques. Ils sont formés d'une tête polaire (un groupement phosphate lié à du glycérol) et d'une partie hydrophobe (deux chaînes d'acides gras estérifiées au glycérol).

Les premiers liposomes ont été préparés à base de lécithine d'œuf vers 1965 (Bangham et al. 1965). Dès les années 1970, les liposomes ont été utilisés pour l'encapsulation de diverses substances, d'abord comme modèle de membranes biologiques (Haxby et al. 1969), puis pour le transport de médicaments et d'enzymes (Gregoriadis et al. 1971). Les processus de fabrication des liposomes se sont affinés dans les années 1980 (Hope et al. 1985) et plusieurs formulations liposomales ont été commercialisées au cours des 15 dernières années. Les liposomes figurent maintenant parmi les systèmes de vectorisation les mieux caractérisés (Torchilin 2005).

Les phospholipides sont la composante principale des liposomes. La forme de ces molécules peut varier selon la structure de la tête polaire (type de substituants sur le groupement phosphate) et de la partie hydrophobe (nature des chaînes d'acides gras) (Fig. 1.5). Alors que les molécules cylindriques forment des bicouches propices à la formation des liposomes, les phospholipides coniques ou coniques inversés forment des agencements micellaires ou des structures hexagonales (New 1990).

L'auto-agencement en bicouches se fait spontanément lorsqu'un film de phospholipides cylindriques est hydraté. D'emblée, l'organisation est multi-lamellaire, c'est-à-dire constituée de plusieurs vésicules sphériques concentriques les unes aux autres. La distribution de taille des liposomes multi-lamellaires est aussi très large. De manière à rendre la formulation plus propice à la vectorisation, il faut uniformiser la taille des vésicules et former des structures unilamellaires. La technique la plus largement utilisée consiste à extruder les vésicules sur une membrane ayant des pores d'une taille définie (Hope et al. 1985).

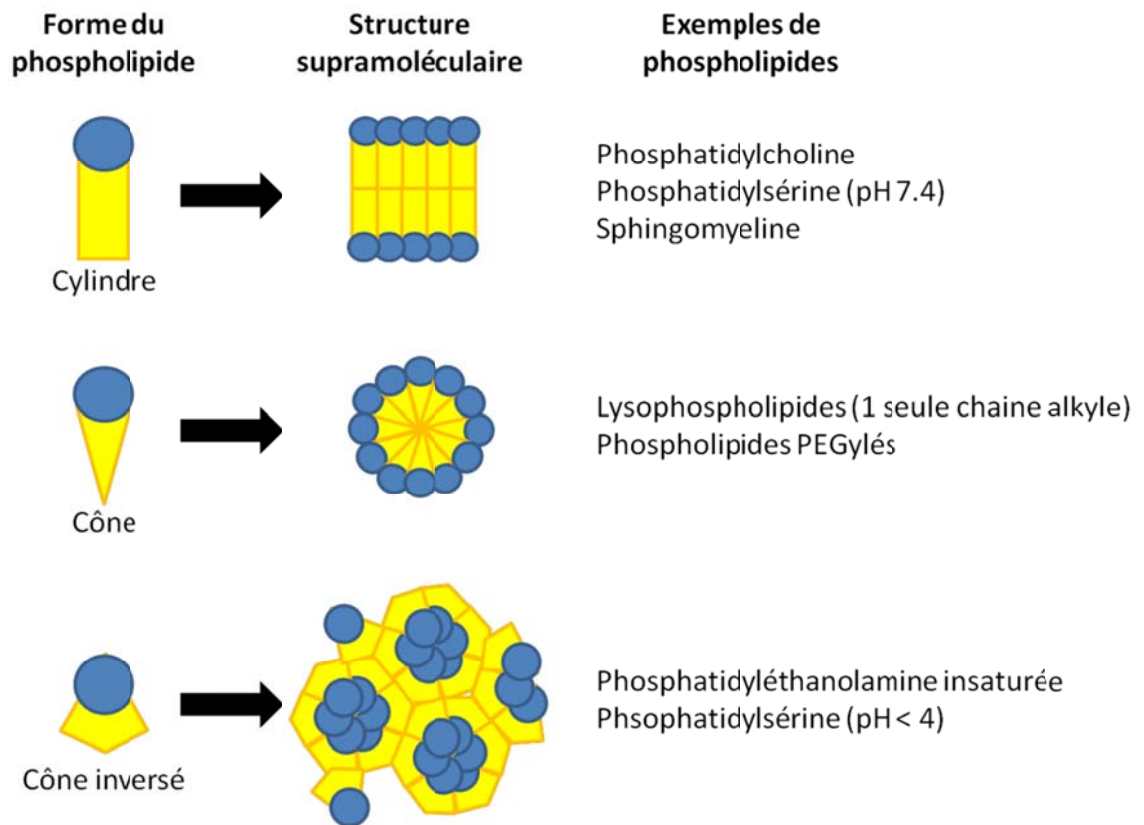


Figure 1.5 Influence de la forme des phospholipides sur la structure de l'agencement supramoléculaire. La bicouche lipidique des liposomes est formée par des phospholipides cylindriques.

Comme vecteurs pharmaceutiques, les liposomes disposent de plusieurs atouts. D'une part, ils sont formés d'ingrédients biodégradables ayant une innocuité bien établie. D'autre part, leur membrane, épaisse d'environ 3 à 5 nm, possède des propriétés uniques pour l'encapsulation et la rétention des principes actifs. Comme les membranes biologiques, la bicouche de phospholipides est très peu perméable aux espèces chargées. La stratégie la plus efficace pour encapsuler des composés ionisables de faible poids moléculaire consiste donc à utiliser un gradient de pH transmembranaire (Cullis et al. 1997; Maurer-Spurej et al. 1999). Le gradient de pH de part et d'autre de la membrane déplace

l'équilibre d'ionisation de la molécule active pour favoriser l'encapsulation du composé actif (Fig. 1.6). En utilisant cette technique, il est possible d'obtenir des rendements d'encapsulation très élevés et de forts taux de chargement.

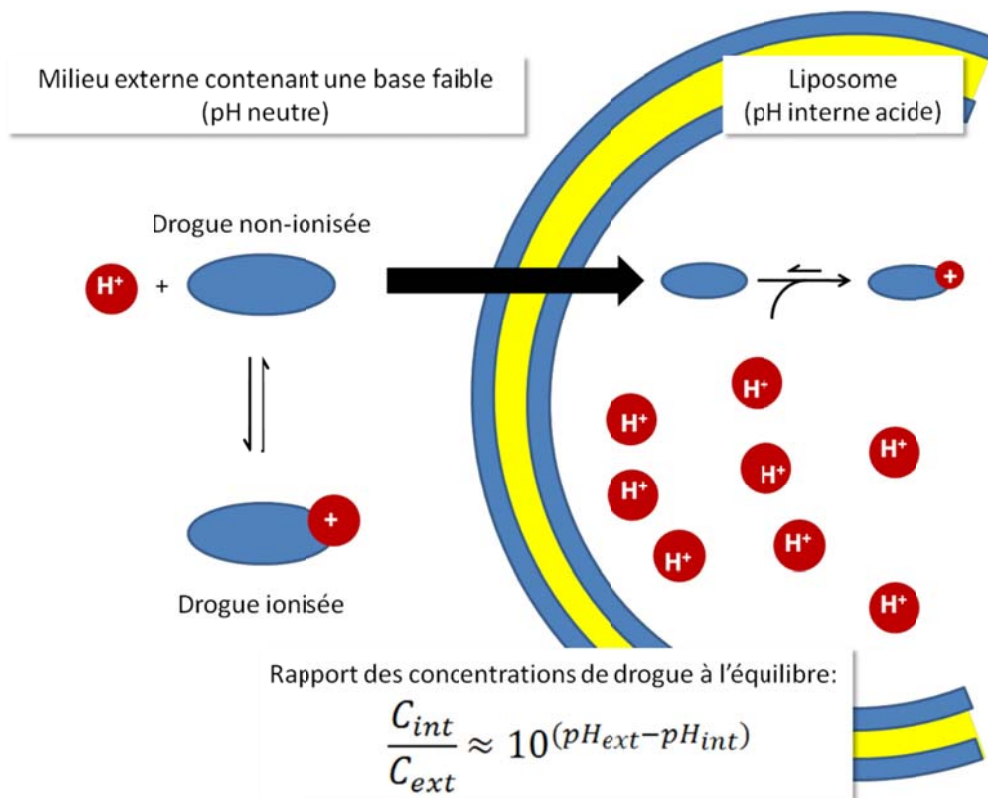


Figure 1.6 Le chargement des drogues dans les liposomes par chargement actif. C_{int} , C_{ext} , pH_{int} et pH_{ext} représentent la concentration à l'intérieur, la concentration à l'extérieur, le pH interne et le pH externe, respectivement.

Par ailleurs, les liposomes permettent aussi l'encapsulation de médicaments hydrophobes dans la couche lipidique. Cependant, le taux de chargement demeure généralement faible. Finalement, la fluidité de la membrane de phospholipides permet la fabrication de formulations sensibles à certains stimuli. Il est donc possible de fabriquer des vésicules qui libèrent leur contenu d'une manière contrôlée après stimulation par la chaleur

(Keisuke et al. 2004), le pH (Meyer et al. 1998; Momekova et al. 2007) ou la présence de certaines protéines (Cheong et al. 2006). Le raisonnement derrière l'utilisation des formulations sensibles au pH est présenté à la section 1.1.3.4.

Afin d'augmenter les temps de circulation des vésicules, il est essentiel de les protéger avec une couche de polymère hydrophile (Gabizon et al. 1988; Allen et al. 1991b). Comme pour les autres types de vecteurs, cette couronne réduit la déposition des protéines plasmatiques à la surface des liposomes et ralentit leur clairance par les cellules du système des phagocytes mononuclés (MPS pour *mononuclear phagocyte system*) (Dos Santos et al. 2007; Alexis et al. 2008). Les polymères hydrophiles sont insérés dans la bicouche lipidique grâce à des groupements hydrophobes. La protection stérique la plus efficace est conférée par des molécules de phospholipides synthétiques où la tête polaire est liée à du PEG (Webb et al. 1998). Le PEG-distéaroylphosphoéthanolamine (PEG-DSPE) possède 2 chaînes alkyles saturées de 18 carbones (acide stéarique) qui assurent l'ancrage dans la bicouche lipidique (Webb et al. 1998; Semple et al. 2005). La charge négative du PEG-DSPE semble avoir un impact sur l'activation du système du complément et être responsable de certains effets secondaires observés en clinique (Moghimi et al. 2006). L'activation de ce système de défense sera discutée plus en profondeur dans la section 1.2.4.2.

Les vésicules polymères et nanocapsules

Il est possible de former des vésicules polymères (polymersomes) avec certains types de polymères amphiphiles multiblocs au lieu de phospholipides. Dans la plupart des cas, il s'agit de polymères diblocs avec une séquence hydrophile et une séquence hydrophobe. Lorsque la taille du bloc hydrophile représente entre 25 et 45 % de la taille totale de la chaîne, ces polymères peuvent s'agencer en structures vésiculaires (Discher et al. 2002). Il est possible d'augmenter l'épaisseur de la membrane jusqu'à environ 20 nm, en augmentant la longueur des chaînes de polymères (Discher et al. 2006).

L'utilisation des polymersomes comme vecteurs pharmaceutiques demeure au stade préclinique, mais ceux-ci présentent quelques caractéristiques intéressantes. L'analyse du temps de circulation des polymersomes a montré qu'ils pouvaient circuler aussi longtemps que les liposomes PEGylés (Photos et al. 2003). De plus, il a aussi été démontré que l'on pouvait s'en servir pour encapsuler conjointement un médicament hydrophobe dans la membrane de polymère et un médicament hydrophile dans le compartiment aqueux. Une formulation de ce type s'est montrée prometteuse dans un modèle de régression tumorale chez la souris nue (Ahmed et al. 2006).

Les nanocapsules sont un autre type de formulation vésiculaire. À la différence des liposomes et des polymersomes présentés précédemment, le compartiment liquide à l'intérieur est hydrophobe (Furtado Mosqueira et al. 2001; Hoarau et al. 2004). Ce compartiment, généralement composé d'un mélange d'huiles ou de cires, est isolé du milieu externe par une couche de polymères ou de phospholipides. À cause de leur cœur hydrophobe, les nanocapsules présentent une alternative intéressante pour encapsuler les principes actifs insolubles dans l'eau.

1.1.3. Objectifs de la vectorisation.

Les vecteurs présentés dans la section précédente offrent diverses alternatives pour modifier les propriétés physicochimiques des principes actifs. Ces modifications visent généralement à altérer le comportement de la drogue pour en augmenter l'efficacité et en diminuer les effets secondaires. Cependant, les objectifs de vectorisation et les caractéristiques spécifiques recherchées pour chaque vecteur sont définis par les propriétés initiales du principe actif.

1.1.3.1 Augmenter la solubilité du principe actif

Dans leur forme la plus simple, les principes de formulation peuvent être appliqués pour augmenter la solubilité aqueuse d'un principe actif. En effet, il n'est pas rare que le

développement de principes actifs prometteurs soit freiné par des problèmes de solubilité dans les milieux biologiques (Rabinow 2004). Afin de limiter les quantités de solvant organiques apolaires utilisées dans les préparations pharmaceutiques (ICH 2011), il peut être avantageux de solubiliser le principe actif dans la phase hydrophobe d'un système colloïdal pour permettre son administration.

Étude de cas du paclitaxel

Le paclitaxel est un agent anticancéreux très hydrophobe largement utilisé en clinique, approuvé depuis 1992 pour le traitement de plusieurs types de cancers (*e.g.*, ovaires, seins, poumon, sarcome de Kaposi). À cause de sa très faible solubilité dans l'eau (< 0.3 mg/L), la formulation ayant conduit à sa commercialisation (Taxol[®], Bristol-Myers-Squibb) contient un tensioactif non-ionique à base de polyoxyéthylénate d'huile de ricin, un agent solubilisant commercialisé sous le nom de Cremophor EL[®]. Le Taxol[®] est une formulation micellaire de paclitaxel, d'éthanol et de Cremophor EL[®] qui est administrée par voie intraveineuse. Le principal désavantage du Cremophor EL[®] réside dans le fait qu'il possède une activité pharmacologique intrinsèque. L'excipient est donc responsable de multiples réactions d'hypersensibilité en plus d'avoir un effet modulateur sur certains transporteurs physiologiques. Afin de limiter les réactions indésirables causées par l'administration du tensioactif, de nombreux efforts ont été mis dans le développement de formulations permettant de solubiliser le paclitaxel sans utiliser de Cremophor EL[®].

La conjugaison de molécules de paclitaxel à des molécules de pGA (poliglumex) a été étudiée (Li et al. 1999; Boddy et al. 2005; Paz-Ares et al. 2008). En plus d'augmenter la solubilité du paclitaxel, la conjugaison à ce polymère prolonge l'exposition plasmatique du médicament et diminue les réactions d'hypersensibilité, par rapport à la formulation contenant du Cremophor EL[®] (Boddy et al. 2005). La formulation Opaxio[®] (Cell Therapeutics) est présentement en études cliniques de phase III pour le traitement du cancer des ovaires et du carcinome du poumon non à petite cellule. Les résultats préliminaires

démontrent que la formulation semble efficace et bien tolérée (Mita et al. 2009; Verschraegen et al. 2009).

Mis à part les conjugués polymères, plusieurs types de structures cœur-couronne (micelles et nanoparticules polymères) ont aussi été évalués pour solubiliser ou disperser le paclitaxel (Burt et al. 1999; Yamamoto et al. 2001; Hamaguchi et al. 2005). Certaines de ces formulations se sont avérées décevantes puisqu'elles n'arrivaient pas à conserver leur chargement en médicament une fois injectées (Burt et al. 1999). Cependant, d'autres ont pu prolonger les temps de circulation du paclitaxel *in vivo* et augmenter les concentrations tumorales chez l'animal (voir l'effet EPR dans la section 1.1.3.4) (Yamamoto et al. 2001; Hamaguchi et al. 2005). Au niveau clinique, plusieurs formulations de micelles polymères sont présentement à l'étude (Hamaguchi et al. 2007; Kim et al. 2007). Les résultats obtenus jusqu'à présent montrent que les formulations micellaires peuvent augmenter les temps de circulation et potentiellement prolonger les temps d'exposition de la tumeur au médicament (Hamaguchi et al. 2007; Kim et al. 2007).

Finalement, un autre vecteur à base de paclitaxel a été commercialisé en 2005. Il s'agit de l'Abraxane[®] (Celgene, USA) Dans cette formulation, des nanocristaux de paclitaxel sont stabilisés par des molécules d'albumine humaine (Gradishar 2006). L'enrobage de protéine assure la stabilité colloïdale de la nanosuspension sans l'utilisation de tensioactif. Cela permet une augmentation de la dose maximale tolérée (DMT) et de l'exposition tumorale à la drogue (Desai et al. 2008; Cortes et al. 2010).

1.1.3.2 Protéger le principe actif

Certains principes actifs particulièrement fragiles doivent être protégés afin de pouvoir exercer leur effet thérapeutique *in vivo*. C'est le cas pour certaines molécules de faible poids moléculaire rapidement métabolisées dans l'organisme (*e.g.*, la 1- β -D-arabinofuranosyluracil (cytarabine) qui est désactivée par la cytidine deaminase) (Hamada et al. 2002) ou pour les acides nucléiques dégradés par les nucléases endogènes (Whitehead

et al. 2009). Le vecteur consiste donc à masquer le principe actif pour empêcher sa reconnaissance par les enzymes responsables de son métabolisme.

Étude de cas des acides nucléiques.

Différents types d'acides nucléiques sont présentement en développement pour la thérapie génique ou la suppression de gènes. Jusqu'à tout récemment, leur utilisation chez l'homme était réservée à l'administration locale dans des tissus où l'activité des nucléases est limitée (*e.g.*, l'œil, la peau ou les muqueuses) (DeVincenzo et al. 2008; Kaiser et al. 2010; Leachman et al. 2010). Récemment, les efforts déployés pour vectoriser ce type de composés et les protéger de la dégradation ont porté fruit. La première preuve de concept de la suppression de gène chez l'humain après administration systémique d'ARN interférant (siRNA) a été établie (Davis et al. 2010).

La vectorisation de plasmides d'ADN, d'oligonucléotides antisens ou de molécules de siRNA dans des colloïdes remonte déjà à plusieurs années (De Fougerolles 2008). Parmi les formulations testées au niveau préclinique, on retrouve, entre autres, des liposomes (Semple et al. 2005), des micelles polyioniques (Katayose et al. 1998; Elsbahy et al. 2008) et des complexes lipidiques (Akinc et al. 2008; Semple et al. 2010). Dans la plupart des cas, les chaînes d'acides nucléiques polyanioniques sont complexées à divers supports cationiques pour former le vecteur. La liaison des chaînes d'acides nucléiques aux colloïdes les protège de la dégradation enzymatique (Fig. 1.7). Le vecteur peut aussi être utilisé pour cibler les cellules malades et augmenter l'internalisation des molécules actives. La formulation présentement à l'étude chez l'homme pour le traitement du cancer (Davis et al. 2010) cible le gène de la sous-unité M2 de la ribonucléotide réductase (RRM2). Le vecteur est formé par la complexation des chaînes d'acides nucléiques avec un polymère linéaire polycationique à base de cyclodextrine. Le colloïde est stabilisé par des chaînes de PEG et fonctionnalisé en surface pour cibler le récepteur à la transferrine, surexprimé dans les cellules cancéreuses (voir la section 1.1.3.4) (Heidel et al. 2007).

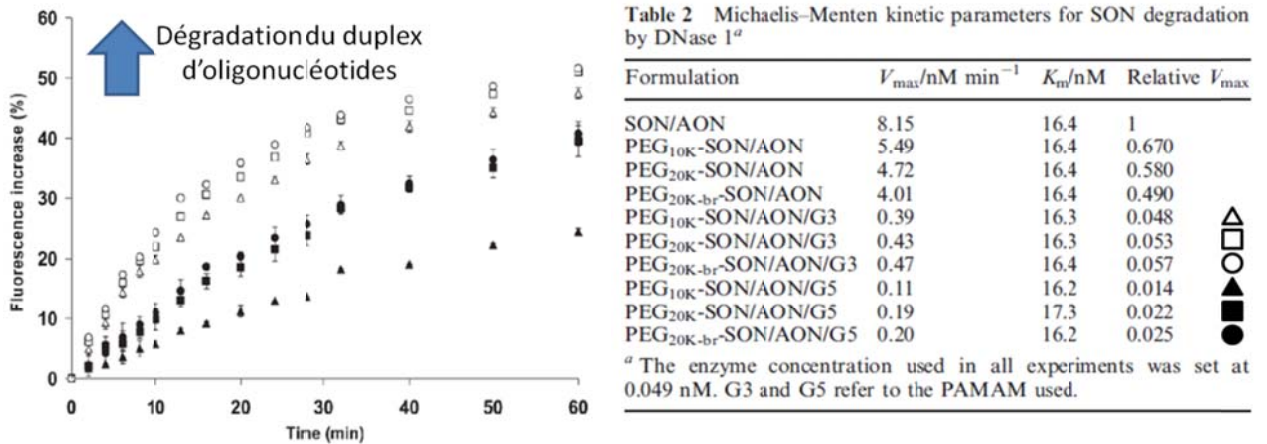


Figure 1.7 L'assemblage d'un duplex d'oligonucléotides au sein de divers complexes polyioniques diminue sa susceptibilité à la dégradation par l'ADNase type I, *in vitro*. À droite, l'effet des différentes formulations sur la cinétique de dégradation. Reproduit de (Elsabagy et al. 2008) avec permission de la Royal Society of Chemistry, disponible en ligne (le 10 mai 2011) : <http://dx.doi.org/10.1039/B714221H>.

Enfin, un autre moyen de vectoriser les acides nucléiques, consiste à les conjuguer de manière covalente à des chaînes lipidiques ou d'autres segments hydrophobes (Bijsterbosch et al. 2000; Bijsterbosch et al. 2002; Wolfrum et al. 2007). Cette conjugaison rend les molécules plus lipophiles et permet leur association aux lipoprotéines (HDL et LDL) une fois injectées dans le sang (Wolfrum et al. 2007). Les acides nucléiques résistent mieux à la dégradation enzymatique et sont délivrés préférentiellement aux hépatocytes où ils peuvent exercer leur effet thérapeutique. Le principal désavantage de cette approche repose dans le fait que les doses de siRNA administrées sont très importantes (50 mg/kg chez la souris), ce qui rend son application à l'échelle humaine difficilement envisageable.

1.1.3.3 Modifier la pharmacocinétique et la distribution d'un principe actif

Le vectorisation peut être utilisée pour modifier la pharmacocinétique (PK) et la manière dont un principe actif se distribue dans l'organisme. Dans certains cas, l'effet thérapeutique d'un médicament peut être amélioré en prolongeant son temps de circulation dans le sang et en permettant des administrations plus espacées (*e.g.*, pour certains peptides ayant une demi-vie très courte) (Harris et al. 2003). Dans d'autres cas, il peut s'agir de limiter la distribution passive du composé vers un tissu sain pour éviter des effets secondaires ou une toxicité.

Étude de cas de la doxorubicine.

La doxorubicine est une anthracycline très couramment utilisée pour le traitement des carcinomes, des cancers hématologiques ou des cancers des tissus mous. Bien que la doxorubicine soit encore très fréquemment employée en clinique, elle cause une cardiotoxicité qui limite les doses cumulatives totales pouvant être reçues (maximum 500 à 550 mg/m²) (Singal et al. 1998).

Les liposomes PEGylés de doxorubicine figurent parmi les vecteurs les plus connus. Ils ont été commercialisés au milieu des années 1990, sous le nom de Doxil[®] aux États-Unis et Caelyx[®] ailleurs dans le monde. La vectorisation de la doxorubicine dans des liposomes réduit l'incidence de cardiotoxicité en limitant la distribution de la drogue dans le myocarde et ce même lorsque les doses utilisées sont très élevées (> 450 mg/m²) (O'Brien et al. 2004). La vectorisation permet aussi de diminuer plusieurs autres types d'effets secondaires reliés à une toxicité non-spécifique de la drogue, notamment les nausées et l'alopécie (O'Brien et al. 2004). L'encapsulation fait passer le temps de demi-vie de la doxorubicine de 10 min pour la forme libre, à plus de 50 h pour la forme liposomale (Fig. 1.8) (Gabizon et al. 2003; O'Brien et al. 2004).

L'augmentation du temps de circulation n'a pas que des avantages puisque des effets secondaires dermatologiques (érythrodysesthésie palmo-plantaire) ont été observés chez 15 à 20 % des patients recevant la doxorubicine liposomale. Ces effets secondaires

sont possiblement reliés à une trop longue exposition plasmatique ou à une accumulation des liposomes au niveau du tissu cutané. Ils se manifestent généralement quelques jours après le 2^{ième} ou 3^{ième} cycle d'administration de la formulation. Ce sont ces effets indésirables qui expliquent pourquoi la DMT de la doxorubicine liposomale est moins élevée que pour la doxorubicine libre (50 mg/m² vs. 60 mg/m²) (Gabizon et al. 2003). Des réactions d'hypersensibilité aiguës possiblement reliées à l'activation du système du complément par les molécules de PEG à la surface des liposomes ont aussi été rapportées (Szebeni et al. 2002; Chahan-Khan et al. 2003; Szebeni 2005).

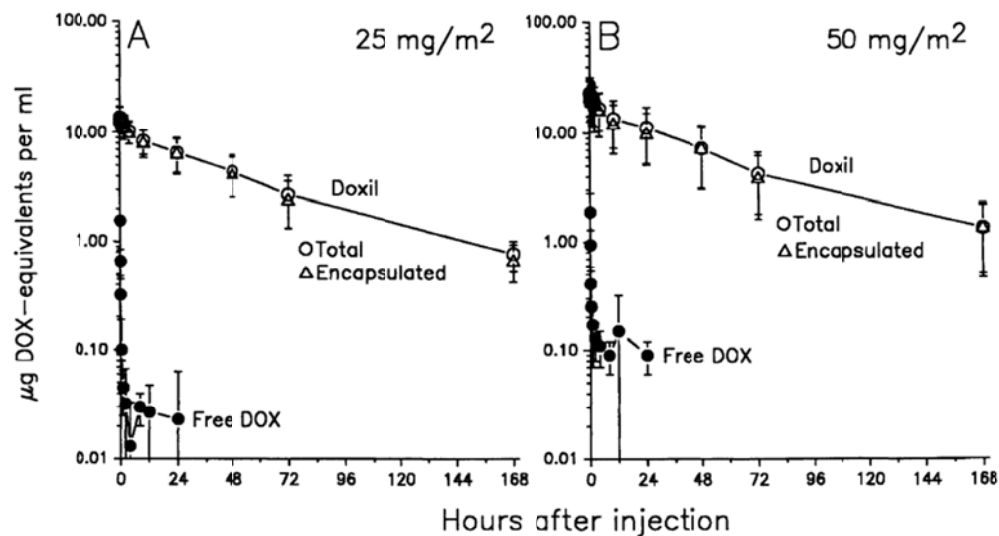


Figure 1.8 Pharmacocinétique de 2 doses de doxorubicine libre (n=4) ou sous forme liposomale (n=14). L'effet de l'encapsulation du principe actif sur la PK est clairement visible. Reproduit avec permission de (Gabizon et al. 1994).

En plus des liposomes, des conjugués polymères de doxorubicine à base de dextran (Danhauser-Riedl et al. 1993) ou de pHPMA (Vasey et al. 1999; Seymour et al. 2002) ont aussi été testés en phases cliniques. La vectorisation avec le polymère réduit la

cardiotoxicité aiguë de la doxorubicine et augmente le temps de demi-vie d'élimination de de l'anticancéreux (> 100 h) en plus d'offrir une meilleure localisation tumorale du principe actif chez certains patients (Vasey et al. 1999; Duncan et al. 2010). Un conjugué à base de pHPMA demeurerait en étude de phase II (depuis 1999, selon clinicaltrials.gov) mais les autres ont été abandonnés puisqu'ils n'ont pas réussi à montrer de supériorité clinique par rapport aux traitements existants (Duncan 2006) ou encore parce qu'ils étaient associés à d'autres toxicités (Danhauser-Riedl et al. 1993).

Les structures cœur-couronne figurent aussi parmi les autres approches de vectorisation de la doxorubicine ayant atteint les phases cliniques (Kattan et al. 1992; Danson et al. 2004; Valle et al. 2011). Encore une fois, certains de ces systèmes ont démontré qu'ils n'offraient pas de bénéfices notables par rapport à la doxorubicine non-formulée (Kattan et al. 1992), alors que d'autres se sont montrés plus prometteurs. Par exemple, des micelles polymères à base de Pluronic® (polymères triblocs de PEG et de poly(propylène glycol)) se sont avérées capables de prolonger la circulation plasmatique de la doxorubicine tout en inhibant possiblement l'apparition de cellules tumorales résistantes aux anticancéreux (Danson et al. 2004; Valle et al. 2011). Un autre système micellaire à base de polymères diblocs de PEG-poly(acide aspartique) s'est montré intéressant pour augmenter le temps de circulation de la doxorubicine malgré une stabilité dans le plasma mitigée. Cette formulation n'a toutefois pas permis d'augmenter considérablement la DMT de la doxorubicine (60-70 mg/m²) (Matusmura et al. 2004).

En terminant, Mayer LD et ses collaborateurs ont démontré, au cours d'une étude chez la souris, que l'administration de liposomes vides possédant un gradient de pH transmembranaire pouvaient altérer la pharmacocinétique et diminuer la toxicité de la doxorubicine injectée par la suite (Mayer et al. 1999). Dans ces expériences comme pour la technique de chargement actif (Fig. 1.6), la différence de pH de part et d'autre de la membrane modifie l'équilibre d'ionisation de la drogue et favorise sa capture par les vésicules. Les liposomes administrés 1 h avant la doxorubicine diminuaient la quantité de doxorubicine disponible pour exercer l'effet toxique. Ces travaux, bien qu'ils n'aient eu à

l'époque qu'une portée très théorique, ont servi de base au travail de détoxication par les liposomes présentés au chapitre 4.

1.1.3.4 Cibler le site thérapeutique du principe actif

Un autre objectif de la vectorisation consiste à utiliser les vecteurs pour délivrer la drogue à un endroit spécifique du corps. Au début du 20^{ième} siècle, Paul Ehrlich, le lauréat du prix Nobel de médecine de 1908, a introduit le concept de « *magic bullet* » pour désigner un médicament qui pourrait spécifiquement différencier les pathogènes des cellules saines. Ce médicament traiterait ainsi spécifiquement les pathologies sans affecter l'homéostasie de l'organisme (Strebhardt et al. 2008). Bien que cette idée soit née à partir d'observations sur la coloration des bactéries en microbiologie, la quête du médicament parfaitement sélectif est devenue le *leitmotiv* de nombreux chercheurs dans le domaine de la vectorisation pharmaceutique.

Le type de cellules à cibler dépend de la pathologie à traiter et du type de médicament à transporter. Étant donné la quantité de travaux qui ont été faits dans le domaine de la vectorisation des anticancéreux au cours des dernières années, les concepts suivants s'appliquent donc principalement au ciblage des cellules cancéreuses. Cependant, certains peuvent être adaptés à d'autres cibles thérapeutiques (Wu et al. 2002; Gao et al. 2008; Chan et al. 2010).

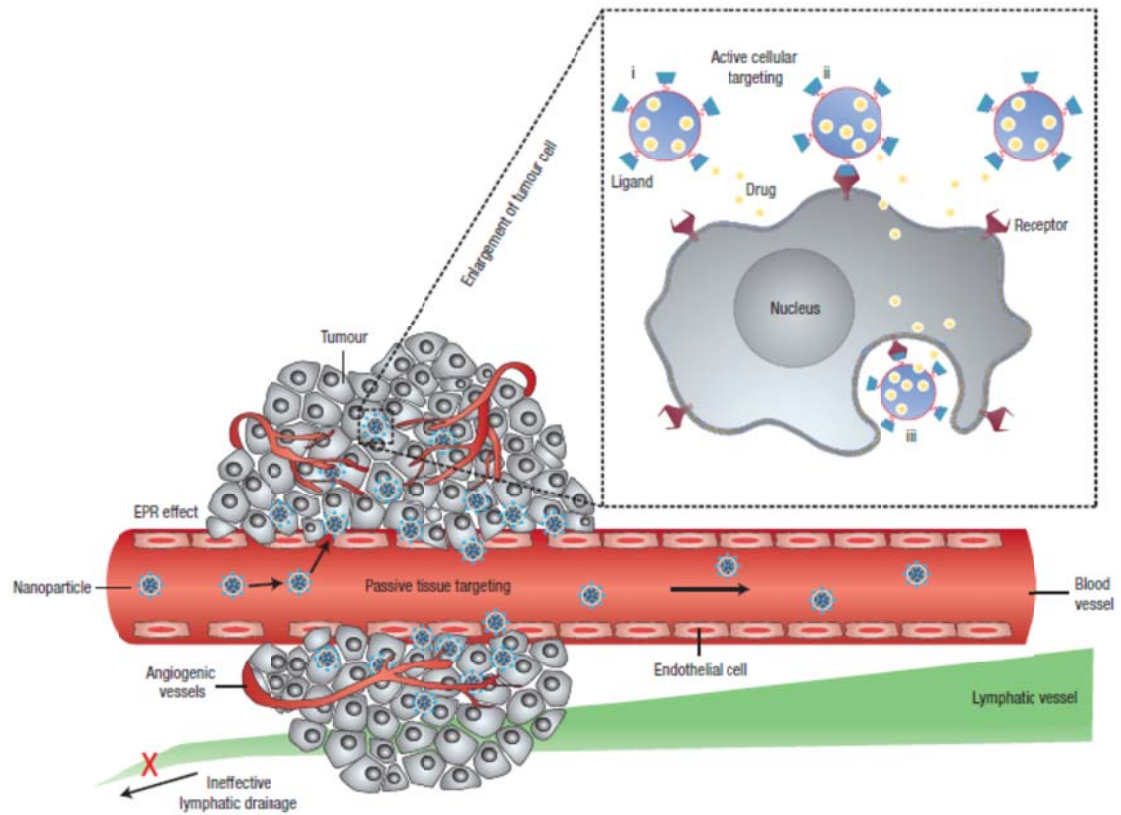


Figure 1.9 Schématisation des principes de ciblage des cellules cancéreuses. Le ciblage passif des tumeurs solides repose sur la perméation accrue des vaisseaux dans les tumeurs et sur le drainage lymphatique déficient. Le ciblage actif (dans l'inséré) repose sur la reconnaissance des cellules malades par des molécules de reconnaissance à la surface des vecteurs. Figure reproduite avec permission de (Peer et al. 2007).

L'effet EPR ou le ciblage passif des tumeurs solides.

Au milieu des années 1980, des chercheurs japonais (Matsumura et al. 1986) ont observé que l'albumine et d'autres substances macromoléculaires s'accumulaient préférentiellement dans le lit extravasculaire des tumeurs. Cette manifestation, appelée effet

EPR est rapidement devenu le fer de lance de la vectorisation et du ciblage des substances anticancéreuses (Noguchi et al. 1998; Duncan 1999; Maeda et al. 2000; Jain et al. 2010).

C'est dans la pathophysiologie du cancer que l'on trouve l'explication de l'effet EPR (Maeda et al. 2000; Maeda 2001a; Maeda et al. 2001). Le développement des cellules cancéreuses en tumeurs solides entraîne le relargage de facteurs de croissance. Ces facteurs de croissance stimulent le développement d'un réseau vasculaire parallèle à la circulation habituelle qui sert à alimenter la tumeur en oxygène et en nutriments. Étant donné la rapidité de la croissance, la néovasculature est souvent anormale. Elle possède une couche endothéliale discontinue et est dépourvue de membrane basale et de cellules musculaires lisses. Ces anomalies résultent en un réseau vasculaire extrêmement perméable et possédant des fenestrations d'une taille d'environ 200 à 1 200 nm (Hobbs et al. 1998). L'extravasation des composants sanguins lors de leur passage dans ce type de vaisseaux est facilitée.

L'accumulation des substances macromoléculaires (protéines, vecteurs et autres colloïdes) s'explique par deux phénomènes. Premièrement, le retour du liquide extracellulaire à la circulation est perturbé par les vaisseaux lymphatiques dysfonctionnels du tissu tumoral (Danhier et al. 2010; Jain et al. 2010). Deuxièmement, la taille des substances macromoléculaires empêche leur retour dans la circulation sanguine par diffusion. Les forces de convection dans les tumeurs étant insuffisantes pour déplacer les colloïdes, ceux-ci sont donc retenus dans l'espace interstitiel (Netti et al. 1999; Danhier et al. 2010).

L'effet EPR est abondamment documenté dans différents modèles animaux, pour plusieurs types de tumeurs et de vecteurs. Cependant, la détection de l'accumulation tumorale chez l'humain est expérimentalement plus complexe. D'une part, l'échantillonnage des tissus est une procédure invasive qui complique le devis expérimental de l'étude. D'autre part, le marquage des formulations nécessaires à la détection par imagerie n'est pas toujours évident à réaliser sans altérer les propriétés du colloïde (Fig. 1.10) (Vasey et al. 1999; Gabizon et al. 2003). Malgré tout, quelques études se sont

intéressées à l'accumulation tumorale de la doxorubicine liposomale chez l'humain. L'accumulation du médicament a été observée dans des carcinomes mammaires (Symon et al. 1999) ainsi que dans des tumeurs primaires ou métastatiques du système nerveux central (Koukourakis et al. 2000a) et des tissus mous (Northfelt et al. 1996; Koukourakis et al. 2000b). Dans l'ensemble de ces études, les concentrations de doxorubicine dans les tumeurs étaient de 5 à 19 fois plus élevées que celles des tissus environnants, de 2 à 288 heures (12 jours) après la dernière injection de doxorubicine liposomale.

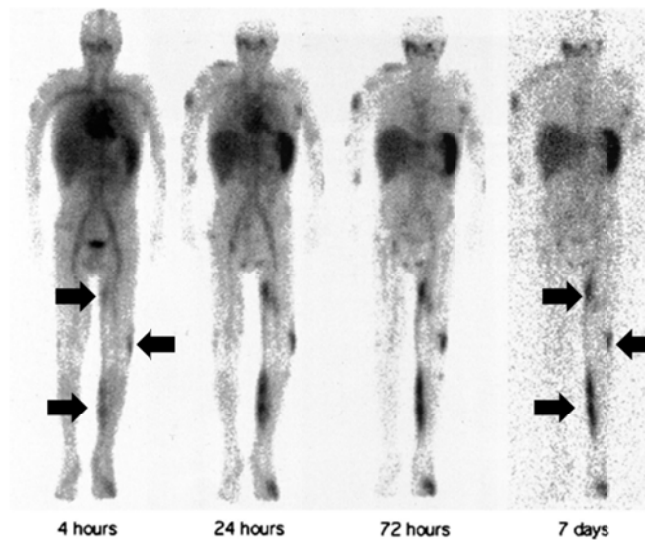


Figure 1.10 L'effet EPR chez l'homme. Accumulation de liposomes PEGylés marqués au ^{111}In -DTPA en fonction du temps chez un patient sidatique atteint du sarcome de Kaposi. Les vésicules sont détectables jusqu'à 7 jours après la dernière administration dans les tumeurs identifiées par les flèches noires. Figure reproduite avec permission de (Harrington et al. 2001).

En terminant, la pertinence clinique de l'effet EPR reste toujours à démontrer. À part quelques exceptions, tous les vecteurs commercialisés n'ont que des effets marginaux sur la survie des patients (Jain et al. 2010). De la même façon, de nombreux autres vecteurs ayant démontré une accumulation tumorale marquée chez l'animal sont décevants en phase

clinique (Duncan 2006; Duncan et al. 2010). La pertinence du ciblage passif par des vecteurs macromoléculaires dans le traitement du cancer peut donc être remise en question. Les tumeurs solides possèdent une forte pression osmotique (et oncotique) et une matrice interstitielle fortement réticulée par des fibres de collagène (Jain et al. 2010). Il est donc probable que ces facteurs limitent la diffusion des vecteurs trop volumineux vers l'intérieur de la tumeur et circonscrit leur effet thérapeutique à la périphérie.

L'utilisation de ligands ou le ciblage actif

Les vecteurs utilisés pour le ciblage actif possèdent, à leur surface, des fonctions de reconnaissance pour la cible thérapeutique. Les vecteurs peuvent donc être décorés par des anticorps (Simard et al. 2009), des fragments d'anticorps (Simard et al. 2010), des aptamères (Farokhzad et al. 2006) ou des petites molécules (Weissleder et al. 2005) (Fig. 1.11). Ces molécules possèdent une affinité et une sélectivité pour un motif présent à la surface du tissu à cibler. La notion de ciblage actif découle directement du concept du « *magic bullet* ». En mettant au point des vecteurs capables de reconnaître spécifiquement des protéines à la surface des cellules malades, on s'assure, en principe, de limiter l'effet du médicament dans les cellules saines.



Figure 1.11 Différentes molécules de reconnaissance pouvant fonctionnaliser la surface d'un vecteur. Figure reproduite avec permission de (Peer et al. 2007).

Le choix de la cible thérapeutique se fait en fonction de différents éléments. D'une part, un récepteur ou une protéine de surface pouvant être internalisé est souvent privilégié (Allen 2002). Cela permet de livrer le médicament directement à l'intérieur de la cellule et de limiter l'effet sur les cellules avoisinantes. La cible peut être une protéine spécifique aux cellules du tissu ciblé (*e.g.*, CD33 ou antigène membranaire spécifique de la prostate) ou encore une protéine largement surexprimée dans les cellules cancéreuses (*e.g.*, récepteur à la transferrine ou récepteur de l'acide folique).

Étant donné leur spécificité et leur affinité, les anticorps ont été à la base des premières tentatives de ciblage actif. Le développement et la commercialisation de nombreux anticorps monoclonaux comme agents thérapeutiques (Adams et al. 2005) ont alimenté l'intérêt à incorporer ces molécules à la surface de différents types de vecteurs (Allen 2002). Cependant, le greffage d'anticorps augmente l'antigénicité du colloïde et la vitesse à laquelle celui-ci est reconnu par l'organisme. Les temps de circulation trop courts rendent donc le ciblage inefficace (Koning et al. 2001).

Plusieurs méthodes ont été employées pour contrer ce problème. Par exemple, le couplage de l'anticorps directement sur le segment Fc vise à en limiter l'accessibilité pour les cellules phagocytaires (Koning et al. 2001; Simard et al. 2009). De la même façon, l'utilisation d'anticorps fragmentés qui ne possèdent pas la partie Fc peut être privilégiée (Simard et al. 2010). Les fragments peuvent avoir une (Fab', ~50 kDa) ou deux ((Fab')₂, ~100 kDa) des parties spécifiques de la molécule originale (~150 kDa). Cependant, malgré tous les efforts, très peu de formulations à base d'anticorps ont atteint les phases cliniques (Allen 2002; Danhier et al. 2010).

Le ciblage actif peut être obtenu avec un ligand endogène dont le récepteur est surexprimé dans les cellules cancéreuses. Les exemples de ligands qui peuvent être employés comprennent la transferrine (Heidel et al. 2007), l'acide folique (Kukowska-Latallo et al. 2005) et la galactosamine (Seymour et al. 2002). Ces ligands sont généralement peu immunogènes et n'altèrent pas la circulation des vecteurs. Ils sont de plus

internalisés par endocytose. Cependant, la nature ubiquitaire du récepteur peut affecter la spécificité du ciblage.

Finalement de nouvelles méthodes ont récemment été mises au point pour synthétiser de nouveaux ligands ayant une très forte affinité et sélectivité pour des protéines de surface. Les fragments d'anticorps variables à une chaîne (scFv, « *single-chain variable fragment* ») sont des protéines de fusion produites par « *phage display* » qui possèdent une affinité comparable aux anticorps sans être reconnues par les macrophages. (Johannsen et al. 2010). Les scFv (~25 kDa) peuvent être directement greffés sur des molécules actives (Johannsen et al. 2010) ou encore attachés à la surface de vecteurs (Qian et al. 2008). Les aptamères quant à eux sont des molécules d'ADN ou d'ARN synthétiques dont la structure tridimensionnelle est optimisée afin d'augmenter l'affinité pour leur ligand (Guo 2010). Dépendant de leur cible, ils peuvent être utilisés seuls (Rusconi et al. 2004) ou pour fonctionnaliser les vecteurs (Farokhzad et al. 2006; Chan et al. 2010; Dhar et al. 2011).

En terminant, la fonctionnalisation de la surface des vecteurs avec des ligands n'est généralement pas suffisante pour radicalement changer le profil de distribution des colloïdes (Pirollo et al. 2008). Lorsque la cible cellulaire est située sur l'endothélium vasculaire et peut être rejointe aisément, la reconnaissance par le vecteur peut survenir lors de son passage dans le vaisseau (Chan et al. 2010). Sinon, dans le traitement des tumeurs solides par exemple, la distribution tumorale des colloïdes fonctionnalisés repose essentiellement sur l'effet EPR. Le ligand favorise seulement l'internalisation des vecteurs dans les cellules ciblées, une fois la tumeur atteinte (Danhier et al. 2010).

La sensibilité au pH ou le ciblage intracellulaire

Une fois les vecteurs distribués au niveau des cellules tumorales, celles-ci sont en mesure de les internaliser (par pinocytose ou endocytose médiée par des récepteurs) (Conner et al. 2003; Petros et al. 2010). L'internalisation de colloïdes conduit à la formation de vésicules intracellulaires (les endosomes) qui s'acidifient lentement jusqu'à

former des lysosomes (Mukherjee et al. 1997). Ce processus de maturation des organelles vise à digérer les substances internalisées et peut être délétère pour le médicament dans le vecteur. Il est donc parfois avantageux de libérer le contenu des vecteurs rapidement après leur capture par les cellules.

Étant donné que la maturation de l'endosome précoce au lysosome entraîne une acidification du pH à l'intérieur de l'organelle, ce paramètre a rapidement été identifié comme un stimulus pouvant être exploité pour permettre la libération intracellulaire (Bareford et al. 2007) (Fig. 1.12). Dans les 40 à 60 minutes suivant l'internalisation, le pH à l'intérieur de l'organelle passe du pH physiologique (7,4) à environ 4,5 dans les lysosomes (Mukherjee et al. 1997). De nombreux vecteurs sensibles au pH ont donc été développés pour déclencher un relargage de leur contenu à un pH entre 5,5 et 6,5.

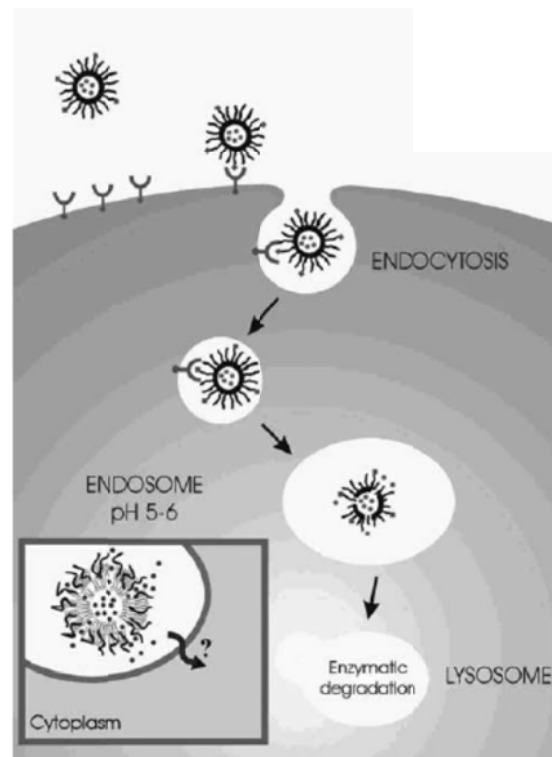


Figure 1.12 Ciblage intracellulaire après l'endocytose médiée par un récepteur. Figure reproduite avec permission de (Roux et al. 2002a).

Parmi les vecteurs mis au point avec cet objectif, on retrouve des conjugués polymères (Murthy et al. 2003), des micelles (Yessine et al. 2003) et différents types de liposomes (Momekova et al. 2007). Une des approches développées dans notre laboratoire consiste à insérer un polymère, le poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-acide méthacrylique) (p(NIPAM-*co*-MAA)), dans la bicouche des liposomes pour les déstabiliser lors d'une baisse du pH environnant (Meyer et al. 1998; Roux et al. 2002a; Roux et al. 2003; Roux et al. 2004).

Les homopolymères de *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) possèdent un point de trouble (LCST pour « *lower critical solubility temperature* ») et ne sont solubles dans l'eau qu'en dessous d'une température précise. Au-delà d'une température avoisinant 32 ± 1 °C, les molécules de pNIPAM se déshydratent et les chaînes de polymère précipitent abruptement (Kujawa et al. 2006) (Fig. 1.13). Pour une utilisation en thérapie humaine, la copolymérisation avec une quantité croissante de monomères plus solubles (*e.g.*, acrylamide, diméthylacrylamide, *N*-hydroxyméthylacrylamide) permet d'augmenter la LCST au-delà de la température physiologique (37°C) (Keisuke et al. 2004). De la même façon, lorsque les comonomères sont ionisables (MAA, acide acrylique, etc.), la solubilité devient aussi dépendante de l'ionisation des molécules (Chen et al. 1995; Meyer et al. 1998). La copolymérisation du NIPAM avec au moins 5 mol% de MAA permet d'obtenir un polymère soluble dans le sang (37°C, pH 7.4) qui se déshydrate et précipite subitement lorsqu'il se retrouve dans des conditions proches de celles des endosomes tardifs (37°C, pH 5 à 5,5) (Meyer et al. 1998).

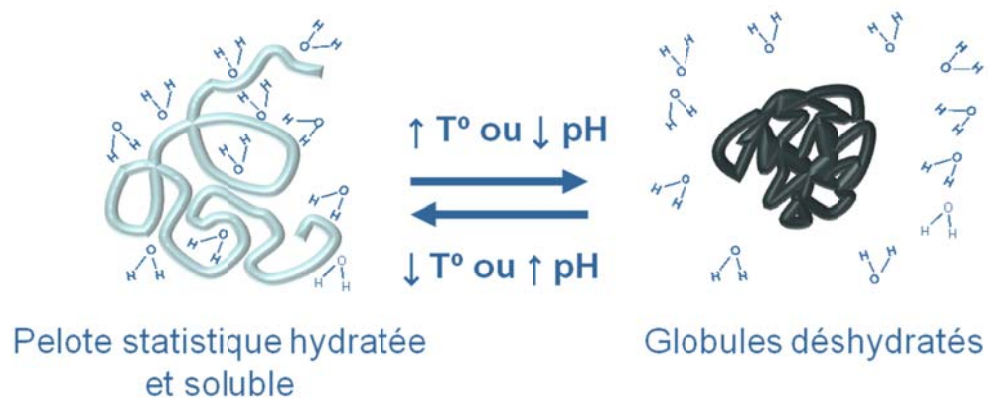


Figure 1.13 Les copolymères de NIPAM en solution possèdent une transition de phase abrupte lorsque la température passe au dessus de leur point de trouble (LCST). Si un des monomères est ionisable (*e.g.*, MAA), cette transition de phase devient dépendante du pH.

Lorsque ce type de polymère est incorporé dans la membrane des liposomes, la précipitation observée à pH acide entraîne une déformation de la membrane de phospholipides et la libération du contenu des vésicules (Meyer et al. 1998; Roux et al. 2002a; Roux et al. 2003; Roux et al. 2004). Ce type de polymère et la caractérisation de leur pharmacocinétique sont traités au chapitre 3.

1.1.4. Au-delà de la vectorisation, la détoxication...

Tel que vu précédemment, la majorité des vecteurs pharmaceutiques visent à améliorer l'efficacité d'une ou plusieurs drogues ou à en diminuer les effets secondaires. Cependant, le même type de technologie peut être employé à d'autres applications, comme par exemple le traitement des intoxications médicamenteuses (Leroux 2007). Dans ce type de traitements, les colloïdes sont fabriqués spécialement pour capter la drogue *in situ* dans l'organisme afin d'éviter sa toxicité (voir Figure 1.14).

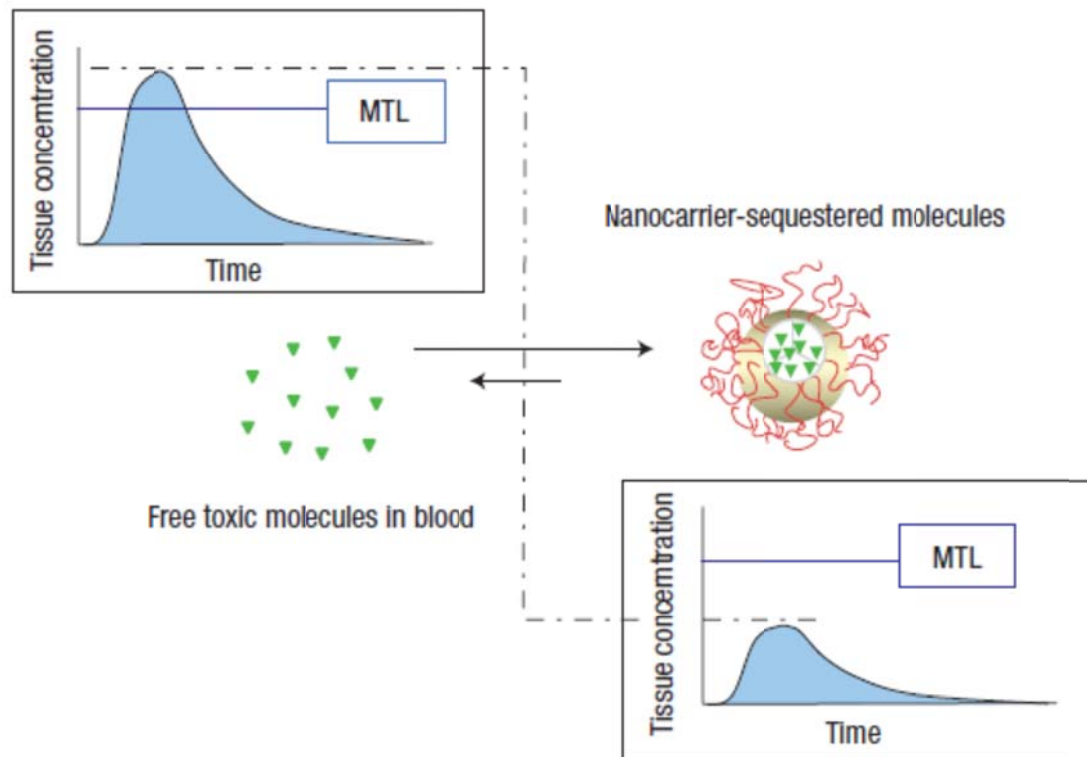


Figure 1.14 Le principe de détoxification par des colloïdes injectables. Les colloïdes séquestrent les molécules de drogue dans la circulation sanguine pour limiter leur distribution vers les tissus. MTL : niveau toxique minimum (« *minimum toxic level* »). Figure extraite avec permission de (Leroux 2007).

En comparaison avec les vecteurs utilisés dans le traitement du cancer, le développement clinique et préclinique de colloïdes pour la détoxification en est à ses premiers balbutiements. L'approche la plus avancée jusqu'à présent utilise une émulsion de lipides commercialisée pour l'alimentation parentérale (Intralipid[®]) (Weinberg et al. 1998). Puisqu'il ne s'agit que de détourner l'indication officielle d'un médicament pour des cas extrêmes, une cinquantaine de cas d'utilisation chez l'homme ont déjà été rapportés pour plusieurs types de médicaments (*e.g.*, anesthésiques locaux, β -bloquants, bloquants des canaux calciques) (Jamaty et al. 2010).

L'administration de ces émulsions lipidiques vise à redistribuer la drogue des tissus vers les gouttelettes dans la circulation, afin d'empêcher l'effet pharmacologique (Tebbutt et al. 2006; Mazoit et al. 2009; Mirtallo et al. 2010). Bien que la méthode semble relativement efficace et puisse s'utiliser pour différents types de molécules actives, plusieurs limitations à cette approche existent. La distribution de la drogue vers le colloïde en circulation se fait passivement en fonction de son affinité pour les lipides. Les quantités pouvant être captées par les gouttelettes sont donc limitées par le caractère lipophile de la molécule active ainsi que la quantité de gouttelettes dans le sang. La détoxification grâce à cette méthode requiert donc la perfusion d'énormes quantités de lipides et conduit parfois à un retour de la toxicité une fois les gouttelettes éliminées de la circulation (Marwick et al. 2009).

Des alternatives aux Intralipid[®] ont donc été proposées. Par exemple, des nano-émulsions possédant une plus grande surface de contact et une plus grande capacité de chargement pour les drogues (Morey et al. 2004; Varschey et al. 2004) ou encore des liposomes chargés pouvant fixer la drogue à leur surface par interactions électrostatiques (Fallon et al. 2006; Howell et al. 2009) ont montré des résultats intéressants *in vitro*. Comme les émulsions de lipides, ces formulations possèdent l'avantage d'être polyvalentes et de pouvoir capter différents types de drogues. Cependant, aucune étude *in vivo* n'a été réalisée jusqu'à présent.

Enfin, d'autres types de colloïdes ont été étudiés comme antidotes spécifiques pour certains principes actifs en développement. Par exemple, des polymères chargés ont été utilisés pour lier des aptamères thérapeutiques et bloquer leur effet anticoagulant *in vivo* (Oney et al. 2009) et des nanoparticules possédant l'empreinte tridimensionnelle d'une toxine ont démontré qu'ils pouvaient bloquer l'effet toxique du peptide dans un modèle animal murin (Hoshino et al. 2010).

1.2 Article de revue : The journey of a drug-carrier in the body: the physiological challenges of nanomedicine.

Article de revue soumis à ACS Nano (27-06-2011 : *en révision*)

Nicolas Bertrand¹ and Jean-Christophe Leroux^{1,2*}

¹ Faculty of Pharmacy, University of Montreal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7

² Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH, HCI H 301, Wolfgang-Pauli-Str. 10, 8093 Zürich, Switzerland

* To whom correspondence should be addressed:
Institute of Pharmaceutical Sciences,
Department of Chemistry and Applied Biosciences,
ETH, HCI H 301, Wolfgang-Pauli-Str. 10,
8093 Zürich, Switzerland
Telephone: +41 (0)44 633 73 10
Fax: +41 (0)44 633 13 11

This article is dedicated *in memoriam* of our former mentor, colleague and friend, Prof. Louis Cartilier (November 22, 1958 - May 27, 2011).

Article soumis à *ACS Nano* (14 juin 2011)

Keywords: nanomedicine; nanoparticles; drug delivery; biodistribution; pharmacokinetics; nanomaterial; polymer conjugates; particle-protein interaction; accelerated blood clearance; mononuclear phagocyte system; complement system

1.2.1 Abstract

Recent advances in chemistry and material sciences have witnessed the emergence of an increasing number of novel and complex nanosized carriers for the delivery of drugs and imaging agents. Nevertheless, this raise in complexity does not necessarily offer more efficient systems. The lack of performance experienced by several colloidal drug carriers during the preclinical and clinical development processes can be explained by inadequate pharmacokinetic/biodistribution profiles and/or unacceptable toxicities. A comprehensive understanding of the body characteristics is necessary to predict and prevent these problems from the early stages of nanomaterial conception. In this manuscript, we review and discuss the anatomical and physiological elements which must be taken into account when designing new carriers for delivery or imaging purposes. This article covers the main organs involved in the elimination of nanosized materials and summarizes the knowledge acquired over more than 30 years of research and development in the field of drug targeting.

1.2.2. Introduction

The rapid development of pharmaceutical chemistry and molecular biology has fostered the production of several new classes of imaging agents and highly potent drugs (*e.g.*, proteins, nucleic acids, etc.). However, such molecules often possess physicochemical and/or biological characteristics that make their use suboptimal in humans. Nanosized drug delivery systems can circumvent these problems by improving the pharmacokinetic/biodistribution characteristics and therapeutic index of drugs (Peer et al. 2007). Recent advances in the fields of chemistry and material sciences have given birth to a plethora of novel nanoscale systems with interesting properties (*e.g.*, nanotubes (Kostarelos et al. 2009), nanodiamonds (Ho 2009), nanocages (Skrabalak et al. 2008)),

which have been proposed as drug delivery platforms. However, notwithstanding a few exceptions, nanocarriers have met mitigated success, and the attrition rate of drugs formulated in nanosized carriers remains substantial during preclinical and clinical development stages.

Disappointments in the performance of colloidal drug carriers (CDCs) are often imputed to suboptimal *in vivo* behaviour. Throughout evolution, complex living organisms have perfected their defences towards the recognition and clearance of exogenous nano- and micro-sized pathogens, and multiple physiological mechanisms overlap to maintain homeostasis. Hence, despite all efforts to decrease biofouling and host reactions, the human body still perceives CDCs as foreign material. Keeping track of the whole biological portrait and the complex nano-bio interactions (Nel et al. 2009) is, therefore, essential when designing novel systems. Furthermore, even if the nanomaterials developed are unmistakably innovative and original, broad experience over the past 30 years with more established CDCs, such as liposomes (Torchilin 2005) and micelles (Gaucher et al. 2005) should be considered as a foundation to elude certain mistakes and pitfalls encountered in the past.

It is with this perspective, and to offer a glimpse of the complexity of biological systems, that this contribution focuses on the host's physiological and anatomical barriers. These elements should be contemplated when designing new injectable nanoscale systems. Rather than offering comparisons of the advantages and limitations of different CDCs, the goal is to underline the common physiological determinants affecting CDC performances *in vivo*, whether to improve chemotherapy (Jain et al. 2010; Scheinberg et al. 2010), treat drug overdose (Leroux 2007; Bertrand et al. 2010) or achieve efficient nucleic acid delivery (Whitehead et al. 2009; Davis et al. 2010). Throughout the review, a distinction is made between insoluble CDCs (particulate CDCs), which possess a liquid-solid interface, and macromolecular conjugates (soluble CDCs), which are in a dissolved state. The manuscript is centered on tissues and organs that are involved in the clearance of exogenous material, namely blood, the kidneys, liver and spleen. The latter two organs represent the major part

of the mononuclear phagocyte system (MPS). In this context, special attention will be paid to CDCs properties that can be tuned to change the host's response to the carrier. From a clinical perspective, comprehension of these factors is vital to potentiate blood circulation times while limiting non-specific toxicities and accumulation in the body. Distinctions between humans and the commonly-used rodent animal models will be highlighted, when relevant. Tumours and other pathological tissues where CDCs can be targeted will not be considered in this contribution, as specific reviews on the delivery of actives to tumours can be found elsewhere (Jain et al. 2010; Scheinberg et al. 2010).

Vocabulary:

Opsonin: Proteins which adsorb on the surface of blood-borne pathogens and particles to enhance their recognition by the mononuclear phagocyte system. Certain proteins of the complement system are opsonins.

Complement system: A system of plasma proteins involved in recognition and elimination of pathogens from the blood. Activation and regulation of the complement cascade is implicated in the immune response.

Phagocytosis: A specific endocytic process by which macrophages and other cells engulf solid particles. Phagocytosis is divided in 3 steps: 1. binding of the particle to the cell surface, 2. invagination of the membrane to engulf the particle and form an intracellular vesicle and 3. maturation of the formed intracellular vesicle to digest its content.

Glomerulus: The blood filtration unit of the kidney. Qualitative and quantitative control of the filtrate is exerted by the 3 different cellular structures forming the glomerulus.

Kupffer cells: The liver macrophages of the liver situated within the sinusoids.

Sinusoids: Fenestrated blood vessels lacking a basal membrane present in certain organs (*i.e.*, liver, spleen).

Glycocalyx: An extracellular gel-like constituent of certain epithelia. The glycocalyx is composed of entangled macromolecules (polysaccharides and glycoproteins).

Reticular fibers: Mesh-like structure of connective tissue providing the structural framework of

certain organs. Reticular fibers are mainly composed of type III collagen.

1.2.3. Entering the systemic circulation

Although CDCs can enter the body *via* different routes (*e.g.*, pulmonary (Choi et al. 2010a), oral (Rabinow 2004)), the most reproducible way to deliver them is usually by peripheral intravenous injection. From the injection site, they are transported directly to the heart *via* the venous network. Blood is delivered to the right ventricle, and continues on to the pulmonary circulation. The entire cardiac output passes through the pulmonary circulation (Fig. 1.15). Lung capillaries are amongst the smallest blood vessels in the body, with diameters between 2 to 13 μm in human and rodents alike. Therefore, they constitute the first sieving constraints for CDCs. Physiologically, the small diameter of the capillary lumen facilitates exchanges with the extravascular milieu and restricts passage from blood components. This size restriction allows qualitative control of the cell population in the lungs: highly-deformable red blood cells (RBC) transit very rapidly while the passage of larger and more rigid white blood cells (WBC) is delayed (Doerschuk et al. 1993). Large, rigid CDCs can be sequestered in the lungs. These CDCs are trapped very rapidly upon their first passage through the pulmonary circulation. Rigid CDCs with a diameter of 10 μm remain permanently trapped, particles with a size of 3-6 μm are initially caught in lung capillaries, but eventually escape to reach the systemic circulation, and smaller particles avoid pulmonary retention (Kutscher et al. 2010). Once they have passed the pulmonary capillaries, CDCs return to the left ventricle of the heart *via* the pulmonary veins and are pumped into the systemic circulation. The total cardiac output is shared by the different organs as shown in Fig. 1.15. Interspecies differences in tissue perfusion and blood volume lead to significant variations in the time taken by one organ to filter the whole blood pool (Table 1.1).

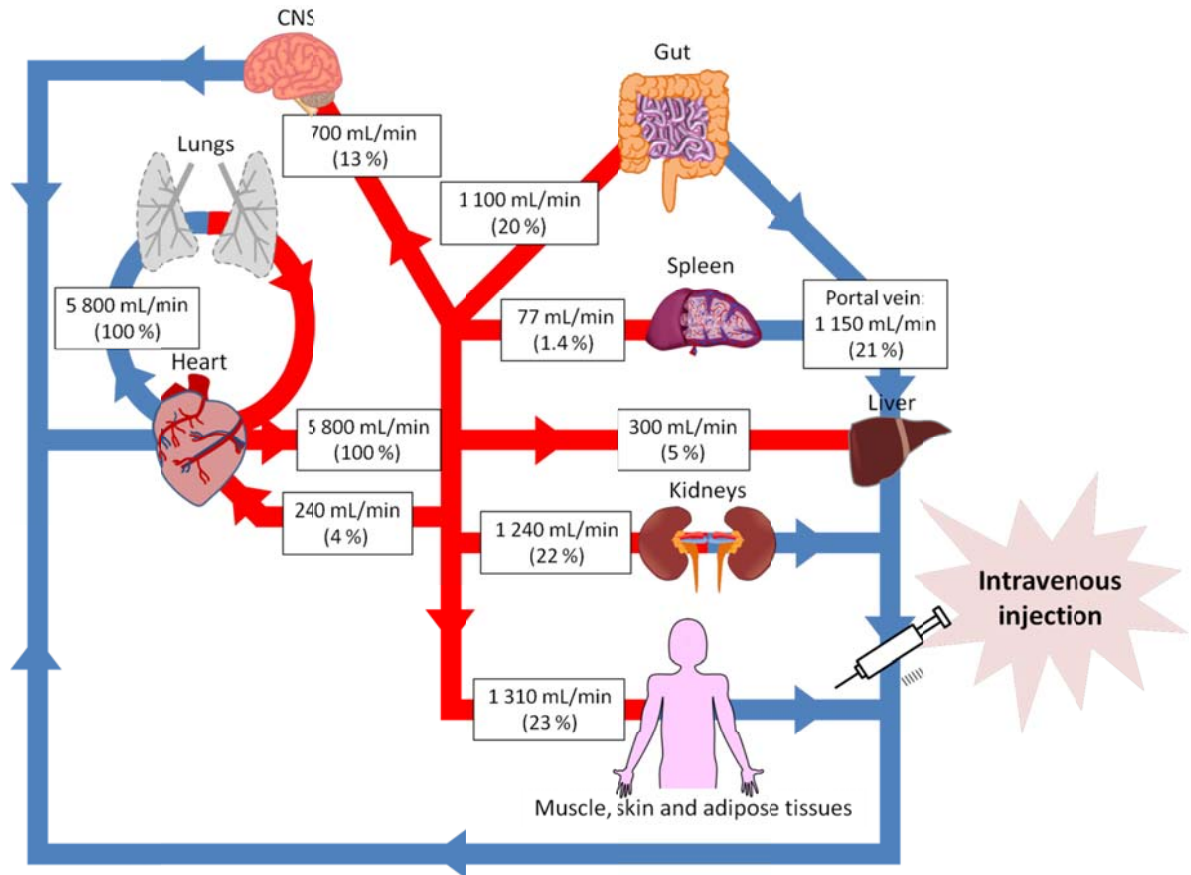


Figure 1.15 Distribution of blood flow in the pulmonary and systemic circulations. Values in parentheses represent the percentage of total blood flow in each organ. Values obtained from reference (Davies et al. 1993). CNS: central nervous system.

Table 1.1 Comparative values of organ weight, blood flow and cycle time in different species. The total animal weight and total blood volume are given in parentheses. Values extracted from reference (Davies et al. 1993).

Organ	Human (70 kg, 4 900 mL)			Rat (250 g, 17.5 mL)			Mice (20 g, 1.4 mL)		
	Weight (g)	Blood flow (mL/min)	Cycle time (min) ^a	Weight (g)	Blood flow (mL/min)	Cycle time (min) ^a	Weight (g)	Blood flow (mL/min)	Cycle time (min) ^a
Lungs	1,000	5,600	0.9	1.5	74.0	0.25	0.12	8	0.175
Kidneys	310	1,240	3.9	2	9.2	1.9	0.32	1.3	1.1
Liver	1,800	1,450	3.4	10	13.8	1.3	1.75	1.8	0.8
Spleen	180	77	63.6	0.75	0.63	27.8	0.1	0.09	15.6

^a The time it takes for the organ to receive a volume equivalent to the total blood volume. The value is calculated as total volume/blood flow in the organ.

1.2.4. Interactions with blood

Blood is the connective tissue responsible for oxygen, nutrients and waste product transport. In human and rodents alike, the blood compartment accounts for around 6 to 7 % of the total body weight. It consists of blood cells suspended in a solution of proteins and low molecular weight solutes, called plasma. It is the connective pathway for CDCs between organs. The following section will review the different blood components that can influence CDCs behaviour in the body.

1.2.4.1. Blood cells

Blood cells consist of RBC, representing 45-55 % of the blood volume, as well as leukocytes (WBC) and thrombocytes (platelets) which together represent 1 % of this

volume. Intravascular interactions of blood cells with pathogens and CDCs are uncommon (Hickey et al. 2009). Erythrocytes and platelets are non-phagocytic, and most circulating WBC must be activated at the site of injury to exert their defence functions (Gordon et al. 2005; Hickey et al. 2009). A new leukocyte-dependent, blood-borne host defence mechanism has been identified recently (Brinkmann et al. 2004). After exposure to pathogens, various types of WBC have been shown to release macromolecular compounds contained in their cytosol, mitochondria and nucleus (granule proteins and chromatin) to sequester and kill the aggressors. Bactericidal entanglements of DNA and proteins, referred to as neutrophil extracellular traps (NETs), have been observed *in vivo* in various pathological conditions (Clark et al. 2007; Fuchs et al. 2010) and *in vitro* upon contact with CDCs of different sizes and shapes (Bartneck et al. 2010). The impact of this newly-identified phenomenon on CDCs clearance remains to be investigated.

1.2.4.2. Plasma proteins and the opsonin/dysopsonin system

CDCs interact with plasma proteins in the bloodstream. These interactions are guided by the physicochemical properties of CDCs (Lundqvist et al. 2008) and highly influence their circulation time as well as their deposition in tissues (Semple et al. 1998; Moghimi et al. 2001; Owens et al. 2006). Proteins that increase or decrease the clearance of exogenous particles by the MPS (see sections 1.2.5 and 1.2.6) are called opsonins and dysopsonins, respectively (Semple et al. 1998).

Albumin

Human albumin is a 67-kDa protein which is the most abundant in plasma (30-45 g/L). Among its multiple functions, it regulates osmotic pressure and acts as a carrier for different molecules. The plasma half-life of albumin is 19-22 days. It is protected from elimination *via* recognition by the neonatal Fc receptors (FcRn), which prevent its

catabolism in endothelial cells and ensures protein reabsorption by proximal tubules after glomerular filtration (Anderson et al. 2009).

Upon CDC injection, rapid and non-specific interactions with albumin occur through ionic and hydrophobic interactions (Blunk et al. 1996; Gaucher et al. 2009). Although early deposition of albumin on the surface of CDCs can protect them from further opsonisation with other proteins, these contacts are transient, and albumin can be easily displaced by other less-abundant proteins with higher affinities (Alléman et al. 1997; Röcker et al. 2009). This phenomenon, called the Vroman effect (Blunk et al. 1996), limits the dysopsonic properties of albumin. Indeed, CDCs bearing physically adsorbed albumin show only marginally increased circulation times (Ogawara et al. 2004). Nevertheless, the abundant and constitutive nature of the protein sustains interest in the development of albumin-based CDCs to augment the hydrodynamic volume of drugs and reduce their renal clearance (Kratz 2008). These range from albumin-drug conjugates (Hartnung et al. 1999) to systems scavenging the protein *in vivo* through either high-affinity binding (Dumelin et al. 2008) or *in situ* covalent bond formation on the reactive functions of albumin (Kratz 2008; Anderson et al. 2009). More abundant clinical experience comes from albumin-coated paclitaxel nanoparticles commercialized in 2005 (Abraxane[®]) (Cortes et al. 2010). Enhanced responses observed in the clinic with this CDC can be attributed to higher injected drug doses permitted by improved tolerance compared to solvent-formulated taxanes. However, increasing evidence also demonstrates that the tumour expression of SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), which strongly interacts with albumin, could positively influence the distribution and antitumour activity of the albumin-formulated drug (Desai et al. 2008; Desai et al. 2009). SPARC is over-expressed in various types of cancers and usually contributes to the poor prognostics of patients because of its stimulatory effect on tumour progression (Desai et al. 2009). It remains to be seen if the positive interactions between SPARC-expressing tumours and albumin in formulation can be generalized to other albumin-containing CDCs.

Lipoproteins and apolipoproteins

Lipoproteins (chylomicrons, high-density (HDL), low-density (LDL), and very-low-density lipoproteins (VLDL)) are responsible for lipid transport in the bloodstream. Lipoproteins are spherical or discoidal particles with diameters between 3.5 to 6,000 nm. They are formed of triacylglycerides, cholesterol esters, phospholipids and different apolipoproteins (Wasan et al. 2008).

Lipoproteins and apolipoproteins can interact with hydrophobic CDCs in the bloodstream (Rodrigueza et al. 1998; Wasan et al. 2008). For instance, exchange of phospholipids between liposomes and lipoproteins can destabilize the former and trigger the release of their payload (Allen 1981). Likewise, apolipoproteins adsorption displaces albumin and other proteins from the colloid surface (Cedervall et al. 2007). It can compel CDC trafficking toward tissues rich in lipoprotein receptors (Rodrigueza et al. 1998). *Ex vivo* decoration of CDCs with apolipoproteins has been exploited for specific targeting of hepatocytes (*via* ApoE) (Rensen et al. 1995) or the central nervous system (*via* Apo A-1, Apo B-100 and Apo E) (Kreuter et al. 2007). Likewise, both *ex vivo* and *in situ* non-covalent association of nucleosides conjugates with lipoproteins has been used to protect lipophilic small interfering RNA derivatives from enzymatic degradation and increase their gene silencing activity (Wolfrum et al. 2007).

Proteins of the complement

The complement system plays a crucial role in the humoral immune responses, as a link between adaptive and innate immunity (Walport 2001; Ricklin et al. 2010). More than 30 zymogens (*i.e.* inactive enzyme precursors) and membrane-bound proteins are involved in the complement cascade. Strict regulation of this cascade prevents uncontrolled reactions against the host's cells (Zipfel et al. 2009). Complement activation, through the classical,

alternative and lectin pathways, results in enhanced clearance of pathogens *via* two mechanisms: A) increased recognition by the MPS through opsonisation and B) direct lysis of the pathogens by the membrane-attack complex.

The high plasmatic concentration of proteins involved in the complement system (around 3 g/L) (Walport 2001) results in abundant interactions with CDCs (Lundqvist et al. 2008; Gaucher et al. 2009). Activation of the cascade can lead to covalent opsonisation of the surface of particulate nanocarriers (Moghimi et al. 2001). Surface-bound complexes ensure self-amplification of the reaction and further deposition of opsonins (Walport 2001; Zipfel et al. 2009). The adsorbed protein fragments and complexes are recognized by macrophages, and trigger CDC phagocytosis (Hickey et al. 2009). In parallel, because some activated fragments of the complement are pro-inflammatory cytokines (C3a and C5a), systemic reactions (Szebeni 2005) and adaptive immunity can occur *via* chemotaxis (Ricklin et al. 2010). Multiple receptors for complement proteins exist and differ between tissues, cells and species (Gordon et al. 2005; Ricklin et al. 2010).

Complement activation by CDCs depends on the surface properties of the carrier. In particulate systems, negatively- or positively-charged (Devine et al. 1994), highly-hydrophobic (Gessner et al. 2000) or irregular surfaces (Semple et al. 1996) promote the adhesion of complement proteins. Likewise, the low radius of curvature of larger particles (> 200 nm) facilitates the deposition of opsonins and their assembly into bulkier complexes (Devine et al. 1994; Harashima et al. 1994; Vonarbourg et al. 2006). Although CDCs are often designed to minimize complement activation, the opposite can be sought for vaccination purposes. For example, hydroxyl-rich surfaces which potentiate alternative pathway activation, have been exploited to maximize complement-dependent immunization (Reddy et al. 2007). As for soluble CDCs, complement activation is not studied routinely because they lack the particle-serum interface usually necessary for protein deposition. Nevertheless, the soluble macromolecular polymers poloxamer 188 and poly(ethylene

glycol) (PEG) have been demonstrated to trigger complement activation through the mannose-binding lectin pathway *in vitro* (Moghimi et al. 2004; Hamad et al. 2008). Additional studies with soluble CDCs integrating these polymers are required to evaluate the clinical implications of such findings.

Other plasma proteins

Other plasma proteins have been shown to interact with CDCs. Deposition of immunoglobulins (IgM and IgG) on particulate CDCs enhances their clearance through cooperative effects with complement (Alléman et al. 1997; Ehrenstein et al. 2010). These proteins can specifically recognize surface epitopes or adsorb through hydrophobic interactions (Alléman et al. 1997). Although immunoglobulins are constitutively present in blood, their secretion is usually induced by immunogenic reactions (Dobrovolskaia et al. 2007; Hubbell et al. 2009). In parallel, other constitutive proteins (fibronectin, fibrinogen or C-reactive protein) could play a role on the blood clearance or biodistribution of colloids through receptor-mediated internalization (Aggarwal et al. 2009) or by increased complement activation (Ricklin et al. 2010). In the case of PEG-poly(D,L-lactic acid) (PEG-PDLLA) micelles, interactions with blood proteins (α - and β -globulins) or cell membranes have been found to destabilize micelles and facilitate the release of their payload (Chen et al. 2008a; Chen et al. 2008b). For these reasons, early kinetic, qualitative and quantitative evaluations of CDC-protein interactions should help identify potential negative effects of blood protein adsorption on the carrier's performance. During such studies, the nature of the biological fluid used should also be carefully chosen as the end result will be affected by the sampling conditions. Plasma contains anticoagulants which can interfere with complement cascade activation (Girardi et al. 2004) while serum is depleted of coagulation proteins (fibrinogen and others) (Leroux et al. 1995).

Hydrophilic coating to reduce protein adsorption

Shielding the surface of particulate CDCs with hydrophilic coronas has been demonstrated to consistently decrease protein adsorption and improve the blood circulation times.^{68, 69} Among the polymers employed, PEG is clearly the gold standard.^{26, 70} The ideal characteristics of PEG coating for enhanced protein repulsion and blood circulation kinetics depend on the CDC type. Generally, the minimum effective PEG molecular weight is around 2 to 5 kDa⁷¹ with further improvements sometimes noticed upon increasing chain length to 20 kDa.^{72, 73} Ideal chain density also varies: some CDCs do not benefit from PEG contents above 5-10 mol%⁷¹ while others need between 20-30 mol% to be long-circulating.⁷² Ideal PEG content depends on polymer length, and architecture, as well as on colloid type, its stability, its size and its surface properties. At very low PEG-chain density, the polymer adopts a random-coil structure where macromolecules freely bend and rotate around their anchoring point. At very high grafting densities, the chains cannot spread in space without constraints from their neighbours, and PEG molecules adopt a more extended structure, resembling a brush on the CDC surface. For most systems, increasing PEG density to pass from coil to brush conformation has a positive influence on *in vivo* circulation times. Nevertheless, the concept of long-circulation times remains highly relative and strongly depends on the type of system under study. Comparison of the circulation times of different PEG-coated and non-PEG-coated CDCs appears in Fig. 1.16.

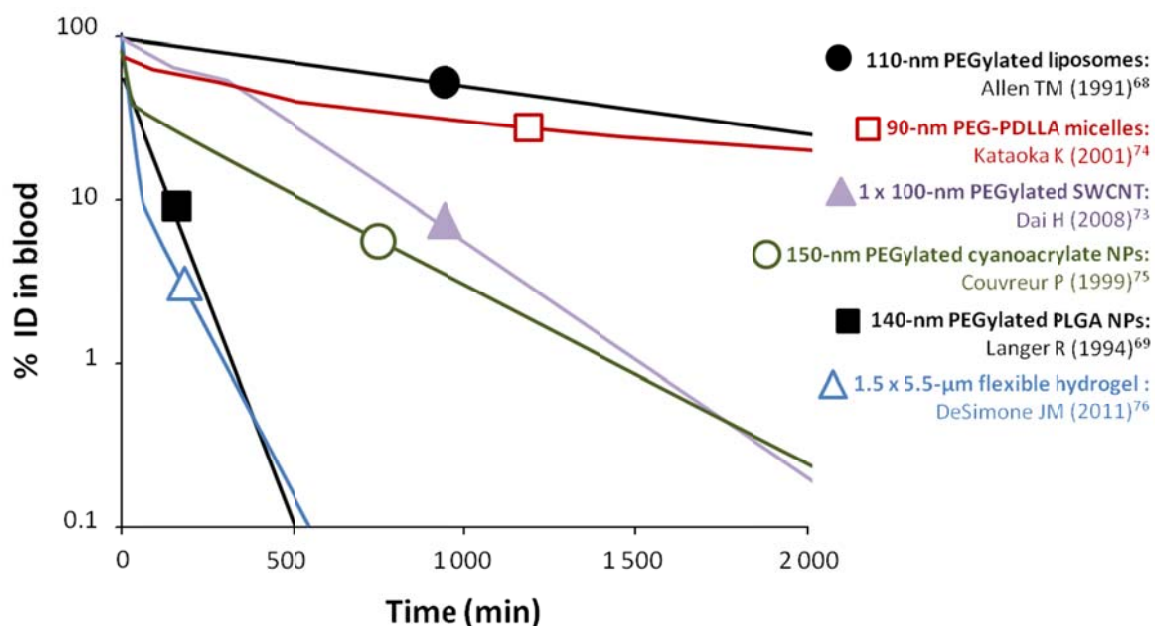


Figure 1.16 Comparison of the pharmacokinetic profiles of different long-circulating formulations in mice. Formulations are identified by the senior author's name in the publications cited. Data were extracted from image analysis. When multiple CDC formulations were presented, the formulation with the longest circulation time was used. Values expressed in %ID/g were multiplied by total blood weight (7 % of the total weight of the larger mice in the reference's experimental section).

Although PEG coating limits biofouling, it never totally abrogates protein deposition and complement activation.⁷⁷ Furthermore, the nature of the PEG-derivative used to coat CDCs can even impact on residual complement activation. PEGylated phospholipids do not trigger complement activation *per se*, but the patterning of their negative charge at the solid-liquid interface of CDCs has been shown to contribute to complement activation.⁷⁸ Furthermore, for a given surface, increasing the density of PEG sheathing can switch complement cascade initiation from the classical to alternative and lectin pathways.⁷⁹ These observations are not anecdotal since PEG-related pseudoallergic reactions observed in the

clinic might be attributed to complement activation.⁸⁰ New approaches to prevent protein adsorption on particulate CDCs are therefore still needed.⁸¹

1.2.5. Filtration by the kidney

1.2.5.1. Kidney Morphology

The kidneys are responsible for blood filtration. Their parenchyma is separated in two sections, the cortex and the medulla (Fig. 1.17A), which comprise different parts of the nephron, the basic kidney functional unit (Fig. 1.17B). Blood filtration occurs in the cortex, through the *glomerulus*, a structure formed of a glomerular capillary network (Fig. 1.17C). The filtering apparatus in the glomerular capillary network is composed of three consecutive elements that are essential for physiological functions (Fig. 1.17D). The first component is the highly fenestrated endothelium. The fenestrations, 60 to 80 nm in size, are covered by a 200- to 300-nm thick glycocalyx layer adsorbed on the luminal side of the endothelium (Haraldsson et al. 2008). This flexible glycoprotein barrier is anchored on the surface of endothelial cells and restricts the passage of blood components. The second structure that is essential to the control of solute passage into urine is the glomerular basement membrane (GBM). It is a 240- to 370-nm hydrated, fibrous, network layer of type IV collagen containing laminin, entactin, and proteoglycan, with high 55eparin and chondroitin sulphates content (Haraldsson et al. 2008). The fibrous mesh of collagen and the abundant anionic charges dispersed in the GBM could together contribute to restrict fluid flux and the passage of negatively-charged solutes. However, it is now believed that the GBM alone cannot be responsible for the high permselectivity of the glomerular filtration process (Haraldsson et al. 2008). The third component of the glomerulus is the visceral layer of Bowman's capsule that is composed of podocytes. These highly-differentiated cells outline the glomerular capillaries. Podocytes interact with the GBM *via* numerous interdigitated foot processes that form filtration slits (Haraldsson et al. 2008).

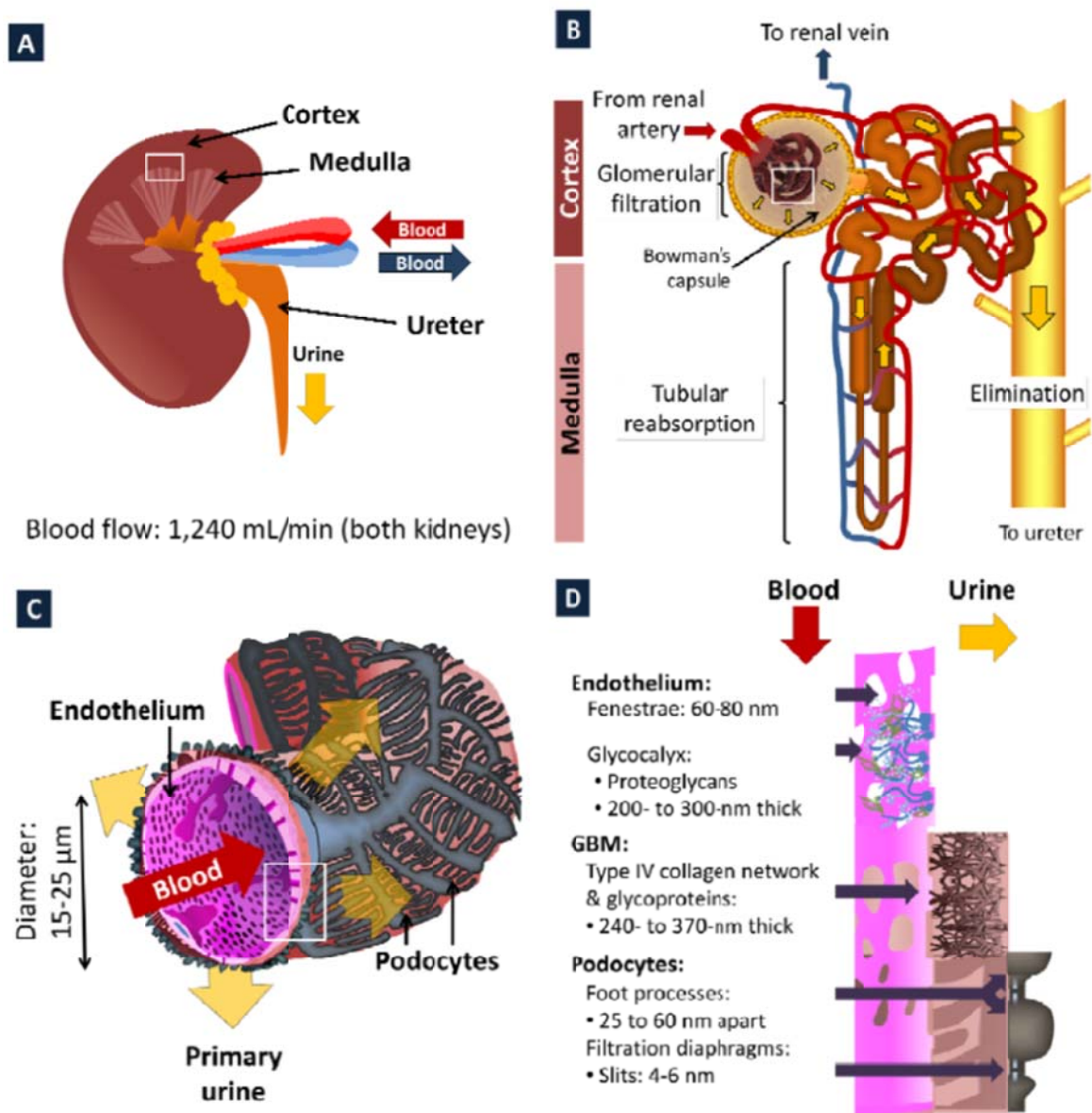


Figure 1.17 Blood filtration in the kidney. **A.** The kidney. The kidney parenchyma is separated between the cortex and the medulla. **B.** The nephron. Approximately one million nephrons span both regions and are responsible for blood filtration. Blood filtration occurs in the glomerulus. Bowman's capsule collects the filtrate before its transit through the tubules where it can be concentrated. The collecting duct gathers urine from multiple nephrons for exit to the ureter. **C.** The glomerular capillary. The glomerular capillaries are

composed of a highly-fenestrated endothelium, the glomerular basal membrane (GBM) and the podocytes. **D.** The filtration apparatus. Three distinctive structures of the component together exert qualitative and quantitative restrictions over the filtrate. The white squares delimit the zones zoomed in the following panel.

1.2.5.2. Glomerular filtration

Convective and diffusive forces in the glomerulus capillaries compel the filtration of blood solutes to Bowman's capsule. Structures of the glomerulus exert qualitative and quantitative control on what is filtered. Proteins with hydrodynamic diameters (D_H) smaller than 5 to 6 nm are freely filtered by the glomerulus, while larger solutes are retained. For globular proteins, this size is equivalent to a molecular weight around 60 kDa. The molecular weight limit can be lower for non-globular proteins (Maack et al. 1979).

Grafting polymer chains to drugs is now a common method of circumventing renal filtration and increasing biological half-life (Kopecek et al. 2001). Still, today, PEG remains the most frequently utilized polymer to augment the D_H of therapeutic molecules (Harris et al. 2003; Gao et al. 2010), but other polymers (Seymour et al. 1987; Li et al. 1999) as well as synthetic linear polypeptides (Schellenberger et al. 2009; Zalevsky et al. 2010) have also been employed for this purpose. Several soluble CDCs based on non-PEG polymers are currently in preclinical and clinical development stages. The excretion limits of different macromolecules are presented in Table 1.2. Macromolecules with sizes situated around the filtration threshold, must distort and reptate through the pores in order to be filtered. Factors affecting their deformability, such as hydration, flexibility as well as intra- and intermolecular architecture, therefore highly influence their glomerular filtration (Bertrand et al. 2009; Fox et al. 2009).

Tableau 1.2 The glomerular filtration cut-offs of different polymers.

Polymer	<i>Cut-off</i> (kDa)	Charge at pH 7.4	Biodegradable	Ref.
Pullulan	~ 29	0	Yes	(Yamaoka et al. 1993)
Dextran	~ 29	0	Yes	(Yamaoka et al. 1993)
Linear PEG	30	0	No	(Yamaoka et al. 1994b)
PVA	30	0	No	(Yamaoka et al. 1995b)
PNIPAM*	32	-	No	(Bertrand et al. 2009)
PHPMA	45	0	No	(Seymour et al. 1987)
Gelatin (alkaline-type, isoelectric point : 5.1)	55	-	Yes	(Yamaoka et al. 1994a)

PEG : poly(ethylene glycol) **PVA** : poly(vinyl alcohol) **PNIPAM** : poly(*N*-isopropylacrylamide)
PHPMA : poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide)

*Copolymerized with 5 mol% methacrylic acid to ensure solubility at 37°C

Most particulate CDCs are too large to be filtered without prior biodegradation. Exceptions include quantum dots, shown to be filtered for diameters up to 5.5 nm (Choi et al. 2007; Choi et al. 2010b), and carbon nanotubes (Liu et al. 2008; Schipper et al. 2008). The unique shape of carbon nanotubes might promote their renal clearance by favourable orientation in the blood flow (Lacerda et al. 2008; Ruggiero et al. 2010) or distinctive transcellular transport mechanisms (Kostarelos et al. 2007). Nonetheless, additional studies

are still needed to confirm that their renal filtration is sufficiently fast to prevent accumulation and toxicities in a clinical context.

1.2.5.3. Tubular reabsorption

Once a solute is filtered in Bowman's capsule and reaches the proximal and distal tubules, it can be reabsorbed by the epithelial cells. Tubular reabsorption regulates the elimination of ions and proteins. It occurs through receptor-mediated and fluid phase endocytosis. After internalization, protein-containing vesicles can transcytose back to the peritubular circulation (*e.g.*, *via* FcRn) (Anderson et al. 2009) or can be catabolised in lysosomes. In the latter case, catabolic products are subsequently released into the systemic circulation (Maack et al. 1979).

Soluble CDCs filtered through the glomerulus can also be reabsorbed. The accumulation of PEG-protein conjugates in intracellular vacuoles inside tubular epithelial cells has been reported (Bendele et al. 1998). In this case, the protein moiety is essential for endocytosis by tubular cells, and it is believed that incomplete catabolism of the non-biodegradable polymer leads to sequestration in intracellular organelles. Although the vacuolation process appears to be transient and no signs of toxicity were witnessed in published studies, one should be aware that data remain limited and risk could increase upon chronic exposure.

1.2.6. Capture by the liver

1.2.6.1. Morphology

The liver engages in numerous metabolic, immunological and endocrine functions. It receives blood from the gut and the heart *via* the portal vein and hepatic artery, respectively (Fig. 1.18A). Blood circulates through a permeable discontinuous capillary network, (the sinusoids) to reach the central and hepatic veins (Fig. 1.18B). The sinusoids are 5 to 10 μm -

wide blood vessels having a fenestrated epithelium without any basal membrane. The size of the fenestrations (100 to 150 nm depending on the animal species) (Wisse et al. 2008; Jacobs et al. 2010) allows almost unrestricted passage of plasma components to the perisinusoidal space (or space of Disse), where the cords of parenchymal cells (hepatocytes) are situated (Wisse et al. 2008; Jacobs et al. 2010). Inside the sinusoid capillaries, the Kupffer cells are responsible for phagocytic activity of the liver. These non-parenchymal cells belong to the MPS and represent 80-90 % of the total body macrophage population. This defence system was formerly known as the reticuloendothelial system, but the name became obsolete when it was understood that endothelial cells are not macrophages responsible for the clearance of pathogens.

1.2.6.2. Phagocytosis in Kupffer cells

Phagocytosis occurs after the multivalent contacts of the colloid with the macrophage and spreading of the cell membrane around the particle to engulf it. After ingestion, phagocytic vesicles (phagosomes) coalesce with intracellular organelles containing digestive proteins and an acidic internal pH, to mature into phagolysosomes and degrade the internalized colloid. The colloid is then eliminated by exocytosis after degradation or sequestered in residual bodies within the cell if it cannot be digested. Contacts between CDCs and macrophages occur *via* the recognition of opsonins on the CDC surface or through interactions with scavenger receptors on Kupffer cells. The size and radius of curvature of the colloids highly influence both CDC-cell contacts and internalization (Harashima et al. 1994; Champion et al. 2008; Jiang et al. 2008). Because Kupffer cells have a ruffled surface, privileged interactions and optimal phagocytosis occur when the colloids have a diameter between 1 and 3 μm (Champion et al. 2008; Doshi et al. 2010a). Smaller particles offer less cooperative contacts with the cell membrane (Jiang et al. 2008), and exploit other entryways into the cells (*e.g.*, fluid phase pinocytosis or endocytosis) (Petros et al. 2010). Oppositely, larger particles cannot maximize contacts

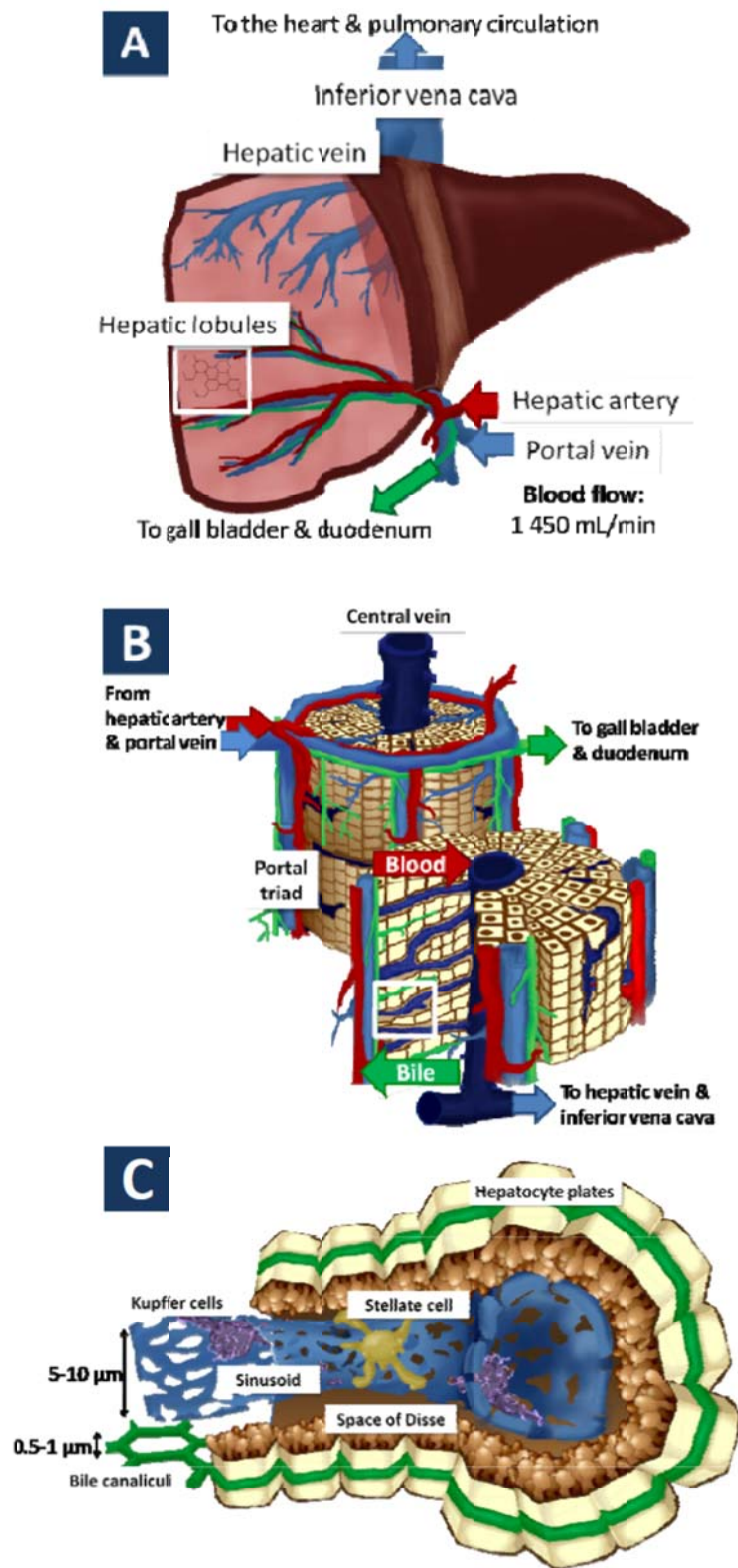


Figure 1.18 Structure of the liver. **A.** The liver. The liver is perfused by the hepatic artery and portal vein. Blood exits through the hepatic vein into the inferior vena cava, and bile drains into the gall bladder. **B.** The liver lobules. The liver parenchyma is composed of hexagonal lobules containing hepatocyte plates and the sinusoids. The blood in each lobule comes from the portal vein and hepatic arteries; it drains out through the central vein and into the inferior vena cava. **C.** The liver sinusoid. Fenestrated hepatic sinusoids where the arterial and portal veins merge. . The white squares delimit zones zoomed in the following panel.

with the cell surface and require extensive cytoskeleton remodelling to be internalized. *In vitro*, the upper size limit for phagocytosis has been determined to be around 20 μm of diameter or when the volume exceeds more than 3 times that of the macrophage (Cannon et al. 1992). Frustrated phagocytosis occurs when the membrane is stretched to the maximum without engulfing the whole system (Cannon et al. 1992).

The shape of CDCs also highly influences internalization (Champion et al. 2006; Gratton et al. 2008; Champion et al. 2009; Doshi et al. 2010a). For large particles ($> 1 \mu\text{m}$), *in vitro* studies have shown that while elongated shapes promote interactions with the surface of macrophages (Sharma et al. 2010), high-aspect ratios (*i.e.* the larger over the smaller dimension) hinder optimal membrane spreading and complete phagocytosis (Champion et al. 2006; Champion et al. 2009; Doshi et al. 2010a). For smaller particles (size $< 1 \mu\text{m}$) shape influences the speed of internalization and the different pathways used to enter the cells (Gratton et al. 2008).

The impact of particle shape on biodistribution and circulation has been documented *in vivo* (Geng et al. 2007; Decuzzi et al. 2010). In comparison to their spherical counterparts, non-spherical particles are steered into distinctive tissue distribution patterns by hydrodynamic forces in the bloodstream (Decuzzi et al. 2010; Doshi et al. 2010b).

Filomicelles with very high aspect ratios (> 10) and longitudinal lengths around $10\ \mu\text{m}$ achieve considerably longer circulation times than spherical particles (Geng et al. 2007). The abovementioned impaired phagocytosis of filomicelles could partially explain the enhanced blood residence times. However, elongated shape might not be the sole factor responsible for prolonged circulation times as other high-aspect ratio systems with smaller longitudinal length (e.g., carbon nanotubes) experience much faster clearance (Liu et al. 2007; Liu et al. 2008).

Flexibility and deformability also influence blood circulation times and uptake by macrophages (Beningo et al. 2002; Banquy et al. 2009). An *in vitro* experiment on Fc-receptor-mediated phagocytosis, showed that large opsonised rigid particles were internalized preferentially in comparison to their softer counterpart. In this case, colloid stiffness influenced the way the macrophage receptors activated actin recruitment to shape the phagocytic cup (Beningo et al. 2002). The flexibility of smaller hydrophilic CDCs ($< 200\ \text{nm}$) was found to affect *in vitro* kinetics and internalization pathways in macrophages (Banquy et al. 2009) and other non-phagocytic cells (You et al. 2009). *In vivo*, the flexibility and deformability of CDCs impact on their tissue distribution and retention. Like RBC, some very flexible colloids have been reported to reenter the circulation after initial sieving through organs of the MPS (Merkel et al. 2011).

Because CDCs capture by the Kupffer cells shortens their circulation time in the bloodstream, strategies to inhibit phagocytosis have been explored to prolong biological half-life. It has been demonstrated in rodents that increasing the dose of empty CDCs enhances their plasma circulation time (Allen et al. 1991a; Oja et al. 1996; Panagi et al. 2001). A decrease in the capacity of Kupffer cells to clear CDCs from the bloodstream is deemed to be responsible for this enhanced blood exposure (Chow et al. 1989). The impact of the saturation process depends on the extent of MPS capture of the formulation. Only CDCs that are highly captured by Kupffer cells induce this effect (van Etten et al. 1998). CDCs designed to evade the MPS (with PEG- or other hydrophilic coatings) do not show enhanced circulation times with increases in dosage up to $300\ \text{mg/kg}$ (Allen et al. 1991a;

Panagi et al. 2001). Two phenomena can explain the dose-dependent increment in circulation time: depletion of plasma opsonins (Oja et al. 1996) or saturation of macrophage phagocytic capacity (Harashima et al. 1993; Semple et al. 1998). Kupffer cell uptake functions can also be altered with the administration of CDCs containing cytotoxic drugs that have a deleterious effect on the macrophages (Gabizon et al. 2002).

1.2.6.3. Targeted delivery to the liver

Hepatocytes are functional units responsible for most of the metabolic and secretory activities of the liver. Small CDCs (< 150 nm) that avoid capture by Kupffer cells can diffuse out of the sinusoids through the fenestrations and reach the hepatocyte plates. These cells can take up colloids through pinocytosis and receptor-mediated endocytosis (Synnes et al. 1999). Improved delivery to the parenchyma is achieved with small colloids (≤ 50 nm) that can diffuse deeper in the perisinusoidal space (Allen et al. 1991b; Ogawara et al. 1999b; Wisse et al. 2008). Specific targeting of hepatocyte receptors can also be achieved. The most commonly exploited target is the asialoglycoprotein receptor (AGPR) that recognizes carbohydrates (mainly galactose and *N*-acetylgalactosamine) with variable affinity (Wu et al. 2002). Since AGPR-positive vesicles transit to the lysosomes, the increasingly acidic and oxidative conditions in organelles after endocytosis must be taken into account when targeting this pathway. Another approach consists of decorating CDCs with hepatocyte-targeting lipoproteins either before administration (Rensen et al. 1995; Wolfrum et al. 2007) or *in situ*, after injection (Bijsterbosch et al. 2000). Although effective targeting to hepatocytes can be achieved, the ubiquitous nature of lipoprotein receptors in different tissues can lead to non-specific distribution and subsequent side-effects (Wasan et al. 2008). Finally, because non-parenchymal liver cells also possess physiological and pathological functions, their targeting can sometimes be desirable. Scavenging receptors can serve to target Kupffer and endothelial cells (Bijsterbosch et al. 2000), while coupling vitamin A on the surface of CDCs revealed an effective way of delivering actives to stellate (Ito) cells that play a fundamental role in liver fibrosis (Sato et al. 2008).

1.2.6.4. Biliary excretion.

Bile is composed of water, bile acids, cholesterol, phospholipids, and proteins. Hepatocytes regulate passage from the space of Disse to the bile canaliculi (Fig 1.19). Various active transporters are responsible for the excretion of small molecules (Hofmann 2007) while para- and transcellular transport is available for high molecular weight compounds (Ellinger et al. 2010). Vesicular-dependent transcytosis occurs either through fluid-phase or receptor-mediated endocytosis (Fig. 1.19). The latter pathway either transits to catabolic lysosomes (*e.g.*, AGPR) (Munniksmma et al. 1980; Friman et al. 1993) or not (*e.g.*, polymeric IgAs) (Ellinger et al. 2010). Biliary excretion is the only excretion pathway available for non-biodegradable CDCs with D_H larger than 6 nm.

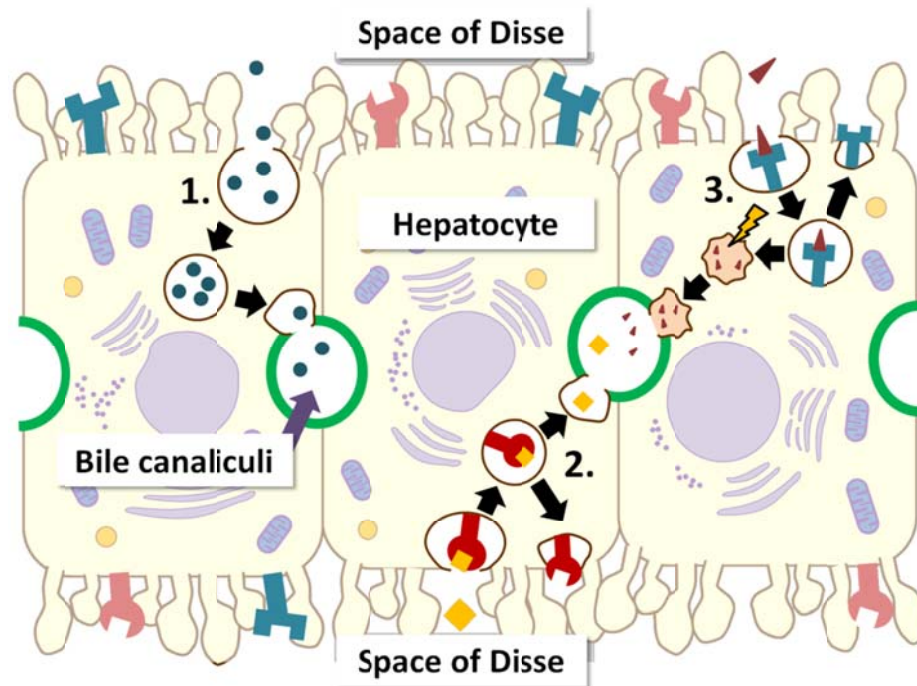


Figure 1.19 Different biliary elimination processes of colloids by hepatocytes: 1) Fluid phase endocytosis (pinocytosis), 2) Direct receptor-mediated transcytosis, and 3) Receptor-mediated transcytosis followed by passage through lysosomes

Unless they possess chemical moieties that can be recognized by hepatocytes, soluble CDCs undergo fluid-phase endocytosis to transit toward the bile canaliculi (Munniksmas et al. 1980). Experiments on isolated perfused rat livers have shown that the biliary excretion of macromolecules (PEG, dextran, inulin and proteins) seems to be independent of molecular weight, from 2 to 500 kDa (Hashida et al. 1990; Friman et al. 1993). Cationic and anionic charges on the solutes promote and hinder excretion, respectively (Hardison et al. 1989; Hashida et al. 1990). Bile excretion of particulate CDCs with sizes between 2 to 200 nm has also been reported (Ogawara et al. 1999a; Furumoto et al. 2001; Liu et al. 2008). In some cases, protein adsorption on the surface of CDCs promotes recognition by hepatocytes (Ogawara et al. 1999a). AGPR and Apo-E receptors have indeed been described as being important for CDC elimination into the bile (Furumoto et al. 2001), but other receptors that also undergo transcytosis could contribute to excretion.

Importantly, for soluble and particulate CDCs alike, the process of biliary elimination is relatively slow, the quantities excreted are usually small ($\leq 5-10\%$ of the injected dose over 8 to 48 h), and, in the case of particulate CDCs, the process can probably be saturated. Hence, the detection of small CDC quantities in bile does not ensure that this elimination pathway will significantly contribute to its removal from the body.

1.2.7. Sieving through the spleen

1.2.7.1. Morphology and function.

The spleen is a large, highly-irrigated, lymphatic organ. It participates in storing spent blood components as well as lymphocyte maturation and recycling. Anatomically, the spleen is confined and protected by a fibrous capsule, and fibrous trabeculae shape its inner structure (Fig. 1.20.A). A fraction of splenic blood flow transits through the closed vasculature with the remainder reaching the open circulation, where small arteries empty directly into the parenchyma (Fig. 1.20.B) (Moghimi 1995; Mebius et al. 2005). The spleen parenchyma is divided between the red and white pulps. The red pulp is formed by a

network of reticular fibres containing macrophages and senescent RBC. It is engaged in the filtration of pathogens and old erythrocytes from blood (Fig. 1.20.C). The white pulp, situated in the vicinity of the arteries, is involved in the proliferation of lymphocytes (both B and T types). The marginal zone, delimiting the outer border of the white pulp, is composed of specialized macrophages. Efferent lymph vessels leave the spleen to reach the lymphatic circulation. The spleen architecture varies between species (Demoy et al. 1999; Mebius et al. 2005). The most evident distinction is the existence of sinusoidal (human, rat) and non-sinusoidal (mice) splenic circulations. Judicious interpretation must be applied when comparing results between animal models. For example, distinct regions of the spleen contribute differently to particle retention in sinusoidal and non-sinusoidal spleens (Demoy et al. 1999).

CDCs retention in the spleen is usually undesired because it can lead to immunogenic reactions (see the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon described below) (Dobrovolskaia et al. 2007). Because of the differences in blood flow between liver and spleen, the splenic delivery is inversely related to hepatic uptake (Allen et al. 1991a). Therefore, PEGylated CDCs that avoid uptake in the liver are delivered to the spleen in higher amounts compared to non-PEGylated colloids (Moghimi 1995; Peracchia et al. 1999). The architecture of the splenic parenchyma is highly tortuous, and its reticular fibre meshwork decrease blood shear rates, maximizing interactions between blood components and splenocytes (Fig. 1.20.C). Moreover, extravasated colloids must squeeze through the elongated fenestrations of the sinusoids to reenter the venous circulation. Physiologically, this process results in the splenic retention (and subsequent phagocytosis) of senescent erythrocytes (Mebius et al. 2005).

For CDCs, the physicochemical factors that limit passage through the sinusoidal sieve (high rigidity, large size (> 200 nm) and elongated or irregular shapes) will therefore contribute to their sequestration in the spleen (Demoy et al. 1999; Liu et al. 2008; Cho et al. 2009). Sufficiently flexible particles can be stored in the spleen upon initial sieving and, if they avoid phagocytosis, are gradually released in the bloodstream within a few days

(Merkel et al. 2011). Further developments and understanding of this strategy are still needed to evaluate its potential for the delivery of active compounds.

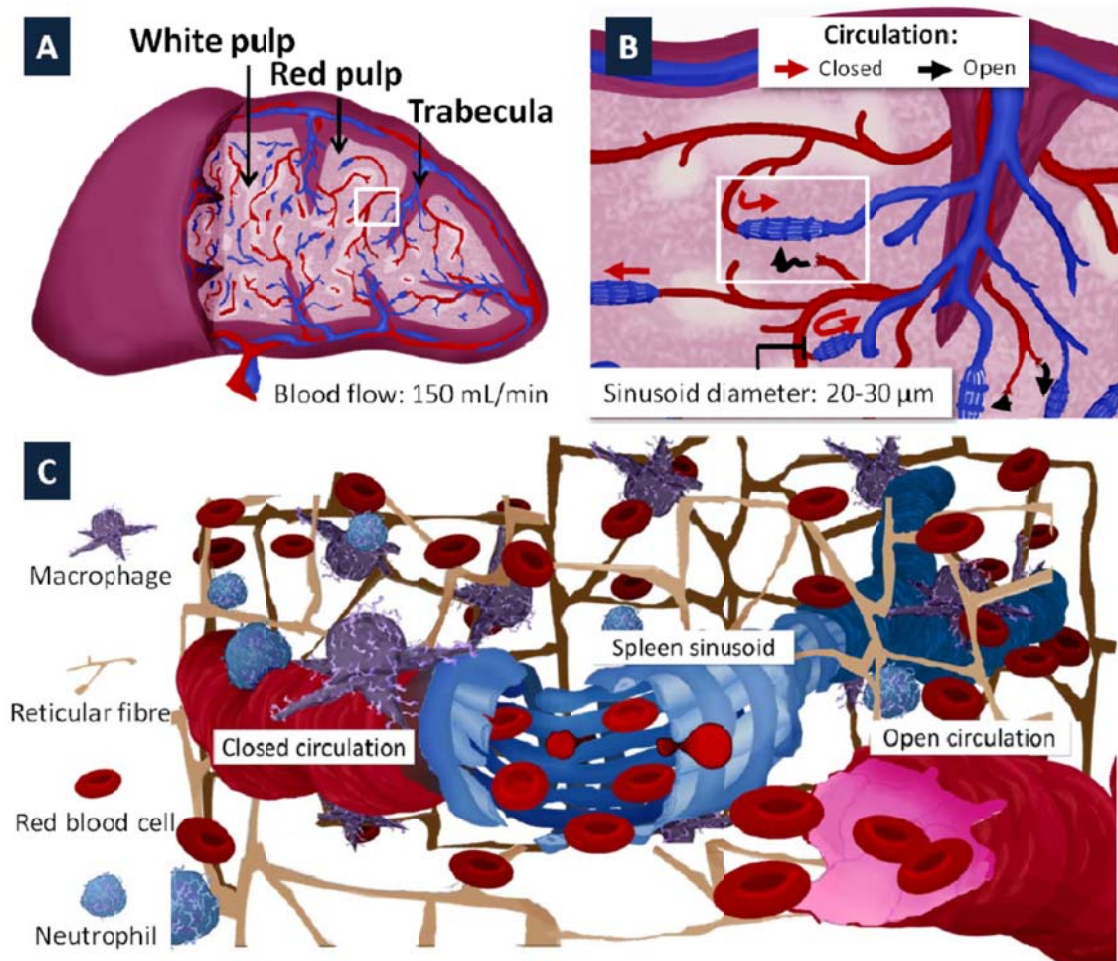


Figure 1.20 Structure of the spleen. **A**. The spleen parenchyma is protected by a fibrous capsule and is composed of the white and red pulps. **B**. From the trabecular circulation, the arteries empty into the splenic sinusoids (closed circulation) or directly into the parenchyma (open circulation). **C**. Reticular fibres confer a highly-tortuous architecture to the red pulp, and blood components must squeeze through the 200-nm wide fenestration of the sinusoids. The white squares delimit zones zoomed in the following panel.

1.2.7.2. The ABC phenomenon

Preclinical pharmacokinetic and biodistribution studies generally involve the administration of a single CDC dose. Nonetheless, experiments have revealed that the blood clearance of a second CDC dose highly increases after initial sensitization. This phenomenon, referred to as the accelerated blood clearance (ABC) effect, has been observed for various CDCs (*e.g.*, liposomes (Laverman et al. 2001), lipid complexes (Tagami et al. 2009), and polymeric nanoparticles (Ishihara et al. 2009)).

The ABC effect is divided into two phases, initial sensitization (induction) and effectuation stage. During induction, direct CDC interactions with B cells in the spleen induce antibody secretion (Judge et al. 2006; Ishihara et al. 2009). Within 2 to 4 days of the first injection, the antibody titer in blood increases, and the effectuation phase begins. CDCs injected during this period are opsonised by circulating antibodies and rapidly cleared by the liver. The blood circulation times of subsequent doses are much shortened compared to the values observed with the first injection. The ABC effect gradually decreases over 2 to 4 weeks. The ABC effect is more evident when CDCs are PEGylated. This can be explained by differences in the initial circulation profiles. Even without prior sensitization, non-PEGylated CDCs are rapidly opsonised and captured by the liver. No effect on their clearance is thus generally discernible with the induction of circulating antibodies. Conversely, PEGylated CDCs are designed to slow down non-specific capture by the MPS. The presence of specific interacting antibodies greatly enhances their clearance.

The secreted antibodies are mainly IgMs (Ishihara et al. 2009), but IgGs have also been reported (Judge et al. 2006). The specific epitopes targeted by the immunoglobulins are still unclear, because high doses of non-PEGylated CDCs (> 5 mg/kg) can induce the ABC effect (Laverman et al. 2001; Ishida et al. 2004). As with most immunization processes, the factors affecting the ABC induction phase rely on a subtle balance between immune responses and tolerance. Particulate CDCs possess characteristics – submicrometer size and

repetitive surface architecture – similar to those of pathogens which can stimulate immunogenic reactions (Bachmann et al. 2010). The nature of the cargo also has an effect. Nucleic acids further enhance immunogenicity (Judge et al. 2006; Tagami et al. 2009) while cytotoxic drugs have a deleterious effect on splenocytes and prevent the initiation of ABC (Laverman et al. 2001; Ishida et al. 2006). Interestingly, high doses (> 5 mg/kg) of PEGylated CDCs seem to induce tolerance (Ishida et al. 2005; Ishida et al. 2006; Tagami et al. 2009).

1.2.8. Perspectives

The body's clearance mechanisms for clearing colloids highly depend on their size, shape, and surface characteristics. In recent years, contemporary chemistry and material science have evolved to allow thorough control of these properties. As a result, the number of potentially different CDCs has become virtually unlimited. In front of the plethora of available nanomaterials, specific applications must therefore dictate optimization of colloid characteristics. The development of efficient nanomedicines requires a thorough understanding of the body characteristics. To potentiate progress at each step of the CDC development process, complete characterization of their interactions with biological milieus, as well as critical comparisons with data from existing systems are necessary. Under similar conditions, the concept of “long-circulating” differs highly from one CDC to another. Each new system must, therefore, be positioned according to previously-established standards. Similarly, routinely integrating head-to-head comparisons between novel systems and other formulations will shed more objective light on the technical advances achieved with each innovation. Efficient and safe formulations will mature only when clinical considerations are taken into account early in the development of materials. In this field, the significance of nanotechnological achievements can sometimes eclipse the remote perspective of therapeutic applications. Nevertheless, when the final objective is

delivery or imaging purposes, the fabrication of complex nanostructures should never occult important biological considerations. The true challenge of nanomedicines lies into conciliating innovative nanomaterial advancements with a realistic clinical perspective.

1.2.9. Acknowledgements

Support from the Swiss National Science Foundation (ID 31003A_124882) and the Canada Research Chair program are acknowledged. N.B. received a scholarship from Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

Chapitre 2. Objectifs et hypothèse de recherche

2.1. Objectifs généraux et hypothèse de recherche

L'objectif principal de cette thèse est d'utiliser les outils de pharmacocinétique (PK) pour approfondir le développement préclinique de différentes formulations liposomales. La partie expérimentale de cette thèse est séparée en deux sujets distincts. D'une part, ces travaux portent sur la PK et la biodistribution d'un polymère utilisé pour la préparation de liposomes sensibles au pH. D'autre part, des liposomes possédant un gradient de pH transmembranaire pour le traitement des intoxications médicamenteuses ont été mis au point. Dans ces deux parties, l'hypothèse de recherche est qu'une caractérisation PK adéquate permet de mieux comprendre les interactions des colloïdes dans l'organisme et de faciliter la mise au point de formulations efficaces et sécuritaires.

2.2 Objectifs spécifiques

2.2.1 Étude de la pharmacocinétique de poly(NIPAM-*co*-MAA) pour la mise au point de formulations liposomales sensibles au pH.

À la fin des années 1990, le poly(NIPAM-*co*-MAA) a été développé dans notre laboratoire pour la mise au point de formulations liposomales sensibles au pH (Meyer et al. 1998; Zignani et al. 2000; Roux et al. 2002a; Roux et al. 2002b; Roux et al. 2003; Roux et al. 2004). Ces travaux ont permis de mettre en évidence le potentiel de ce polymère et de justifier le développement préclinique d'une formulation liposomale sensible au pH à base de 1- β -D-arabinofuranosylcytosine pour le traitement de la LMA (Simard et al. 2009; Simard et al. 2010).

Ce projet de recherche a été mené parallèlement aux travaux du Dr Pierre Simard, afin de poursuivre le développement préclinique de la formulation liposomale sensible au pH utilisant le poly(NIPAM-*co*-MAA). Il avait pour but de caractériser le comportement systémique et le profil d'élimination du copolymère afin de déterminer les propriétés physicochimiques optimales pour assurer efficacité et innocuité. Parce qu'il s'agit de la première étude de pharmacocinétique et d'élimination de copolymères à base de NIPAM, les informations recueillies dans ce travail sont indispensables au développement de toutes formulations pharmaceutiques utilisant ce polymère. Ces travaux s'ajoutent à d'autres visant à mieux comprendre le comportement *in vivo* des macromolécules pouvant se retrouver dans la circulation sanguine lors de leur utilisation en vectorisation.

Les objectifs spécifiques de ces travaux étaient de :

- a. Synthétiser des polymères radiomarqués possédant différentes propriétés (masse molaire, point de trouble, lipophilie).
- b. Évaluer la pharmacocinétique et la biodistribution de ces polymères chez des rats sains, en s'attardant particulièrement sur les voies d'élimination empruntées.
- c. Déterminer le seuil de filtration glomérulaire de ce polymère non-biodégradable.
- d. Identifier le polymère possédant les meilleures caractéristiques de circulation pour permettre la fabrication de liposomes sensibles au pH.
- e. Comparer la pharmacocinétique et la biodistribution du polymère choisi lorsqu'injecté seul ou ancré dans la membrane des liposomes.

2.2.2 Développement d'une formulation liposomale à gradient de pH transmembranaire pour le traitement des intoxications médicamenteuses.

À la fin des années 1990, Mayer et collaborateurs (Mayer et al. 1999) ont utilisé des liposomes possédant un gradient de pH transmembranaire pour modifier la pharmacocinétique de la doxorubicine afin d'en améliorer les propriétés anticancéreuses. Ces résultats n'ont eu à l'époque qu'une portée limitée. Cependant, ils ont inspiré une vague de travaux dans notre laboratoire qui visaient à explorer divers colloïdes pour la détoxication des drogues (Dhanikula et al. 2006; Dhanikula et al. 2007a; Dhanikula et al. 2007b; Leroux 2007). Dans ces travaux, il a été démontré que des vésicules multilamellaires (sphérulites) ou des nanocapsules pouvaient être employées pour capturer différentes drogues dans les milieux biologiques *in vitro* (Dhanikula et al. 2006), *in vivo* (Dhanikula et al. 2007a) ou *ex vivo* (Dhanikula et al. 2007b).

Malgré le succès rencontré, plusieurs facteurs restreignent l'utilisation des vecteurs proposés dans ces études. Dans le premier cas, les sphérulites sont fabriquées avec un gradient de pH transmembranaire et peuvent donc séquestrer de grandes quantités de drogue par chargement actif (Dhanikula et al. 2006; Dhanikula et al. 2007b). Cependant, lorsqu'injectées dans le sang, ces vésicules sont très rapidement captées par le MPS et possèdent des temps de circulation très courts (Simard et al. 2005). Cela limite donc leur potentiel pour la détoxication *in vivo*. À l'inverse, les nanocapsules utilisées dans les études de pharmacocinétique chez la souris circulent plus longtemps, mais captent la drogue d'une manière « passive » en fonction de sa lipophilie, à la manière des émulsions lipidiques (Dhanikula et al. 2007a). Les inconvénients de ces deux types de vecteurs ont donc orientés la deuxième partie de ce travail de recherche vers le développement de liposomes à gradient de pH pour le traitement des intoxications médicamenteuses.

Les liposomes PEGylés circulent longtemps dans le sang (Allen et al. 1991b) et ils sont couramment fabriqués avec un gradient de pH transmembranaire pour favoriser l'encapsulation des drogues *in vitro* (Cullis et al. 1997; Maurer-Spurej et al. 1999). Ces

travaux visaient donc à investiguer leurs propriétés comme colloïde injectable pour la détoxification d'un médicament ionisable amphiphile modèle. Le diltiazem (DTZ), un bloquant des canaux calciques, a été choisi puisque les intoxications avec ce médicament sont présentement difficiles à traiter en clinique. Ces travaux figurent parmi les premières études s'intéressant à la capture d'une drogue par un colloïde *in vivo*. En plus d'établir des bases pour le développement d'une formulation liposomale efficace pour le traitement des intoxications médicamenteuses, ils servent aussi de preuve de concept à l'utilisation de vecteurs colloïdaux pour la détoxification.

Les objectifs spécifiques de ces travaux étaient de :

- a. Mettre au point une formulation liposomale possédant un gradient de pH transmembranaire permettant une capture optimale du DTZ.
- b. Comparer, *in vitro*, la capacité de capture de la formulation liposomale à celle de d'autres systèmes colloïdaux en développement ou utilisés en clinique.
- c. Évaluer la stabilité du gradient transmembranaire dans des conditions biologiques, *in vitro* et *in vivo*.
- d. Évaluer la capacité de la formulation à modifier la pharmacocinétique du DTZ et de son métabolite principal dans un modèle simple, chez le rat.
- e. Évaluer la capacité de la formulation à modifier l'effet pharmacologique du DTZ dans un modèle simple, chez le rat anesthésié.

Chapitre 3. Pharmacokinetics and biodistribution of *N*-isopropylacrylamide copolymers for the design of pH-sensitive liposomes

Nicolas Bertrand¹, Jackie Fleischer², Kishor M Wasan², Jean-Christophe Leroux^{1,3*}

¹Canada research chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal,
PO box 6128 Downtown Station, H3C 3J7, Montreal, Québec, Canada

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of British Columbia, V6T 1Z3
Vancouver, British Columbia, Canada,

³ ETH Zürich, Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Chemistry and
Applied Biosciences, HCI J 398 Wolfgang-Pauli-Str. 10, 8093 Zürich, Switzerland

*Corresponding author.

Article publié dans *Biomaterials* (2009), 30(13); 2598-2605

Keywords: Poly(*N*-isopropylacrylamide); pharmacokinetics; biodistribution; pH-sensitivity; pH-sensitive liposomes; drug targeting

3.1. Abstract

The purpose of this work was to characterize the pharmacokinetics (PK) and biodistribution of pH-responsive *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) copolymers, and to determine the impact of some physicochemical parameters on their biological profiles. Radiolabeled copolymers of NIPAAm and methacrylic acid (MAA) of different molecular weight, amphiphilicity and lower critical solution temperature (LCST) were synthesized and injected intravenously to rats. The PK and excretion profiles were monitored over 48 hours. It was found that elimination occurred mainly through urinary excretion, which was principally governed by molecular weight. Above a threshold of 32,000, the polymer chains avoided glomerular filtration and presented prolonged circulation times. Moreover, the presence of alkyl moieties at the chain extremity influenced circulation time and tissue distribution of polymer chains, hypothetically through formation of micellar structures. The polymers with a LCST situated below the physiological temperature did not circulate for prolonged periods in the bloodstream and were highly captured by the organs of the mononuclear phagocyte system. Finally, the complexation of an alkylated pH-sensitive polymer with a molecular weight of 10,000 to the bilayer of PEGylated liposomes produced a drastic change in the PK parameters, indicating that the polymer remained anchored in the phospholipid bilayer in the bloodstream. These data indicate that stable pH-sensitive liposomes can be produced using excretable NIPAAm copolymers.

3.2. Introduction

Over the past 20 years, there has been a growing interest in the design and use of materials that are capable of reacting adaptively and reversibly to changing environmental stimuli [1]. Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) is a polymer endowed with such properties. Since its first report in 1968 [2], it has been the object of a tremendous number

publications and are still today among the most investigated stimuli-responsive polymers in the fields of pharmaceutical sciences [1] and biomedical engineering [3, 4]. PNIPAAm is characterized by a lower critical solution temperature (LCST), which is around 32°C in water [2]. This phase transition temperature can be modulated by copolymerization with more hydrophilic or hydrophobic monomers, and has been exploited to construct a variety of temperature-responsive delivery systems such as micelles [5-7], liposomes [8, 9], and hydrogels [10, 11]. Moreover, the introduction of ionisable moieties within the PNIPAAm structure has been shown to confer pH-sensitivity to the phase transition and been used to design pH-sensitive formulations [10-15]. Among these, pH-responsive liposomes appear as promising delivery systems for the targeting of drugs to the endosomal compartment. Indeed, our group [16-19] and others [20-22] have demonstrated that terminally-alkylated copolymers of NIPAAm and methacrylic acid (MAA) can insert in liposomal bilayers and destabilize the latter at pH values typically found in the endosomes, thereby triggering the release of the encapsulated content in the endosomal compartment. Such formulations have been shown to be stable in plasma [17, 18] and could be functionalized with monoclonal antibodies to specifically target tumoral cells [23]. Despite the amount of literature on PNIPAAm, very little is known about its biological fate *in vivo*. Indeed, to the best of our knowledge, no animal studies have been carried out so far to specifically characterize its pharmacokinetics (PK) and biodistribution patterns following intravenous (i.v.) injection. Such information is of utmost importance for scientists working with this polymer since PNIPAAm is *a priori* not biodegradable and therefore should be carefully designed to allow its clearance from the body. Elimination studies conducted with other synthetic macromolecules [24-32] have shown that excretion from the body is highly dependent on physicochemical properties, and that renal excretion is mainly controlled by the hydrodynamic volume of the polymer chains. The principal objective of the present work was to study the impact of molecular weight, amphiphilicity and LCST on the pharmacokinetics, elimination and biodistribution of NIPAAm copolymers. The information gathered from these experiments allowed the selection of a pH-responsive

polymer which was then complexed to liposomes and studied with respect to its retention in the lipid bilayer under *in vivo* conditions. It was indeed found that stable pH-sensitive liposomes could be formulated with excretable pH-responsive NIPAAm copolymers. The data of this paper emphasize the importance of selecting NIPAAm copolymers with the appropriate physicochemical parameters in order to construct a clinically viable stimuli-sensitive colloidal drug carrier.

3.3. Experimental

3.3.1. Materials

4,4'-Azobis(4-cyanovaleric acid), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide HCl (EDC), anhydrous 1,4-dioxane, NIPAAm, MAA, acrylamide (AAm), *N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), Sepharose[®] CL-4B, Sephadex[®] G-15, 30% hydrogen peroxide, isopropanol reagent grade, Spectra/Por[®] dialysis bags (molecular *cut-off* 3,500 and 6-8,000) and pyrene, were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). ¹⁴C-acrylamide (6 mCi/mmol) and ³H-cholesteryl hexadecyl ether (³H-CHE) (50-60 mCi/mmol) were obtained from American Radiolabeled Chemicals (St Louis, MO). Hionic Fluor[®] scintillation cocktail and Solvable[®] digestion solution were purchased from Perkin Elmer (Waltham, MA). Coatsome NC-50[®] egg phosphatidylcholine (96.5% purity, EPC), Sunbright DSPE-020CN[®] 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-monomethoxy-[poly(ethylene glycol)] 2000 (98.6% purity, DSPE-PEG) and Cholesterol HP[®] (99.6% purity, Chol) were purchased from NOF (Tokyo, Japan). Unstabilized HPLC grade THF was purchased from JT Baker (Phillipsburg, NJ). NIPAAm and MAA were purified as described elsewhere [18]. Water was deionized and purified with a MilliQ purification system (Millipore, Bedford, MA). All other products were used without further purification.

3.3.2. Polymer synthesis

The alkylated initiator, DODA-501, was synthesized as previously described [33], by reacting the activated precursor disuccinimidyl 4,4'-azobis(cyanovalerate) with dioctadecylamine. Unsubstituted 4,4'-azobis(cyanovaleric acid) was used as initiator for synthesis of non-alkylated polymer. Radiolabeled random copolymers were synthesized by modification of a method previously described [14, 18]. Briefly, polymers of different molecular weights were prepared by free radical copolymerization of NIPAAm, MAA, ^{14}C -AAm +/- AAm in anhydrous 1,4-dioxane and in the presence of various amounts of initiator (Table 1). Prior to polymerization, ethanol from the ^{14}C -AAm solution was evaporated from the monomer blend by a flow of argon gas. The dioxane solution, containing initiator and monomers, was degassed for 10 min by bubbling argon. The copolymerization was then initiated by heating at 70°C under inert atmosphere and constant stirring for 6-60 h. The polymer was recovered by precipitation in diethylether after solubilisation in THF. It was further dialyzed against water for 7 days and finally freeze dried.

3.3.3. Polymer characterization

Number- (M_n) and weight- (M_w) average molecular weight were determined by gel permeation chromatography with a Waters Alliance GPCV2000 system (Waters, Milford, MA) operating in THF at 1 mL/min at 40°C, and mounted with Styragel HT 5, 3, and 2 columns (Waters, Milford, MA). Monodisperse polystyrene standards were used for relative analysis calibration. The LCST was measured by turbidimetry on a Series 2 Aminco Bowman fluorimeter (Spectronics Instruments Inc, Rochester, NY) in phosphate buffered saline (PBS, Na_2HPO_4 53 mM, NaH_2PO_4 13 mM, NaCl 76 mM, pH 7.4) at a polymer concentration of 0.05 mg/mL. The solution was heated from 25 to 60 °C with 1°C increments under stirring, and the intensity of scattered light measured at 480 nm. An equilibration time of at least 2 min was allowed after each temperature increment. The specific radioactivity of the labelled polymers was determined by scintillation counting

(Liquid Scintillation Analyser Tri-Carb 2100TR, Packard, Meriden, CT).

3.3.4. Determination of the critical association concentration (CAC)

The CAC was determined by a steady-state pyrene fluorescence method [34]. The shift in pyrene excitation wavelength from 333 to 338 nm corresponding to transfer of molecules from hydrophilic to hydrophobic environment was monitored and used to determine the apparent CAC. Polymer solutions with concentrations ranging from 4×10^{-2} to 5×10^3 mg/L were incubated overnight at 37°C with 2×10^{-7} M pyrene. The I_{338}/I_{333} intensity ratio of each solution was then measured at 37°C on a Series 2 Aminco Bowman fluorimeter, after 5 min equilibration. The CAC was determined graphically on a I_{338}/I_{333} vs. concentration plot as described elsewhere [34].

3.3.5. Preparation of dual-labelled, PEGylated, liposomes

Liposomes were prepared by the film-hydration/extrusion method [35]. Briefly, EPC, Chol, DSPE-PEG, ^{14}C -DODA-P(NIPAAm-co-MAA) and ^3H -cholesteryl hexadecyl ether (^3H -CHE) (57:38:3:1.2:0.8 mol%) were dissolved in chloroform. The organic solvent was eliminated under rotary evaporation during at least 2 h and the lipid film placed under vacuum for another 20 min. The dried film was then hydrated overnight with an isotonic buffer solution of HEPES (20 mM and NaCl 140 mM, pH 7.4) and extruded through 400-, 200- and 100-nm polycarbonate membranes using a LiposoFast[®] manual extruder (Avestin, Ottawa, ON, Canada) to yield 120 nm vesicles (PI = 0.07, as determined by dynamic light scattering). Free polymer was removed by size exclusion chromatography on a Sepharose[®] CL-4B column (25-cm height, 1.5-cm width) using HEPES buffer as eluent. Adequate separation of liposomes from free polymer was assessed by scintillation counting of each collected fraction. Fractions containing liposomes were pooled and lipid concentration was determined by the phosphorous assay [36]. Specific radioactivity of both isotopes was

assessed by dual scintillation counting.

3.3.6. PK studies

All animal studies were conducted as approved by the Animal Welfare and Ethics Committee of the University of Montreal in accordance with Canadian Council on Animal Care guidelines. Male Sprague-Dawley rats weighing 280-320 g (Charles River, Montreal, QC, Canada) were housed individually in metabolic cages. The polymer solution/liposomal formulation were injected in the subclavian vein under isoflurane anaesthesia. The quantities injected were ~8 mg/kg of polymer (2.5-5 mCi/kg of ^{14}C) and 9.5 mg/kg of lipids for $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ labelled liposomes (0.5 mCi/kg of ^{14}C and 4 mCi/kg of ^3H). On each rat, 300- μL blood samples were collected in EDTA-coated capillary tubes by the lateral saphenous vein after 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 12 and 24 h. The last blood sample was collected under anaesthesia by the subclavian vein 48 h post-dosing. The animals were then sacrificed, organs were flushed with saline and collected for analysis. Urine and faeces were collected at 4, 12, 24 and 48 h after injection. Five to seven animals were included in each group.

Blood samples and 200-800 mg of organ homogenate were weighed, digested at 60°C with isopropanol and Solvable[®] digesting solution, and bleached with a 30% hydrogen peroxide solution. Total urine and faeces collections were weighed and aliquots were digested with Solvable[®]. Preparations were left at 60°C for at least 48 h and then mixed with Hionic Fluor[®] scintillation cocktail. Radioactivity was assessed by scintillation counting. The polymer amounts in faeces, urine, organs and blood are expressed as percentage of injected dose (% ID). For blood, the % ID remaining in the animal was calculated by multiplying the blood radioactivity per gram by 0.064 x body weight in grams [37].

3.3.7. Calculations of PK parameters

To simplify comparison between groups, PK data were treated by

noncompartmental analysis of percentage-of-injected dose per gram ($\%ID \cdot g^{-1}$) vs. time profiles. Maximal concentration (C_{max}) corresponds to the maximum concentration measured. Apparent first-order terminal elimination rate (K_{el}) was estimated with a linear least-squares regression on the semi-log plot of the plasmatic concentration vs. time curve using the last 3 to 4 points of the curve. Terminal half-life ($T_{1/2\beta}$) was determined as $0.693/K_{el}$. Areas under the blood concentration-time curve (AUC_{0-48h}) were calculated with the trapezoidal method from 0 to 48 h. Areas under the blood concentration-time curve from time zero to infinity ($AUC_{0-\infty}$) were calculated by adding AUC_{0-48h} to the ratio of the last measurable concentration to K_{el} . Total blood clearance (CL_{total}) was determined as the injected dose (100%) divided by $AUC_{0-\infty}$, and the apparent volume of distribution (V_{area}) by further dividing CL_{total} by K_{el} . A density value of 1 g/mL was used to convert into mL. Urinary ($CL_{urinary}$) and faecal (CL_{faeces}) clearances were calculated by dividing the amounts excreted over 48 h throughout the study (in %ID) by AUC_{0-48h} .

3.3.8. Determination of the glomerular filtration cut-off

In order to determine the glomerular filtration cut-off, polymer samples with various molecular weights were pooled ($M_n = 16.5 \times 10^3$, $M_w/M_n = 2.17$) and injected i.v. to Male Sprague-Dawley rats at a dose of 33 mg/kg ($n = 3$ rats). Due to the large polydispersity of this polymer sample the animals received, in a single injection, polymeric chains of a wide range of length. Urine samples were collected at 4, 12, 24 and 48 h, and then freeze-dried. They were dissolved in 2 mL of double distilled water and eluted through a Sephadex[®] G-15 size-exclusion chromatography column (12-cm height, 3-cm width) with double distilled water as the mobile phase. Fractions of 2 mL were collected and assessed for radioactivity by scintillation counting. The fractions containing the polymer (~20-26 mL elution volume) were pooled together, freeze-dried, solubilised in THF, filtered on a 0.45- μ m GHP filter and analyzed by GPC as described above. The glomerular filtration *cut-off* was determined as the highest molecular weight detected (1% area of the refractive index signal) in the size

exclusion chromatogram of the excreted polymer.

3.3.9. Statistical analysis

Statistics were computed with the SigmaStat software (SPSS, Chicago, IL). Differences in group means (multiple comparisons) were calculated by standard analysis of variance followed by the Holm-Sidak test to determine the significance of all paired combinations. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3.4. Results

3.4.1. Polymer synthesis and characterization

The physicochemical characteristics of the synthesized ^{14}C -NIPAAm copolymers are presented in Table 3.1. P-5k, P-10k and P-40k had a M_n of *ca.* 5 K, 10 K and 40 K, respectively. They also contained 5 mol% of MAA (to confer pH-sensitivity) and 2 terminal alkyl chains (DODA). These 3 polymers possessed a LCST which was above body temperature (37°C). The polymer with the highest molecular weight also contained 5 mol% unlabelled AAm. In this case, this monomer was found necessary to keep the LCST above 37°C . In order to study the impact of the terminal alkyl chains on the PK profile, a polymer of similar molecular weight and composition to P-5k, but containing no DODA moiety, *i.e.* P-5k-NA, was also synthesized. At last, polymer P-40k-L with lower amounts of hydrophilic monomers, had approximately the same molecular weight as P-40k but was insoluble at body temperature (LCST = 32°C). As shown in Table 3.1, for alkylated polymers which were soluble at 37°C , *i.e.* P-5k, P-10k, P-40k, the CAC was found to increase with molecular weight (13, 42 and 260 mg/L, respectively). The DODA-free polymer, P-5k-NA, also self-associated upon increasing the concentration. However, its CAC (330 mg/L) was 25-fold higher than its alkylated counterpart.

Table 3.1 Physicochemical characteristics of NIPAAm copolymers

Polymer	Initiator (mol %)	MAA (mol %)	¹⁴ C-AAm (mol %)	M _n (x 10 ³)	M _w /M _n	Solubility at 37°C	CAC (mg/L)
P-40k ^a	0.03	5	1	38.4	1.4	+	260
P-10k	1	5	1	11.5	1.7	+	42
P-5k	8	5	1	6.1	1.4	+	13
P-5k-NA ^b	15	5	1	5.0	1.7	+	330
P-40k-L	0.03	1.5	1	37.3	1.3	-	N.D.

^a also contains 5 mol % of cold acrylamide ^b synthesized using non-alkylated initiator.

3.4.2. PK profiles and biodistribution of [¹⁴C]-DODA-P(NIPAAm-co-MAA)

Figure 3.1 shows the blood circulation profiles of P-5k, P-5k-NA, P-10k, P-40k and P-40k-L, after i.v. injection to Sprague-Dawley rats. The longest circulation time was achieved with P-40k, the polymer displaying the highest molecular weight, which was hydrosoluble at 37°C. At 48 h post-dosing, 30% of the ID was still circulating in the blood compartment. The fastest clearances from the bloodstream were obtained with P-5k-NA and P-40k-L. P-5k and P-10k presented intermediate circulation times.

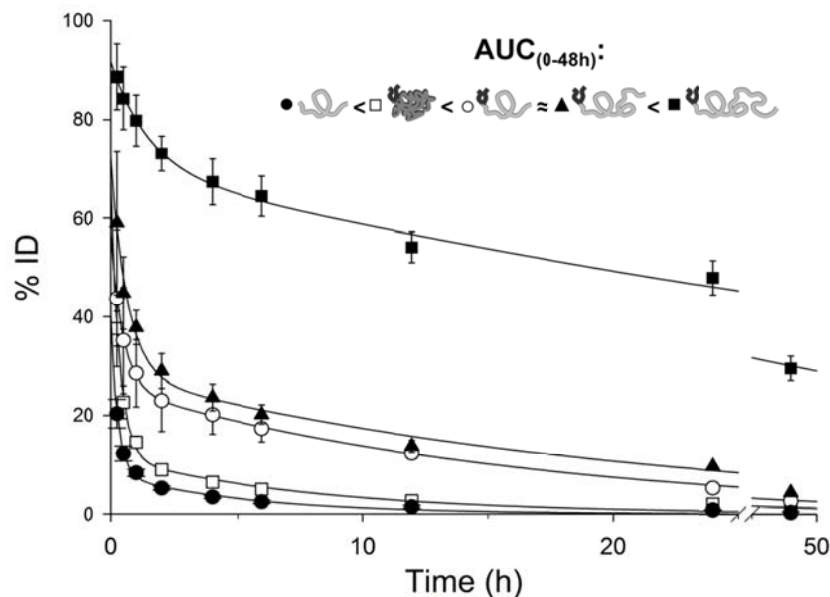


Figure 3.1 Blood circulation profiles of P-5K (○), P-10K (▲), P-40K (■), P-5K-NA (●) and P-40K-L (□). Mean \pm SD (n = 5-7), % ID represent percentage of injected dose.

Table 3.2 PK parameters of NIPAAm copolymers.

Polymer	AUC _{0-48h} (%ID·h·g ⁻¹)	AUC _{0-∞} (%ID·h·g ⁻¹)	C _{max} (%ID·g ⁻¹)	K _{el} (h ⁻¹)	V _{area} (mL)	CL _{total} (g·h ⁻¹)	CL _{urinary} (g·h ⁻¹)	CL _{faeces} (g·h ⁻¹)
P-40k	122 ± 12 ^{***§}	306 ± 43 ^{**§}	4.6 ± 0.5 ^{***§}	0.009 ± 0.002 ^{**§}	39 ± 4 ^{#§}	0.33 ± 0.04 ^{#§}	0.02 ± 0.005 [#]	0.009 ± 0.007 [#]
P-10k	31 ± 2 ^{****}	46 ± 4 ^{***§}	3.1 ± 0.7 ^{***§}	0.016 ± 0.001 ^{***}	137 ± 8 ^{#§}	2.2 ± 0.2 ^{#§}	0.63 ± 0.19 [#]	0.110 ± 0.3 [#]
P-5k	24 ± 3 ^{****}	32 ± 4 ^{***§}	2.4 ± 0.8 ^{***§}	0.018 ± 0.002 ^{***}	177 ± 27 ^{#§}	3.2 ± 0.4 ^{#§}	0.52 ± 0.12 [#]	0.17 ± 0.05 [#]
P-5k-NA	3.7 ± 0.4 ^{****}	4.9 ± 2 ^{****}	1.0 ± 0.1 ^{***}	0.022 ± 0.010 ^{***}	1044 ± 287 ^{***§}	23 ± 7 ^{***§}	3.73 ± 2.3 ^{***§}	3.0 ± 2.2 ^{***§}
P-40k-L	8.1 ± 0.7 ^{***}	11 ± 1 ^{****}	2.0 ± 0.2 ^{***}	0.013 ± 0.002 ^{***}	635 ± 88 ^{***#}	8.8 ± 0.7 ^{***#}	0.53 ± 0.25 [#]	0.20 ± 0.10 [#]

Values represent mean \pm SD (n=5-7) * p < 0.05 vs. P-5k; ** p < 0.05 vs. P-10k; *** p < 0.05 vs. P-40k; # p < 0.05 vs. P-5k-NA; § p < 0.05 vs. P-40k-L

The PK parameters extracted from the concentration-time curves are reported in Table 3.2. The AUC_{0-48h} and $AUC_{0-\infty}$ of the injected polymers could be ranked as follows: $P-40k > P-10k \geq P-5k > P-40k-L > P-5k-NA$. P-40k was the polymer displaying the lowest V_{area} , and highest C_{max} while P-5k-NA was the one distributing the most extensively in the extravascular space.

Figure 3.2 shows the cumulative amounts of each polymer eliminated in the urine (A) and faeces (B) during the PK study. In accordance with the PK data, considerable amounts of polymers were excreted in the urine when molecular weight was low (see P-5k, P-5k-NA and P-10k). The larger polymers (P-40k and P-40k-L) seemed to escape glomerular filtration to a large extent. However, due to the high variability of the data, statistical significance could only be demonstrated between P-10k and P-40k after 12 h (Fig. 3.2A). Likewise, no statistical differences in the urine recovery between polymers of similar molecular weight but different compositions (P-5k vs. P-5k-NA and P-40k vs. P-40k-L) could be established.

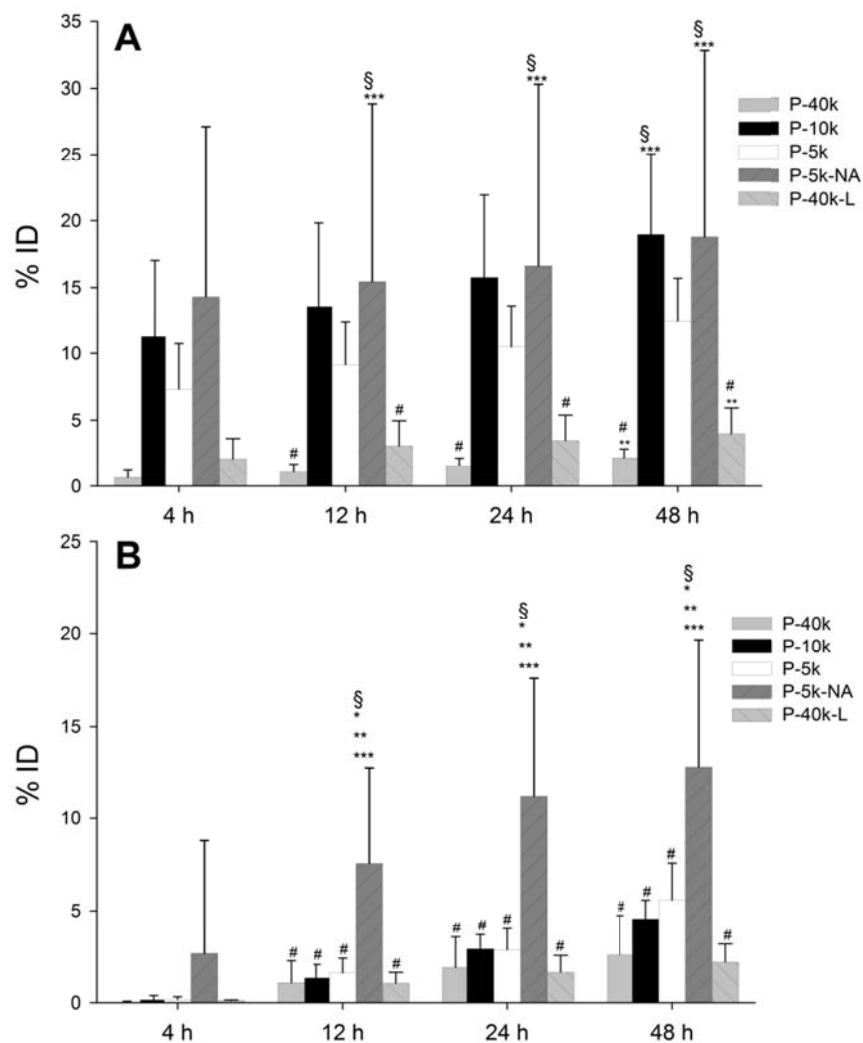


Figure 3.2 Cumulative polymer excretion in urine (A) and in faeces (B) excretion over 48 h. * $p < 0.05$ vs. P-5k; ** $p < 0.05$ vs. P-10k; *** $p < 0.05$ vs. P-40k; # $p < 0.05$ vs. P-5k-NA; § $p < 0.05$ vs. P-40k-L. Mean \pm SD ($n = 5-7$), % ID represent percentage of injected dose

For all alkylated polymers, the amounts eliminated in the faeces were low ($\sim 5\%$ of ID after 48 h) and of similar levels (Fig. 3.2B). P-5k-NA was apparently eliminated to a greater extent in the faeces. CL_{total} , $CL_{urinary}$ and CL_{faeces} are reported in Table 3.2. It can be

seen that PK-40k had very low clearances while P-5k-NA was the most rapidly cleared polymer and was associated with the highest CL_{urinary} and CL_{faeces} values. Interestingly, P-40k-L, exhibited a fairly elevated CL_{total} , despite its high molecular weight. Indeed, as will be discussed later, this apparently high clearance reflected only polymer removal from the bloodstream and was not the consequence of a true elimination from the body. Altogether these data clearly show the impact of molecular weight on the circulation time and elimination pathway, but also of the LCST and degree of amphiphilicity (presence or absence of DODA moiety).

Figure 3.3 depicts the accumulation of polymer in organs 48 h after injection. Here again, the biodistribution profiles were found to depend on molecular weight and physicochemical properties. P-5k, P-10k, and P-40k deposited mainly in the liver and kidneys in proportions that were inversely related to the molecular weight. The kidney concentration of P-40k was low compared to P-5k and P-10k. It reflected the limited renal excretion of this polymer (Fig. 3.2.A). Conversely and in accordance with the urinary excretion data, statistically higher levels of P-5k-NA were recovered in the kidneys. P-40k-L was associated with a distinctive biodistribution pattern. Apart from the liver, it ended up mostly in the spleen and lungs.

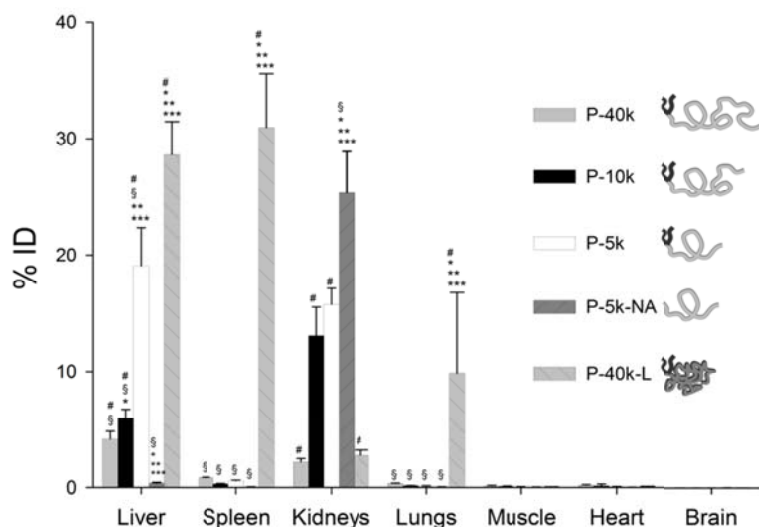


Figure 3.3 Organ distribution of polymers 48 h after injection. ** $p < 0.05$ vs. P-10k; *** $p < 0.05$ vs. P-40k; # $p < 0.05$ vs. P-5k-NA; § $p < 0.05$ vs. P-40k-L. Mean \pm SD (n = 5-7), % ID represent percentage of injected dose.

3.4.3. Determination of the glomerular filtration cut-off

In this experiment, rats were injected with a polymer sample with high polydispersity and at a higher dose in order to analyse the molecular weight distribution of the polymer recovered in the urine over 48 h. Preparative G-15 column chromatography of the lyophilised urine samples allowed recollection of polymer with minimal losses (>85% of the excreted polymer collected). After 4 h, the highest molecular weight detected in the sample, which was taken as the renal filtration threshold, was estimated at 32 K. Figure 3.4 presents the size distributions of the polymers injected in the *in vivo* studies in relation to the glomerular *cut-off* excretion limit. One can see that fractions of polymer distributions under the filtration limit are well correlated with the amounts excreted in the urine (Fig 3.2A).

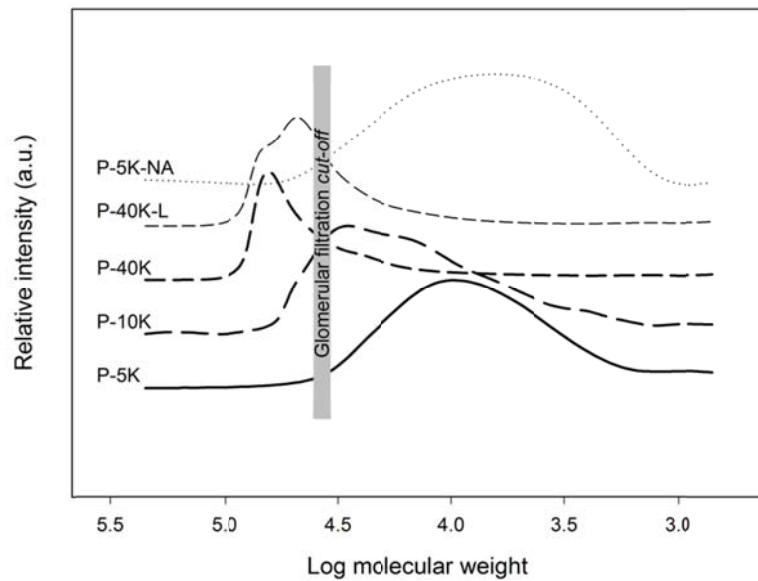


Figure 3.4 Polymer size distribution profiles of polymers relative to glomerular filtration cut-off.

3.4.4. PK profiles and biodistribution of pH-sensitive liposomes

In this experiment, ^{14}C -P-10k was inserted in the bilayer of 120-nm ^3H -PEGylated liposomes and both polymer and liposomes were tracked *in vivo*. Figures 3.5A and 3.5B show the %ID vs. time curve and biodistribution pattern of the dually labelled pH-sensitive formulation, respectively. The anchoring of P-10k into the liposomal bilayer produced a major change in its PK, increasing by more than 2-fold the AUC (Table 3.3). V_{area} also decreased substantially as did CL_{total} . It can be seen from Figure 3.5A that the circulation profiles of the polymer and liposomes were practically superimposed. Indeed, apart from the urinary and faecal clearances, no statistical significance could be demonstrated between the calculated PK parameters of liposomes and those of anchored polymer (Table 3.3).

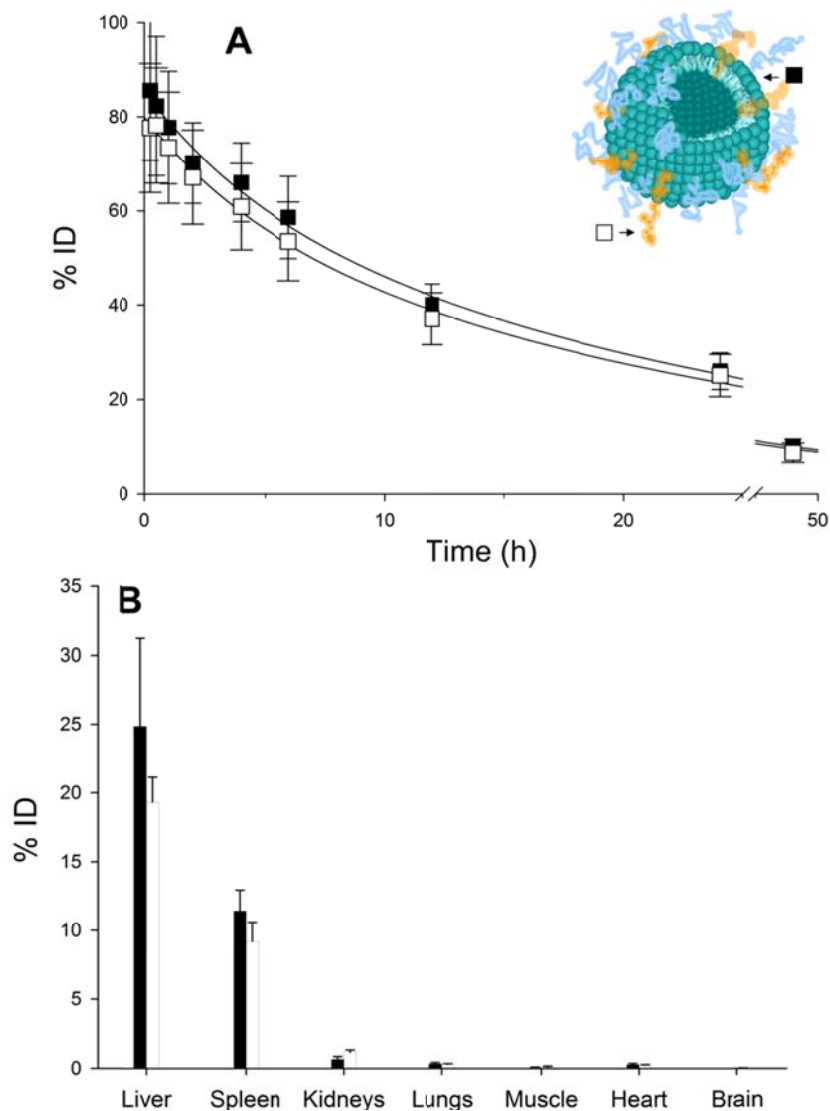


Figure 3.5 Blood circulation profiles (A) and organ distribution 48 h post dosing (B) of pH-responsive liposomes labelled with the non exchangeable lipid probe 3H-CHE (■) and 14C-P-10-k (□). ¶ $p < 0.05$ vs. Anchored P10-k; ° $p < 0.05$ vs. Liposomes. Mean \pm SD (n =7), % ID represent percentage of injected dose.

Likewise, both deposited in liver, spleen and kidneys to a similar extent. These results demonstrate that P-10k remained largely anchored in the liposome bilayer for at least 48 h after injection.

Tableau 3.3 PK parameters of liposomes and anchored P-10k

	AUC_{0-48h} (%ID·h·g ⁻¹)	$AUC_{0-\infty}$ (%ID·h·g ⁻¹)	C_{max} (%ID·g ⁻¹)	K_{el} (h ⁻¹)	V_{area} (mL)	CL_{total} (g·h ⁻¹)	$CL_{urinary}$ (g·h ⁻¹)	CL_{faeces} (g·h ⁻¹)
Liposomes (³ H)	78 ± 10	107 ± 9	3.9 ± 0.7	0.018 ± 0.003	54 ± 10	0.9 ± 0.09	1.2 × 10 ⁻³ ± 6 × 10 ⁻⁴ ¶	0.002 ± 0.002¶
Anchored P-10k (¹⁴ C)	73 ± 10**	98 ± 12**	4.0 ± 0.6**	0.019 ± 0.003	57 ± 12**	1.0 ± 0.13**	1.6 × 10 ⁻² ± 3 × 10 ⁻³ °**	0.221 ± 0.198°

Values represent mean ± SD (n=5-7) ** p < 0.05 vs. P-10k; ¶ p < 0.05 vs. Anchored P10-k; ° p < 0.05 vs. Liposomes.

3.5. Discussion

Previous studies conducted with non-biodegradable water-soluble synthetic polymers such as poly(ethylene glycol) (PEG) [24, 26, 38] and poly(2-hydroxypropyl) methacrylamide (PHPMA) [31, 32] have clearly established that molecular weight was a factor governing the elimination rate of macromolecules. Long polymeric chains possess a greater hydrodynamic volume, which hinders extravasation into the perivascular space and glomerular filtration. Our data confirm that the PK parameters of alkylated pH-responsive NIPAAm copolymers are strongly influenced by their molecular weight. In the context of designing a clinically viable pH-responsive liposomal formulation, polymers with M_n of 30 – 50 k should be avoided to minimize the risk of accumulation following multiple dosing. P-40k was endowed with a long circulation time and low V_{area} ,

but it was found to be poorly excreted in the urine and faeces (Fig. 3.2). The fraction of P-40k which was eliminated might correspond to the polymeric chains with the lowest molecular weights. The molecular cut-off for renal filtration of DODA-P(NIPAAm-*co*-MAA) was estimated at 32 K (Fig. 3.4), a value comparable to filtration *cut-off* of different polymers like PEG (~30 K) [38] and HPMA (~40-45 K) [31]. Our previous studies evaluating the ability of NIPAAm copolymer to destabilize lipid bilayers under mildly acidic conditions also revealed that high molecular weights were not necessarily associated with better pH-responsive properties, and important pH-triggered releases (>80%) could be achieved with polymers of M_w as low as 8 K [18]. Moreover, using a high molecular weight pH-sensitive polymer further increases the risk of impairing the conjugation of a targeting ligand to the surface of PEGylated liposomes [23].

P-5k and P-10k exhibited close PK profiles, with the latter circulating slightly longer than P-5k (Fig. 3.1 and Table 3.2). This suggests that the influence of the molecular weight on elimination from the bloodstream is less important under a certain size, as hindered diffusion is not the limiting factor [24, 30-32]. However, let alone, this cannot explain all *in vivo* data obtained with these 2 polymers. Indeed, a close look at the molecular weight distributions of P-5k and P-10k show that a substantially more important fraction of P-5k had a molecular weight below the glomerular *cut-off* (Fig. 3.4). It could then be expected that this polymer would be excreted much faster than P-10k. Surprisingly, both polymers were excreted to a similar extent in the urine and faeces (Fig. 3.2). Furthermore, a marked difference in the liver concentration was noticed between P-10k and P-5k (Fig. 3.3). The latter was deposited 3-fold more in the liver than P-10k. This is rather unusual as amounts of polymer retained in the fenestrated capillaries of this organ are generally increasing with the length of the chains [26, 30, 32]. One explanation for both these observations rests on the fact that alkylated NIPAAm copolymers are known to micellize in water [14, 39-43]. Moreover, as shown in Table 3.1, the CAC of DODA-P(NIPAAm-*co*-MAA) increased with P(NIPAAm-*co*-MAA) length, and the CAC of P-10k

was 3 fold higher than that of P-5k. It can thus be hypothesized that a greater fraction of P-5k circulated as micelles in the bloodstream. This would have in turn slowed down the renal excretion process and favoured hepatic deposition of polymer in a self-assembled form [44].

The impact of the DODA tail on the *in vivo* behaviour of the polymers can be further highlighted by comparing the circulation kinetics of alkylated and non-alkylated polymers. P-5k-NA, which is devoid of alkyl chain, self-assembled only at very high concentrations (Table 3.1). It was thus eliminated from the bloodstream much more rapidly than P-5k (Fig. 3.1 and Table 3.2). Furthermore, its high V_{area} , low C_{max} and important CL values also reflected fast distribution and elimination processes. Striking differences can also be seen in the organ distribution profiles (Fig. 3.3). P-5k-NA evaded most of organ deposition, excepting the kidneys. In summary, these observations suggest that micellization possibly increased the circulation time of DODA-P(NIPAAm-*co*-MAA) and its deposition in the liver. Among other hypotheses, the DODA tail may also contribute to prolonging the circulation and/or specific targeting to the liver via association of the polymers to circulating blood cells and/or plasma proteins [45].

The LCST is another physicochemical parameter that was found to affect the biological fate of NIPAAm copolymers. Although they were of the same molecular weight, P-40k-L and P-40k displayed drastic differences in their PK parameters and biodistribution profiles (Figs 3.1 & 3.3, Table 3.2). The low LCST polymer, P-40k-L, was withdrawn very rapidly from the bloodstream after i.v. injection. This rapid apparent clearance was however not accompanied by a strong excretion in urine and faeces. Indeed, poor excretion was expected considering the high molecular weight of this polymer. Noticeably, P-40k-L but not P-40k deposited extensively in the liver, spleen and lungs (Fig. 3.3). Due to its low LCST (32°C), this polymer underwent transition from hydrated random coil to hydrophobic globule upon entering the systemic circulation, and thereby possibly aggregated *in vivo*. This resulted in a very high uptake by the organs of the mononuclear phagocyte system

(liver and spleen) and possibly some embolism in the lung capillaries [46]. One can therefore see that a LCST above the physiological temperature is paramount to allow bloodstream circulation of NIPAAm copolymers after intravenous injection.

Our previously published studies [14, 17, 23] revealed that P-10k was a good polymer candidate to prepare pH-sensitive liposomes capable of resisting inactivation by plasma components. Furthermore, the data presented here clearly shows that this polymer can be eliminated from the body *via* renal filtration. Therefore, it was of interest to verify whether it would remain anchored in the liposome bilayer following i.v. injection. Indeed, in order for pH-sensitive formulations to be effective *in vivo*, they have to reach their target site - whether it is intra or extravascular - in their intact form. Our work showed that P-10k remained anchored throughout the time course of the experiment (Fig. 3.4 and Table 3.3). The drastic change in PK parameters of bound P-10k compared to the free form (increased AUC, marked reduction of V_{area} and CL) and its colocalisation with the liposomes in the blood and organs confirmed that there was minimal polymer desorption occurring *in vivo*. It can be thus reasonably expected that pH-responsive liposomes prepared with P-10k would maintain their pH-sensitivity until their endocytosis by the target cells.

3.6. Conclusion

The present work provided insights on the biological fate of NIPAAm copolymers used in the formulation of stimuli-responsive liposomes and micelles. Parameters such as the degree of amphiphilicity, molecular weight and solubility at body temperature were found to greatly impact the PK and biodistribution profiles. When administered systemically, NIPAAm copolymers should have a molecular weight below 32 K and an LCST greater than 37°C, to ensure proper elimination from the body and low uptake by the MPS. Alkylated polymers with molecular weight lower than 10 K may be more prone to circulate as micelles in the body and would eventually end up to a greater extent in the liver. DODA-P(NIPAAm-*co*-MAA) with a molecular weight of 10 K, appears optimal in

terms of conferring strong pH-sensitivity to liposomal formulations, ensuring clearance from the body as well as adequate anchoring in the lipid bilayer.

3.7. Acknowledgements

This work was financially supported by the Canadian Institutes of Health Research, the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (Steacie Fellowship to J.C.L.) and the Canada Research Chair program. N.B. received a scholarship from Fonds de Recherche en Santé du Québec. Mr François Plourde and Dr Meriam Kabbaj are acknowledged for their help with the animal experiments and insightful discussion on PK analysis, respectively.

3.8 References

1. Schmaljohann D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev* 2006;58:1655-1670.
2. Heskins M, Guillet J. Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Macromol Sci, Part A: Pure Appl Chem* 1968;2:1441-1455.
3. Rzaev ZMO, Dinçer S, Piskin E. Functional copolymers of *N*-isopropylacrylamide for bioengineering applications. *Progress in Polymer Science* 2007;32:534-595.
4. Mano JF. Stimuli-responsive polymeric systems for biomedical applications. *Advanced Engineering Materials* 2008;5:510-527.
5. Liu S-Q, Wiradharma N, Gao S-J, Tong YW, Yang Y-Y. Bio-functional micelles self-assembled from a folate-conjugated block copolymer for targeted intracellular delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 2007;28:1423-1433.
6. Wei H, Zhang X-Z, Cheng C, Cheng S-X, Zhuo R-X. Self-assembled, thermosensitive micelles of a star block copolymer based on PMMA and PNIPAAm for controlled drug delivery. *Biomaterials* 2007;28:99-107.

7. Cheng C, Wei H, Shi B-X, Cheng H, Li C, Gu Z-W, et al. Biotinylated thermoresponsive micelle self-assembled from double-hydrophilic block copolymer for drug delivery and tumor target. *Biomaterials* 2008;29:497-505.
8. Kono K, Henmi A, Yamashita H, Hayashi H, Takagishi T. Improvement of temperature-sensitivity of poly(*N*-isopropylacrylamide)-modified liposomes. *J Control Release* 1999;59:63-75.
9. Yoshino K, Kadowaki A, Takagishi T, Kono K. Temperature sensitization of liposomes by use of *N*-isopropylacrylamide copolymers with varying transition endotherms. *Bioconjug Chem* 2004;15:1102-1109.
10. Zhang K, Wu XY. Temperature and pH-responsive polymeric composite membranes for controlled delivery of proteins and peptides. *Biomaterials* 2004;25:5281-5291.
11. Liu Y-Y, Shao Y-H, Lü J. Preparation, properties and controlled release behaviors of pH-induced thermosensitive amphiphilic gels. *Biomaterials* 2006;27:4016-4024.
12. Fundueanu G, Constantin M, Ascenzi P. Preparation and characterization of pH- and temperature-sensitive pullulan microspheres for controlled release of drugs. *Biomaterials* 2008;29:2767-2775.
13. Le Garrec D, Taillefer J, Van Lier JE, Lenaerts V, Leroux J-C. Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model. *J Drug Target* 2002;10(5):429-437.
14. Leroux J-C, Roux E, Le Garrec D, Hong K, Drummond DC. *N*-isopropylacrylamide copolymers for the preparation of pH-sensitive liposomes and polymeric micelles. *J Control Release* 2001;72(1-3):71-84.
15. Lo C-L, Huang C-K, Lin K-M, Hsiue G-H. Mixed micelles formed from graft and diblock copolymers for application in intracellular drug delivery. *Biomaterials* 2007;28:1225-1235.
16. Roux E, Francis M, Winnik FM, Leroux J-C. Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drugs. *Int J Pharm* 2002;242:25-36.
17. Roux E, Passirani C, Scheffold S, Benoit J-P, Leroux J-C. Serum-stable and long-circulating, PEGylated pH-sensitive liposomes. *J Control Release* 2004;94(2-3):447-451.
18. Roux E, Stomp R, Giasson S, Pézolet M, Moreau P, Leroux J-C. Steric stabilization of liposomes by pH-responsive *N*-isopropylacrylamide copolymer. *J Pharm Sci* 2002;91(9):1795-1802.

19. Roux E, Lafleur M, Lataste É, Moreau P, Leroux J-C. On the characterization of pH-sensitive Liposome/Polymer Complexes. *Biomacromolecules* 2003;4(2):240-248.
20. Vial F, Rabhi S, Tribet C. Association of octyl-modified poly(acrylic acid) onto unilamellar vesicles of lipids and kinetics of disruption. *Langmuir* 2005;21:853-862.
21. Polozova A, Winnik FM. Contribution of hydrogen bonding to the association of liposomes and an anionic hydrophobically modified poly(*N*-isopropylacrylamide). *Langmuir* 1999;15:4222-4229.
22. Polozova A, Winnik FM. Mechanism of the interaction of hydrophobically-modified poly-(*N*-isopropylacrylamides) with liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1997;1326:213-224.
23. Simard P, Leroux J-C. pH-sensitive immunoliposomes specific to the CD33 cell surface antigen of leukemic cells. *Int J Pharm* 2009;381:86-96.
24. Jorgensen KE, Moller JV. Use of flexible polymers as probes of glomerular pore size. *Am J Physiol* 1979;236:F103-111.
25. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci* 1994;83:601-606.
26. Murakami Y, Tabata Y, Ikada Y. Tumor accumulation of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous injection. *Drug Deliv* 1997;4:23-31.
27. Takakura Y, Fujita T, Hashida M, Sezaki H. Disposition characteristics of macromolecules in tumor-bearing mice. *Pharm Res* 1990;7:339-346.
28. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Comparison of body distribution of poly(vinyl alcohol) with other water-soluble polymers after intravenous administration. *J Pharm Pharmacol* 1995;47:479-486.
29. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Fate of water-soluble polymers administered via different routes. *J Pharm Sci* 1995;84:349-354.
30. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Body distribution profile of polysaccharides after intravenous administration. *Drug Deliv* 1993;1:75-82.
31. Seymour LW, Duncan R, Strohal J, Kopecek J. Effect of molecular weight (Mw) on *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;21:1341-1358.

32. Seymour LW, Miyamoto Y, Maeda H, Brereton M, Strohmalm J, Ulbrich K, et al. Influence of Molecular Weight on Passive Tumour Accumulation of a Soluble Macromolecular Drug Carrier. *Eur J Cancer* 1995;31A:766-770.
33. Kitano H, Akatsuka Y, Ise N. pH-responsive liposomes which contain amphiphiles prepared by using lipophilic radical initiator. *Macromolecules* 1991;24:42-46.
34. Wilhelm M, Zhao C-L, Wang Y, Xu R, Winnik MA, Mura J-L, et al. Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: A fluorescence probe study. *Macromolecules* 1991;24:1033-1040.
35. Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membran potential. *Biochim Biophys Acta* 1985;812:55-65.
36. Bartlett GR. Phosphorous assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959;234:466-468.
37. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 2001;21:15-23.
38. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci* 1994;83:601-606.
39. Winnik FM, Davidson AR, Hamer GK, Kitano H. Amphiphilic poly(*N*-isopropylacrylamide) prepared by using a lipophilic radical initiator: Synthesis and solution properties in water. *Macromolecules* 1992;25:1876-1880.
40. Ringsdorf H, Simon J, Winnik FM. Hydrophobically-modified poly(*N*-isopropylacrylamides) in water: Probing the microdomain composition by nonradiative energy transfer. *Macromolecules* 1992;25:5353-5361.
41. Chung J, Yokoyama M, Aoyagi T, Sakurai Y, Okano T. Effect of molecular architecture of hydrophobically modified poly(*N*-isopropylacrylamide) on the formation of thermoresponsive core-shell micellar drug carriers. *J Control Release* 1998;53:119-130.
42. Chung J, Yokoyama M, Suzuki K, Aoyagi T, Sakurai Y, Okano T. Reversibly thermo-responsive alkyl-terminated poly(*N*-isopropylacrylamide) core-shell micellar structures. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1997;9:37-48.

43. Taillefer J, Brasseur N, Van Lier JE, Lenaerts V, Le Garrec D, Leroux J-C. *In vitro* and *in vivo* evaluation of pH-responsive polymeric micelles in a photodynamic cancer therapy model. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:155-166.
44. New RR. Chapter 1: Introduction. In: New RR, editor. *Liposomes: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 1990. p. 1-31.
45. Wolfrum C, Shi S, Jayaprakash KN, Jayaraman M, Wang G, Pandey RK, et al. Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs. *Nat Biotechnol* 2007;25:1149-1157.
46. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Blood clearance and organ distribution of intravenously administered polystyrene microspheres of different sizes. *J Bioact Compat Polym* 1993;8:220-235.

Chapitre 4. Transmembrane pH-gradient liposomes for cardiovascular drug detoxification: making the old new

Nicolas Bertrand¹, Céline Bouvet¹, Pierre Moreau¹, Jean-Christophe Leroux^{1,2*}

¹Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, PO box 6128 Downtown Station, H3C 3J7, Montreal, Québec, Canada

²ETH Zürich, Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Chemistry and Applied Biosciences, HCI J 398 Wolfgang-Pauli-Str. 10, 8093 Zürich, Switzerland

*Corresponding author.

Article publié dans *ACS Nano* 4(12): 7552-7558

Keywords: detoxification, lipid resuscitation, diltiazem, pharmacokinetics, scavenging nanocarriers, nanomedicine

4.1. Abstract

Injectable scavenging nanocarriers have been proposed as detoxifying agents when there are no specific antidotes to treat pharmacological overdoses. They act by capturing the drug *in situ*, thereby restricting distribution in tissues. In the clinic, the only systems used for that purpose are parenteral lipid emulsions, which are relatively inefficient in terms of uptake capacity. In this study, we investigated long-circulating liposomes with a transmembrane pH gradient as treatment for diltiazem intoxication. The unique ion-trapping properties of the vesicles towards ionizable compounds were exploited to sequester the drug in the bloodstream, and limit its pharmacological effect. After *in vitro* optimization of the formulation, the *in vivo* scavenging properties of the liposomes were demonstrated by examining the drug's pharmacokinetics. The reduced volume of distribution and increased area under the plasma-concentration-vs-time curve in animals treated with liposomes indicated limited tissue distribution. The vesicles exerted a similar but more pronounced effect on deacetyl-diltiazem, the principal active metabolite of the drug. This *in vivo* uptake of both drug and metabolite altered the overall pharmacological outcome. In rats receiving an intravenous bolus of diltiazem, the liposomes tempered the hypotensive decline, and maintained higher average blood pressure for 1 h. The detoxifying action of liposomes was even stronger when the rats received higher doses of the drug *via* perfusion. In conclusion, the present work provided clear evidence that liposomes with a transmembrane pH gradient are able to change the pharmacokinetics and pharmacodynamics of diltiazem and its metabolite and confirmed their potential as efficient detoxifying nanocarriers.

4.2. Introduction

Over one million cases of drug intoxication are reported yearly in the United States. Cardiovascular drugs are among the substances most frequently encountered in overdoses, and within this class of therapeutic molecules, calcium channel blockers (CCB) are responsible for more than 30% of fatalities.¹ The clinical profile of CCB poisoning is erratic and dose-dependent. It usually involves peripheral vasodilatation and bradycardia, as

well as arrhythmias and metabolic disorders, often followed by cardiogenic shock and death.^{2, 3} Moreover, because of the common availability of controlled-release CCB formulations, the prognosis is complicated by sustained absorption of the medication in the gastrointestinal tract over prolonged periods of time. Consequently, patient deterioration occurs gradually and leads to long-lasting and costly hospital stays in intensive care. Different treatment algorithms combine aggressive decontamination with supportive hemodynamic measures, and administration of calcium salts, insulin or glucagon. However, there are no therapeutic consensuses, and CCB overdoses remain difficult to treat, with morbidity and mortality as frequent outcomes.^{2,3}

Researchers have recently proposed an alternative treatment for CCB overdose. It consists of administering intravenous fat emulsions (IFE).⁴⁻⁶ These emulsions are composed of nanosized (~200-400-nm) droplets of soy bean oil stabilized with phospholipids (PL). Large doses of IFE are known to reverse the toxicity of local anaesthetics, tricyclic antidepressants, barbiturates, β -blockers, and CCB, in both animal models and human case reports.⁷ Although the mechanism behind the effect of these emulsions has not been elucidated, the most commonly-accepted hypothesis is the *in situ* drug uptake in the lipid droplets, which reduces the available toxic concentration at different action sites.⁸ Drug partitioning in the lipid emulsions has indeed been demonstrated *in vitro* for certain local anaesthetics.⁸⁻¹⁰ However, this uptake depends on the drug's lipophilicity, and is limited by relatively fast clearance of the droplet from the bloodstream. Both these features are responsible for the use of very high IFE doses.⁶ In addition to the unknown metabolic consequences of administering large amounts of lipids,¹¹ other drawbacks to IFE rescue have been recently brought to light. For example, possible toxicity relapse after initial improvement,¹² decreased efficiency in hypoxia,^{13, 14} and probable interaction with other resuscitation medicines^{15, 16} are aspects that have mitigated the initial enthusiasm surrounding IFE deployment in CCB overdoses.

In the present work, long-circulating liposomes with a transmembrane pH gradient are proposed as surrogates to IFE to treat CCB intoxications. Vesicles with an acidic internal compartment possess ion-trapping properties for weak basic drugs (Fig. 4.1). This feature has been successfully applied to encapsulate various compounds with remarkable entrapment efficiencies.¹⁷ The capture properties also appear to be maintained under *in vivo* conditions, as reported by Mayer *et al.*, employing doxorubicin as model drug.¹⁸ Surprisingly, there have been no attempts to adapt such systems as antidotes. Recently, we reported that transmembrane pH-gradient spherulites (a type of multilamellar vesicles) were highly efficient *ex vivo* in reversing amitriptyline-induced toxicity in isolated perfused hearts.¹⁹ However, because of their modest stealth properties,²⁰ they were not deemed ideal for *in vivo* application. In contrast, poly(ethylene glycol) (PEG)-stabilized liposomes of less than 200 nm are known to possess biological half-lives exceeding 15 h.²¹ They are generally considered safe and biocompatible.²² These characteristics, combined with the high efficiency of the pH-gradient-loading process, make them near optimal systems for drug detoxification. In this report, PEGylated liposomes with a transmembrane pH gradient were investigated to capture diltiazem (DTZ), a CCB frequently involved in life-threatening intoxications. The liposomal formulation was shown to modify the pharmacokinetics (PK) of DTZ and its principal active metabolite (deacetyl-diltiazem, DAD), and efficiently tempered the drug's hypotensive effect.

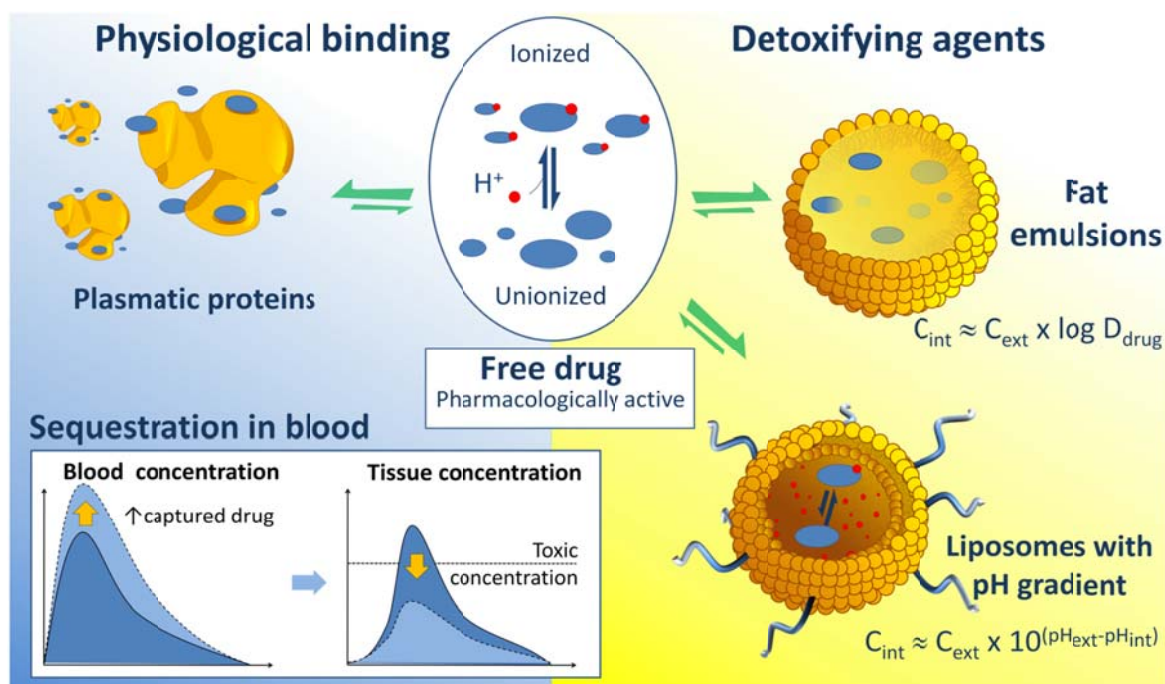


Figure 4.1 Rationale behind the use of transmembrane pH-gradient liposomes as antidotes. Similarly to IFE, the vesicles act as sinks to scavenge circulating free drugs. The transmembrane pH gradient maximizes the quantities that can be captured. Sequestration of the drug by vesicles in the blood decreases the amounts of pharmacologically-active free drug. In the equations, C_{int} , C_{ext} , D_{drug} , pH_{int} , and pH_{ext} represent the concentration of drug captured, the external drug concentration, the drug distribution coefficient and internal and external pHs, respectively.

4.3. Experimental methods

4.3.1. Preparation of PEGylated liposomes with transmembrane pH gradient

Liposomes were prepared by the film-hydration/extrusion method.⁴¹ Briefly, egg phosphatidylcholine (Egg PC), cholesterol (Chol), and *N*-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3 phosphoethanolamine (DSPE-PEG) (58:38:4 mol%) (NOF Corporation, Tokyo, Japan) were dissolved in chloroform. After evaporation

of the solvent, the dried film was hydrated for at least 1 h with a buffer solution of citrate and extruded through 400- and 200-nm polycarbonate membranes with a LiposoFast manual extruder (Avestin, Ottawa, ON, Canada) to yield < 200 nm vesicles (PdI < 0.2, as determined by dynamic light scattering). The pH gradient was generated by replacing external citrate buffer by isotonic HEPES- buffered saline (20 mM HEPES, 144 mM NaCl, HBS) or normal saline solution (150 mM NaCl) either by size exclusion chromatography (SEC) on a Sephadex G-50 (Sigma, St Louis, MO) column (25-cm height, 1.5-cm width) or by dialysis for > 6 h on a Spectra/Por membrane with a molecular weight cut-off of 300 kDa (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA). For the *in vivo* experiments, liposomes were concentrated by ultrafiltration on Amicon-4, 300-kDa centrifugal filter units (Millipore, Billerica, MA). Lipid concentration was quantified by the phosphorous assay.⁴²

4.3.2. *In vitro* uptake studies

Liposomes were incubated at 37°C under horizontal shaking in buffer in the presence of [³H]-DTZ (60-87 Ci/mmol, Perkin Elmer, Waltham, MA) (and [³H]-DAD) for experiments in the Supplementary Information). After 1 h of incubation, they were separated from the free drug by SEC on a Sephadex G-50 or Sepharose CL-4B (Sigma) column (20-cm height, 1.5-cm width) with HBS, pH 7.4, as mobile phase. Fractions of 1 or 2 mL were collected (up to 34-mL total volume), and radioactivity in each fraction was assessed by scintillation counting (Liquid Scintillation Analyzer, Tri-Carb 2100TR, Packard, Meridan, CT). The fraction of drug captured was determined by the ratio of the area under the radioactivity *vs.* elution volume curve for liposome-containing fractions (7 to 12 mL) over the total area under the curve. The quantity of drug captured was normalized by the amount of phospholipids (PL) in solution. The default incubation buffer was isotonic HBS, pH 7.4, except when 50% rat plasma/HBS, pH 7.4, was included. The default drug concentration was 1 mM with a drug-to-PL molar ratio of 0.4 (liposome concentration of 2.5 mM of PL).

4.3.3. PK studies

All animal studies conducted were approved by the Animal Welfare and Ethics Committee of the University of Montreal in accordance with Canadian Council on Animal Care guidelines. Male Sprague-Dawley rats (300-350 g) (Charles River, Montreal, QC, Canada) were injected in the subclavian vein with liposomes (275 mg/kg), followed 2 min later by DTZ (5 mg/kg), under isoflurane (2%) anaesthesia. From each rat, 500- μ L blood samples were collected in EDTA-coated Microtainer (BD, Franklin Lakes, CT) *via* the subclavian vein, under anaesthesia, at 5, 15, 30 min, 1, 2, 4 and 6 h. Plasma was separated immediately from blood cells by centrifugation at 2 000 g for 10 min, and samples were kept at -20 °C until further use. Seven and 8 animals were included in the control and treatment groups, respectively.

4.3.4. Calculations of PK parameters

PK data were treated by non-compartmental analysis of plasma concentration *vs.* time profiles. Maximum concentration (C_{\max}) corresponded to the maximum concentration measured while C_0 was extrapolated as the Y intercept of linear least-squares regression on the semi-log plot of the plasma concentration *vs.* time curve using the first 3 to 4 points of the curve. Extrapolated volume of distribution (V_d) was determined by dividing the injected dose by C_0 . The apparent first-order terminal elimination rate (K_{el}) was estimated by linear least-squares regression on the semi-log plot of the plasma concentration *vs.* time curve with the last 3 to 4 points of the curve. Plasma terminal elimination half-life ($t_{1/2}$) was assessed as $\ln(2)/K_{el}$. The areas under the plasma-concentration *versus* time curve ($AUC_{(0-6h)}$) were calculated by the trapezoidal method from 0 to 6 h. Areas under the plasma concentration *versus* time curve from time zero to infinity ($AUC_{(0-\infty)}$) were calculated by adding $AUC_{(0-6h)}$ to the ratio of the last measurable concentration to K_{el} . Total clearance (Cl) was quantified as the injected dose (5 mg/kg) divided by $AUC_{(0-\infty)}$.

4.3.5. DTZ extraction and high performance liquid chromatography (HPLC)

The extraction method was adapted from a previously published study.⁴³ Fifty μL of a 10- $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution of imipramine were spiked as internal standard to 220 μL of thawed plasma. After alkalisation of the plasma (with 50 μL of NaOH 0.1 N), DTZ was extracted twice with 1 mL of diethyl ether. The organic phase was evaporated to dryness under mild heating (50-60 $^{\circ}\text{C}$), dissolved in 100 μL of diethylether and back- extracted with 85 μL of acetate buffer, pH 5.5 (50 mM acetic acid). DTZ content in 60 μL of the aqueous phase was measured at 237 nm by reverse-phase HPLC in a system equipped with a 1525 binary pump, a dual wavelength absorbance detector, mounted with an Ascentis C18 column (15 cm x 4.6 mm, 3 μm) and Breeze chromatography software version 3.3 (Waters, Milford, MA). The flow rate was set at 1 mL/min for H₂O:acetonitrile (ACN) gradient elution of 30 \rightarrow 70% ACN in 25 min, followed by a return to initial conditions over 2 min. Trifluoroacetic acid 0.1% (v/v) was added to the mobile phase as a charge stabilizer. Elution times of DAD, DTZ and the internal standard were 6.0, 8.8 and 10.7 min, respectively. Linearity of a 12-point calibration curve was achieved for concentrations ranging from 10 to 10,000 ng/mL with a quantification limit above 10 ng/mL for DTZ and 50 ng/mL for DAD. For mean calculations, values under the quantification limit were set at 0 ng/mL.

4.3.6. Pharmacological activity of DTZ

The pharmacodynamic study of DTZ was carried out on Sprague-Dawley rats with left femoral vein and artery catheterized with polyethylene-10 tubing (Folioplast SA, Sarcelles, France) under pentobarbital anaesthesia (65 mg/kg). Arterial access was connected to a pressure transducer for continuous measurement of systolic and diastolic blood pressures by Chart software version 5.5.6 (AD Instruments, Colorado Springs, CO). Mean arterial pressure (MAP) was calculated as (2/3 diastolic + 1/3 systolic pressure). During hemodynamic monitoring, the animals were maintained under continuous isoflurane (2%)

anaesthesia. After recording basal hemodynamic parameters for at least 20 min, venous access was used for the injection of identical volumes of either normal saline solution or pH-gradient liposomes (275 mg/kg), followed by DTZ (5 mg/kg) 2 min later. After each bolus injection, the catheters were rinsed with 300 μ L of heparinized normal saline (100 UI/mL). In the perfusion experiment, DTZ 1 mg/mL solution was initiated at 8 mL/kg/h right after DTZ bolus. Pressures were measured for 1 h after DTZ dosing. Five rats were included in all groups except in the liposome-perfusion group where 6 animals were studied.

4.3.7. Statistical analysis

Statistics were computed with SigmaPlot 11.0 software (SPSS, Chicago, IL) (Table 4.5). Differences in group means were calculated by standard unpaired *t*-test, Mann-Whitney U test on ranks or Kruskal-Wallis test on ranks followed by Student-Neuman-Keuls test. Non-parametric tests were used when samples failed tests for equality of variance and/or normality with the Kolmogorov-Smirnov test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

4.4. Results and Discussion

4.4.1. Preparation and characterization of liposomes

Liposomes were composed of Egg PC, Chol, DSPE-PEG and citric acid, ingredients that are already included in FDA-approved formulations. The structures of the lipid components and DTZ are presented in Fig. 4.6. Internal pH and citrate buffer concentration (Fig. 4.2 and Table 4.2) were identified as the main factors affecting drug uptake. Lowering the internal pH from 3 to 2 almost doubled the uptake capacity (Fig. 4.2.A). However, in the subsequent *in vivo* experiments, an internal pH of 3 was preferred in order to maximize stability and limit acid-catalyzed PL hydrolysis. Fig. 4.2.B illustrates that at pH 3, capture capacity increased with citrate concentration until 200 mM. At this stage, the internal

solution became iso-osmolar with the external milieu (300 mOsm/kg). Above 300 mOsm/kg, uptake decreased because of the opposing force of the osmotic pressure (Fig. 4.7) or the membrane instability caused by the high ionic strength.²³ The drug was mainly captured inside the vesicles and not adsorbed on their surface as indirectly revealed by the complexation of DTZ with encapsulated bromophenol blue inside the liposomes (Fig. 4.8), and the augmentation of uptake capacity with entrapped volume (Fig. 4.9). The liposomes were relatively stable in biological fluids with a minimal internal pH increase when incubated in 80% plasma at different concentrations (Fig. 4.10). The stability of the pH gradient comes from the limited permeability of charged molecules (*e.g.* protons) through the hydrophobic phospholipid membrane and from the high buffering capacity of the entrapped citrate. Similarly, a complementary experiment showed that the citrate buffer remained trapped in the liposomes *in vivo* after intravenous (i.v.) injection, as indicated by the parallel blood profiles of radiolabeled lipid and citrate (Fig. 4.11).

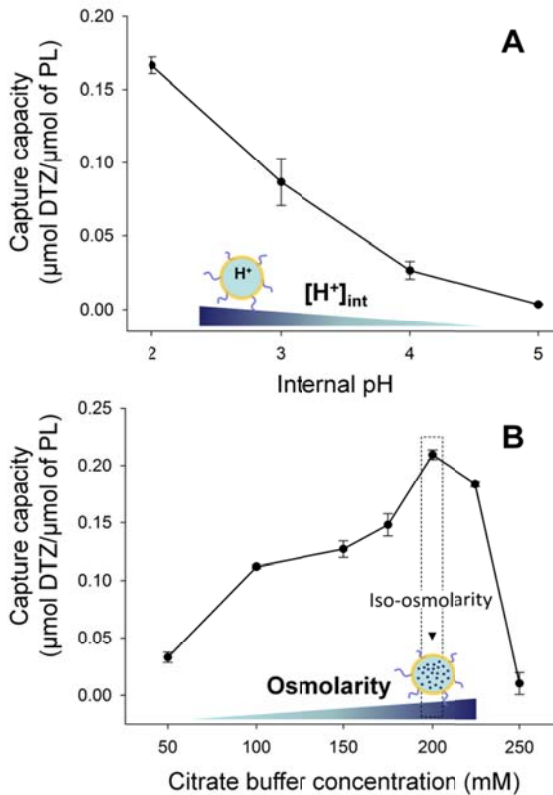


Figure 4.2 Internal buffer parameters influencing DTZ capture. **(A)**. The greater the gradient between internal and external pHs, the more efficient the capture (buffer concentration 150 mM, values represent means \pm SD, $n=3$). **(B)**. Capture increases with buffer strength until iso-osmolarity is reached (buffer pH 3, values represent means \pm SD, $n=3$). Values are normalized for the amount of PL in the formulation.

4.4.2. Uptake of DTZ and comparison with other formulations

Fig. 4.3 charts DTZ uptake in HBS and in the presence of 50% plasma by different colloidal formulations, including the commercially-available IFE Intralipid[®]. Transmembrane pH-gradient liposomes surpassed the IFE (Intralipid[®] 20%) by 40-fold in terms of capture capacity. They were also largely superior to neutral liposomes with an internal pH of 7.4 and negatively-charged liposomes (prepared with anionic 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG) instead of Egg PC), which have

recently been reported in the literature to be potential detoxifying systems, but were never tested *in vivo*.^{24, 25} The presence of plasma reduced the uptake capacity of transmembrane pH-gradient liposomes by about 35%. This was substantially better than IFE which experienced a loss of more than 3-fold DTZ uptake in plasma. The superior uptake capacity of the transmembrane pH-gradient liposomes over the IFE was confirmed with another, more hydrophilic basic drug, bupivacaine (Fig. 4.12). In a clinical context of drug overdose, this higher capture efficiency is of paramount importance because it would translate into much lower administered doses, shorter administration times, and faster onset of action. The smaller amounts injected also reduce the risks of metabolic disorders and other adverse effects potentially associated with lipid perfusion.¹¹

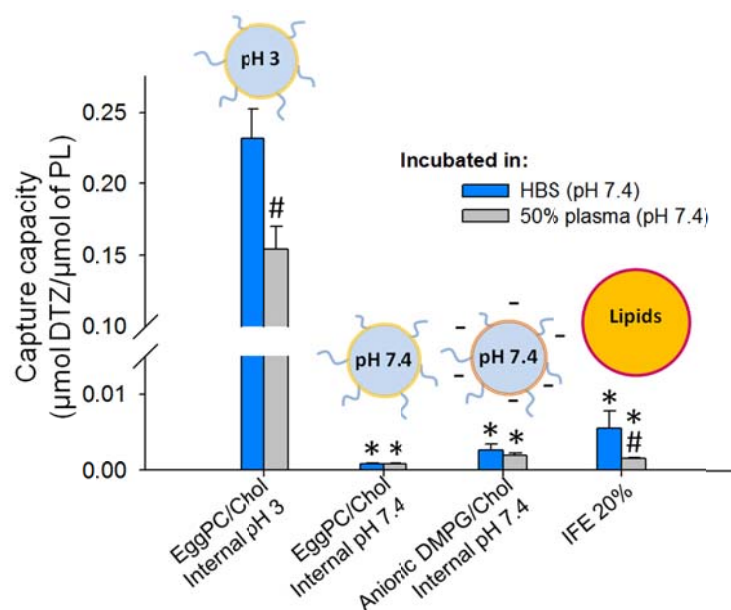


Figure 4.3 DTZ capture by different formulations in the presence of plasma. Values represent means \pm SD, n=3. Values are normalized for the amount of PL in the formulation. # p<0.05 vs. same formulation in HBS, * p<0.05 vs. liposomes EPC/Chol internal pH 3 in plasma.

4.4.3. Impact of liposomes on the PK of DTZ and DAD

When given alone, DTZ has a high, non-physiological V_d ranging between 1.5 to 4 L/kg in rats,²⁶ and slightly superior in humans.²⁷ This implies that DTZ is highly distributed in tissues and only a small fraction circulates in the blood. The DTZ metabolite DAD possesses around 25 to 50% of the pharmacological activity of the parent drug.^{28, 29} It is produced by lung, liver and blood esterases.³⁰⁻³² Its PK profile in rats is similar to that of DTZ, with high V_d and rapid plasma Cl.^{26, 29, 30} The large V_d , combined with high plasma protein binding (70-80%) of DTZ and DAD, explains the inadequacy of conventional hemodialysis and hemoperfusion detoxification techniques.³³ It also justifies the need for effective circulating colloidal detoxifying agents to limit distribution toward the peripheral compartments.³⁴ The *in vivo* experimental procedure followed in this manuscript was aimed at characterizing the *in situ* uptake of DTZ.

Tableau 4.1 PK parameters for DTZ and DAD in the presence and absence of liposomes.

Mean \pm SD (n=7-8), * p<0.05 vs. control.

	Control	Liposomes	Difference (fold)	
DTZ	C_{max} (ng/mL)	2421 \pm 871	33,698 \pm 8135*	14
	$AUC_{(0-6h)}$ (ng.h/mL)	1520 \pm 445	9188 \pm 1671*	6
	$t_{1/2}$ (h)	0.86 \pm 0.48	0.92 \pm 0.38	-
	V_d (mL/kg)	2141 \pm 548	105 \pm 37*	20
	Cl (mL/h)	1091 \pm 276	180 \pm 34*	6
DAD	C_{max} (ng/mL)	2430 \pm 1032	30,583 \pm 8045*	13
	$AUC_{(0-6h)}$ (ng.h/mL)	1213 \pm 605	30,951 \pm 13,459*	26
	$t_{1/2}$ (h)	0.59 \pm 0.22	0.72 \pm 0.75	-

DTZ was administered intravenously to avoid extensive metabolism *via* the first-pass effect and to allow the determination of main PK parameters. Fig. 4.4, Table 4.1 and Table 4.3 show the PK profiles and parameters of DTZ (A) and DAD (B) in the absence and presence of a pre-injected bolus of transmembrane pH-gradient liposomes. Due to the rapid distribution of intravenously injected DTZ, the antidote was administered before the drug. This allowed a better monitoring of the uptake process. It is clear, however, that in an oral overdose context, the liposomes would be given after drug ingestion. In the control group, the PK of i.v.-injected DTZ and DAD was similar to that reported in the literature for similar doses.^{26, 29, 30} The impact of liposome administration on the blood profile of DTZ was predominant in the early distribution phase of the drug, with a C_{\max} 14-fold higher than in the control group (Fig. 4.4.A and Table 4.1). This resulted in a 20-fold lower V_d , and a 6-fold increase in the $AUC_{(0-6h)}$. The increment of plasma drug exposure reflected early confinement in the blood compartment. The action of liposomes on DTZ PK declined over time until 2 h after the injection. After that time, the blood levels in both groups were superimposed. Hence, $t_{1/2}$ remained similar, and the decrease in Cl can be mainly explained by the reduced V_d .

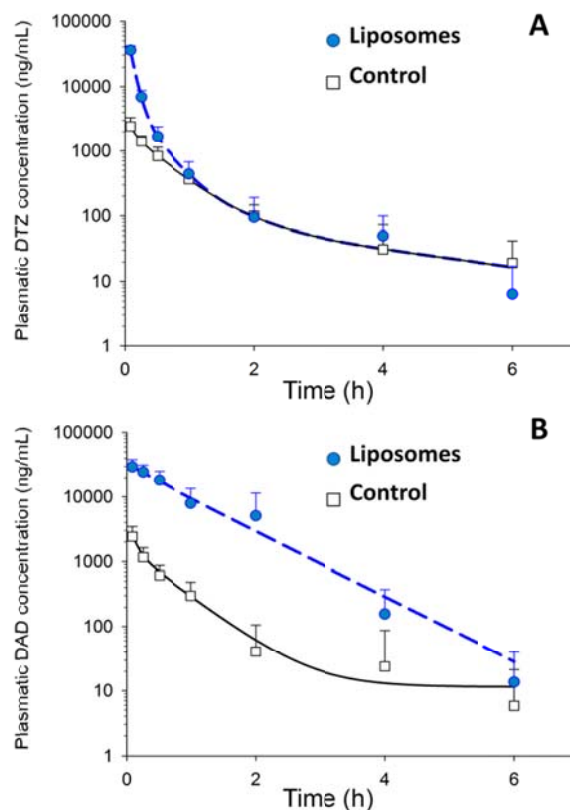


Figure 4.4 Plasma concentrations of DTZ and DAD in control and liposome-treated rats. **(A)**. The influence of liposomes on DTZ is seen mostly during the distribution phase. **(B)**. The liposomes also captured DAD, and the effect was more prolonged than with DTZ. Mean \pm SD (n= 7-8), lines are used as eye-guides only.

Interestingly, the outcome of liposome pretreatment on DAD exposure was much more pronounced (Fig. 4.4.B). Liposomes enhanced the C_{max} and $AUC_{(0-6h)}$ by 13- and 26-fold, respectively. Although V_d could not be calculated because DAD is not the sole metabolite of DTZ, these findings confirm that the most important active metabolite of DTZ could also be captured and sequestered in the blood compartment. The effect of liposome pretreatment on the metabolite was maintained for more than 2 h after DTZ injection, resulting in the higher increase in $AUC_{(0-6h)}$ compared to the parent drug (6- versus 26-fold increase for

DTZ and DAD, respectively). This difference in effectiveness is difficult to rationalize as DTZ and DAD have the same pK_{as} (7.57 ± 0.05 for DTZ and 7.68 ± 0.05 for DAD), the same affinity for plasma proteins and their capture in liposomes *in vitro* was found to be identical (Fig. 4.13). However, it can be hypothesized that, by heightening the concentration of drug in the blood pool, liposomes may augment the DTZ exposure to the blood esterases, making the newly-formed metabolite readily available for capture by circulating liposomes. Indeed, Fig. 4.14 supports such a mechanism. In this experiment, DTZ was loaded into liposomes and the latter were incubated in whole blood for 4 h. During that period, intravesicle DAD concentration rose by 4-folds, while that of DTZ decreased. Such an effect was not observed for DTZ-loaded liposomes incubated in HBS.

4.4.4. Impact of liposomes on the pharmacological activity of DTZ

In subsequent experiments, the influence of liposomes on the hypotensive activity of DTZ was monitored for 60 min (Fig. 4.5 and Table 4.4). The first set of experiments examined the effect of an i.v. bolus of 5 mg/kg DTZ (Fig. 4.5.A), while the second studied the hemodynamic response to a bolus (5 mg/kg) followed by continuous i.v. perfusion (8 mg/kg/h) (Fig. 4.5.B). This second dosing schedule was chosen to evaluate if liposomes were able to maintain their efficacy when higher DTZ doses were administered. Fig. 4.5.A, shows the relative variation of mean arterial blood pressure (MAP) after a single bolus of DTZ. A significantly lower maximum pressure drop (Δ Max) was seen when liposomes were injected into rats. Likewise, the mean hypotensive action of DTZ, assessed by the area under the relative-pressure vs. time curve ($AUC_{(0-60min)}$), also decreased significantly. After the initial drop in blood pressure, the recovery profiles were parallel, in agreement with the PK data, suggesting that liposomes exert most of their effect during the distribution phase, when DTZ concentrations are high. Fig. 4.5.B illustrates the hemodynamic profile when rats were continuously perfused with DTZ, following the administration of a bolus. These conditions allowed the administration of higher drug doses with a dosing schedule that

could be related to the blood exposure observed with sustained DTZ oral absorption. Once again liposomes attenuated the hypotensive effect of DTZ, as revealed by 1.5- and 1.7-fold decreases in Δ Max and $AUC_{(0-60\text{min})}$, respectively. These findings suggest that the sequestration of DTZ, and DAD can partially abrogate the pharmacological activity of DTZ. Likewise, even when higher doses are administered in a sustained fashion, long-circulating liposomes maintain their detoxifying properties.

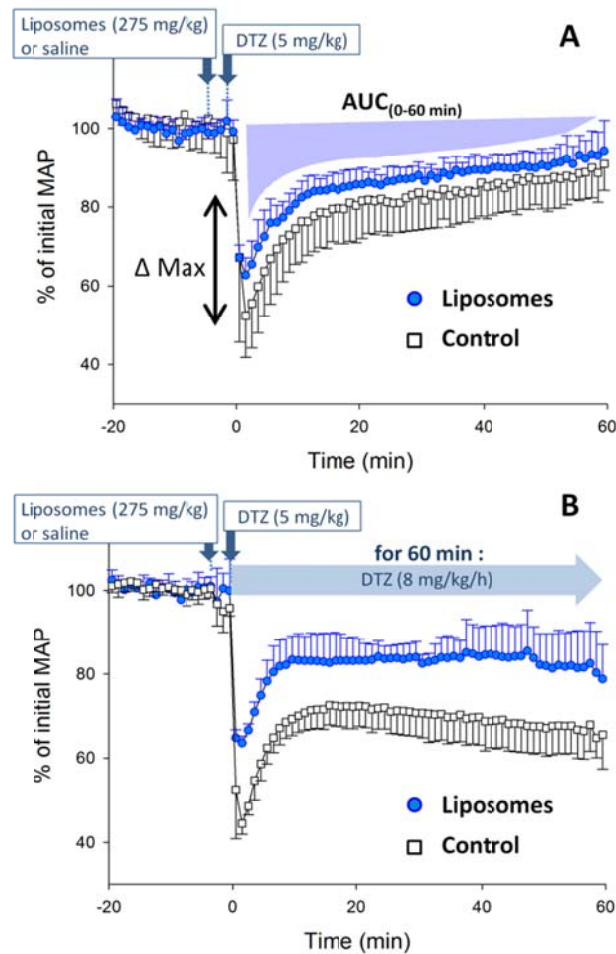


Figure 4.5 Influence of liposomes on the hypotensive effect of DTZ. **(A)**. After a bolus injection of DTZ, the liposomes minimized the drop in blood pressure. **(B)**. The effect of liposomes was more pronounced when higher DTZ doses were perfused over 1 h. Mean \pm SD (n=5-6).

4.5. Conclusions

Stable liposomes with a transmembrane pH gradient were designed to trap DTZ and its active metabolite both *in vitro* and *in vivo*. In a simple i.v. model, the formulation was shown to diminish the pharmacological hypotensive effect of the drug after a single bolus injection and sustained perfusion. Based on this optimistic proof of concept, further studies are anticipated to focus on experimental designs closer to a clinical intoxication context. However, the unique properties of liposomes, which combine well-established innocuousness, long circulation properties, and efficient drug capture, strengthen the belief that they could be a viable alternative to IFE, and other scavenging particulate systems in development^{10, 35, 36} for the treatment of CCB overdose. Moreover, because the ion-trapping phenomenon applies to most ionisable molecules, it is believed that the versatility of the formulation could straightforwardly transpose to a variety of other drugs.³⁴ The latter feature is particularly important, given recent interest in developing pluripotent universal antidotes.³⁷ Finally, one important issue that will have to be addressed in the future is the necessity of PEGylating the liposomes. Intoxication with sustained release oral formulations of CCB will probably require scavenging formulations that remain in the circulation for prolonged periods of time. However, while PEG-phospholipids are useful to provide the liposomes with stealth properties, they have also been associated with complement-activated pseudoallergic reactions.^{38, 39} In the context of drug overdose, the relatively large dose of liposomes that may be given to treat the intoxication may obviate the need to PEGylate the liposomes given that the saturation of the MPS might suffice to increase their biological half-life.⁴⁰

4.5.1. Acknowledgements

Support from the Swiss National Science Foundation (ID 31003A_124882) and the Canada Research Chair program are acknowledged. N.B. received a scholarship from Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ)..

4.5.2. Supporting Information Available:

Additional methods and results on the synthesis of DAD, *in vitro* uptake experiments, stability of the pH-gradient and citrate loading, and *in vitro* experiments on the conversion of DTZ to DAD. Tables of formulations used during experiments, detailed results of the PK and pharmacodynamic experiments, and statistical tests used in each figure and table are also reported. This material is available free of charge *via* the Internet at <http://pubs.acs.org>.

4.6. Supporting information

4.6.1 Supplementary Methods

4.6.1.1 Synthesis of deacetyl-diltiazem and determination of pK_as

The DTZ metabolite, DAD, was obtained by deacetylation of 500 mg of diltiazem in 0.5 M NaOH in methanol/water 40% (v/v) under stirring at room temperature for 1 h. The product was recovered by liquid-liquid extraction with dichloromethane after evaporating the methanol under reduced atmosphere. The yield was ~65%, and structure was confirmed by H-NMR (¹H, 300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.31 (s; 6H), 2.51 (m; 1H), 2.74 (m; 1H), 3.74 (m; 1H), 3.85 (s; 3H), 4.32 (d; J= 4.0 Hz, 1H), 4.51 (m; 1H), 4.92 (d; J= 4.0 Hz; 1H), 6.92 (d; J= 4.0 Hz ; 2H), 7.11-7.53 (m, 5H), 7.73 (m; 1H), ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 46.39, 48.49, 56.12, 57.4, 70.1, 114.5, 125.3, 127.0, 128.5, 129.7, 131.5, 132.2, 136.2, 145.6, 160.7, 172.2, and high resolution mass spectrometry (on LC-MSD TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)) Calculated for C₂₀H₂₅N₂O₃S: 373.15804; Found 373.15745; δ= -1.58 ppm. Purity in excess of 97% was confirmed by HPLC.

The pK_as of DTZ and DAD were determined in 35 % methanol/water (v/v) by direct alkaline titration, and the pK_a in pure water (^wpK_a) was extrapolated with equation 1⁴⁴:

$${}^s pK_a = a_{s^w} {}^w pK_a + b_s \quad (1)$$

Where s_pK_a is the pK_a obtained by titration in 35 % methanol, and values of a_s and b_s are 0.988, and -0.204 as proposed for 35 % methanol in ⁴⁴.

4.6.1.2. Interaction of bromophenol blue (BPB) with DTZ

The interaction of 0.025% BPB with diltiazem was assessed by incubating the probe with different amounts of drug⁴⁵. BPB-loaded liposomes were prepared by the lipid-film hydration/extrusion method using a pH 3, 200-mM citrate buffer containing 0.025% BPB. Immediately after SEC purification, liposomes were incubated in HBS pH 7.4 buffer with or without 1 mM DTZ. The BPB absorbance was measured from 350 to 800 nm with a Safire plate reader (Tecan, Durham, NC) after 10 and 30 min. At the end of the experiment, the liposomes were lysed with 10 μ L of Triton® X-100 (10%).

4.6.1.3. Determination of captured volume of liposomes

The entrapped (or captured) volume of liposome (measured in μ L/ μ mol of PL) corresponds to the aqueous volume delimited by the PL membrane⁴⁶. It varies according to membrane lamellarity, PL concentration, and vesicle size distribution and shape⁴⁷. To determine it experimentally, liposomes of different diameters were prepared by extrusion as described in the Methods section except that [¹⁴C]-citric acid (100-124 mCi/mmol, Perkin Elmer, Waltham, MA) was added to the hydration buffer at a concentration of 0.5 μ Ci/mL. After purification by SEC on a Sephadex G-50 column, the entrapped amount of [¹⁴C]-citric acid was immediately measured by scintillation counting, and volume was normalized for PL content^{23, 47}. The entrapped volume to diameter (Z-average) curve was fitted with descriptive empirical equation 2:

$$\text{Entrapped volume} = y_0 - A e^{(-B \times \text{Diameter})} \quad (2)$$

A $R^2 = 0.999$ was obtained with values of 3.426, 2011.428, and 0.057 for y_0 , A and B, respectively. This equation was then applied to quantify the entrapped volume of liposomes

of different diameters prepared without [^{14}C]-citric acid, and investigated in uptake studies as described in Methods. Capture capacity vs. entrapped volume is plotted in Fig. 4.9.

4.6.1.4. Stability of transmembrane pH gradient

8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (pyranine) (Invitrogen, Carlsbad, CA) fluorescence served as a pH indicator to show stability of the pH gradient in liposomes after exposure to 80 % rat plasma. Liposomes were prepared as described in the Methods section, except that the citrate hydration buffer (pH 3, 200 mM) contained 5 mM pyranine. Liposomes were purified by SEC on a Sephadex G-50 column, and incubated in 80% plasma or HBS. After different incubation times (0, 1, 2 and 6 h), the liposomes were purified by SEC on a Sepharose CL-4B column. The fluorescence spectra of entrapped pyranine (from 350 to 495 nm) were measured in a 96-well plate, on a Safire plate reader (Tecan, Durham, NC) with an emission wavelength of 520 nm. The ratio of fluorescence at 405 over 455 nm was used to determine the increase in pH⁴⁸.

4.6.1.5. Pharmacokinetics of liposomes and encapsulated citrate buffer

Dual-labeled liposomes were prepared as described in the Methods section. [^3H]-cholesteryl hexadecylether ([^3H]-CHE) (50-60 mCi/mmol, American Radiolabeled Chemicals, St Louis, MO) and [^{14}C]-citric acid (100-124 mCi/mmol, Perkin Elmer, Waltham, MA), were added during lipid-film preparation and hydration, respectively. Liposomes were purified by dialysis (Spectra/Por regenerated cellulose with a membrane cut-off of 6-8000 kDa) and the blood profiles of both isotopes were monitored in Sprague-Dawley rats by scintillation counting as described elsewhere²¹.

4.6.1.6. *In vitro* bupivacaine capture study.

Bupivacaine capture by the transmembrane pH-gradient liposomes was determined by incubating 1 mM bupivacaine HCl (Sigma, St Louis, MO) spiked with radiolabeled [^3H]-bupivacaine HCl (1-5 Ci/mmol, Moravek, Brea, CA) with liposomes or IFE 20% (2.5 mM of PL) as described for the DTZ capture experiment. Free drug was separated from the

colloidal formulation by SEC, and scintillation counting was used to determine the amount of drug in each fractions. Capture capacity was normalized for PL content.

4.6.1.7. Deacetylation of encapsulated DTZ in blood

Liposomes were prepared, and DTZ was loaded in vesicles by incubation as outlined in the Methods section. Free drug was removed from the vesicles by SEC, and liposomes containing 300 µg of DTZ and 10 µg of DAD were incubated in 1 mL HBS, pH 7.4, or freshly collected, EDTA-anticoagulated rat blood (Ht ≈60%). At different time intervals, the DAD/DTZ ratio in solution (total) and in unbound form (free) was assessed by HPLC. The free drug concentration was obtained after ultrafiltration at 12,000 g on 30-kDa Amicon Ultra-0.5, centrifugation units (Millipore, Billerica, MA). The drug ratio inside the liposomes was determined by subtracting free DTZ and DAD concentrations from total concentrations in solution. At all time points, the percentage of leaked drug was below 12% of total content.

4.6.1. 8. Supplementary secondary pharmacokinetic parameters

The area under the first moment curve from 0 to 6h ($AUMC_{(0-6h)}$) was calculated using the trapezoidal method. The area under the first moment curve from 6 h to infinite ($AUMC_{(6h-\infty)}$) was determined using equation 3:

$$AUMC_{(6h-\infty)} = \frac{C_{last} \times t_{last}}{K_{el}} \times \frac{C_{last}}{K_{el}} \quad (3)$$

The area under the first moment curve from 0 to infinite ($AUMC_{(0-\infty)}$) was obtained from the addition of $AUMC_{(0-6h)}$ and $AUMC_{(6h-\infty)}$. The mean residence time (MRT) was calculated from the ratio of $AUMC_{(0-\infty)}$ to $AUC_{(0-\infty)}$. The volume of distribution at steady-state (Vd_{ss}) was calculated by multiplying the MRT by Cl, and the volume of distribution based on the total area under the concentration vs. time curve (Vd_{area}) by dividing Cl by K_{el} .

4.6.2 Supplementary results

Tableau 4.2 Liposome formulations tested. Mean \pm SD (n=3).

	----- Internal buffer -----		---- Vesicle diameter ----				Notes
	pH	Citrate conc. (mM)	Osmolarity (mOsm/kg)	Z-average (nm)	PdI		
Figure 4.2.A	2	150	298 \pm 1	130 \pm 4	0.074 \pm 0.014	-	
	3	150	305 \pm 1	141 \pm 1	0.094 \pm 0.057	-	
	4	150	295 \pm 1	150 \pm 3	0.067 \pm 0.016	-	
	5	150	360 \pm 2	137 \pm 4	0.055 \pm 0.016	-	
Figure 4.2.B	3	50	73 \pm 2	139 \pm 5	0.068 \pm 0.019	-	
	3	100	150 \pm 1	142 \pm 4	0.048 \pm 0.004	-	
	3	150	220 \pm 1	141 \pm 2	0.054 \pm 0.009	-	
	3	175	255 \pm 1	140 \pm 3	0.054 \pm 0.009	-	
	3	200	293 \pm 1	146 \pm 2	0.054 \pm 0.012	-	
	3	225	328 \pm 1	144 \pm 4	0.074 \pm 0.006	-	
	3	250	365 \pm 2	141 \pm 3	0.047 \pm 0.004	-	
Figure 4.3	3	200	293 \pm 1	143 \pm 3	0.067 \pm 0.018	Optimized formulation	
	7.4	NA	292 \pm 1	143 \pm 4	0.069 \pm 0.009	EPC/Chol containing HBS, pH 7.4	
	7.4	NA	292 \pm 1	143 \pm 2	0.062 \pm 0.015	DMPG/Chol containing HBS, pH 7.4	
	-	-	-	285 \pm 6	0.121 \pm 0.015	Intralipid® 20%	
Figures 4.4 & 4.5	3	200	293 \pm 1	141 \pm 4	0.093 \pm 0.004	Fig. 4	
	3	200	293 \pm 1	142 \pm 2	0.068 \pm 0.015	Fig. 5A	
	3	200	293 \pm 1	145 \pm 3	0.041 \pm 0.027	Fig. 5B	
Figure 4.7	3	50	73 \pm 2	139 \pm 5	0.068 \pm 0.019	-	
	3	100	150 \pm 1	142 \pm 4	0.048 \pm 0.004	-	
	3	150	220 \pm 1	141 \pm 2	0.054 \pm 0.009	-	
	3	50	296 \pm 1	139 \pm 5	0.054 \pm 0.008	Made iso-osmolar with NaCl	
	3	100	302 \pm 2	139 \pm 4	0.053 \pm 0.002		
	3	150	305 \pm 1	144 \pm 4	0.049 \pm 0.012		

Table 4.2 (cont'd)

Figure 4.8	3	200	343±3	157±3	0.061±0.015	Containing 0.025% bromophenol blue (BPB)
Figure 4.9	4	150	295±1	128±3	0.065±0.017	Containing [¹⁴ C]-citrate for internal volume measurement
	4	150	295±1	144±2	0.087±0.012	
	4	150	295±1	170±6	0.056±0.014	
	4	150	295±1	190±4	0.163±0.028	
	4	150	295±1	127±3	0.080±0.006	
	4	150	295±1	153±2	0.078±0.007	
	4	150	295±1	159±2	0.066±0.026	
	4	150	295±1	174±1	0.120±0.030	
	3	150	293±1	181±6	0.079±0.011	
	3	150	293±1	142±3	0.047±0.030	
3	150	293±1	127±2	0.051±0.014	-	
Figure 4.10	3	200	320±3	132±4	0.051±0.013	Containing 5 mM pyranine
	3	200	320±3	156±1	0.071±0.016	
	3	200	320±3	158±2	0.067±0.010	
Figure 4.11	3	100	150±1	135±4	0.049±0.026	Containing [³ H]-CHE and [¹⁴ C]-citric acid
Figure 4.12	3	200	-	148±3	0.056±0.030	-
	-	-	-	285±6	0.121±0.015	Intralipid® 20%
Figures 4.13 & 4.14	3	200	293±1	148±5	0.037±0.022	Fig. S5
	3	200	293±1	142±2	0.099±0.012	Fig. S6 Loaded with DTZ before incubation

Pdl: Polydispersity index

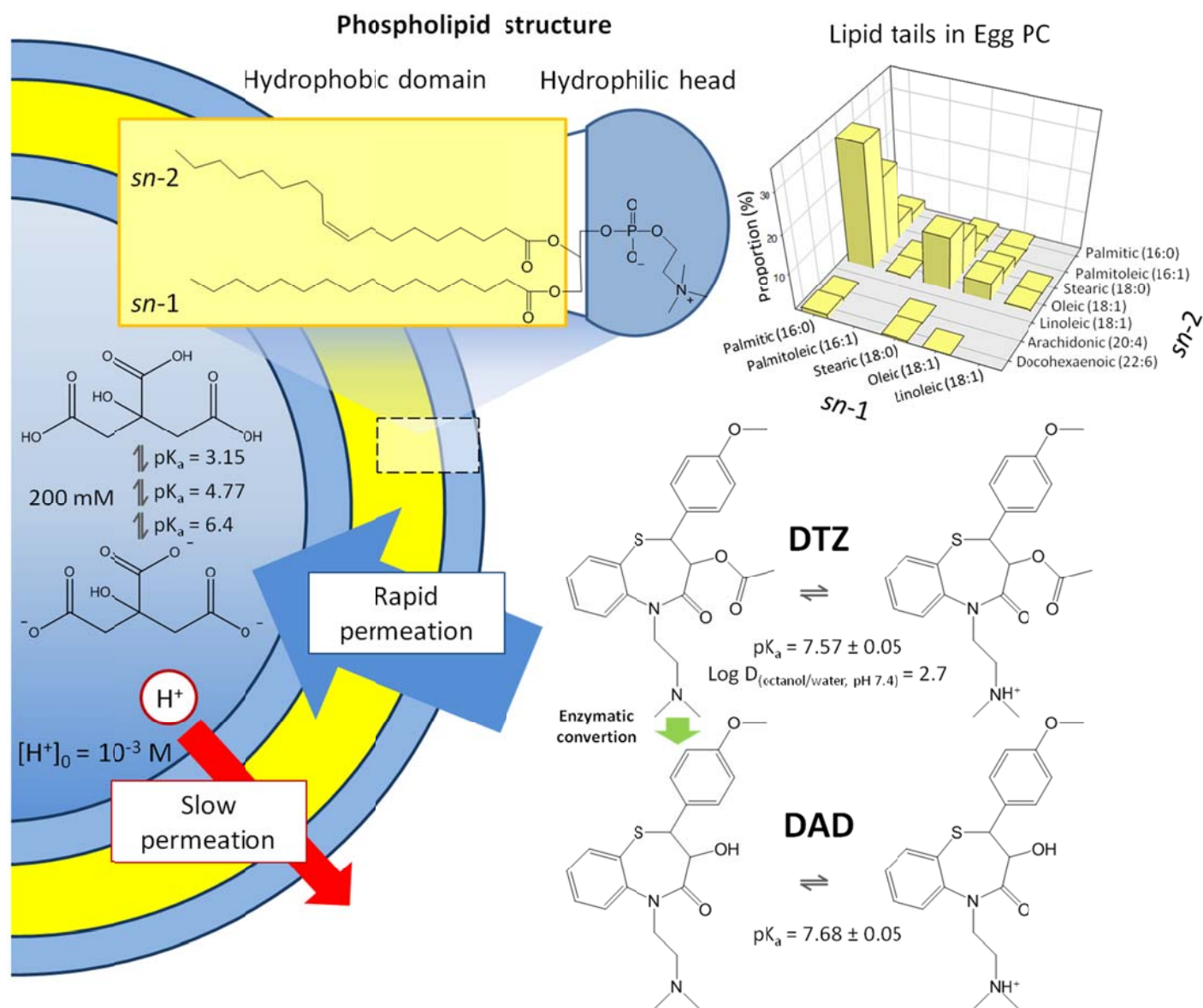


Figure 4.6 Structures of Egg PC, citrate, DTZ and DAD. Egg PC lipid chains were obtained from reference⁴⁹ and DTZ partition coefficient from reference⁵⁰. [H⁺]₀: initial proton concentration.

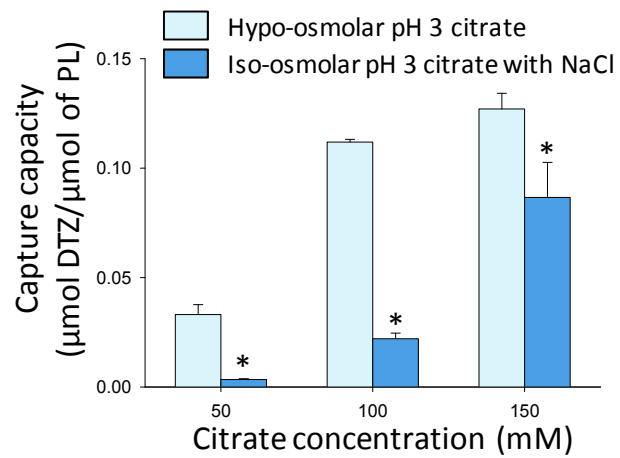


Figure 4.7 Influence of ionic strength on capture. Mean \pm SD (n=3), *p<0.05 vs. same citrate concentration hypo-osmolar buffer. With liposomes containing the same citrate concentration, buffers made iso-osmolar with NaCl are less efficient to take up DTZ than their hypo-osmolar counterpart. Ion concentration inside the liposomes affects drug capture.

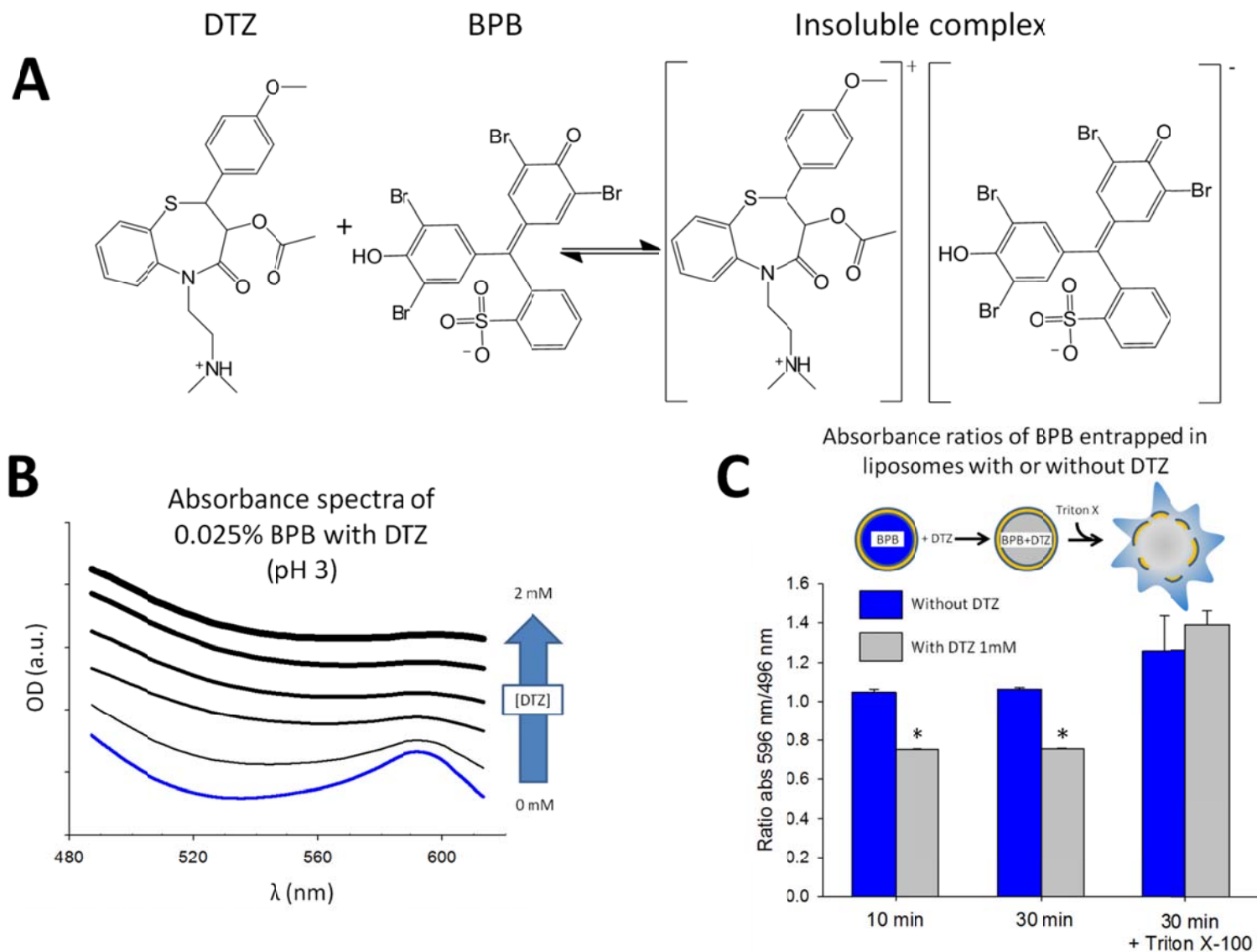


Figure 4.8 Interactions of DTZ with BPB inside the liposomes. **(A)**. Schematic representation of the interaction between DTZ and BPB. **(B)**. Absorbance spectra of BPB with increasing DTZ concentrations. **(C)**. Ratio of absorbance (596 nm/496 nm) of BPB entrapped in liposomes with or without DTZ 1 mM (Mean \pm SD, $n=4$) * $p<0.05$ vs. incubation without DTZ. Interactions between the drug and the encapsulated probe show that DTZ is rapidly pumped inside the liposomes as a result of the transmembrane pH gradient. Solubilization of the liposomes with Triton® X-100 disrupts the interactions.

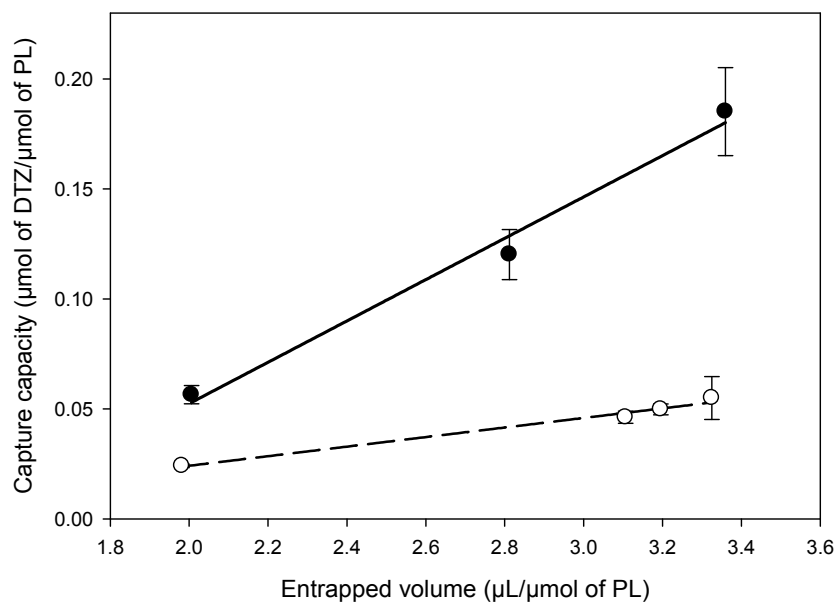


Figure 4.9 Influence of entrapped volume in vesicles on DTZ uptake capacity. Full and empty circles represent vesicles with internal pH 3.0 and 4.0, respectively. Mean \pm SD (n=3). Capture efficiency increases with the volume entrapped in vesicles.

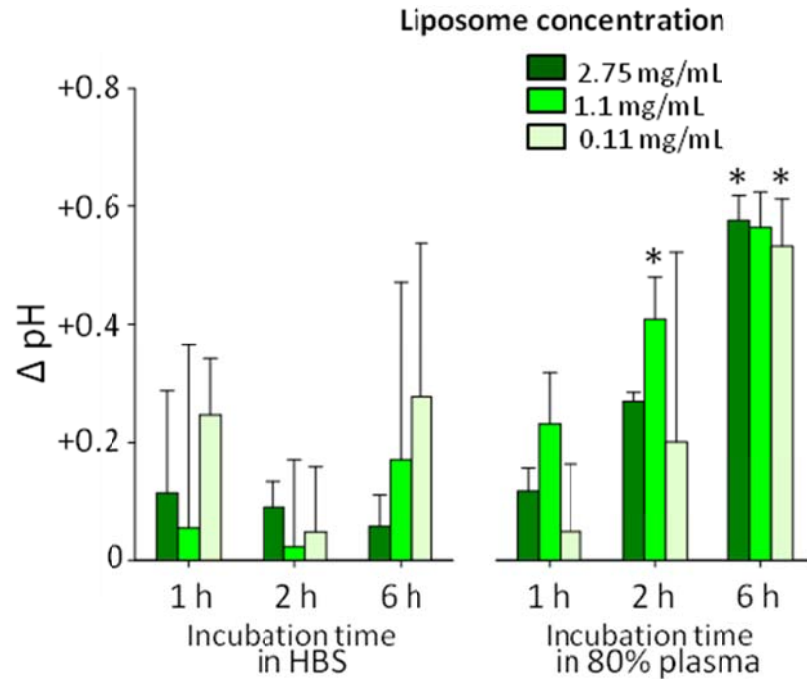


Figure 4.10 Stability of pH gradient in the presence of plasma. Mean \pm SD (n=3-5), *p<0.05 vs. same incubation time in HBS. The pH gradient remains stable when incubated in HBS and increases by less than 0.6 pH units over 6 h when incubated in 80% plasma. Since the liposomes concentrations used in this experiments are comparable to those which could be achieved after intravenous injection, it can be concluded that the pH-gradient should remain stable under physiological conditions.

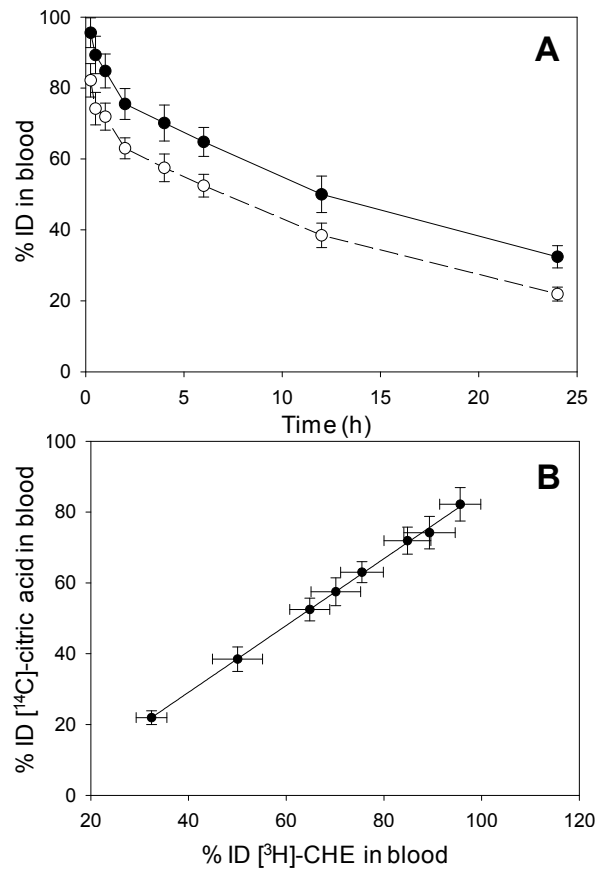


Figure 4.11 Stability of citric acid entrapment in blood. **(A)** Blood circulation profiles of [^3H]-CHE-labelled transmembrane pH-gradient liposomes (full circles) and encapsulated [^{14}C]-citrate buffer (empty circles). **(B)** Linear relationship between injected doses of vesicles and citrate. Mean \pm SD (n=6). The parallel circulation profiles of both isotopes, as well as the linear relation between the circulating doses of vesicles and entrapped citrate buffer, indicate that minimal citrate leakage occurs in the bloodstream during the first 24 h.

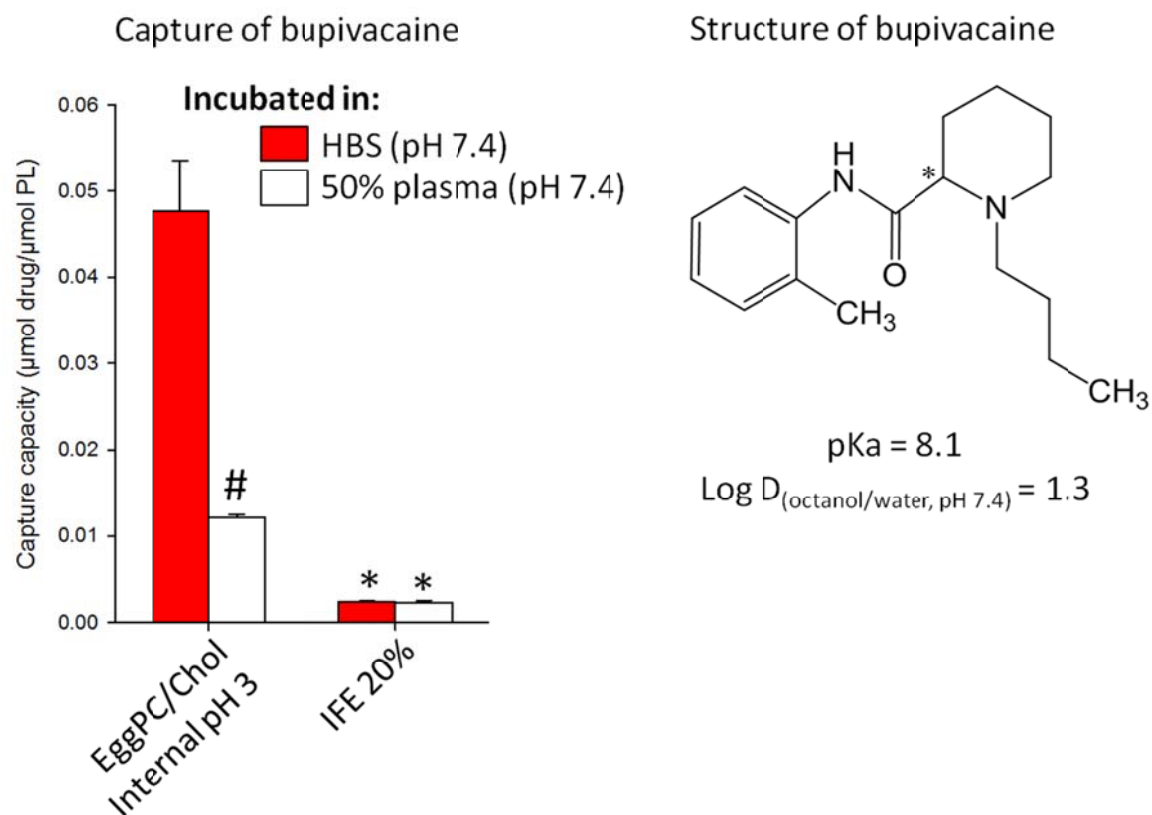


Figure 4.12 Capture of bupivacaine by liposomes with transmembrane pH-gradient and IFE 20%. (Mean \pm SD, n=3). # $p < 0.05$ vs. same formulation in HBS, * $p < 0.05$ vs. liposomes EggPC/Chol internal pH 3 in same incubation medium. Despite the physicochemical differences vs. DTZ (pK_a and log D obtained from references^{10, 51}), the liposomes can efficiently capture bupivacaine.

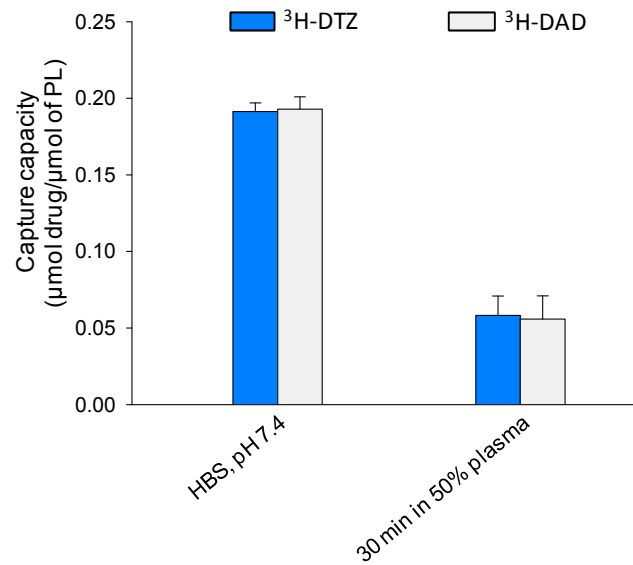


Figure 4.13 *In vitro* capture of DTZ and DAD. Mean \pm SD (n=3), *p<0.05 vs. DTZ in same conditions. Both DTZ and DAD are taken up to a similar extent *in vitro* in the presence and absence of 50% rat plasma. Incubation time in plasma was set at 30 min to minimize the *in situ* conversion of DTZ to DAD. The pK_{a} s of DTZ and DAD are 7.57 ± 0.05 and 7.68 ± 0.05 , respectively.

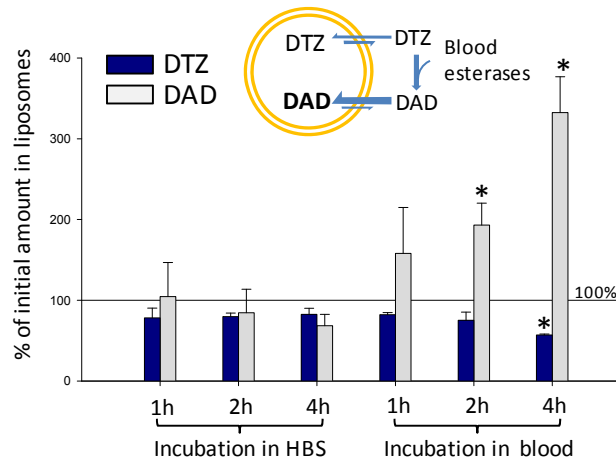


Figure 4.14 Percentage of initial DTZ and DAD amounts in liposomes after incubation in HBS and blood. Mean \pm SD (n=3), * $p < 0.05$ vs. the same drug (DTZ or DAD) after the same incubation time in HBS. The quantities of DTZ and DAD in liposomes remain stable in HBS while the amount of DTZ present in liposomes incubated in blood decreases with the conversion of DTZ to DAD caused by esterases.

Table 4.3 Supplementary secondary PK parameters. Mean \pm SD (n =7-8), *p<0.05 vs. control.

		Control	Liposomes
DTZ	K_{el} (h^{-1})	0.97 \pm 0.36	0.85 \pm 0.28
	$AUC_{(0-\infty)}$ (ng.h/mL)	1562 \pm 458	9 298 \pm 1637*
	MRT (h) ¹	0.92 \pm 0.28	0.29 \pm 0.13*
	AUMC (ng.h ² /mL)	1479 \pm 846	2617 \pm 1040*
	Vd_{ss} (mL/kg)	3023 \pm 1123	162 \pm 93*
	$Vd_{are\bar{z}}$ (mL/kg)	3795 \pm 1274	725 \pm 283*
DAD	K_{el} (h^{-1})	1.26 \pm 0.28	1.52 \pm 0.85
	$AUC_{(0-\infty)}$ (ng.h/mL)	1337 \pm 582	31,364 \pm 13,418*
	MRT (h)	0.70 \pm 0.32	0.86 \pm 0.24
	AUMC (ng.h ² /mL)	1050 \pm 1050	29,518 \pm 19,842*

¹The lower MRT for DTZ in the liposome group could be explained by the change in metabolic profile and V_d of the encapsulated drug (see Table 1 and Fig. S9).

Table 4.4 Hemodynamic parameters after DTZ injection in the presence and absence of liposomes. Mean \pm SD (n =5-6), *p<0.05 vs. control.

		Diastolic		Systolic		MAP	
		Control (NS)	Liposomes (275 mg/kg)	Control (NS)	Liposomes (275 mg/kg)	Control (NS)	Liposomes (275 mg/kg)
DTZ Bolus (5 mg/kg)	Δ Max (%)	-53 \pm 12.3	-40 \pm 3.4*	-46 \pm 8.7	-34 \pm 3.9*	-50 \pm 10.7	-38 \pm 3.4*
	$AUC_{(0-60min)}$ (%.min)	1484 \pm 508	964 \pm 221*	1003 \pm 184	670 \pm 225*	1287 \pm 362	853 \pm 203*
DTZ Bolus (5 mg/kg) + Perfusion (8 mg/kg/h)	Δ Max (%)	-57 \pm 3.4	-42 \pm 4.4*	-54 \pm 3.1	-31 \pm 3.0*	-56 \pm 2.9	-37 \pm 2.0*
	$AUC_{(0-60min)}$ (%.min)	2100 \pm 394	1442 \pm 140*	1716 \pm 250	735 \pm 188*	1929 \pm 314	1149 \pm 128*

Tableau 4.5 Statistical tests used in figures and tables.

	Number of samples	Reference	Symbol	Statistical test
Fig 4.3	n = 3	vs. same formulation in HBS	#	t-test
	n = 3	vs. EPC/Chol Internal pH 3 in same medium	*	Kruskal-Wallis and SNK
Fig 4.7	n = 3	vs. same citrate concentration hypo-osmolar	*	t-test
Fig 4.8	n = 4	vs. incubation without DTZ	*	Mann-Whitney U
Fig 4.10	n = 3-5	vs. same incubation time in HBS	*	t-test
Fig 4.12	n = 3	vs. same formulation in HBS	#	t-test
	n = 3	vs. EPC/Chol Internal pH 3 in same medium	*	t-test
Fig 4.13	n = 3	vs. DTZ in the same condition	*	t-test
Fig 4.14	n = 3	vs. same drug at same incubation time in HBS	*	t-test
Table 4.1	n = 7-8	vs. control	*	Mann-Whitney U
Table 4.3	n = 7-8	vs. control	*	Mann-Whitney U
Table 4.4	n = 5-6	vs. control	*	t-test

SNK: Student-Neuman-Keuls *post-hoc* test.

4.7 References

1. Bronstein, A. C.; Spyker, D. A.; Cantilena, L. R.; Green, J. L.; Rumack, B. H.; Giffin, S. L., 2008 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 26th Annual Report. *Clin. Toxicol.* **2009**, *47*, 911-1084.
2. Salhanick, S. D.; Shannon, M. W., Management of Calcium Channel Antagonist Overdose. *Drug Saf.* **2003**, *26*, 65-79.
3. DeWitt, C. R.; Waksman, J. C., Pharmacology, Pathophysiology and Management of Calcium Channel Blocker and β -Blocker Toxicity. *Toxicol. Rev.* **2004**, *23*, 223-238.
4. Bania, T. C.; Chu, J.; Perez, E.; Su, M.; Hahn, I.-H., Hemodynamic Effects of Intravenous Fat Emulsion in an Animal Model of Severe Verapamil Toxicity Resuscitated with Atropine, Calcium and Saline. *Acad. Emerg. Med.* **2007**, *14*, 105-111.
5. Tebbutt, S.; Harvey, M.; Nicholson, T.; Cave, G., Intralipid Prolongs Survival in a Rat Model of Verapamil Toxicity. *Acad. Emerg. Med.* **2006**, *13*, 134-139.
6. Perez, E.; Bania, T. C.; Medlej, K.; Chu, J., Determining the Optimal Dose of Intravenous Fat Emulsion for the Treatment of Severe Verapamil Toxicity in a Rodent Model. *Acad. Emerg. Med.* **2008**, *15*, 1284-1289.
7. Jamaty, C.; Bailey, B.; Larocque, A.; Notebaert, E.; Sanogo, K.; Chauny, J. M., Lipid Emulsions in the Treatment of Acute Poisoning: A Systematic Review of Human and Animal Studies. *Clin. Toxicol.* **2010**, *48*, 1-27.
8. Mazoit, J.-X.; Le Guen, R.; Beloeil, H.; Benhamou, D., Binding of Long-Lasting Local Anesthetics to Lipid Emulsions. *Anesthesiology* **2009**, *110*, 380-386.
9. Weinberg, G. L.; Vadeboncouer, T.; Ramaraju, G.; Garcia-Amaro, M. F.; Cwik, M. J., Pretreatment or Resuscitation with a Lipid Infusion Shifts the Dose-Response to Bupivacaine-Induced Asystole in Rats. *Anesthesiology* **1998**, *88*, 1071-1075.
10. Varschey, M.; Morey, T. E.; Shah, D. O.; Flint, J. A.; Moudgil, B. M.; Seubert, C. N.; Dennis, D. M., Pluronic Microemulsions as Nanoreservoirs for Extraction of Bupivacaine from Normal Saline. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5108-5112.

11. Mirtallo, J. M.; Dasta, J. F.; Kleinschmidt, K. C.; Varon, J., State of the Art Review: Intravenous Fat Emulsions: Current Applications, Safety Profile, and Clinical Implications. *Ann. Pharmacother.* **2010**, *44*, 688-700.
12. Marwick, P. C.; Levin, A. I.; Coetzee, A. R., Recurrence of Cardiotoxicity after Lipid Rescue from Bupivacaine-Induced Cardiac Arrest. *Anesth. Analg.* **2009**, *108*, 1344-1346.
13. Harvey, M.; Cave, G.; Kazemi, A., Intralipid Infusion Diminishes Return of Spontaneous Circulation after Hypoxic Cardiac Arrest in Rabbits. *Anesth. Analg.* **2009**, *108*, 1163-1168.
14. Mayr, V. D.; Mitterschiffthaler, L.; Neurauter, A.; Gritsch, C.; Wenzel, V.; Muller, T.; Luckner, G.; Lindner, K. H.; Strohmenger, H. U., A Comparison of the Combination of Epinephrine and Vasopressin with Lipid Emulsion in a Porcine Model of Asphyxial Cardiac Arrest after Intravenous Injection of Bupivacaine. *Anesth. Analg.* **2008**, *106*, 1566-1571.
15. Hiller, D. B.; Di Gregorio, G.; Ripper, R.; Kelly, K.; Massad, M.; Edelman, L.; Edelman, G.; Feinstein, D. L.; Weinberg, G. L., Epinephrine Impairs Lipid Resuscitation from Bupivacaine Overdose: A Threshold Effect. *Anesthesiology* **2009**, *111*, 498-505.
16. Hicks, S. D.; Salcido, D. D.; Logue, E. S.; Suffoletto, B. P.; Empey, P. E.; Poloyac, S. M.; Miller, D. R.; Callaway, C. W.; Menegazzi, J. J., Lipid Emulsion Combined with Epinephrine and Vasopressin Does Not Improve Survival in a Swine Model of Bupivacaine-Induced Cardiac Arrest. *Anesthesiology* **2009**, *111*, 138-146.
17. Cullis, P. R.; Hope, M. J.; Bally, M. B.; Madden, T. D.; Mayer, L. D.; Fenske, D. B., Influence of Ph Gradient on the Transbilayer Transport of Drugs, Lipids, Peptides and Metal Ions into Large Unilamellar Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1331*, 187-211.
18. Mayer, L. D.; Reamer, J.; Bally, M. B., Intravenous Pretreatment with Empty Ph Gradient Liposomes Alters the Pharmacokinetics and Toxicity of Doxorubicin through in Vivo Active Drug Encapsulation. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 96-102.
19. Dhanikula, A. B.; Lamontagne, D.; Leroux, J. C., Rescue of Amitriptyline-Intoxicated Hearts with Nanosized Vesicles *Cardiovasc. Res.* **2007**, *74*, 480-486.
20. Simard, P.; Hoarau, D.; Khalid, M. N.; Roux, E.; Leroux, J. C., Preparation and in Vivo Evaluation of Pegylated Spherulite Formulations. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1715*, 37-48.

21. Bertrand, N.; Fleischer, J. G.; Wasan, K. M.; Leroux, J. C., Pharmacokinetics and Biodistribution of *N*-Isopropylacrylamide Copolymers for the Design of pH-Sensitive Liposomes. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2598-2605.
22. Torchilin, V. P., Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 145-160.
23. Mui, B. L.-S.; Cullis, P. R.; Evans, E. A.; Madden, T. D., Osmotic Properties of Large Unilamellar Vesicles Prepared by Extrusion. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 443-453.
24. Fallon, M. S.; Chauhan, A., Sequestration of Amitriptyline by Liposomes. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *300*, 7-19.
25. Howell, B. A.; Chauhan, A., Bupivacaine Binding to Pegylated Liposomes. *Anesth. Analg.* **2009**, *109*, 678-682.
26. Lee, Y.-H.; Lee, M.-H.; Shim, C.-K., Pharmacokinetics of Diltiazem and Deacetyldiltiazem in Rats. *Int. J. Pharm.* **1991**, *76*, 71-76.
27. Echizen, H.; Eichelbaum, M., Clinical Pharmacokinetics of Verapamil, Nifedipine and Diltiazem. *Clin. Pharmacokinet.* **1986**, *11*, 425-449.
28. Yeung, P. K.; Feng, J. D. Z.; Buckley, S. J., Pharmacokinetics and Haemodynamic Effect of Deacetyl Diltiazem (M1) in Rabbits after Single Intravenous Administration. *Biopharm. Drug Dispos.* **1998**, *19*, 109-113.
29. Tsui, B. C. H.; Feng, J. D. Z.; Yeung, P. K., Pharmacokinetics and Haemodynamic Effect of Diltiazem in Rats: Effect of Route of Administration. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, *50*, 183-188.
30. Tsui, B.; Feng, J. D. Z.; Buckley, S. J.; Yeung, P. K., Pharmacokinetics and Metabolism of Diltiazem in Rats Following a Single Intra-Arterial or Single Oral Dose. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1994**, *19*, 369-373.
31. McLean, A.; Cefali, E.; Roden, J. S.; Gonzalez, M. A.; Bialer, M., Stability of Diltiazem in Different Biological Fluids. *Biopharm. Drug Dispos.* **1991**, *12*, 327-334.
32. Caillé, G.; Dubé, L.; Théorêt, Y.; Varin, F.; Mousseau, N.; McGilveray, I. J., Stability Study of Diltiazem and Two of Its Metabolites Using a High Performance Liquid Chromatography Method. *Biopharm. Drug Dispos.* **1989**, *10*, 107-114.
33. Roberts, D. M.; Roberts, J. A.; Boots, R. J.; Mason, R.; Lipman, J., Lessons Learnt in the Pharmacokinetic Analysis of the Effect of Haemoperfusion for Acute Overdose with Sustained-Release Diltiazem. *Anaesthesia* **2008**, *63*, 714-718.

34. Leroux, J. C., Injectable Nanocarriers for Biodetoxification. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 679-684.
35. Morey, T. E.; Varshney, M.; Flint, J. A.; Rajasekaran, S.; Shah, D. O.; Dennis, D. M., Treatment of Local Anesthetic-Induced Cardiotoxicity Using Drug Scavenging Nanoparticles. *Nano Letters* **2004**, *4*, 757-759.
36. Hoshino, Y.; Koide, H.; Urakami, T.; Kanazawa, H.; Kodama, T.; Oku, N.; Shea, K. J., Recognition, Neutralization, and Clearance of Target Peptides in the Bloodstream of Living Mice by Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles: A Plastic Antibody. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6644-6645.
37. Oney, S.; Lam, R. T. S.; Bompiani, K. M.; Blake, C. M.; Quick, G.; Heidel, J. D.; Liu, J. Y. C.; Mack, B. C.; Davis, M. E.; Leong, K. W., *et al.*, Development of Universal Antidotes to Control Aptamer Activity. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 1224-1228.
38. Szebeni, J.; Baranyi, L.; Savay, S.; Milosevits, J.; Bungler, R.; Laverman, P.; Metselaar, J.; Storm, G.; Chahan-Khan, A.; Liebes, L., *et al.*, Role of Complement Activation in Hypersensitivity Reactions to Doxil and Hynic PEG Liposomes: Experimental and Clinical Studies. *J. Liposome Res.* **2002**, *12*, 165-172.
39. Moghimi, S. M.; Andersen, A.; Hashemi, S.; Lettiero, B.; Ahmadvand, D.; Hunter, A. C.; Andresen, T.; Hamad, I.; Szebeni, J., Complement Activation Cascade Triggered by PEG-PL Engineered Nanomedicines and Carbon Nanotubes: The Challenges Ahead. *J. Control. Release* **2010**, *146*, 175-181.
40. Allen, T. M.; Hansen, C., Pharmacokinetics of Stealth Versus Conventional Liposomes: Effect of Dose. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1068*, 133-141.
41. Hope, M. J.; Bally, M. B.; Webb, G.; Cullis, P. R., Production of Large Unilamellar Vesicles by a Rapid Extrusion Procedure. Characterization of Size Distribution, Trapped Volume and Ability to Maintain a Membrane Potential. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *812*, 55-65.
42. Bartlett, G. R., Phosphorous Assay in Column Chromatography. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 466-468.
43. Choi, J. S.; Han, H.-K., Enhanced Oral Exposure of Diltiazem by the Concomitant Use of Naringin in Rats. *Int. J. Pharm.* **2005**, *305*, 122-128.
44. Ruiz, R.; Ràfols, C.; Rosés, M.; Bosch, E., A Potentially Simpler Approach to Measure Aqueous pKa of Insoluble Basic Drugs Containing Amino Groups. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 1473-81.

45. Rahman, N.; Hejaz-Azmi, S. N., Extractive Spectrophotometric Methods for Determination of Diltiazem Hcl in Pharmaceutical Formulations Using Bromothymol Blue, Bromophenol Blue and Bromocresol Green. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *24*, 33-41.
46. New, R. R., Chapter 3: Characterization of Liposomes. In *Liposomes: A Practical Approach*, 4th ed.; New, R. R., Ed. Oxford University Press: Oxford, 1990; pp 105-61.
47. Perkins, W.; Minchey, S.; Ahl, P.; Janoff, A., The Determination of Liposome Captured Volume. *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 197-217.
48. Kano, K.; Fendler, J. H., Pyranine as a Sensitive pH Probe for Liposome Interiors and Surfaces. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *509*, 289-99.
49. Kuskis, A.; Marai, L., Determination of the Complete Structure of Natural Lecithins *Lipids* **1967**, *2*, 217-24.
50. Morigushi, I.; Hirono, S.; Nagakome, I.; Hirano, H., Comparison of Reliability of Log P Values for Drugs Calculated by Several Methods. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 976-8.
51. Grant, G. J.; Barenholz, Y.; Piskoun, B.; Bansinath, M.; Turndorf, H.; Bolotin, E. M., Drv Liposomal Bupivacaine: Preparation, Characterization, and *In Vivo* Evaluation in Mice. *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 336-343.

Chapitre 5. Discussion générale

Les travaux effectués dans le cadre de ce projet de doctorat avaient principalement pour but de caractériser la PK de divers composés liés au développement de nouvelles formulations liposomales.

5.1 Le choix de l'analyse non-compartmentale.

La taille des composés de faible poids moléculaire n'est généralement pas un facteur important lorsque l'on s'intéresse à leur circulation ou leur distribution dans l'organisme. En effet, ce sont généralement leurs autres caractéristiques physicochimiques (*e.g.*, solubilité, ionisation) qui influencent les paramètres PK (*e.g.*, V_d , liaison aux protéines plasmatiques). Cependant, tel que décrit dans la section 1.2, les dimensions des macromolécules et des colloïdes affectent grandement leur devenir dans le corps (*e.g.*, interactions avec les protéines, capture par les macrophages, distribution dans les organes). La caractérisation de la taille des composés est donc un paramètre important pour comprendre leur PK.

La taille des macromolécules synthétiques et les colloïdes se distingue de celle des espèces de faible poids moléculaire parce qu'elle n'est pas définie par une valeur précise, mais par une distribution de valeurs. Ce concept est schématisé à la figure 5.1. Pour décrire adéquatement la taille d'une macromolécule ou d'un colloïde, la distribution est caractérisée par une valeur moyenne ainsi qu'une mesure de la dispersion de l'ensemble des valeurs (l'indice de polymolécularité, M_w/M_n pour les polymères et l'indice de polydispersité (PDI, pour « *polydispersity index* ») pour les colloïdes).

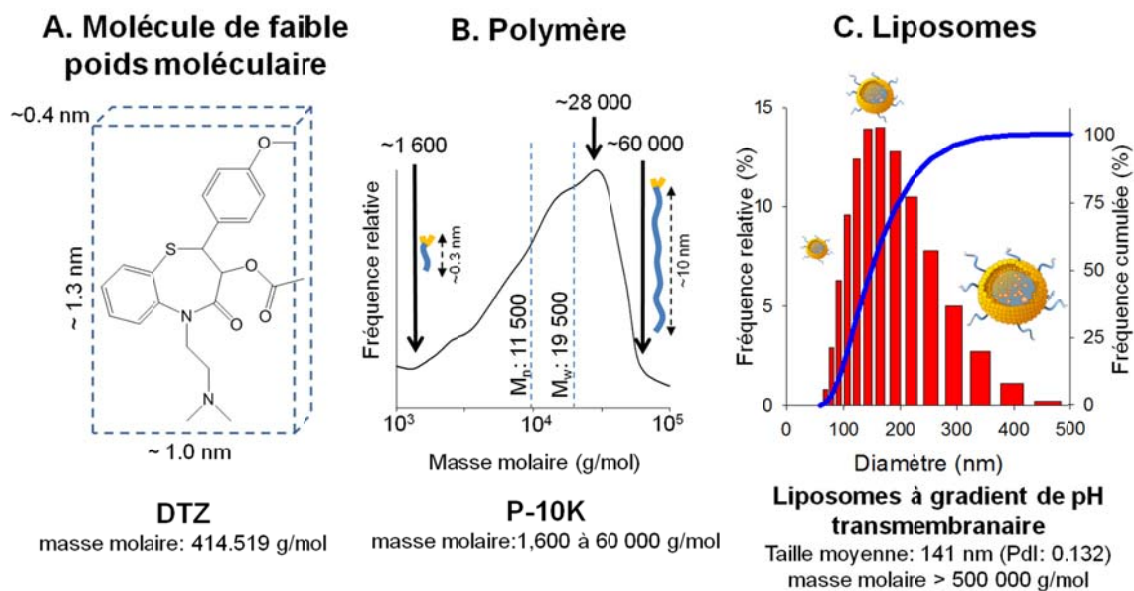


Figure 5.1 La mesure de la taille de différents types de composés. A. Les molécules de DTZ possèdent une masse molaire et des dimensions strictement définies. B. Le polymère P-10K représente un ensemble de chaînes de polymères de tailles différentes. C. Le diamètre des vésicules formant une formulation de liposomes varie entre 70 et 450 nm.

Pour un composé donné (par exemple, le polymère P-10K présenté à la Fig. 5.1.B), on peut s'attendre à ce que les molécules à une extrémité de la distribution (les courtes chaînes d'une masse molaire d'environ 2 000 Da) aient un comportement radicalement différent de celles situées du côté opposé (les longues chaînes de 60 000 Da). Le profil de circulation et de biodistribution observé lors de l'administration d'une préparation de polymère ou de liposomes représente donc le comportement moyen de l'ensemble des molécules/colloïdes.

Lors de ce projet de recherche, des formulations possédant différentes propriétés ont été étudiées. L'impact de chaque caractéristique (*i.e.*, masse molaire, LCST, hydrophilie) sur le comportement des préparations dans l'organisme n'était pas connu initialement. L'analyse PK a donc été utilisée pour comparer les formulations entre elles d'une manière

objective. Le côté prédictif de l'analyse n'a pas été exploité. L'utilisation de l'analyse compartimentale qui exige un plus grand nombre d'assumptions *a priori*, n'a donc pas été privilégiée.

Pour exploiter au maximum le côté descriptif de l'analyse non-compartimentale, quelques pré-suppositions sont nécessaires, même si elles sont moins nombreuses que celles requises pour l'analyse compartimentale. Par exemple, la manière de calculer le MRT dépend de la voie d'administration pour le médicament (Yamaoka et al. 1978). De la même façon, pour pouvoir interpréter le MRT adéquatement, on doit supposer que la PK est linéaire et que toute l'élimination se produit à partir du compartiment central. Dans cette thèse, les principes de PK sont appliqués à un contexte différent de celui utilisé habituellement (*i.e.*, un ensemble de composés aux tailles et aux propriétés différentes; une situation où le volume de distribution peut changer au fur et à mesure que la quantité de liposomes dans le sang diminue ou que la capacité de capture de ceux-ci diminue). Il est donc probable que certaines assomptions soient transgressées. Malgré tout, certains paramètres sont indépendants de toute présupposition puisqu'ils ne reposent que sur des valeurs mesurées expérimentalement (*e.g.*, C_{max} ; $AUC_{(0-t)}$; $V_{d(extrapolé)}$). L'utilisation de ces paramètres sera donc privilégiée pour analyser les résultats et les conclusions tirées de l'analyse PK seront aussi mises en évidence par des expériences indépendantes.

5.2 La PK du poly(NIPAM-co-MAA)

Dans ces travaux, l'analyse PK de différents copolymères de NIPAM a permis de mettre en relief plusieurs aspects intéressants quant à leur devenir dans l'organisme.

Dans un premier lieu, afin de pouvoir en examiner leur profil de circulation dans le sang, il a fallu synthétiser des polymères radiomarqués. La méthode de synthèse choisie a été la polymérisation radicalaire (Leroux et al. 2001; Roux et al. 2002b). L'agent amorceur utilisé pour la polymérisation possédait 2 chaînes alkyles (chaînes saturées de 18 carbones) servant à ancrer le polymère dans les liposomes (Kitano et al. 1991). Afin de suivre les

polymères, nous avons décidé d'incorporer une faible quantité (1 mol%) de [^{14}C]-acrylamide dans la structure du polymère lors de la synthèse. Ce monomère est structurellement similaire aux autres monomères de la chaîne et, en l'intégrant de manière covalente dans la molécule, on s'assure de la stabilité du marquage (Fig. 5.2). Cinq polymères différents ont été produits : 3 de masse molaire différentes (P-40K , P-10K et P-5K), 1 ayant une LCST en-dessous de la température physiologique (P-40K-L) et 1 polymère ne possédant pas la chaîne alkyle nécessaire à l'ancrage dans la membrane des liposomes (P-5K-NA).

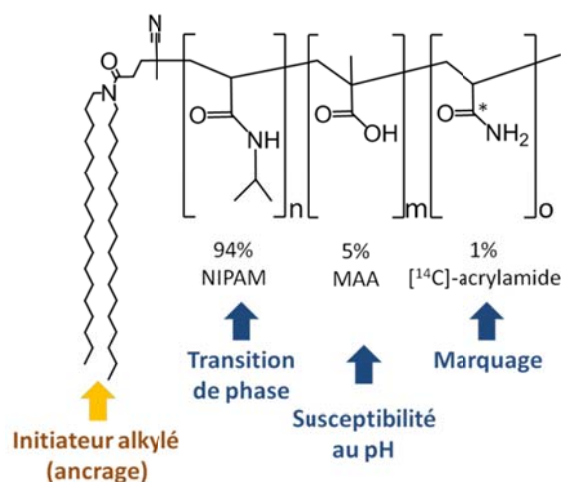


Figure 5.2 Structure du polymère et fonction de chaque composante, n , m et o représentent le nombre d'unités de répétition dans la chaîne.

Les différents polymères ont été administrés par la voie intraveineuse à une dose de 8 mg/kg pour analyser leur profil de circulation plasmatique. Tel que prévu, il s'est avéré que le polymère de haut poids moléculaire (P-40K) demeurait dans la circulation beaucoup plus longtemps que les polymères plus courts (P-10K et P-5K) (Fig. 3.1 et Tableau 3.2). Des observations similaires ont déjà été relatées avec d'autres polymères, tels le pHPMA (Seymour et al. 1987) et le PEG (Yamaoka et al. 1994b). Afin de mieux percevoir le profil de distribution des polymères, la Fig. 3.1 est représentée sous forme semi-logarithmique à la figure 5.3.

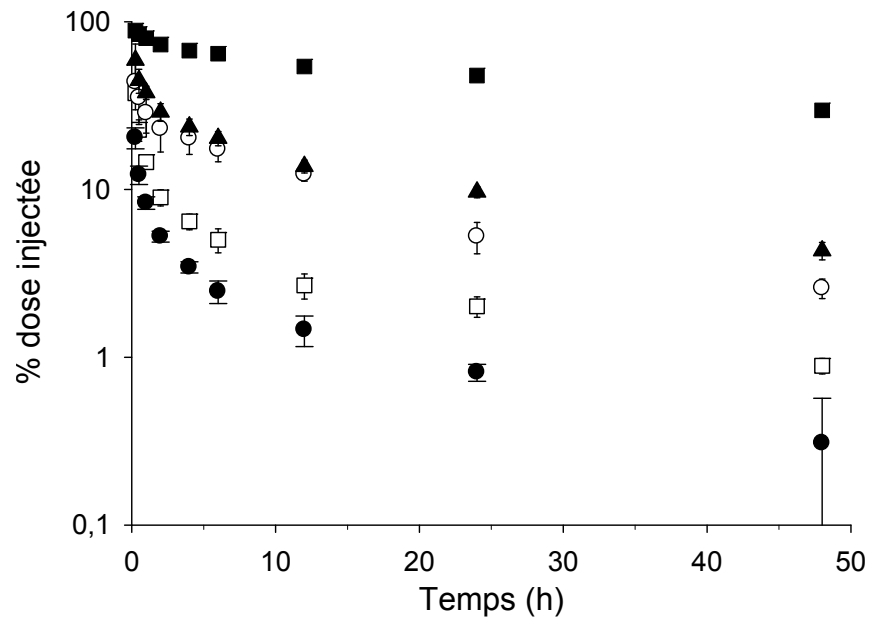


Figure 5.3 Profil de circulation des différents polymères (échelle logarithmique). P-5K (O), P-10K (▲), P-40K (■), P-5K-NA (●) et P-40K-L (□).

Une caractérisation complète de la PK d'un composé après l'administration d'une dose unique nécessite que la partie extrapolée de l'AUC ne représente pas plus de 25 % de l'AUC totale (Gabrielsson et al. 2006). Dans l'étude présentée, les $AUC_{(48h-\infty)}$ de P-5k, P-10k, P-40k, P-5k-NA et P-40k-L représentent respectivement 25, 33, 60, 24 et 26 % de l' $AUC_{(0-\infty)}$. Selon cette règle, l'échantillonnage sur 48 h ne s'avère donc pas suffisant pour caractériser de manière exhaustive la PK de P-10k, P-40k et P-40k-L. Le choix de la durée de l'étude PK a été fait initialement selon des considérations éthiques : afin de ne pas prélever trop de sang chez les animaux, pour limiter le temps passé par ceux-ci en cage métabolique et enfin pour s'assurer que l'étude de distribution tissulaire terminale ne soit pas trop éloignée de l'injection. Ceci étant dit, même si les valeurs des constantes qui dépendent de K_{el} ($T_{1/2}$, $AUC_{(0-\infty)}$, Cl , V_{area}) sont donc possiblement inexactes, les comparaisons entre les polymères sont aussi effectuées grâce à certains paramètres expérimentaux indépendants de K_{el} (*i.e.*, l' AUC_{0-48h} , et la $Cl_{urinaire}$). De plus, chaque

observation tirée de l'analyse PK est corroborée par des résultats expérimentaux complémentaires (*e.g.*, profil d'élimination, distribution dans les organes). Ces deux aspects permettent donc d'accorder plus de certitude aux conclusions tirées de l'analyse PK.

La comparaison des paramètres PK du P-40k à ceux du P-40k-L (d'une taille similaire à celle de P-40k, mais possédant une LCST inférieure à la température du corps) confirme également qu'un point de trouble au-dessus de 37°C est essentiel pour que le polymère circule sous forme hydratée. À cet égard, l'analyse du profil de biodistribution du P-40K-L (obtenu 48 h après l'injection) (Fig. 3.3) nous indique aussi que les agrégats formés lors de la déshydratation du polymère sont suffisamment gros et rigides pour être fortement séquestrés dans les poumons, la rate et le foie (voir section 1.2.6. et 1.2.7.).

Par ailleurs, la pertinence d'effectuer une analyse PK est aussi mise en évidence par la comparaison des profils de circulation du P-5k et du P-10k. Les 2 polymères ont des profils PK similaires malgré l'importante différence de taille (Fig 3.1 et Tableau 3.2). Cette similitude a permis d'émettre l'hypothèse que le segment hydrophobe utilisé pour ancrer le polymère dans la membrane de liposome jouait un rôle dans le profil de circulation du P-5K. Cette hypothèse a été confirmée en comparant les profils de P-5k avec ceux du polymère dépourvu de segment hydrophobe, le P-5k-NA. Dans ce cas, des changements majeurs au niveau de l' $AUC_{(0-48h)}$ (24 ± 3 vs. 3.7 ± 0.4 %ID.h/mL), du volume de distribution (V_{area} : 177 ± 27 vs. 1044 ± 287 mL) ainsi que de la clairance urinaire (0.52 ± 0.12 vs. 3.73 ± 2.3 g/mL) et totale (3.2 ± 0.4 vs. 27 ± 7 g/mL), indiquent clairement que le comportement du polymère alkylé et non-alkylé sont différents. L'hypothèse retenue pour expliquer ce phénomène est que la présence des chaînes alkyles à l'extrémité de la chaîne de polymère favorise l'autoagencement des molécules de P-5k en des complexes multimoléculaires (Fig. 5.3). Les CAC mesurées *in vitro* pour les polymères corroborent cette explication.

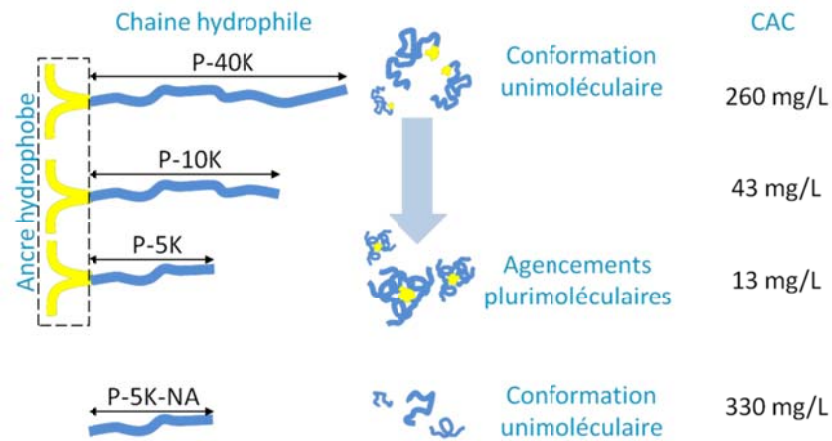


Figure 5.4 Différences structurales expliquant les conformations des polymères en solution. Pour les polymères alkylés, la longueur de la chaîne de polymère hydrophile varie alors que l'ancre hydrophobe demeure identique. L'hydrophilie globale de la molécule diminue avec la taille du polymère. En devenant moins hydrophiles, les chaînes s'agencent en structures polymoléculaires. P-5K-NA ne possède pas d'ancre hydrophobe et reste sous forme unimoléculaire.

L'autoagencement des chaînes justifierait pourquoi la PK de P-5k est plus proche de celle de P-10K que de celle de P-5K-NA. Les complexes forment des colloïdes plus volumineux dont la filtration glomérulaire est diminuée (Fig. 3.2) et la capture par le foie augmentée (Fig. 3.3). Il faut noter que la possibilité d'une association des chaînes de polymères avec certaines protéines plasmatiques ne peut pas être écartée. En effet, en s'associant à diverses protéines sanguines, les chaînes de polymères pourraient circuler plus longtemps et se retrouver sélectivement distribuées dans le foie (Bijsterbosch et al. 2000; Bijsterbosch et al. 2002; Wolfrum et al. 2007). L'association avec des protéines a été impossible à mettre en évidence *in vitro*.

L'étude sur l'élimination dans l'urine et les selles a permis de confirmer que l'excrétion du polymère dépend de sa taille et de sa structure. Si l'excrétion biliaire des polymères alkylés semble très faible, la filtration glomérulaire est quant à elle dépendante

de la taille, comme pour d'autres macromolécules (Seymour et al. 1987; Yamaoka et al. 1993; Yamaoka et al. 1994b; Yamaoka et al. 1995b). Les molécules de poly(NIPAM-co-MAA) avec une masse molaire au dessus de 32 000 Da ne semblent pas être éliminées. Également, les quantités totales retrouvées dans les excréta après 48 h sont généralement inférieures à 30 % de la dose injectée. L'élimination n'est donc pas très rapide. Cependant comme les régimes thérapeutiques à base de liposomes (*e.g.*, avec la doxorubicine liposomale) sont généralement administrés aux 3 à 6 semaines (O'Brien et al. 2004), il est probable que cette cinétique d'élimination soit suffisante pour éviter l'accumulation du polymère. Finalement, comme l'étude d'excrétion a été conduite simultanément à l'étude de PK (sur les mêmes animaux éveillés), des quantités non-négligeables d'urine ont été perdues lors de chaque prélèvement sanguin. Il est donc possible que les valeurs rapportées sous-estiment les quantités réellement excrétées. Cela expliquerait le faible taux de recouvrement et l'important écart-type observé dans les valeurs.

Après avoir déterminé que le seuil de filtration glomérulaire, le polymère P-10k a été identifié comme étant un bon candidat pour la fabrication des liposomes sensibles au pH. Ce polymère est adéquatement éliminé par filtration rénale (Fig. 3.2) et sa distribution hépatique ne semble pas influencée par la formation de complexes plurimoléculaires (Fig. 3.3). La PK de liposomes marqués au [³H]-CHE et intégrant le P-10k (marqué au [¹⁴C]-acrylamide) dans leur membrane a donc été étudiée afin d'évaluer la stabilité de la fixation du polymère à la surface des vésicules.

En effet, la méthode utilisée pour fixer le copolymère de NIPAM dans la membrane des liposomes ne se fait que *via* des interactions hydrophobes de faible énergie. Or, il a été démontré que les molécules fixées par cette méthode pouvaient être libérées et/ou transférées à d'autres membranes de phospholipides lorsque l'ancre hydrophobe n'était pas adaptée aux propriétés de la chaîne hydrophile (longueur, solvatation, flexibilité) (Silvius et al. 1993; Tribet et al. 2008). Pour tout nouveau polymère, il est donc essentiel de s'assurer que l'ancre choisie permette de maintenir le polymère à la surface des liposomes après injection de la formulation. La comparaison des paramètres PK obtenus avec les liposomes

et le polymère radiomarqué (Figure 3.5, Tableau 3.3) a permis d'étudier la stabilité du complexe.

Au cours de cette expérience, nous avons comparé d'une part, le profil de circulation des vésicules avec celui du P-10k fixé à leur surface et, d'autre part, la circulation du P-10k injecté seul à celle du polymère ancré dans les vésicules. Ces deux observations complémentaires ont montré que la formulation demeurerait intacte après injection (Fig. 3.5 et Tableau 3.3). Comme pour le PEG₂₀₀₀ (Parr et al. 1994; Webb et al. 1998; Semple et al. 2005), il s'avère donc qu'une fonction lipophile terminale possédant 2 chaînes de 18 carbones assure la fixation du NIPAM à la surface des liposomes.

L'ensemble des données recueillies dans ce manuscrit indiquent qu'il est possible de fabriquer un vecteur liposomal sensible au pH stable, avec un copolymère de poly(NIPAM-*co*-MAA) pouvant s'éliminer par voie rénale. Ces informations confirment la faisabilité d'une telle formulation pour la libération ciblée de médicaments dans l'endosome des cellules (Sheff 2004; Bareford et al. 2007; Simard et al. 2009). Malheureusement, les résultats obtenus par la suite pour établir la preuve de concept de cette formulation dans un modèle de souris leucémiques se sont avérés décevants. Dans des travaux s'intéressant au traitement de la LMA par des immunoliposomes, Simard et Leroux (Simard et al. 2010) n'ont pas réussi à démontrer la supériorité des liposomes sensibles au pH par rapport à une formulation dépourvue de polymère. Cette formulation a donc été abandonnée dans notre laboratoire, mais le NIPAM demeure un polymère largement étudié dans le domaine de la vectorisation pharmaceutique (Bajpai et al. 2011). Ces travaux pourront donc contribuer au développement d'autres systèmes thérapeutiques à base de ce polymère.

5.3 Les liposomes à gradient de pH transmembranaire pour le traitement des intoxications médicamenteuses.

Dans cette étude, l'analyse PK a été utilisée pour mettre en évidence la capacité des liposomes à capturer un médicament cardiovasculaire dans le compartiment sanguin et à limiter sa distribution vers les tissus.

En partant d'un principe de chargement actif largement utilisé *in vitro* pour encapsuler des principes actifs (voir Fig. 1.5) (Cullis et al. 1997; Maurer-Spurej et al. 1999), des liposomes possédant une grande capacité de capture pour le DTZ ont été préparés. Au cours des étapes de mise-au-point, la formulation a été optimisée *in vitro* pour maximiser l'encapsulation (Fig. 4.2) et la stabilité du gradient de pH dans les fluides biologiques (Fig. 4.10 et 4.11). Les vésicules se sont avérées jusqu'à 40 fois plus performantes pour séquestrer le DTZ que l'émulsion de lipide présentement utilisée chez les patients (Fig. 4.3). Les étapes de développement *in vitro* ont permis de mieux comprendre les paramètres jouant un rôle dans le chargement actif du DTZ (Fig 4.2, 4.7) et de mettre en évidence la capture du médicament à l'intérieur des vésicules (Fig. 4.8 et 4.9).

Pour évaluer la stabilité de la formulation *in vivo*, nous avons marqué la membrane de liposomes au [³H]-CHE et le compartiment interne au [¹⁴C]-acide citrique. La figure 4.11.A rapporte le profil sanguin pour les 2 isotopes. Malgré le relargage d'environ 10 % de l'acide citrique à l'injection, la corrélation entre les profils de circulation des marqueurs est bonne (Fig. 4.11.B), ce qui indique que le tampon citrate demeure à l'intérieur des liposomes après leur injection. Bien qu'on ne puisse exclure qu'une partie des liposomes se déstabilise lors de l'injection, les taux sanguins plus faibles en citrate peuvent aussi être expliqués par une purification incomplète de l'acide citrique libre lors de la préparation de la formulation.

Suite aux résultats prometteurs obtenus *in vitro*, la capacité de capture de la formulation a été évaluée chez le rat. Afin de comparer la PK du DTZ d'un groupe témoin ne recevant pas de traitement avec celle du groupe traité, nous avons sélectionné une dose

de médicament non-toxique (5 mg/kg). L'injection intraveineuse a été privilégiée afin de limiter une éventuelle interférence causée par le premier passage hépatique du DTZ (55 à 60 %) et son métabolisme important (Smith et al. 1983; Echizen et al. 1986). De la même façon, les liposomes ont été administrés en prétraitement (avant l'administration du DTZ) pour faciliter l'expérimentation et l'analyse PK. Cette approche présentait aussi l'avantage de limiter l'influence du métabolisme très rapide sur la capture. Bien entendu, cette méthodologie s'éloigne des conditions réelles d'intoxication au DTZ où les antidotes sont administrés en réponse à la prise, par voie orale, de doses toxiques du médicament (Pearigen et al. 1991; DeWitt et al. 2004). Des études évaluant l'importance de ces paramètres (*e.g.*, voie d'administration, doses de médicament) sont présentement menées par Vincent Forster, étudiant au doctorat dans le laboratoire du Prof. Leroux, à l'ETH.

L'analyse PK a permis d'apprécier le rôle déterminant des liposomes sur le profil plasmatique d'un bolus de DTZ. La figure 4.4.A. montre des différences majeures dans les concentrations plasmatiques totales (libre et encapsulée) mesurées durant la première heure suivant l'injection. Toutefois, les concentrations plasmatiques des 2 groupes se superposent après 2 h. La comparaison des paramètres PK, dans l'article tel que publié, révèle que les liposomes accroissent l'exposition sanguine au DTZ en augmentant la C_{max} , et l'AUC et l'AUMC ainsi qu'en diminuant les volumes de distribution (V_d (extrapolé), $V_{d_{ss}}$ et $V_{d_{area}}$), la clairance et le MRT, mais sans modifier la constante d'élimination terminale (K_{el}). La figure 4.4.B présente le profil de circulation plasmatique du DAD, le principal métabolite actif du DTZ. Dans le groupe contrôle, comme c'est le cas dans les autres études PK s'intéressant au DTZ (Lee et al. 1991; Tsui et al. 1994; Tsui et al. 1998), le métabolite est formé très rapidement et ses concentrations plasmatiques évoluent parallèlement à celles de la drogue-mère. Cependant, le rapport des concentrations de DAD :DTZ dans notre étude (1 :1) semble plus élevé que ceux présentés ailleurs (1 :2 à 1 :5) (Lee et al. 1991; Tsui et al. 1994; Tsui et al. 1998). À température ambiante, le DTZ est stable dans le plasma durant au moins 24 h, mais il est rapidement métabolisé en DAD dans le sang complet (Caillé et al. 1989). Les disparités entre nos rapports DAD :DTZ et ceux de la littérature pourraient

donc être expliquées par un délai entre le prélèvement et la centrifugation du plasma ou encore un problème de stabilité durant l'extraction. Malgré tout, ce biais dans la méthodologie devrait être similaire dans le groupe témoin et le groupe traité.

À la Fig.4.4.B, les concentrations plasmatiques de DAD dans le groupe ayant reçu les liposomes sont radicalement différentes de celles mesurées dans le groupe témoin. De plus, l'effet des liposomes sur le DAD est prolongé et se maintient au-delà de 5 h après l'injection. Les liposomes modifient également la C_{max} , l'AUC et l'AUMC du DAD sans en affecter K_{el} ni le MRT. L'effet semble plus marqué pour le métabolite que pour la drogue-mère. Comme l'utilisation de [3H]-DTZ et de [3H]-DAD a permis de s'assurer que la drogue et son métabolite étaient capturés de manière similaire *in vitro* (Fig. 4.13), l'hypothèse retenue pour expliquer ce phénomène est que les concentrations plasmatiques accrues du DTZ augmentent son exposition aux estérases sanguines responsables de sa désacétylation. Nous avons démontré *in vitro* que les molécules de DTZ encapsulées dans des liposomes étaient converties en DAD puis recapturées par les vésicules lorsque l'on incubait celles-ci dans le sang (Fig 4.14). *In vivo*, il est donc possible que le DTZ initialement capté par les vésicules soit rapidement métabolisé en DAD, ce qui expliquerait pourquoi l'effet des liposomes sur la drogue-mère ne se manifeste que durant les 2 premières heures après l'injection. Au niveau de la PK, ce phénomène se traduit par une diminution du temps de résidence moyen (MRT) des molécules de DTZ, mais pas du DAD.

Ceci étant dit, la méthode utilisée dans l'article pour traiter les échantillons ayant une concentration en dessous de la limite inférieure de quantification (LLOQ) n'est peut-être pas idéale pour calculer tous les paramètres PK. Bien que cette approche soit parfois employée lors d'études de bioéquivalence, le remplacement des valeurs inférieures à LLOQ par zéro sous-estime l'importance de la partie terminale de la courbe. Il est donc possible d'omettre ces valeurs et ne comptabiliser que les mesures au-dessus de LLOQ. L'aspect des profils de circulation plasmatique s'en trouve un peu affecté (Fig. 5.5) et il faut alors réévaluer les paramètres PK (tableaux 5.1 et 5.2).

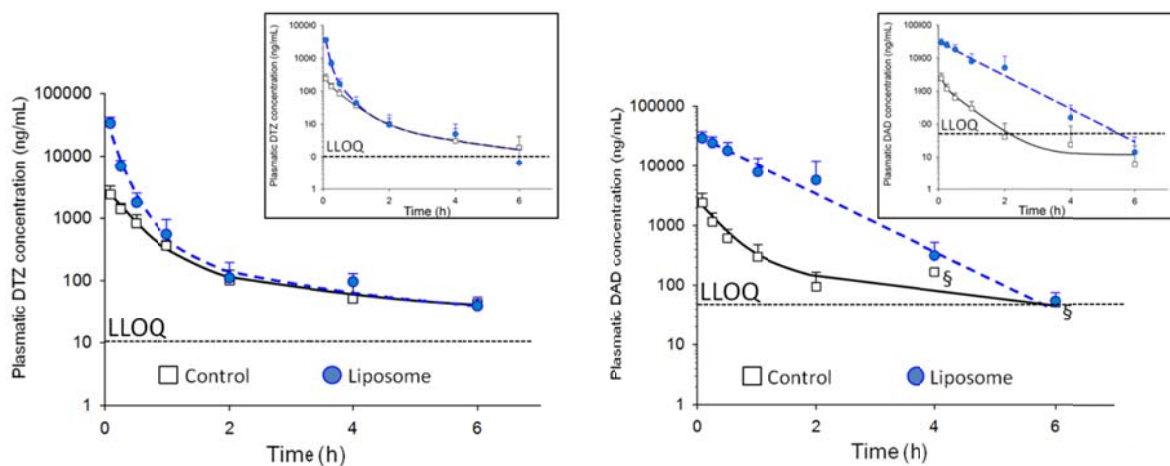


Figure 5.5 Profils de circulation plasmatique du DTZ et du DAD en omettant les valeurs sous la LLOQ. Le symbole § dénote un point où une seule valeur est représentée. Pour comparaison, les 2 parties de la figure 4.4 sont présentées en vignette.

Tableau 5.1 Paramètres PK calculés en omettant les valeurs sous LLOQ (à comparer avec le tableau 4.1).

	Control	Liposomes	Difference (fold)	
DTZ	C_{max} (ng/mL)	2421 ± 871	33,698 ± 8135*	14
	$AUC_{(0-t)}$ (ng.h/mL)	1515 ± 441	9186 ± 1670*	6
	$t_{1/2}$ (h)	1.02 ± 0.56	0.99 ± 0.65	-
	V_d (mL/kg)	2141 ± 548	105 ± 37*	20
	Cl (mL/h)	1077 ± 286	181 ± 35*	6
DAD	C_{max} (ng/mL)	2430 ± 1032	30,583 ± 8045*	13
	$AUC_{(0-t)}$ (ng.h/mL)	1213 ± 605	30,951 ± 13,458*	25
	$t_{1/2}$ (h)	0.63 ± 0.57	0.68 ± 0.41	-

Tableau 5.2 Paramètres PK secondaires calculés en omettant les valeurs sous LLOQ (à comparer avec le tableau 4.3).

		Control	Liposomes
DTZ	K_{el} (h^{-1})	0.89 ± 0.48	1.46 ± 1.58
	$AUC_{(0-\infty)}$ (ng.h/mL)	1590 ± 473	9286 ± 1697*
	MRT (h) ¹	1.0 ± 0.32	0.32 ± 0.15*
	AUMC (ng.h ² /mL)	1633 ± 865	2935 ± 1436
	Vd_{ss} (mL/kg)	3237 ± 1232	179 ± 104*
	Vd_{area} (mL/kg)	4537 ± 2044	774 ± 486*
DAD	K_{el} (h^{-1})	1.52 ± 0.61	1.27 ± 0.52
	$AUC_{(0-\infty)}$ (ng.h/mL)	1318 ± 602	31,949 ± 14,449*
	MRT (h)	0.69 ± 0.4	0.86 ± 0.29
	AUMC (ng.h ² /mL)	1068 ± 1260	30,932 ± 24,032*

Dans ces tableaux, on constate que les 2 méthodes donnent des valeurs très similaires et malgré que la différence entre l'AUMC du DTZ entre les deux groupes ne devienne non-significative, les mêmes conclusions peuvent être tirées.

Ces résultats montrent donc clairement que les liposomes influencent le devenir du DTZ et de son métabolite dans l'organisme. L'analyse PK a permis de quantifier les changements entraînés par l'administration des vésicules. En convertissant en concentrations molaires les concentrations de DTZ et de DAD obtenues en ng/mL à la Fig. 5.4), il est possible d'exprimer les quantités de DTZ et de DAD dans le sang en fonction de la dose de médicament injectée.

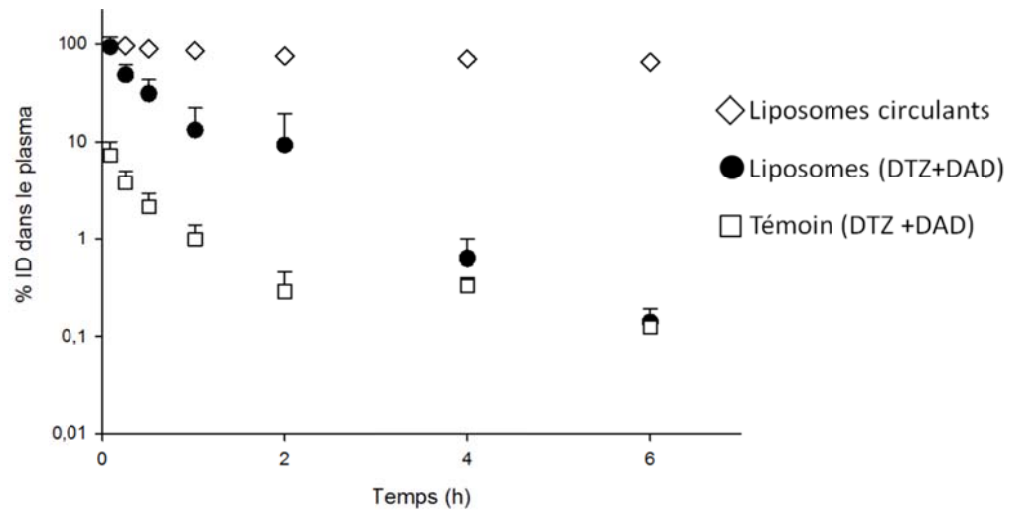


Figure 5.6 Pourcentage de la dose injectée (DTZ+DAD) dans le plasma en fonction du temps. Les liposomes séquestrent les molécules actives dans la circulation sanguine et limitent la quantité de principe actif pouvant se distribuer dans les tissus.

Dans la figure 5.6, l'effet des liposomes sur la quantité de molécules actives présentes dans la circulation est clairement visible. Cependant, la clairance du principe actif est plus rapide que celle des liposomes. Cela indique donc que la drogue encapsulée lors de la phase de distribution ne demeure pas dans les vésicules indéfiniment. Les molécules dans les vésicules sont en équilibre avec celles qui sont libres dans la circulation. Le médicament encapsulé est donc libéré graduellement au fur et à mesure que celui-ci est métabolisé et éliminé. De plus, il est aussi probable que la capacité de capture des liposomes (*i.e.* le gradient de pH transmembranaire) décroisse après plusieurs heures passées dans la circulation. Des études complémentaires devront être menées pour mieux comprendre le phénomène.

Il est possible de comparer les résultats obtenus avec le DTZ à ceux obtenus pour la capture de la doxorubicine (Mayer et al. 1999) et du docétaxel (Dhanikula et al. 2007a). Dans l'étude de Mayer (Mayer et al. 1999), l' AUC_{0-24h} de la doxorubicine avec un prétraitement de liposomes à gradient de pH transmembranaire (500 mg/kg) est 74 fois plus

élevée que celle de la drogue seule (*vs.* 6 fois pour le DTZ et 26 fois pour le DAD). Il faut toutefois noter que les propriétés physicochimiques de la doxorubicine et du DTZ ne sont pas les mêmes. Des facteurs comme le coefficient de partage et le pK_a vont influencer la capture dans les vésicules (Maurer-Spurej et al. 1999). De plus, il a été démontré *in vitro* que la doxorubicine pouvait précipiter dans la lumière des vésicules lorsque l'on utilise le chargement actif, augmentant ainsi la capacité d'encapsulation et de rétention des liposomes (Cullis et al. 1997). En parallèle, les paramètres PK des deux drogues sont aussi différents. D'une part, l'exposition plasmatique de la doxorubicine et du DTZ dans les groupes témoins (sans liposomes) sont différentes (doxorubicine : $AUC_{0-24h} = 5\ 000$ ng.h/mL et DTZ : $AUC_{0-\infty} = 1\ 500$ ng.h/mL). D'autre part, la doxorubicine subit un métabolisme moins important que le DTZ et la méthode utilisée par Mayer pour le dosage plasmatique (spectrofluorométrie) ne distingue pas la drogue-mère de son métabolite principal, le doxorubicinol. Tous ces facteurs peuvent contribuer à augmenter l'efficacité de capture de la doxorubicine par rapport au DTZ. En terminant, il faut noter que tel qu'observé dans notre étude, les concentrations plasmatiques de la doxorubicine ne suivent pas le profil d'élimination des liposomes.

D'autres travaux effectués dans notre laboratoire (Dhanikula et al. 2007a) ont évalué des nanocapsules lipidiques (NC) pour séquestrer le docétaxel dans la circulation. Le docétaxel est un agent anticancéreux, analogue du paclitaxel qui est très peu soluble dans l'eau. Les NC captent le docétaxel en raison d'un coefficient de partage favorable pour la phase huileuse. Les NC ne possèdent cependant pas la même capacité de capture que des liposomes utilisant le chargement actif. Le prétraitement avec 500 mg/kg de NC a augmenté l'exposition plasmatique du docétaxel (AUC_{0-24h}) et a diminué sa clairance d'environ 3,4 fois. Le MRT de la drogue était aussi augmenté (6,6 fois). Encore une fois, les profils de circulation de la drogue et des colloïdes n'étaient pas parallèles.

En terminant, afin de déterminer si l'effet des liposomes sur la PK se traduisait par des manifestations au niveau pharmacodynamique, nous nous sommes intéressés à quantifier l'effet des vésicules sur l'effet hypotenseur du DTZ. Au cours de cette étude,

l'effet du DTZ sur la tension artérielle moyenne (MAP) a été mesuré avec ou sans prétraitement aux liposomes (Fig. 4.5). La méthodologie de la première expérience (Fig 4.5.A) était identique à celle de l'étude de PK. Les résultats ont montré que la séquestration du DTZ et du DAD se traduisait par une diminution de l'effet hypotenseur du principe actif. Dans la seconde expérience (Fig 4.5.B), la dose de DTZ de 5 mg/kg a été suivie d'une perfusion à 8 mg/kg/h. L'objectif de cette étude était de s'assurer que les liposomes maintenaient leur effet avec une dose de drogue plus forte, administrée sur une période plus longue. Bien qu'aucune donnée PK n'ait été recueillie, cette étude visait à mesurer l'effet hypotenseur de la drogue, un indicateur plus direct de la toxicité. Encore une fois, l'effet du DTZ sur la pression artérielle a été atténué par l'administration des liposomes et ce, jusqu'à 1 h après le début de la perfusion. Cette expérience a prouvé que la capacité de capture des vésicules est maintenue au moins durant cette période, avec une dose totale de DTZ administrée en 60 minutes de 13 mg/kg.

En établissant une preuve de concept, ces travaux ont donc montré que les liposomes possédant un gradient de pH transmembranaire pourraient être employés pour le traitement des intoxications au DTZ et à d'autres médicaments cardiovasculaires basiques. L'analyse PK a été exploitée pour quantifier l'effet des liposomes et l'impact de ces changements a été confirmé grâce à une analyse pharmacodynamique.

Chapitre 6. Conclusions et perspectives

Depuis la première utilisation des liposomes pour la vectorisation d'enzymes il y a plus de 40 ans (Gregoriadis et al. 1971), les vecteurs pharmaceutiques se sont multipliés. De nombreux conjugués polymères, liposomes et micelles ont atteint les phases cliniques et plusieurs ont été commercialisés (Torchilin 2005; Duncan 2006; Scheinberg et al. 2010). Alors que par le passé, elle s'intéressait seulement à améliorer l'efficacité de drogues déjà commercialisées, la vectorisation est maintenant intégrée dans la mise au point des nouveaux médicaments, dès les premières phases de développement (Sapra et al. 2008; Sapra et al. 2009; Davis et al. 2010)

Malgré ces avancées, le taux d'attrition des vecteurs pharmaceutiques dans les phases cliniques et précliniques demeure important. De plus, hormis quelques exceptions, l'impact de la vectorisation sur l'efficacité des traitements reste limité. Dans le traitement du cancer par exemple, les vecteurs mis au point s'avèrent rarement supérieurs aux régimes traditionnels pour augmenter l'espérance de vie et se contentent d'offrir un profil d'effets secondaires plus avantageux (Duncan et al. 2010; Jain et al. 2010). Des efforts doivent donc être déployés pour mieux comprendre les avantages et les limites de la vectorisation.

L'analyse PK des profils de circulation des vecteurs permet d'évaluer leur devenir dans l'organisme. Les informations sont d'autant plus pertinentes que les systèmes étudiés sont complexes. Dans la majorité des cas, les conclusions pouvant être tirées d'expériences effectuées dans les modèles animaux adéquats vont bien au-delà des informations obtenues lors d'analyses *in vitro*, conduites dans des systèmes isolés (Gaspar et al. 2009; Duncan et al. 2010). La PK devient donc un outil essentiel pour le développement des vecteurs pharmaceutiques. Dans ces travaux, l'analyse PK a été employée pour mieux comprendre le profil de circulation et la biodistribution d'un copolymère aux propriétés complexes et pour caractériser l'impact d'une formulation liposomale sur l'effet d'un médicament cardiovasculaire.

Dans un premier temps, l'étude réalisée sur le copolymère poly(NIPAM-*co*-MAA) a permis d'établir le seuil de filtration glomérulaire de ce polymère à 32 kDa et de mieux comprendre les phénomènes influençant sa circulation et sa biodistribution. Il a ensuite été démontré qu'une double chaîne alkyle de 18 carbones était suffisante pour assurer la stabilité de l'ancrage du polymère dans la membrane des liposomes (Bertrand et al. 2009). Ces travaux ont donc déterminé d'importants paramètres qui permettront d'optimiser le développement de formulation à base de polymères de NIPAM dans le futur.

Afin de généraliser ces résultats à tous les copolymères de NIPAM, des études complémentaires devront être effectuées. D'une part, l'utilisation de méthodes de synthèse plus contrôlées permettra de mieux connaître les propriétés des molécules synthétisées (Bajpai et al. 2011). Il sera ensuite important d'évaluer l'influence de la charge des molécules sur leur profil d'élimination, puisque ce paramètre s'est avéré important pour d'autres polymères (Hashida et al. 1990; Yamaoka et al. 1995a; Bolton et al. 1998). Finalement, étant donné les résultats décevants obtenus dans notre laboratoire avec la formulation sensible au pH dans un modèle de leucémie (Simard et al. 2010), une nouvelle application devra être envisagée pour confirmer le potentiel du poly(NIPAM-*co*-MAA) pour le ciblage intracellulaire. À cet égard, l'endosome joue un rôle charnière dans plusieurs étapes de l'immunisation, notamment dans la voie de la présentation croisée (« *cross-presentation* ») (Hubbell et al. 2009; Bachmann et al. 2010). Le polymère pourrait donc éventuellement se montrer bénéfique dans certaines applications reliées à la vaccination.

À l'opposé, les résultats positifs obtenus lors des travaux sur le traitement des intoxications médicamenteuses permettent d'envisager des perspectives encourageantes. Une formulation efficace a été développée puis la preuve de concept a été établie *in vivo* (Bertrand et al. 2010). Le développement se poursuivra donc vers une formulation offrant une meilleure capacité de capture et une stabilité du gradient de pH prolongée (Forster et al. 2010). Des études supplémentaires impliquant des modèles d'intoxication plus sévères et

surtout plus proches des réalités cliniques devront aussi être menées afin de confirmer le potentiel de la formulation.

Chapitre 7. Bibliographie

- Abuchowski, A., J. R. McCoy, et al. (1977a). "Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase." J. Biol. Chem. **11**: 3582-3586.
- Abuchowski, A., T. Van Es, et al. (1977b). "Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol." J. Biol. Chem. **252**: 3578-3581.
- Adams, G. P. and L. M. Weiner (2005). "Monoclonal antibody therapy of cancer." Nat. Biotechnol. **23**: 1147-1157.
- Aggarwal, P., J. B. Hall, et al. (2009). "Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy." Adv. Drug Delivery Rev. **61**: 428-437.
- Ahmed, F., R. I. Pakunlu, et al. (2006). "Shrinkage of a rapidly growing tumor by drug-loaded polymersomes: pH-triggered release through copolymer degradation." Mol. Pharmaceutics **3**: 340-350.
- Akinc, A., A. Zumbuehl, et al. (2008). "A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics." Nat. Biotechnol.: 1-9.
- Alexis, F., E. Pridgen, et al. (2008). "Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles" Mol. Pharmaceutics **5**: 505-515.
- Alléman, É., P. Gravel, et al. (1997). "Kinetics of blood component adsorption on poly(D,L-lactic acid) nanoparticles: Evidence of complement C3 component involvement." J. Biomed. Mater. Res. **37**: 229-234.
- Allen, T. M. (1981). "A study of phospholipid interactions between high-density lipoproteins and small unilamellar vesicles." Biochim. Biophys. Acta **640**: 385-397.
- Allen, T. M. (2002). "Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy." Nat. Rev. Cancer **2**: 750-763.
- Allen, T. M. and C. Hansen (1991a). "Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose." Biochim. Biophys. Acta **1068**: 133-141.
- Allen, T. M., C. Hansen, et al. (1991b). "Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo." Biochim. Biophys. Acta **1066**: 29-36.
- Anderson, J. T. and I. Sandlie (2009). "The versatile MHC Class 1-related FcRn protects IgG and albumin from degradation: implications for the development of new diagnostics and therapeutics." Drug Metab. Pharmacokinet. **24**: 318-332.
- Bachmann, M. F. and G. T. Jennings (2010). "Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns." Nat. Rev. Immunol. **10**: 787-796.
- Bailon, P., A. Palleroni, et al. (2001). "Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon α -2a for the treatment of hepatitis C." Bioconjugate Chem. **12**: 195-202.
- Bajpai, A., J. Bajpai, et al. (2011). "Responsive polymers in biology and technology." Polym. Rev. **51**: 53-97.

- Bangham, A. D., M. Standish, et al. (1965). "Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids." J. Mol. Biol. **13**: 238-252.
- Banquy, X., F. Suarez, et al. (2009). "Effect of mechanical properties of hydrogel nanoparticles on macrophage cell uptake." Soft Matter **5**: 3984-3991.
- Bareford, L. M. and P. W. Swaan (2007). "Endocytic mechanisms for targeted drug delivery." Adv. Drug Delivery Rev. **59**: 748-758.
- Bartneck, M., H. A. Keul, et al. (2010). "Phagocytosis independent extracellular nanoparticles clearance by human immune cells." Nano Letters **10**: 59-63.
- Bendele, A., J. Seely, et al. (1998). "Renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins." Toxicol. Sci. **42**: 152-157.
- Beningo, K. A. and Y.-L. Wang (2002). "Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target." J. Cell Sci. **115**: 849-856.
- Bertrand, N., C. Bouvet, et al. (2010). "Transmembrane pH-gradient liposomes to treat cardiovascular drug intoxication." ACS Nano **4**: 7552-7558.
- Bertrand, N., J. G. Fleischer, et al. (2009). "Pharmacokinetics and biodistribution of *N*-isopropylacrylamide copolymers for the design of pH-sensitive liposomes." Biomaterials **30**: 2598-2605.
- Bijsterbosch, M. K., M. Manoharan, et al. (2002). "bis-Cholesteryl-Conjugated Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides Are Highly Selectively Taken Up by the Liver." J. Pharmacol. Exp. Ther. **302**: 619-626.
- Bijsterbosch, M. K., E. T. Rump, et al. (2000). "Modulation of plasma protein binding and in vivo liver cell uptake of phosphorothioate oligodeoxynucleotides by cholesterol conjugation." Nucleic Acids Res. **28**: 2717-2725.
- Blunk, T., A. Calvör, et al. (1996). "Kinetics of plasma adsorption on model particles for controlled drug delivery and drug targeting." Eur. J. Pharm. Biopharm. **42**: 262-268.
- Boddy, A. V., E. R. Plummer, et al. (2005). "A phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel poliglumex (XYOTAX), investigating both 3-weekly and 2-weekly schedules." Clin. Cancer Res. **11**: 7834-7840.
- Bolton, G. R., W. M. Deen, et al. (1998). "Assessment of the charge selectivity of glomerular basement membrane using Ficoll sulfate." Am. J. Physiol. Renal Physiol. **274**: F889-896.
- Brinkmann, V., U. Reichard, et al. (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science **303**: 1532-1535.
- Burt, H. M., X. Zhang, et al. (1999). "Development of copolymers of poly(D, L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel." Colloids Surf. B Biointerfaces **16**: 161-171.
- Caillé, G., L. Dubé, et al. (1989). "Stability study of diltiazem and two of its metabolites using a high performance liquid chromatography method." Biopharm. Drug Dispos. **10**: 107-114.
- Cannon, G. J. and J. A. Swanson (1992). "The macrophage capacity for phagocytosis." J. Cell Sci. **101**: 907-913.
- Cedervall, T., I. Lynch, et al. (2007). "Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles." Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **119**: 5856-5858.

- Chahan-Khan, A., J. Szebeni, et al. (2003). "Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil(R)): possible role in hypersensitivity reactions." Ann. Oncol. **14**: 1430-1437.
- Champion, J. A. and S. Mitragotri (2006). "Role of target geometry in phagocytosis." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**: 4930-4934.
- Champion, J. A. and S. Mitragotri (2009). "Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles." Pharm. Res. **26**: 244-249.
- Champion, J. A., A. Walker, et al. (2008). "Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres." Pharm. Res. **25**: 1815-1821.
- Chan, J. M., L. Zhang, et al. (2010). "Spatiotemporal controlled delivery of nanoparticles to injured vasculature." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **107**: 2213-2218.
- Chen, G. and A. S. Hoffman (1995). "Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transitions over a wide range of pH." Nature **373**: 49-52.
- Chen, H., S. Kim, et al. (2008a). "Fast release of lipophilic agents from circulating PEG-PDLLA micelles revealed by *in vivo* Förster resonance energy transfer imaging." Langmuir **24**: 5213-5217.
- Chen, H., S. Kim, et al. (2008b). "Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Förster resonance energy transfer imaging." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**: 6596-6601.
- Cheong, I., X. Huang, et al. (2006). "A bacterial protein enhances the release and efficacy of liposomal cancer drugs." Science **314**: 1308-1311.
- Chiu, K., L. L. Agoubi, et al. (2010). "Effects of polymer molecular weight on the size, activity and stability of PEG-functionalized trypsin." Biomacromolecules **11**: 3688-3692.
- Cho, M., W.-S. Cho, et al. (2009). "The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles." Toxicol. Lett. **189**: 177-183.
- Choi, H. S., Y. Ashitate, et al. (2010a). "Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body." Nat. Biotechnol. **28**: 1300-1303.
- Choi, H. S., W. Liu, et al. (2010b). "Design considerations for tumour-targeted nanoparticles." Nat. Nanotechnol. **5**: 42-47.
- Choi, H. S., W. Liu, et al. (2007). "Renal clearance of nanoparticles." Nat. Biotechnol. **25**: 1165-1170.
- Chow, D. D., H. E. Essien, et al. (1989). "Targeting Small Unilamellar Liposomes to Hepatic Parenchymal Cells by Dose Effect." J. Pharmacol. Exp. Ther. **248**: 506-513.
- Christian, D. A., S. Cai, et al. (2009). "Flexible filaments for *in vivo* imaging and delivery: Persistent circulations of filomicelles opens the dosage window for sustained tumor shrinkage." Mol. Pharmaceutics **6**: 1343-1352.
- Clark, S. R., A. C. Ma, et al. (2007). "Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood." Nat. Med. **13**: 463-469.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**: 37-44.

- Cortes, J. and C. Saura (2010). "Nanoparticle albumin-bound (*nab*TM)-paclitaxel: improving efficacy and tolerability by targeted drug delivery in metastatic breast cancer." Eur. J. Cancer **Suppl 8**: 1-10.
- Cullis, P. R., M. J. Hope, et al. (1997). "Influence of pH gradient on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles." Biochim. Biophys. Acta **1331**: 187-211.
- Danhauser-Riedl, S., E. Hausmann, et al. (1993). "Phase I clinical and pharmacokinetic trial of dextran conjugated doxorubicin (AD-70, DOX-OXD)." Invest. New Drugs **11**: 187-195.
- Danhier, F., O. Feron, et al. (2010). "To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery." J. Control. Release **148**: 135-146.
- Danson, S., D. R. Ferry, et al. (2004). "Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP1049C) in patients with advanced cancer." Br. J. Cancer **90**: 2085-2091.
- Davies, B. and T. Morris (1993). "Physiological parameters in laboratory animals and humans." Pharm. Res. **10**: 1093-1095.
- Davis, M. E., J. E. Zuckerman, et al. (2010). "Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA *via* targeted nanoparticles." Nature **464**: 1067-1070.
- De Fougères, A. R. (2008). "Delivery Vehicles for Small Interfering RNA *In Vivo*." Human Gene Therapy **19**: 125-132.
- Decuzzi, P., B. Godin, et al. (2010). "Size and shape effect in the biodistribution of intravascularly injected particles." J. Control. Release **141**: 320-327.
- Demoy, M., J.-P. Andreux, et al. (1999). "Spleen capture of nanoparticles: influence of animal species and surface characteristics." Pharm. Res. **16**: 37-41.
- Desai, N. P., V. Trieu, et al. (2009). "SPARC expression correlates with tumor response to albumin-bound paclitaxel in head and neck cancer patients." Transl. Oncol. **2**: 59-64.
- Desai, N. P., V. Trieu, et al. (2008). "Improved effectiveness of nanoparticle albumin-bound (*nab*) paclitaxel versus polysorbate-based docetaxel in multiple xenografts as a function of HER2 and SPARC status." Anticancer Drugs **19**: 899-909.
- DeVincenzo, J., J. E. Cehelsky, et al. (2008). "Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV)." Antiviral Res. **77**: 225-231.
- Devine, D. V., K. Wong, et al. (1994). "Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies." Biochim. Biophys. Acta **1191**: 43-51.
- DeWitt, C. R. and J. C. Waksman (2004). "Pharmacology, pathophysiology and management of calcium channel blocker and β -blocker toxicity." Toxicol. Rev. **23**: 223-238.
- Dhanikula, A. B., N. M. Khalil, et al. (2007a). "Long circulating lipid nanocapsules for drug detoxification." Biomaterials **28**: 1248-1257.

- Dhanikula, A. B., M. Lafleur, et al. (2006). "Characterization and in vitro evaluation of spherulites as sequestering vesicles with potential application in drug detoxification." Biochim. Biophys. Acta **1758**: 1787-1796.
- Dhanikula, A. B., D. Lamontagne, et al. (2007b). "Rescue of amitriptyline-intoxicated hearts with nanosized vesicles " Cardiovasc. Res. **74**: 480-486.
- Dhar, S., N. Kolishetti, et al. (2011). "Targeted delivery of cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy *in vivo*." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **108**: 1850-1855.
- Discher, D. E. and F. Ahmed (2006). "Polymersomes." Annu. Rev. Biomed. Eng. **8**: 323-341.
- Discher, D. E. and A. Eisenberg (2002). "Polymer vesicles." Science **297**: 967-973.
- Dobrovolskaia, M. A. and S. E. McNeil (2007). "Immunological properties of engineered nanomaterials." Nat. Nanotechnol. **2**: 469-478.
- Doerschuk, C. M., N. Beyers, et al. (1993). "Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung." J. Appl. Physiol. **74**: 3040-3045.
- Dos Santos, N., C. Allen, et al. (2007). "Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding." Biochim. Biophys. Acta **1768**: 1367-1377.
- Doshi, N. and S. Mitragotri (2010a). "Macrophages recognize size and shape of their targets." Plos One **5**: e10051.
- Doshi, N., B. Prabhakarandian, et al. (2010b). "Flow and adhesion of drug carriers in blood vessels depend on their shape: a study using model synthetic microvascular networks." J. Control. Release **146**: 196-200.
- Dumelin, C. E., S. Trussel, et al. (2008). "A portable albumin binder from a DNA-encoded chemical library." Angew. Chem.-Int. Edit. **47**: 3196-3201.
- Duncan, R. (1999). "Polymer conjugates for tumour targeting and intracytoplasmic delivery. The EPR effect as a common gateway?" Pharm. Sci. Technol. Today **2**: 441-449.
- Duncan, R. (2003). "The dawning era of polymer therapeutics." Nat. Rev. Drug Discovery **2**: 347-360.
- Duncan, R. (2006). "Polymer conjugates as anticancer nanomedicines." Nat. Rev. Cancer **6**: 688-701.
- Duncan, R. and M. J. Vicent (2010). "Do HEMA copolymer conjugates have a future as clinically useful nanomedicines? A critical overview of current status and future opportunities." Adv. Drug Delivery Rev. **62**: 272-282.
- Dunne, M., O. I. Corrigan, et al. (2000). "Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. ." Biomaterials **21**: 1659-1668.
- Echizen, H. and M. Eichelbaum (1986). "Clinical pharmacokinetics of verapamil, nifedipine and diltiazem." Clin. Pharmacokinet. **11**: 425-449.
- Ehrenstein, M. R. and C. A. Notley (2010). "The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator." Nat. Rev. Immunol. **10**: 778-786.

- Ellinger, I. and R. Fuchs (2010). "Receptor-mediated and fluid-phase transcytosis of horseradish peroxidase across rat hepatocytes." J. Biomed. Biotechnol. **2010**: 850320.
- Elsabahy, M., M. Zhang, et al. (2008). "Synthesis and enzymatic stability of PEGylated oligonucleotides duplexes and their self-assemblies with polyamidoamine dendrimers." Soft Matter **4**: 294-302.
- Fallon, M. S. and A. Chauhan (2006). "Sequestration of amitriptyline by liposomes." J. Colloid Interface Sci. **300**: 7-19.
- Farokhzad, O. C., J. Cheng, et al. (2006). "Targeted nanoparticles-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**: 6315-6320.
- Forster, V. and J. C. Leroux (2010). "*In vitro* optimization of injectable nanovesicles to treat drug overdose." Eur. Cell Mater. **20**: 82.
- Fox, M. E., F. C. Szoka, et al. (2009). "Soluble polymer carriers for the treatment of cancer: the importance of the molecular architecture." Acc. Chem. Res. **42**: 1141-1151.
- Friman, S., B. Egestad, et al. (1993). "Hepatic excretion and metabolism of polyethylene glycols and mannitol in the cat." J. Hepatol. **17**: 48-55.
- Fuchs, T. A., A. Brill, et al. (2010). "Extracellular DNA traps promote thrombosis." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **107**: 15880-15885.
- Furtado Mosqueira, V. C., P. Legrand, et al. (2001). "Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effect of PEG chain length and density." Pharm. Res. **18**: 1411-1419.
- Furumoto, K., K.-i. Ogawara, et al. (2001). "Biliary excretion of polystyrene microspheres depends on the type of receptor-mediated uptake in rat liver." Biochim. Biophys. Acta **1526**: 221-226.
- Gabizon, A., R. Catane, et al. (1994). "Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes." Cancer Res. **54**: 987-992.
- Gabizon, A. and D. Papahadjopoulos (1988). "Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **85**: 6949-6953.
- Gabizon, A., H. Schmeeda, et al. (2003). "Pharmacokinetics of Pegylated liposomal doxorubicin: review of animal and human studies." Clin. Pharmacokinet. **42**: 419-436.
- Gabizon, A., D. Tzemach, et al. (2002). "Dose dependency of pharmacokinetics and therapeutic efficacy of PEGylated liposomal doxorubicin (DOXIL) in murine models." J. Drug Target. **10**: 539-548.
- Gabrielsson, J. and D. Weiner (2006). Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications. Stockholm, Swedish Pharmaceutical Press.
- Gao, W., W. Liu, et al. (2010). "*In situ* growth of a PEG-like polymer from the C terminus of an intein fusion protein improves pharmacokinetics and tumor accumulation." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **107**: 16432-16437.
- Gao, X., J. Chen, et al. (2008). "Quantum dots bearing lectin-functionalized nanoparticles as a platform for *in vivo* brain imaging." Bioconjugate Chem. **19**: 2189-2195.

- Gaspar, R. and R. Duncan (2009). "Polymeric carriers: preclinical safety and the regulatory implications for the design and development of polymer therapeutics." Adv. Drug Delivery Rev. **61**: 1220-1231.
- Gaucher, G., K. Asahina, et al. (2009). "Effect of poly(*N*-vinyl-pyrrolidone)-*block*-poly(D,L-lactide) as coating agent on the opsonization, phagocytosis, and pharmacokinetics of biodegradable nanoparticles." Biomacromolecules **10**: 408-416.
- Gaucher, G., M.-H. Dufresne, et al. (2005). "Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery." J. Control. Release **109**: 169-188.
- Gauthier, M. A. and H.-A. Klok (2010). "Polymer-protein conjugates: an enzymatic activity perspective." Polym. Chem. **1**: 1352-1373.
- Geng, Y., P. Dalhaimer, et al. (2007). "Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery." Nat. Nanotechnol. **2**: 249-255.
- Gessner, A., R. Waicz, et al. (2000). "Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption." Int. J. Pharm. **196**: 245-249.
- Girardi, G., P. Redecha, et al. (2004). "Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation." Nat. Med. **10**: 1222-1226.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat. Rev. Immunol. **5**: 953-964.
- Gradishar, W. J. (2006). "Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane." Expert Opin. Pharmacother. **7**: 1041-1053.
- Gratton, S. E., P. A. Ropp, et al. (2008). "The effect of particle design on cellular internalization pathways." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**: 11613-11618.
- Gref, R., M. Lück, et al. (2000). "'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influence of the corona (PEG chain length and surface density) and the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption." Colloids Surf. B Biointerfaces **18**: 301-313.
- Gref, R., Y. Minamitake, et al. (1994). "Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres." Science **263**: 1600-1602.
- Gregoriadis, G. and B. Ryman (1971). "Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases." Biochem. J. **124**: 58P.
- Guo, P. X. (2010). "The emerging field of RNA nanotechnology." Nat. Nanotechnol. **5**: 833-842.
- Hamad, I., A. C. Hunter, et al. (2008). "Poly(ethylene glycol)s generate complement activation products in human serum through increased alternative pathway turnover and a MASP-2-dependent process." Mol. Immunol. **46**: 225-232.
- Hamada, A., T. Kawaguchi, et al. (2002). "Clinical pharmacokinetics of cytarabine formulations." Clin. Pharmacokinet. **41**: 705-718.
- Hamaguchi, T., K. Kato, et al. (2007). "A phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel incorporating micellar nanoparticle formulation." Br. J. Cancer **97**: 170-176.

- Hamaguchi, T., Y. Matsumura, et al. (2005). "NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend *in vivo* antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel." Br. J. Cancer **92**: 1240-1246.
- Hamidi, M., A. Azadi, et al. (2006). "Pharmacokinetic Consequences of Pegylation." Drug Deliv. **13**: 399-409.
- Hammady, T., A. El-Gindy, et al. (2009). "Characteristics and properties of nanospheres co-loaded with lipophilic and hydrophilic drug models." Int. J. Pharm. **369**: 185-195.
- Haraldsson, B., J. Nyström, et al. (2008). "Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria." Physiol. Rev. **88**: 451-487.
- Harashima, H., K. Sakata, et al. (1994). "Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of the liposomes." Pharm. Res. **11**: 402-406.
- Harashima, H., K. Sakata, et al. (1993). "Distinction between the depletion of opsonins and the saturation of uptake in the dose-dependent hepatic uptake of liposomes." Pharm. Res. **10**: 606-610.
- Hardison, W. G., P. J. Lowe, et al. (1989). "Effect of molecular charge on para- and transcellular access of horseradish peroxidase into rat bile." Hepatology **9**: 866-871.
- Harrington, K. J., S. Mohammadtaghi, et al. (2001). "Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled PEGylated liposomes." Clin. Cancer Res. **7**: 243-254.
- Harris, M. J. and R. B. Chess (2003). "Effect of Pegylation of Pharmaceuticals." Nat. Rev. Drug Discovery **2**: 214-221.
- Hartnung, G., G. Stehle, et al. (1999). "Phase I trial of methotrexate-albumin in a weekly intravenous bolus regimen in cancer patients." Clin. Cancer Res. **5**: 753-759.
- Hashida, M., R. Atsumi, et al. (1990). "Biliary Excretion of Mitomycin C Dextran Conjugates in Relation to Physico-chemical Characteristics of Carrier Dextran." J. Pharmacobio-Dyn. **13**: 441-447.
- Haxby, J. A., O. Götze, et al. (1969). "Release of trapped marker from liposomes by the action of purified complement components " Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **64**: 290-295.
- Heidel, J. D., Y. Zhongping, et al. (2007). "Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **104**: 5715-5721.
- Hickey, M. J. and P. Kubes (2009). "Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels." Nat. Rev. Immunol. **9**: 364-375.
- Ho, D. (2009). "Beyond the sparkle: the impact of nanodiamonds as biolabeling and therapeutic agents." ACS Nano **3**: 3825-3829.
- Hoarau, D., P. Delmas, et al. (2004). "Novel long-circulating lipid-nanocapsules." Pharm. Res. **21**: 1783-1789.
- Hobbs, S. K., W. L. Monsky, et al. (1998). "Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95**: 4607-4612.

- Hofmann, A. F. (2007). "Biliary secretion and excretion in health and disease: current concepts." Ann. Hepatol. **6**: 15-27.
- Honda, S., T. Yamamoto, et al. (2010). "Topology-directed control on thermal stability: micelles formed from linear and cyclized amphiphilic block copolymers." J. Am. Chem. Soc. **132**: 10251-10253.
- Hope, M. J., M. B. Bally, et al. (1985). "Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential." Biochim. Biophys. Acta **812**: 55-65.
- Hoshino, Y., H. Koide, et al. (2010). "Recognition, neutralization, and clearance of target peptides in the bloodstream of living mice by molecularly imprinted polymer nanoparticles: A plastic antibody." J. Am. Chem. Soc. **132**: 6644-6645.
- Howell, B. A. and A. Chauhan (2009). "Bupivacaine binding to pegylated liposomes." Anesth. Analg. **109**: 678-682.
- Hubbell, J. A., S. A. Thomas, et al. (2009). "Materials engineering for immunomodulation." Nature **462**: 449-460.
- ICH, E. W. G. (2011). Impurities: Guidelines for residual solvents Q3C(R5), ICH: 25.
- Ishida, T., K. Atobe, et al. (2006). "Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes upon repeated injections: Effect of doxorubicin-encapsulation and high dose first injection." J. Control. Release **115**: 251-258.
- Ishida, T., M. Harada, et al. (2005). "Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes." J. Control. Release **105**: 305-317.
- Ishida, T., T. Ichikawa, et al. (2004). "Effect of physicochemical properties of initially injected liposomes on the clearance of subsequently injected PEGylated liposomes in mice." J. Control. Release **95**: 403-412.
- Ishihara, T., M. Takeda, et al. (2009). "Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles." Pharm. Res. **26**: 2270-2279.
- Jacobs, F., E. Wisse, et al. (2010). "The role of the sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer." Am. J. Pathol. **176**: 14-21.
- Jain, R. K. and T. Stylianopoulos (2010). "Delivering nanomedicine to solid tumors." Nat. Rev. Clin. Oncol. **7**: 653-664.
- Jamaty, C., B. Bailey, et al. (2010). "Lipid emulsions in the treatment of acute poisoning: a systematic review of human and animal studies." Clin. Toxicol. **48**: 1-27.
- Jiang, W., B. Y. Kim, et al. (2008). "Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent." Nat. Nanotechnol. **3**: 145-150.
- Johannsen, M., G. Spitaleri, et al. (2010). "The tumour-targeting human L19-IL2 immunocytokine: preclinical safety studies, phase I clinical trial in patients with solid tumours and expansion into patients with advanced renal cell carcinoma." Eur. J. Cancer **46**: 2926-2935.
- Jones, M.-C. and J. C. Leroux (2010). "Reverse micelles from amphiphilic branched polymers." Soft Matter **6**: 5850-5859.

- Judge, A., K. McClintock, et al. (2006). "Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes." Mol. Ther. **13**: 328-337.
- Kaiser, P. K., R. A. Symons, et al. (2010). "RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027." Am. J. Ophthalmol. **150**: 33-39.
- Katayose, S. and K. Kataoka (1998). "Remarkable increase in nuclease resistance of plasmid DNA through supramolecular assembly with poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer." J. Pharm. Sci. **87**: 160-163.
- Kattan, J., J.-P. Droz, et al. (1992). "Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of doxorubicin carried by polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles." Invest. New Drugs **10**: 191-199.
- Keisuke, Y., A. Kadowaki, et al. (2004). "Temperature sensitization of liposomes by use of *N*-isopropylacrylamide copolymers with varying transition endotherms." Bioconjugate Chem. **15**: 1102-1109.
- Kim, D., S. Kim, et al. (2007). "Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a novel Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer." Ann. Oncol. **18**: 2009-2014.
- Kitano, H., Y. Akatsuka, et al. (1991). "pH-responsive liposomes which contain amphiphiles prepared by using lipophilic radical initiator." Macromolecules **24**: 42-46.
- Klose, D., F. Siepmann, et al. (2006). "How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles." Int. J. Pharm. **314**: 198-206.
- Knop, K., R. Hoogenboom, et al. (2010). "Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives." Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **49**: 6288-6308.
- Kobayashi, A., T. Oda, et al. (1988). "Protein binding of macromolecular anticancer agent SMANCS: characterization of poly(styrene-co-maleic acid) derivatives as an albumin binding ligand." J. Bioact. Compat. Polym. **3**: 319-333.
- Koning, G. A., H. W. M. Morselt, et al. (2001). "Pharmacokinetics of Differently Designed Immunoliposome Formulations in Rats with or without Hepatic Colon Cancer Metastases." Pharm. Res. **18**: 1291-1298.
- Kopecek, J., P. Kopeckova-Rejmanova, et al. (2001). "Water soluble polymers in tumor targeted delivery." J. Control. Release **74**: 147-158.
- Kostarelos, K., A. Bianco, et al. (2009). "Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics." Nat. Nanotechnol. **4**: 627-633.
- Kostarelos, K., L. Lacerda, et al. (2007). "Functionalized carbon nanotube cellular uptake and internalisation mechanism is independent of functional group and cell type." Nat. Nanotechnol. **2**: 108-113.
- Koukourakis, M. I., S. Koukouraki, et al. (2000a). "High intratumoural accumulation of stealth liposomal doxorubicin (Caelyx(r)) in glioblastomas and in metastatic brain tumours." Br. J. Cancer **83**: 1281-1286.
- Koukourakis, M. I., S. Koukouraki, et al. (2000b). "High intratumoural accumulation of stealth liposomal doxorubicin in sarcomas: rationale for combination with radiotherapy." Acta Oncol. **39**: 207-211.
- Kratz, F. (2008). "Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles." J. Control. Release **132**: 171-183.

- Kreuter, J., T. Hekmatara, et al. (2007). "Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain." J. Control. Release **118**: 54-58.
- Kujawa, P., F. Segui, et al. (2006). "Impact of end-group association and main-chain hydration on the thermosensitive properties of hydrophobically modified telechelic poly(*N*-isopropylacrylamide) in water." Macromolecules **39**: 341-348.
- Kukowska-Latallo, J. F., K. A. Candido, et al. (2005). "Nanoparticles targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer." Cancer Res. **65**: 5317-5324.
- Kutscher, H. L., P. Chao, et al. (2010). "Threshold size for optimal passive pulmonary targeting and retention of rigid microparticles in rats." J. Control. Release **143**: 31-37.
- Lacerda, L., M. A. Herrero, et al. (2008). "Carbon-nanotube shape and individualization critical for renal excretion." Small **4**: 1130-1132.
- Laverman, P., M. G. Carstens, et al. (2001). "Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection." J. Pharmacol. Exp. Ther. **298**: 607-612.
- Leachman, S. A., R. P. Hickerson, et al. (2010). "First-in-human mutation targeted siRNA phase Ib trial of an inherited skin disorder." Mol. Ther. **18**: 442-446.
- Lee, C. C., J. A. MacKay, et al. (2005). "Designing dendrimers for biological applications." Nat. Biotechnol. **23**: 1517-1526.
- Lee, Y.-H., M.-H. Lee, et al. (1991). "Pharmacokinetics of diltiazem and deacetyldiltiazem in rats." Int. J. Pharm. **76**: 71-76.
- Leroux, J.-C., E. Roux, et al. (2001). "N-isopropylacrylamide copolymers for the preparation of pH-sensitive liposomes and polymeric micelles." J. Control. Release **72**: 71-84.
- Leroux, J. C. (2007). "Injectable nanocarriers for biodetoxification." Nat. Nanotechnol. **2**: 679-684.
- Leroux, J. C., F. De Jaeghere, et al. (1995). "An investigation on the role of plasma and serum opsonins on the internalization of biodegradable poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by human monocytes." Life Sci. **57**: 695-703.
- Letchford, K. and H. M. Burt (2007). "A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes." Eur. J. Pharm. Biopharm. **65**: 259-269.
- Li, C., J. E. Price, et al. (1999). "Antitumor activity of poly(L-glutamic acid)-paclitaxel on syngeneic and xenografted tumors." Clin. Cancer Res. **5**: 891-897.
- Liggins, R. T. and H. M. Burt (2004). "Paclitaxel-loaded poly(l-lactic acid) microspheres 3: blending low and high molecular weight polymers to control morphology and drug release." Int. J. Pharm. **282**: 61-71.
- Liu, Z., W. Cai, et al. (2007). "*In vivo* biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice." Nat. Nanotechnol. **2**: 47-52.
- Liu, Z., C. Davis, et al. (2008). "Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**: 1410-1415.

- Lundqvist, M., J. Stigler, et al. (2008). "Nanoparticle size and surface properties determined the protein corona with possible implications for biological impacts." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**: 14265-14270.
- Ma, H., K. Shiraishi, et al. (2010). "Accelerated blood clearance was not induced for a gadolinium-containing PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle in mice." Pharm. Res. **27**: 296-302.
- Maack, T., V. Johnson, et al. (1979). "Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: a review." Kidney Int. **16**: 251-270.
- Maeda, H. (2001a). "The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting." Advances in Enzyme Regulation **41**: 189-207.
- Maeda, H. (2001b). "SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy." Adv. Drug Delivery Rev. **46**: 169-185.
- Maeda, H., T. Sawa, et al. (2001). "Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS." J. Control. Release **74**: 47-61.
- Maeda, H., J. Wu, et al. (2000). "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review." J. Control. Release **65**: 271-284.
- Marwick, P. C., A. I. Levin, et al. (2009). "Recurrence of cardiotoxicity after lipid rescue from bupivacaine-induced cardiac arrest." Anesth. Analg. **108**: 1344-1346.
- Matsumura, Y. and H. Maeda (1986). "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs." Cancer Res. **46**: 6387-6392.
- Matusmura, Y., T. Hamaguchi, et al. (2004). "Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin." Br. J. Cancer **91**: 1775-1781.
- Maurer-Spurej, E., K. F. Wong, et al. (1999). "Factors influencing uptake and retention of amino-containing drugs in large unilamellar vesicles exhibiting transmembrane pH gradients." Biochim. Biophys. Acta **1416**: 1-10.
- Mayer, L. D., J. Reamer, et al. (1999). "Intravenous pretreatment with empty pH gradient liposomes alters the pharmacokinetics and toxicity of doxorubicin through in vivo active drug encapsulation." J. Pharm. Sci. **88**: 96-102.
- Mazoit, J.-X., R. Le Guen, et al. (2009). "Binding of long-lasting local anesthetics to lipid emulsions." Anesthesiology **110**: 380-386.
- Mebius, R. E. and G. Kraal (2005). "Structure and function of the spleen." Nat. Rev. Immunol. **5**: 606-616.
- Merkel, T. J., S. W. Jones, et al. (2011). "Using mechanobiological mimicry of red blood cells to extend circulation times of hydrogel microparticles." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **108**: 586-591.
- Meyer, O., D. Papahadjopoulos, et al. (1998). "Copolymers of *N*-isopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes." FEBS Lett. **421**: 61-64.

- Mirtallo, J. M., J. F. Dasta, et al. (2010). "State of the art review: Intravenous fat emulsions: Current applications, safety profile, and clinical implications." Ann. Pharmacother. **44**: 688-700.
- Mita, M., A. Mita, et al. (2009). "Phase I study of paclitaxel poliglumex administered weekly for patients with advanced solid malignancies." Cancer Chemother. Pharmacol. **64**: 287-295.
- Moghimi, S. M. (1995). "Mechanisms of splenic clearance of blood cells and particles: towards development of new splenotropic agents." Adv. Drug Delivery Rev. **17**: 103-115.
- Moghimi, S. M., I. Hamad, et al. (2006). "Methylation of the phosphate oxygen moiety of phospholipid-methoxy(polyethylene glycol) conjugate prevents PEGylated liposome-mediated complement activation and anaphylatoxin production." FASEB J. **20**: E2057-E2067.
- Moghimi, S. M., A. C. Hunter, et al. (2004). "Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F68, FlocorTM)-induced complement activation in human sera. A protective role against poloxamer-mediated complement activation by elevated serum lipoprotein levels." Biochim. Biophys. Acta **1689**: 103-113.
- Moghimi, S. M., A. C. Hunter, et al. (2001). "Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice." Pharmacol. Rev. **53**: 283-318.
- Momekova, D., S. Rangelov, et al. (2007). "Long-circulating, pH-sensitive liposomes sterically stabilized by copolymers bearing short blocks of lipid-mimetic units." Eur. J. Pharm. Sci. **32**: 308-317.
- Morey, T. E., M. Varshney, et al. (2004). "Treatment of local anesthetic-induced cardiotoxicity using drug scavenging nanoparticles." Nano Letters **4**: 757-759.
- Mukherjee, S., R. N. Ghosh, et al. (1997). "Endocytosis." Physiol. Rev. **77**: 759-803.
- Munniksmas, J., M. Noteborn, et al. (1980). "Fluid endocytosis by rat liver and spleen." Biochem. J. **192**: 613-621.
- Murakami, Y., Y. Tabata, et al. (1997). "Tumor accumulation of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous injection." Drug Deliv. **4**: 23-31.
- Murthy, N., J. Campbell, et al. (2003). "Design and synthesis of pH-responsive polymeric carriers that target uptake and enhance the intracellular delivery of oligonucleotides." J. Control. Release **89**: 365-374.
- Nel, A. E., L. Mädler, et al. (2009). "Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface." Nat. Mater. **8**: 543-557.
- Netti, P. A., L. M. Hamberg, et al. (1999). "Enhancement of fluid filtration across tumor vessels: implication for delivery of macromolecules." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **96**: 3137-3142.
- New, R. R. (1990). Chapter 1: Introduction. Liposomes: a practical approach. R. R. New. Oxford, Oxford University Press: 1-31.
- Noguchi, Y., J. Wu, et al. (1998). "Early Phase Tumor Accumulation of Macromolecules: A Great Difference in Clearance Rate between Tumor and Normal Tissues." Jpn. J. Cancer Res. **89**: 307-314.
- Northfelt, D. W., F. J. Martin, et al. (1996). "Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor

- localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma." J. Clin. Pharmacol. **36**: 55-63.
- O'Brien, M., N. Wigler, et al. (2004). "Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of PEGylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil(R)) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer." Ann. Oncol. **15**: 440-449.
- Ogawara, K.-i., K. Furumoto, et al. (2004). "Pre-coating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: implications for rational design of nanoparticles." J. Control. Release **100**: 451-455.
- Ogawara, K.-i., M. Yoshida, et al. (1999a). "Uptake by hepatocytes and biliary excretion of intravenously administered polystyrene microspheres in rats." J. Drug Target. **7**: 213-221.
- Ogawara, K.-i., M. Yoshida, et al. (1999b). "Hepatic uptake of polystyrene microspheres in rats: Effect of particle size on intrahepatic distribution." J. Control. Release **59**: 15-22.
- Oja, C. D., S. C. Semple, et al. (1996). "Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins." Biochim. Biophys. Acta **1281**: 31-37.
- Oney, S., R. T. S. Lam, et al. (2009). "Development of universal antidotes to control aptamer activity." Nat. Med. **15**: 1224-1228.
- Owens, D. E., III and N. A. Peppas (2006). "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles." Int. J. Pharm. **307**: 93-102.
- Panagi, Z., A. Beletsi, et al. (2001). "Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles " Int. J. Pharm. **221**: 143-152.
- Park, T. G. (1994). "Degradation of poly(D,L-Lactic acid) microspheres: effect of molecular weight." J. Control. Release **30**: 161-173.
- Park, T. G. (1995). "Degradation of Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microspheres- Effect of Copolymer Composition." Biomaterials **16**: 1123-1130.
- Parr, M. S., S. M. Ansell, et al. (1994). "Factors influencing the retention and chemical stability of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates incorporated into large unilamellar vesicles." Biochim. Biophys. Acta **1195**: 21-30.
- Paz-Ares, L., H. Ross, et al. (2008). "Phase III trial comparing paclitaxel poliglumex vs docetaxel in the second-line treatment of non-small-cell lung cancer." Br. J. Cancer **98**: 1608-1613.
- Pearigen, P. D. and N. L. Benowitz (1991). "Poisoning due to calcium antagonists: Experience with verapamil, diltiazem and nifedipine." Drug Saf. **6**: 408-430.
- Peer, D., J. M. Karp, et al. (2007). "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy." Nat. Nanotechnol. **2**: 751-760.
- Peracchia, M. T., E. Fattal, et al. (1999). "Stealth^(R) PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting." J. Control. Release **60**: 121-128.
- Petros, R. A. and J. M. DeSimone (2010). "Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications." Nat. Rev. Drug Discovery **9**: 615-627.

- Photos, P. J., L. Bacakova, et al. (2003). "Polymer vesicles *in vivo*: correlations with PEG molecular weight." J. Control. Release **90**: 323-334.
- Pirollo, K. F. and E. H. Chang (2008). "Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake?" Trends in Biotechnology **26**: 552-558.
- Pochan, D. J., Z. Chen, et al. (2004). "Toroidal triblock copolymer assemblies." Science **306**: 94-97.
- Qian, X., X.-H. Peng, et al. (2008). "In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags." Nat. Biotechnol. **26**: 83-90.
- Rabinow, B. E. (2004). "Nanosuspensions in drug delivery." Nat. Rev. Drug Discovery **3**: 785-796.
- Reddy, S. T., A. J. van der Vlies, et al. (2007). "Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticles vaccines." Nat. Biotechnol. **25**: 1159-1164.
- Rensen, P. C., M. C. Van Dijk, et al. (1995). "Selective liver targeting of antivirals by recombinant chylomicrons: A new therapeutic approach to hepatitis B." Nat. Med. **1**: 221-225.
- Ricklin, D., G. Hajishengallis, et al. (2010). "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis." Nat. Immunol. **11**: 785-797.
- Röcker, C., M. Pötzl, et al. (2009). "A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles." Nat. Nanotechnol. **4**: 577-580.
- Rodrigueza, W. V., M. C. Phillips, et al. (1998). "Structural and metabolic consequences of liposome-lipoprotein interactions." Adv. Drug Delivery Rev. **32**: 31-43.
- Roux, E., M. Francis, et al. (2002a). "Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drugs." Int. J. Pharm. **242**: 25-36.
- Roux, E., M. Lafleur, et al. (2003). "On the characterization of pH-sensitive Liposome/Polymer Complexes." Biomacromolecules **4**: 240-248.
- Roux, E., C. Passirani, et al. (2004). "Serum-stable and long-circulating, PEGylated pH-sensitive liposomes." J. Control. Release **94**: 447-451.
- Roux, E., R. Stomp, et al. (2002b). "Steric stabilization of liposomes by pH-responsive N-isopropylacrylamide copolymer." J. Pharm. Sci. **91**: 1795-1802.
- Rowinsky, E. K., J. Rizzo, et al. (2003). "A phase I and pharmacokinetic study of pegylated camptothecin as a 1-hour infusion every 3 weeks in patients with advanced solid malignancies." J. Clin. Oncol. **21**: 148-157.
- Ruggiero, A., C. H. Villa, et al. (2010). "Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **107**: 12369-12374.
- Rusconi, C. P., J. D. Roberts, et al. (2004). "Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer *in vivo*." Nat. Biotechnol. **22**: 1423-1428.
- Sant, S., V. Nadeau, et al. (2005). "Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles." J. Control. Release **107**: 203-214.
- Sapra, P., P. Kraft, et al. (2009). "Marked therapeutic efficacy of a novel polyethylene glycol-SN38 conjugate, EZN-2208, in xenografts models of B-cell non-Hodgkin's lymphoma." Haematologica **94**: 1456-1459.
- Sapra, P., H. Zhao, et al. (2008). "Novel delivery of SN38 markedly inhibits tumor growth in xenografts, including a camptothecin-11-refractory model." Clin. Cancer Res. **14**: 1888-1896.

- Sato, Y., K. Murase, et al. (2008). "Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone." Nat. Biotechnol. **26**: 431-442.
- Scheinberg, D. A., C. H. Villa, et al. (2010). "Conscripts of the infinite armada: systemic cancer therapy using nanomaterials." Nat. Rev. Clin. Oncol. **7**: 266-276.
- Schellenberger, V., C.-w. Wang, et al. (2009). "A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner." Nat. Biotechnol. **27**: 1186-1191.
- Schipper, M. L., N. Nakayama-Ratchford, et al. (2008). "A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice." Nat. Nanotechnol. **3**: 216-221.
- Schoemaker, N., C. van Kesteren, et al. (2002). "A phase I and pharmacokinetic study of MAG-CPT, a water-soluble polymer conjugate of camptothecin." Br. J. Cancer **87**: 608-614.
- Semple, S. C., A. Akinc, et al. (2010). "Rational design of cationic lipids for siRNA delivery." Nat. Biotechnol. **28**: 172-176.
- Semple, S. C., A. Chonn, et al. (1996). "Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes." Biochemistry **35**: 2521-2525.
- Semple, S. C., A. Chonn, et al. (1998). "Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo." Adv. Drug Delivery Rev. **32**: 3-17.
- Semple, S. C., T. O. Harasym, et al. (2005). "Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic acid." J. Pharmacol. Exp. Ther. **312**: 1020-1026.
- Seymour, L. W., R. Duncan, et al. (1987). "Effect of Molecular Weight (Mw) on N(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats." J. Biomed. Mater. Res. **21**: 1341-1358.
- Seymour, L. W., D. R. Ferry, et al. (2002). "Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin." J. Clin. Oncol. **20**: 1668-1676.
- Sharma, G., D. T. Valenta, et al. (2010). "Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages." J. Control. Release **147**: 408-412.
- Sheff, D. (2004). "Endosomes as a route for drug delivery in the real world." Adv. Drug Delivery Rev. **54**: 927-930.
- Silvius, J. R. and M. J. Zuckermann (1993). "Interbilayer transfer of phospholipid-anchored macromolecules via monomer diffusion." Biochemistry **32**: 3153-3161.
- Simard, P., D. Hoarau, et al. (2005). "Preparation and in vivo evaluation of PEGylated spherulite formulations." Biochim. Biophys. Acta **1715**: 37-48.
- Simard, P. and J. C. Leroux (2009). "pH-sensitive immunoliposomes specific to the CD33 cell surface antigen of leukemic cells." Int. J. Pharm. **381**: 86-96.
- Simard, P. and J. C. Leroux (2010). "In vivo evaluation of pH-sensitive polymer-based immunoliposomes targeting the CD33 antigen." Mol. Pharmaceutics **7**: 1098-1107.
- Singal, P. K. and N. Iliskovic (1998). "Doxorubicin-induced cardiomyopathy." New Engl. J. Med. **339**: 900-905.

- Skrabalak, S. E., J. Chen, et al. (2008). "Gold nanocages: synthesis, properties and applications." Acc. Chem. Res. **41**: 1587-1595.
- Smith, M. S., P. Chacko, et al. (1983). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of diltiazem." Am. J. Cardiol. **51**: 1369-1374.
- Strebhardt, K. and A. Ullrich (2008). "Paul Ehrlich's magical bullet concept: 100 years of progress." Nat. Rev. Cancer **8**: 473-480.
- Symon, Z., A. Peyser, et al. (1999). "Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by stealth liposomes." Cancer **86**: 72-78.
- Synnes, M., K. Prydz, et al. (1999). "Fluid phase endocytosis and galactosyl receptor-mediated endocytosis employ different early endosomes." Biochim. Biophys. Acta **1421**: 317-328.
- Szebeni, J. (2005). "Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity." Toxicology **216**: 106-121.
- Szebeni, J., L. Baranyi, et al. (2002). "Role of complement activation in hypersensitivity reactions to doxil and HYNIC PEG liposomes: experimental and clinical studies." J. Liposome Res. **12**: 165-172.
- Tagami, T., K. Nakamura, et al. (2009). "Effect of siRNA in PEG-coated siRNA-lipoplex on anti-PEG IgM production." J. Control. Release **137**: 234-240.
- Tebbutt, S., M. Harvey, et al. (2006). "Intralipid prolongs survival in a rat model of verapamil toxicity." Acad. Emerg. Med. **13**: 134-139.
- Teplyakov, A., G. Obmolova, et al. (1993). "Crystal structure of apo-neocarzinostatin at 0.15-nm resolution." Eur. J. Biochem. **213**: 737-741.
- Torchilin, V. P. (2005). "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers." Nat. Rev. Drug Discovery **4**: 145-160.
- Tribet, C. and F. Vial (2008). "Flexible macromolecules attached to lipid bilayers: impact on fluidity, curvature, permeability and stability of membranes." Soft Matter **4**: 68-81.
- Trussel, S., C. Dumelin, et al. (2009). "New Strategy for the Extension of the Serum Half-Life of Antibody Fragments." Bioconjugate Chem. **20**: 2286-2292.
- Tsui, B., J. D. Z. Feng, et al. (1994). "Pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in rats following a single intra-arterial or single oral dose." Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. **19**: 369-373.
- Tsui, B. C. H., J. D. Z. Feng, et al. (1998). "Pharmacokinetics and haemodynamic effect of diltiazem in rats: Effect of route of administration." J. Pharm. Pharmacol. **50**: 183-188.
- Valle, J. W., A. Armstrong, et al. (2011). "A phase 2 study of SP1049C, doxorubicin in P-glycoprotein-targeting pluronics, in patients with advanced adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction." Invest. New Drugs Epub ahead of print: DOI 10.1007/s10637-10010-19399-10631.
- van Etten, E. W., M. T. ten Kate, et al. (1998). "Administration of liposomal agents and blood clearance capacity of the mononuclear phagocyte system." Antimicrob. Agents Chemother. **42**: 1677-1681.
- Varschey, M., T. E. Morey, et al. (2004). "Pluronic microemulsions as nanoreservoirs for extraction of bupivacaine from normal saline." J. Am. Chem. Soc. **126**: 5108-5112.

- Vasey, P. A., S. B. Kaye, et al. (1999). "Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-- drug-polymer conjugates." Clin. Cancer Res. **5**: 83-94.
- Veronese, F. M. and G. Pasut (2005). "PEGylation, successful approach to drug delivery." Drug Discovery Today **10**: 1451-1458.
- Verschraegen, C. F., K. Skubitz, et al. (2009). "A phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel poliglumex and cisplatin in patients with advanced solid tumors." Cancer Chemother. Pharmacol. **63**: 903-910.
- Vicent, M. J., F. Greco, et al. (2005). "Polymer therapeutics designed for a combination therapy of hormone-dependent cancer." Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **44**: 4061-4066.
- Vonarbourg, A., C. Passirani, et al. (2006). "Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake." J. Biomed. Mater. Res. **78A**: 620-628.
- Walport, M. J. (2001). "Advances in immunology: Complement: First of two parts." New Engl. J. Med. **344**: 1058-1066.
- Wasan, K. M., D. R. Brocks, et al. (2008). "Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery." Nat. Rev. Drug Discovery **7**: 84-99.
- Webb, M. S., D. Saxon, et al. (1998). "Comparison of different hydrophobic anchors conjugated to poly(ethylene glycol): effect on the pharmacokinetics of liposomal vincristine." Biochim. Biophys. Acta **1372**: 272-282.
- Webster, R., É. Didier, et al. (2007). "PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies." Drug Metab. Dispos. **35**: 9-16.
- Webster, R., V. Elliott, et al. (2009). PEG and PEG conjugates toxicity: towards an understanding of the toxicity of PEG and its relevance to PEGylated biologicals. PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications. F. M. Veronese, Birkhäuser Basel: 127-146.
- Weinberg, G. L., T. Vadeboncouer, et al. (1998). "Pretreatment or resuscitation with a lipid infusion shifts the dose-response to bupivacaine-induced asystole in rats." Anesthesiology **88**: 1071-1075.
- Weissleder, R., K. Kelly, et al. (2005). "Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules." Nat. Biotechnol. **23**: 1418-1423.
- Whitehead, K. A., R. S. Langer, et al. (2009). "Knocking down barriers: advances in siRNA delivery." Nat. Rev. Drug Discovery **8**: 129-138.
- Wisse, E., F. Jacobs, et al. (2008). "The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer." Gene Therapy **15**: 1193-1199.
- Wolfrum, C., S. Shi, et al. (2007). "Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs." Nat. Biotechnol. **25**: 1149-1157.
- Wu, J., M. H. Nantz, et al. (2002). "Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications." Front. Biosci. **7**: d717-725.

- Yamamoto, Y., Y. Nagasaki, et al. (2001). "Long-circulating poly(ethylene glycol)-poly(d,l-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge." J. Control. Release **77**: 27-38.
- Yamaoka, K., T. Nakagawa, et al. (1978). "Statistical moments in pharmacokinetics." J. Pharmacokinet. Biopharm. **6**: 547-558.
- Yamaoka, T., M. Kuroda, et al. (1995a). "Body distribution of dextran derivatives with electric charges after intravenous administration." Int. J. Pharm. **113**: 149-157.
- Yamaoka, T., Y. Tabata, et al. (1993). "Body distribution profile of polysaccharides after intravenous administration." Drug Deliv. **1**: 75-82.
- Yamaoka, T., Y. Tabata, et al. (1994a). "Body distribution of intravenously administered gelatin with different molecular weights." J. Control. Release **31**: 1-8.
- Yamaoka, T., Y. Tabata, et al. (1994b). "Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice." J. Pharm. Sci. **83**: 601-606.
- Yamaoka, T., Y. Tabata, et al. (1995b). "Comparison of Body Distribution of Poly(vinyl alcohol) with Other Water-soluble Polymers after Intravenous Administration." J. Pharm. Pharmacol. **47**: 479-486.
- Yessine, M.-A., M. Lafleur, et al. (2003). "Characterization of the membrane-destabilizing properties of different pH-sensitive methacrylic acid copolymers." Biochim. Biophys. Acta **1613**: 28-38.
- You, J.-O. and D. T. Auguste (2009). "Nanocarrier cross-linking density and pH sensitivity regulate intracellular gene transfer." Nano Letters **9**: 4467-4473.
- Yurkovetskiy, A. V. and R. J. Fram (2009). "XMT-1001, a novel polymeric camptothecin pro-drug in clinical development for patients with advanced cancer." Adv. Drug Delivery Rev. **61**: 1193-1202.
- Zalevsky, J., A. K. Chamberlain, et al. (2010). "Enhanced antibody half-life improve *in vivo* activity " Nat. Biotechnol. **28**: 157-159.
- Zignani, M., D. C. Drummond, et al. (2000). "*In vitro* characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. ." Biochim. Biophys. Acta **1463**: 383-394.
- Zipfel, P. F. and C. Skerka (2009). "Complement regulator and inhibitory proteins." Nat. Rev. Immunol. **9**: 729-740.
- Zweers, M. L. T., G. H. M. Engbers, et al. (2004). "In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide)." J. Control. Release **100**: 347-356.

ANNEXE 1. Serum-stable, long-circulating, pH-sensitive PEGylated liposomes

Nicolas Bertrand¹, Pierre Simard¹ and Jean-Christophe Leroux^{1*}

¹Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, PO box 6128 Downtown Station, H3C 3J7, Montreal, Québec, Canada

*Corresponding author.

Abstract

pH-sensitive liposomes have been designed to deliver active compounds, specifically to acidic intracellular organelles, and to augment their cytoplasmic concentrations. These systems combine the protective effects of other liposomal formulations with specific environment-controlled drug release. They are stable at physiological pH, but abruptly discharge their contents when endocytosed into acidic compartments, allowing the drug to be released before it is exposed to the harsh environment of the lysosomes.

Serum-stable formulations with minimal leakage at physiological pH and rapid drug release at pH 5.0 to 5.5 can be easily prepared by inserting a hydrophobically modified *N*-isopropylacrylamide/methacrylic acid copolymer (poly(NIPAM-*co*-MAA)) in the lipid bilayer of sterically-stabilized liposomes. The present chapter describes polymer synthesis, as well as the preparation and characterization of large unilamellar pH-sensitive vesicles.

Key words: pH-sensitive liposomes, *N*-isopropylacrylamide copolymer, triggered release

INTRODUCTION

The acidification of endosomal compartments as they evolve towards lysosomes is a well-described phenomenon (1) that can be exploited to design drug delivery systems capable of releasing their contents after endocytosis. Enhanced cytoplasmic drug concentrations can therefore be achieved with “smart” formulations which are sensitive to acidic pHs. For this purpose, liposomal formulations are attractive because their deformable phospholipid bilayers can be rapidly disrupted to trigger drug release. In this book section, ionisable copolymers of *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) are anchored in the phospholipid membrane and used to destabilize the bilayer upon acidification of the environment.

These polymers were selected because of their ability to promptly transit from hydrated coil to dehydrated globule conformation when temperature increases above their lower critical solubility temperature (LCST). Homopolymers of NIPAM have a LCST in aqueous solution around 32°C which is not compatible with physiological conditions. Thus, to be exploitable for *in vivo* drug delivery, this temperature must be increased by copolymerization with other hydrophilic monomers. When these monomers have ionisable moieties, such as methacrylic acid (MAA, pKa= 5.4), the increase in LCST is dependent on ionisation, and therefore the polymers acquire pH-dependent physiological solubility (2).

Poly(NIPAM-*co*-MAA) with MAA content above 5 mol% is soluble under both physiological pH (7.4) and temperature (37°C), when its carboxylic functions are ionized. However, when pH is decreased to the pH of late endosomes and lysosomes (~pH = 5 to 5.5)(1), MAA protonation triggers dehydration of the polymer chains. If the polymer is

anchored to a phospholipid membrane through randomly- or terminally-incorporated alkyl chains, transition to a globule conformation induces reorganization of the bilayer that leads to massive content leakage(3).

This book chapter thoroughly describes the preparation of poly(NIPAM-*co*-MAA)-based liposomes that can enhance the cytoplasmic bioavailability of drugs by triggering drug release specifically in acidic compartments. The optimization and characterization of these systems have been described in numerous publications (3-9).

1. MATERIALS

2.1 Polymer synthesis

2.1.1. Alkylated initiator (DODA-501) synthesis

1. Anhydrous tetrahydrofuran (THF), distil freshly on an alumina column and maintain under inert atmosphere until use.
2. Anhydrous chloroform (CHCl₃), distil freshly on an alumina column and maintain under inert atmosphere until use.
3. Anhydrous acetonitrile (ACN), commercially available, store in a ventilated cabinet at room temperature, under inert atmosphere.
4. Acetone, reagent grade, store in a ventilated cabinet at room temperature.
5. Hexane, reagent grade, store in a ventilated cabinet at room temperature.
6. Ethyl acetate, reagent grade, store in a ventilated cabinet at room temperature.
7. 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (V-501, Sigma), store at room temperature.
8. *N*-hydroxysuccinimide (NHS, Sigma), store at room temperature.

9. 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC, Sigma), store at -20°C and protect from humidity.
10. Dioctadecylamine (DODA, Sigma). To purify, solubilise in boiling acetone/ CHCl_3 (4:1 v/v), cool to room temperature and filter under vacuum on a Buchner funnel. Store the purified product at room temperature.
11. Silica thin layer chromatography (TLC) sheets, store at room temperature.
12. Silica powder, store at room temperature.
13. Potassium permanganate (KMnO_4) solution. To prepare, dissolve 1.5 g (10 mmol) of KMnO_4 and 10 g (72 mmol) of potassium carbonate (K_2CO_3) in 1.25 mL of 2.5 *N* sodium hydroxide (NaOH) solution and add 200 mL of deionised water. Store at room temperature for a maximum of 3 months.

2.1.2. Poly(NIPAM-*co*-MAA) synthesis

1. Previously-synthesized alkylated initiator (DODA-501), store at room temperature under inert atmosphere.
2. NIPAM (Sigma). Upon arrival, purify the commercially available product by crystallisation from boiling heptane/acetone (4:1 v/v) and filter under vacuum on a Buchner funnel. Store the purified product under argon, at room temperature.
3. MAA (Sigma). Upon arrival, purify the commercially available product from its polymerization inhibitor by elution on an inhibitor-removing disposable column (Sigma). Store the purified product at -20°C .

4. Anhydrous 1,4-dioxane, store in a ventilated cabinet at room temperature, under inert atmosphere.
5. THF, reagent grade, store in a ventilated cabinet at room temperature.
6. Diethylether, reagent grade, store in a ventilated cabinet at room temperature.
7. Regenerated cellulose dialysis bags, molecular *cut-off* 6-8 kDa (eg. Spectra/Por[®], Spectrum). Before use, soak the membrane in water for at least 30 min and rinse with distilled water. Standard polypropylene clips (eg. Spectra/Por[®] Closures, Spectrum) can be employed to seal the tubes.

2.2. Polymer characterization

1. *d*-Chloroform (CDCl₃) for proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) analysis, store at room temperature.
2. THF, High Performance Liquid Chromatography-grade, for gel permeation chromatography (GPC) analysis, store at room temperature.
3. 55 mM isotonic phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4. Sterilize by filtration on a 0.22- μm nylon filter and store at 4°C.
4. 5 N hydrochloric acid (HCl) solution. Store in a ventilated cabinet at room temperature.
5. Quartz 10-mm X 10-mm cuvettes.

2.3. Liposome preparation

1. 4% (w/v) poly(NIPAM-*co*-MAA) solution in CHCl₃. Store at -80°C until use.

2. 4% (w/v) egg phosphatidylcholine (EPC) solution in CHCl₃. Store at -80°C until use (see **Note 1**).
3. 4% (w/v) cholesterol solution in CHCl₃. Store at -80°C until use.
4. 2% (w/v) 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(methoxy polyethylene glycol)₂₀₀₀ (DSPE-PEG, NOF) solution in CHCl₃. Store at -80°C until use.
5. 20 mM isotonic 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid buffer saline (HEPES) pH 7.4, containing 35 mM of trisodium 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate (HPTS) and 50mM of *p*-xylene-*bis*-pyridinium bromide (DPX). Store protected from light at 4°C (see **Note 2**).
6. Manual liposome extruder and polycarbonate filters (pore diameters of 400, 200 and 100 nm).
7. 20 mM HEPES isotonic buffer, pH 7.4. Sterilize by filtration on a 0.22- μ m nylon filter and store at 4°C.
8. Agarose column of adequate length and width (eg. Sepharose CL-4B[®], Sigma, 30-cm length and 1-cm width) for size exclusion chromatography (SEC). Store hydrated with isotonic HEPES buffer at 4°C.

2.4. Liposome characterization

2.4.1. pH sensitivity experiments

1. Quartz 10 mm X 10 mm cuvettes.
2. 10% (w/w) Triton X-100 aqueous solution, store at 4°C.

3. 20 mM HEPES isotonic buffer, pH 7.4. Sterilize by filtration on a 0.22- μm nylon filter and store at 4 °C.
4. 20 mM isotonic 2-*N*-(morpholino)ethanesulfonic acid(MES) buffers, pH 5.0-6.5. Sterilize by filtration on a 0.22- μm nylon filter and store at 4°C.

2.4.2. Serum stability experiments

1. Quartz 10 mm X 10 mm cuvettes.
2. 10% (*w/w*) Triton X-100 aqueous solution, store at 4°C.
3. 20 mM HEPES isotonic buffer, pH 7.4. Sterilize by filtration on a 0.22- μm nylon filter and store at 4 °C.
4. Rat non-sterile serum. Store at -20 °C.

2.4.3. Preservation of pH-sensitivity

1. Quartz 10 mm X 10 mm cuvettes.
2. 10% (*w/w*) Triton X-100 aqueous solution, store at 4°C.
3. 20 mM HEPES isotonic buffer, pH 7.4. Sterilize by filtration on a 0.22- μm nylon filter and store at 4 °C.
4. Rat non-sterile serum. Store at -20 °C.
5. Agarose column of adequate length and width (eg. Sepharose CL-4B[®], Sigma, 30-cm length and 1-cm width) for size exclusion chromatography (SEC). Store hydrated with isotonic HEPES buffer at 4°C.

2. METHODS

The following section thoroughly describes polymer synthesis and purification as well as liposome preparation, purification and basic characterization. To provide detailed protocols, the number of experiments was narrowed down to the most general procedures. However, creative investigators will find plenty of ways to modify and adjust the protocols to achieve their drug delivery needs and objectives.

In previous publications, different probes and drugs have been encapsulated successfully in the pH-sensitive liposomes described in this chapter (3-9). The vesicles alone have been shown to be stable for prolonged periods of time (over months) when stored at 4°C. However, depending on the nature of the encapsulated compounds, content may degrade or leak upon storage, reducing the overall shelf-life of the formulation.

3.1. Polymer synthesis

3.1.1. Alkylated radical initiator (DODA-501) synthesis (see **Fig. 1A**) (10)

3.1.1.1 *Synthesis of disuccinimide 4,4'-azobis-(4-cyanovalerate) (A-501)*

1. Flame-dry a round bottom flask containing a magnetic stirrer, sealed with a rubber septum and under a flux of argon. Cool down under a flux of argon.
2. To obtain around 1g of purified product, weigh 2.65 g (9.5 mmol) of V-501, 1.04 g (9 mmol) of NHS and 2.06 g (10.8 mmol) of EDC. Rapidly transfer the reagents to the reaction flask, without allowing air to disturb the inert atmosphere.

3. Using anhydrous techniques, transfer 10 mL of THF and 10 mL of ACN to the reaction flask (V-501 concentration ~ 0.5 mmol/mL). Stir overnight (>12 h) at room temperature, under argon atmosphere.

3.1.1.2 Purification of A-501

1. Evaporate the solvent under reduced pressure and mild heating (40 - 50°C).
2. Solubilise the content of the reaction flask with ~ 30 mL acetone. Transfer the mixture to a large beaker and precipitate the reaction product by adding ~ 70 mL of ice-cold water. Filter under vacuum on a Buchner funnel.
3. Dry the white crust on the filter paper overnight under vacuum at room temperature. The yield is around 25%.

3.1.1.3 Synthesis of DODA-501

1. Flame-dry a round bottom flask containing a magnetic stirrer, sealed with a rubber septum and under a flux of argon. Cool down under a flux of argon.
2. To obtain around 800 mg of alkylated initiator, weigh 1.00 g (2.1 mmol) of A-501 and 2.20 g (4.2 mmol) of purified DODA. Rapidly transfer both reagents to the round bottom flask, without allowing air to disturb the inert atmosphere and wrap the flask with aluminium foil to protect the content from light.
3. Employing anhydrous techniques, transfer 15 mL of THF and 7.5 mL of CHCl_3 to the reaction flask (A-501 concentration ~ 0.1 mmol/mL). Stir overnight (>12 h) at room temperature, under argon atmosphere.
4. Confirm completion of the reaction by TLC with elution of a few drops of the reaction mixture with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v). Reveal with KMnO_4

solution. Consider the reaction completed when the spot for A-501 is no longer visible on TLC or when no intensity changes in the spots are detectable (see **Note 3**).

3.1.1.4 Purification of DODA-501

1. When the reaction is completed, evaporate the solvent under reduced pressure and mild heating (40-50°C).
2. Prepare silica gel for chromatography by solvating silica powder in hexane. Deposit the gel in a chromatographic column (30-cm length, 2-cm width), and allow to settle.
3. Solubilise the reaction products in a small quantity of hexane/ethyl acetate (2:1 v/v) (see **Note 4**). Deposit the solution with a glass pipette on top of the silica gel column and start eluting with solvent (hexane/ethyl acetate 2:1 v/v). Collect fractions of 10 mL and identify DODA-501 by TLC. The product should elute with early fractions.
4. Pool together the fractions containing DODA-501 and evaporate the solvent under reduced pressure to obtain a brownish viscous liquid. Add a small volume of CHCl₃ and precipitate in ACN. Filter under vacuum on a Buchner funnel and collect the white powder. The yield is around 25%.

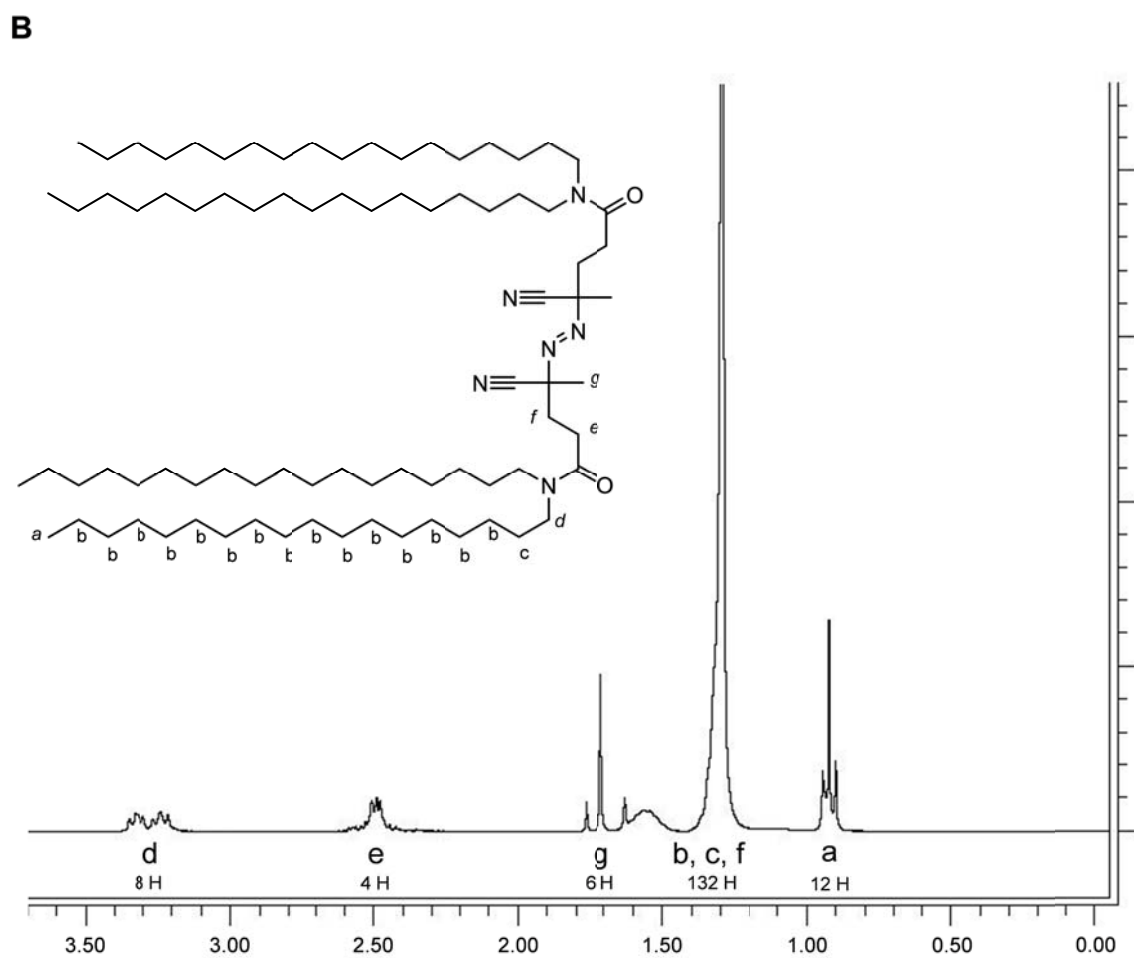
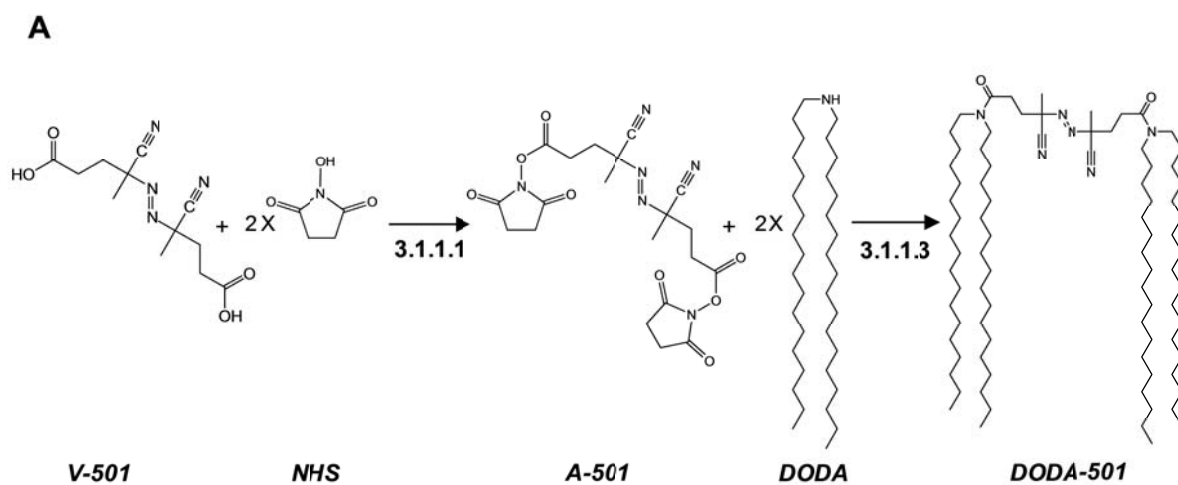


Figure 1. A. Synthesis scheme of the alkylated radical initiator DODA-501

B. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of DODA-501 with its characteristic protons.

5. Confirm structure by $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 (see **Fig. 1B**): δ 0.9 ppm (12 H, t, - CH_3), 1.1-1.6 (132 H, m, $-\text{CH}_2-$), 1.7 (6 H, t, $-\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 2.5 (4 H, t, $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$), 3.1-3.5 (8 H, m, $-\text{NCH}_2-$).

3.1.2. Poly(NIPAM-co-MAA) synthesis

3.1.2.1. Polymer synthesis

1. Flame-dry a round bottom flask containing a magnetic stirrer, sealed with a rubber septum and under a flux of argon. Cool down under a flux of argon.
2. To obtain around 400 mg of polymer, weigh 0.025 g (0.019 mmol) of the radical initiator DODA-501, 0.425 g (3.8 mmol) of NIPAM and 0.017 g (0.20 mmol) of MAA. Rapidly transfer the reagents to the round bottom flask, restore inert atmosphere by purging with argon for a few minutes.
3. Using anhydrous techniques, transfer 5 mL of 1,4-dioxane in the reaction flask (monomer concentration ~ 0.8 mmol/mL). Degas the reaction flask by bubbling argon through the solution for 10 min. Stir overnight (>12 h) at 70°C under argon atmosphere.

3.1.2.2. Polymer purification

1. Evaporate the remaining solvent under reduced pressure and strong heating ($80-100^\circ\text{C}$).

2. Solubilise the reaction product in a small quantity of THF and precipitate the polymer in cold diethylether. Filter under vacuum on a Buchner funnel, and collect the polymer on the filter.
3. Solubilise the polymer in water, transfer the aqueous solution to a dialysis bag and dialyse against deionised water under stirring at room temperature for 5-7 days, changing the water daily. Collect the contents of the dialysis bag and freeze-dry to obtain an amorphous solid. The yield is around 80%.

3.2. Polymer characterization

3.2.1. Basic characterization

1. Basic polymer characterization is done by 1H -NMR, in $CDCl_3$, and GPC relative to polystyrene standards, in THF at 1 mL/min flow. The presence of the terminal alkyl chains of the polymer is ascertained by the methyl 1H -NMR peak at 0.9 ppm(10, 11). The expected number-average molecular weight (M_n) under these conditions should range between 10 and 15 kDa with a polydispersity comprised between 1.2 and 1.8.

3.2.2. Measuring the pH of precipitation of the polymer

1. The following experiment is conducted to find out the pH at which the polymer will precipitate and induce drug release from the liposomes, once anchored on the membrane. The phase transition pH is determined at 37°C by measuring the turbidity of the polymer solutions at different pHs. As the polymer undergoes

coil-to-globule transition and aggregates, the turbidity of the polymer solution increases.

2. Weigh 10 mg of polymer and dissolve in 200 ml of PBS, pH 7.4. Decrease the pH of the solution step by step (0.2 unit/step) to a final pH of 4.6, with a concentrated HCl solution. Sample aliquots of 4 mL after each pH decrement.
3. Measure the turbidity of each aliquot (amount of light scattered at 90°) in a 10-mm x 10-mm quartz cuvette at 37°C and under magnetic stirring. Before reading, leave each sample in the cuvette for at least 5 min to reach equilibrium. Determine the turbidity of the solution with a fluorometer by setting the excitation and emission wavelengths at 480 nm.
4. Establish the fluorometer sensitivity and offset by using the aliquot of maximum turbidity and a blank buffer solution, respectively.

3.3. Liposome preparation and purification

3.3.1 Liposome extrusion

1. In a clean, round bottom flask, add 693 μL (36.5 μmol) of the EPC solution, 234 μL (24.2 μmol) of the cholesterol solution, 286 μL (2.1 μmol) of the DSPE-PEG solution and 950 μL (2.5 μmol) of the poly(NIPAM-*co*-MAA) solution.
2. Evaporate the CHCl_3 by rotary evaporation under reduced pressure, at room temperature for at least 1 h, to form a dry, uniform film on the flask wall.

3. Hydrate the polymer/lipid film with 0.9 mL of HPTS/DPX-containing HEPES buffer (see **Note 2**). Vortex and leave the mixture to rest overnight protected from light, at 4°C, to ensure complete lipid hydration (see **Note 5**).
4. Extrude the lipid preparation on a tightly-closed manual extruder through a 400-nm polycarbonate membrane. Force liposome dispersion through the membrane an *even* number of times (6 or 8 times). Change the membrane for one with 200-nm pore-size and repeat the extrusion process 6 or 8 times. Finally, substitute the membrane for a 100-nm membrane and extrude an *odd* number of times, normally 7 to 21 times. Collect liposomes on the extruder side opposite to the starting point (see **Note 6**).
5. Confirm that the liposomes have an adequate size and size distribution by DLS. Repeat extrusion with the smallest pore-sized membrane if the results are not satisfactory (see **Note 7**).

3.3.2 Liposome purification

1. Separate liposomes from non-encapsulated dyes and free polymer by SEC with 20-mM HEPES buffer as the mobile phase (see **Note 8**).
2. Pool fractions together if a high amount of liposomes is needed.

3.4. Liposome characterization

The basic characterization of liposomes revolves around size determination, usually by DLS, and sample liposome concentration by phosphorous assay, neither of which will be described here. Indeed, the procedures of the DLS experiments highly depend on the

type of apparatus used, while the Bartlett colorimetric assay of phosphorous content has fully been described elsewhere (12-14).

3.4.1. Liposome pH-sensitivity

1. Liposome pH-sensitivity is assessed by comparing the release kinetics of encapsulated HPTS/DPX between liposomes dispersed in neutral HEPES and acidic MES buffers (pH between 5.0 and 6.5). The method relies on monitoring the dequenching of HPTS fluorescence as it is released ($\lambda_{\text{excitation}}$ 413 nm and $\lambda_{\text{emission}}$ 512 nm) (see **Note 9**).
2. The following experiments can be conducted on any fluorometer. Release experiments are performed in a 10-mm X 10-mm quartz cuvette containing with 1 mL of buffer maintained at 37°C and under constant magnetic stirring.
3. After calibration of the apparatus, put 10 μL of purified liposomes in 1 mL of HEPES and monitor fluorescence emission for 30 min. At the end of the experiment, disrupt the liposomes with 10 μL of Triton X-100 solution and record this fluorescence intensity as the maximum value (100%). Plot the fraction of HPTS released *versus* time.
4. Repeat the experiment under acidic conditions (MES buffer) and plot the release kinetics at different pHs from 5.0 to 6.5. Efficient pH-sensitive liposomes should show minimal HPTS leakage at pH 7.4 and near complete (> 80%) release within the first 10 min at acidic pH (see **Fig. 2**).

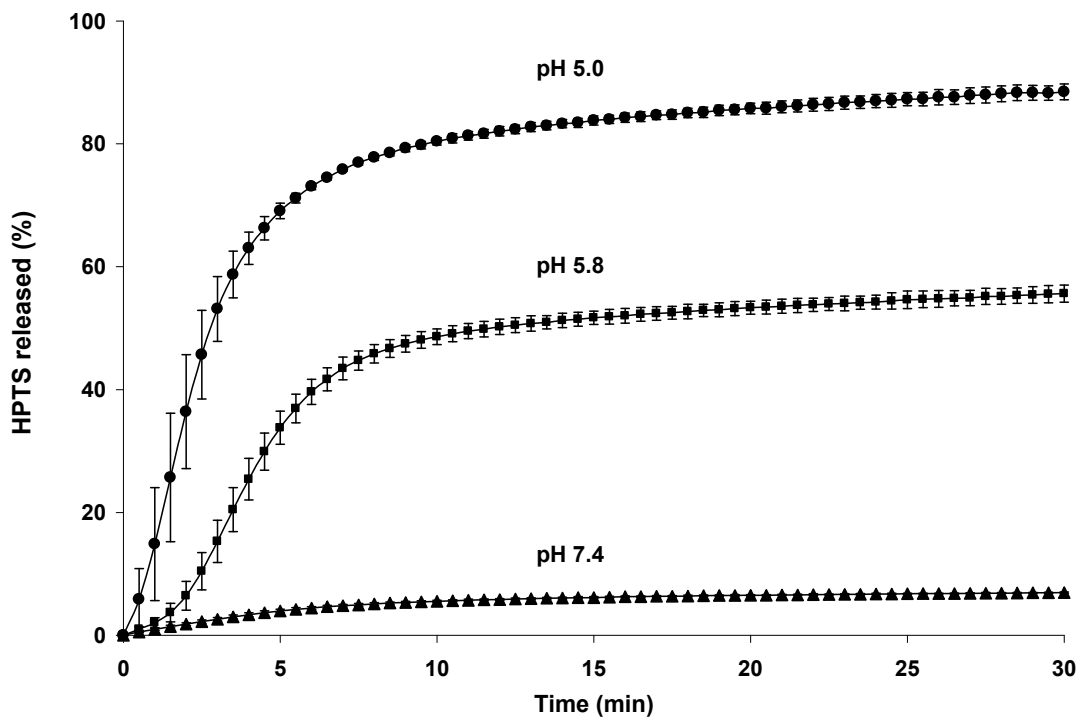


Figure 2. Release rates of encapsulated HPTS at 37°C for liposomes prepared with the pH-sensitive polymer poly(NIPAM-*co*-MAA) ($M_n = 11,000$; $M_w/M_n = 2.1$) at pH 5.0 (circles), 5.8 (squares), and 7.4 (triangles). The extent of content release was calculated from HPTS fluorescence intensity ($\lambda_{ex} = 413$ nm, $\lambda_{em} = 512$ nm) relative to measurement after vesicle disruption with 10% (v/v) Triton X-100.

3.4.2. Serum stability

3.4.2.1 Content leakage in serum.

1. To verify that the content of the liposome do not leak when the formulation is exposed to blood components, the kinetics of HPTS release in serum can be monitored for different periods of time.

2. Dilute a given quantity of liposomes in HEPES buffer with a given quantity of serum to give a final serum concentration of 50% (v/v). Incubate for a prolonged period of time (up to a few hours).
3. At given time intervals, sample 1-mL aliquots of the liposome suspension and measure fluorescence as described in Section 3.4.1. Total fluorescence of each sample can be determined by disruption of the liposome with 10 μ L of Triton X-100 solution. Serum-stable liposomes should exhibit minimal release of HPTS in serum.

3.4.2.2 Preservation of pH-sensitivity

1. To verify that the liposomes maintain their pH-sensitivity after exposure to blood proteins, the pH-sensitivity experiment can be conducted after incubation of the liposomes with serum or plasma.
2. Incubate the liposome formulation for 1 h with preheated serum under stirring at 37°C. Separate the liposomes from excess serum by SEC with a 20-mM HEPES mobile phase.
3. Conduct the pH sensitivity experiment on serum-exposed liposomes as described in Step 3.4.1.

3. SUMMARY

From the bases presented in this chapter, the imaginative scientist will find many ways to use the pH-sensitive liposomes to its advantage. Now that serum compatibility and pH-sensitivity have been established with the *in vitro* experiments presented above, the next major step is to inject the formulation *in vivo* and study their biological fate.

As protocols for *in vivo* experiments highly depend on the desired purposes of the investigator and on local animal welfare legislation and guidelines, detailed procedures for animal studies will not be presented here. However, a few helpful suggestions will be proposed to guide the design of pH-sensitive PEGylated liposomes from a preclinical *in vivo* perspective. Although these recommendations could probably be adapted to any animal model, they were mainly drawn from experiments on rodents.

The PEG corona provided by DSPE-PEG in the preparation of liposomes prolongs their circulation time, but the vesicles are still considered foreign to the body and are eventually caught up by the mononuclear phagocytosis system. Therefore, PEGylated liposomes will likely be cleared from the circulation within a few hours to a few days after injection, depending on their size, charge and composition. For the same reasons, although long-circulating liposomes may accumulate at tumour and inflammation sites when present, the vesicles will mostly distribute in the liver and spleen. The expected plasmatic circulation half-life for these liposomes is usually between 3 to 12 h, contingent on PEG chain length, the doses injected and the tracking marker deployed (7, 8).

Although tracing the content of the liposomes can be easily achieved by developing analytical methods for each type of payload, following the vesicles themselves can offer

interesting complementary information. To this end, radioactive non-exchangeable probes inserted in the phospholipid membranes, such as ^{14}C -cholesteryl oleate or ^3H -hexadecyl ether, are commonly used. The amount of radioactivity injected depends on the isotope, purpose of the experiment and design of the formulation. However, doses from 5 to 10 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ can be used to accurately depict liposome circulation profiles. Also, although these markers are known to be retained in the bilayer as long as the liposomes remain intact, it is worth mentioning that redistribution or biotransformation of the probes can occur once the vesicles are destroyed. Hence, data must be critically considered if these probes are to be monitored over time frames compatible with possible liposome disruption and metabolism.

At last, the molecular weight of the NIPAM copolymers must also be carefully chosen. Indeed, these polymers are not expected to be biodegradable because of their chemical structure. In order to avoid accumulation in the body after injection, it is of primary importance that all polymer chains be of a size shorter than the glomerular filtration *cut-off* for the polymer. In rats, this maximum value is in the range of 40,000 (15).

4. NOTES

1. Although EPC has been the most commonly used phospholipid for the preparation of poly(NIPAM-*co*-MAA)-based liposomes, other lipids can be chosen if desired. The successful utilization of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC) (5) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) (6) has been reported. Use of lipids with high transition temperature (T_m) complicates the preparation procedure, because the

formulation must be heated to reach the fluid phase during the extrusion step. When the lipid T_m is above the polymer's LCST, the two-step film hydration/extrusion procedure described in Section 3.3.1 cannot be longer performed. The fixation of the polymer in the bilayer is achieved by incubating the preformed liposomes with the polymer solution overnight (>12 h) at 4°C (5, 6, 9). However, this post-incorporation method is not as efficient for the production of pH-sensitive liposomes, because the release triggered at acidic pH is lower (6).

2. Any isotonic buffer can be selected. This buffer will form the internal compartment of the liposomes so it must be chosen according to the experiments that will be carried out. To be able to quantify the phospholipids after liposome preparation, the buffer must be phosphate-free. The buffer can contain either the dissolved drug or fluorescent marker, depending on the intended use of the liposomes.
3. This step is not essential, but rapidly confirms the success of the reaction before starting silica gel chromatography. The KMnO_4 solution reveals the cyanide groups present on A-501 and DODA-501. With these specific elution solvents, the retention factor of DODA-501 is much higher ($R_f \sim 0.80$) than that of the initial product, A-501 ($R_f \sim 0$). Thus, a fast eluting spot on the TLC sheet confirms that the reaction product is present.
4. Utilize the smallest amount of solvent possible to solubilise the products to ensure homogenous migration of the product.

5. Although leaving the film to hydrate overnight facilitates incorporation of the polymer in the bilayer and extrusion through the polycarbonate membranes, it is also possible to hydrate for only a couple of hours. Likewise, higher lipid concentrations could also be used, but this may further impede extrusion.
6. Employing an odd number of extrusions with the last set of membrane ensures that any large aggregates or contaminants will be kept off the final preparation. Assuming that all glassware is sterilised and handled according to sterile techniques, it is noteworthy that extrusion through the last membrane safeguards sterility of the formulation.
7. Theoretically, to achieve long-circulating properties and avoid extensive uptake by the liver and spleen, injected colloids should have a size between 70 and 200 nm (16). A typical diameter of 100-200 nm is obtained for the pH-sensitive PEGylated liposomes presented here. The number of times the formulation is extruded through the membrane regulates size distribution, the latter becoming more uniform as the number increases. In DLS, the polydispersity index (PdI) is calculated from the square of the normalized standard deviation ($\text{PdI} = (\sigma/Z_{\text{avg}})^2$). Acceptable PdI values will depend on the desired properties of the vesicles, but values under 0.1 can be usually attained.
8. Once again, HEPES is utilized here as the mobile phase because it is a phosphate-free buffer, but other types can be used if desired. The elution buffer will constitute the external phase of the final formulation. In cases where the liposomes are loaded with a fluorescent probe, fractions which contain the

colloids can be identified by absorbance or fluorescence. Alternatively, turbidity can also be used for non-fluorescent liposomes, assuming that the initial lipid quantities are large enough. Finally, it is essential to verify that the column used can properly separate free poly(NIPAM-co-MAA) and liposomes. Separating properties of chromatographic conditions can be established through the use of fluorescently-(9) or radiolabelled (15) copolymers.

9. Although this experiment is the simpler way to ascertain the pH-sensitivity of the liposomes, similar experiments can be conducted with encapsulated drugs. The same procedure can be used if the drug is fluorescent and self-quenched when encapsulated (e.g. doxorubicin). However, in the case of non-fluorescent compounds, the drug released must be separated from the liposome by SEC or dialysis at each time-point and then assayed by the appropriate analytical method.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support from the CIHR and the FRSQ (scholarships to NB and PS) is acknowledged.

6. REFERENCES

1. Mukherjee, S., Ghosh, R. N., and Maxfield, F. R. (1997) Endocytosis. *Physiol Rev.* **77**, 759-803.
2. Chen, G., and Hoffman, A. S. (1995) Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transitions over a wide range of pH. *Nature.* **373**, 49-52.

3. Meyer, O., Papahadjopoulos, D., and Leroux, J.-C. (1998) Copolymers of *N*-isopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes. *FEBS Letters*.**421**, 61-4.
4. Leroux, J.-C. (2004) pH-responsive carriers for enhancing the cytoplasmic delivery of macromolecular drugs. *Adv Drug Deliv Rev*.**56**, 925-6.
5. Leroux, J.-C., Roux, E., Le Garrec, D., Hong, K., and Drummond, D. C. (2001) *N*-isopropylacrylamide copolymers for the preparation of pH-sensitive liposomes and polymeric micelles. *J Control Release*.**72**, 71-84.
6. Roux, E., Francis, M., Winnik, F. M., and Leroux, J.-C. (2002) Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drugs. *Int J Pharm*.**242**, 25-36.
7. Roux, E., Passirani, C., Scheffold, S., Benoit, J.-P., and Leroux, J.-C. (2004) Serum-stable and long-circulating, PEGylated pH-sensitive liposomes. *J Control Release*.**94**, 447-51.
8. Roux, E., Stomp, R., Giasson, S., Pérolet, M., Moreau, P., and Leroux, J.-C. (2002) Steric stabilization of liposomes by pH-responsive *N*-isopropylacrylamide copolymer. *J Pharm Sci*.**91**, 1795-802.
9. Zignani, M., Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., and Leroux, J.-C. (2000) *In vitro* characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. *Biochim Biophys Acta*.**1463**, 383-94.
10. Kitano, H., Akatsuka, Y., and Ise, N. (1991) pH-responsive liposomes which contain amphiphiles prepared by using lipophilic radical initiator. *Macromol*.**24**, 42-6.
11. 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. **25**, 1876-80.
12. Bartlett, G. R. (1959) Phosphorous assay in column chromatography. *J Biol Chem*.**234**, 466-8.
13. Satish, P. R., and Surolia, A. (2002) Preparation and characterization of glycolipid-bearing multilamellar and unilamellar liposomes, *in* "Liposomes: Methods and

- Protocols" (Basu, S. C., and Basu, M., Eds.), Vol. 199, pp. 193-202, Humana Press, Totowa, NJ.
14. Zuidam, N. J., de Vruet, R., and Crommelin, D. J. (2003) Chapter 2: Characterization of liposomes, *in* "Liposomes: A Practical Approach" (Torchilin, V. P., and Weissig, V., Eds.), pp. 31-78, Oxford University Press, Oxford.
 15. Bertrand, N., Fleischer, J. G., Wasan, K. M., and Leroux, J.-C. (2009) Pharmacokinetics and biodistribution of *N*-isopropylacrylamide copolymers for the design of pH-sensitive liposomes. DOI:10.1016/j.biomaterials.2008.12.082 (*in press*)
 16. Stolnik, S., Illum, L., and Davis, S. S. (1995) Long circulating microparticulate drug carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* **16**, 194-214.