

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

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

NOTICE

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

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

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

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

Université de Montréal

**Micelles polymères unimoléculaires ou inverses pour
l'administration orale d'agents thérapeutiques**

par

Marie-Christine Jones

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en Sciences Pharmaceutiques
option Technologie Pharmaceutique

Novembre, 2007

© Marie-Christine Jones, 2007

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Micelles polymères unimoléculaires ou inverses pour l'administration orale d'agents
thérapeutiques

présentée par :

Marie-Christine Jones

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Louis Cartilier, président-rapporteur

Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche

Maxime Ranger, co-directeur

Alain Desjardins, membre du jury

Jérôme Claverie, examinateur externe

Louis Cartilier représentant du doyen de la FES



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Micelles polymères unimoléculaires ou inverses pour l'administration orale d'agents
thérapeutiques

présentée par :

Marie-Christine Jones

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Louis Cartilier, président-rapporteur
Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche
Maxime Ranger, co-directeur
Alain Desjardins, membre du jury
Jérôme Claverie, examinateur externe
Julian Zhu, représentant du doyen de la FES

Résumé

De nombreux facteurs peuvent affecter la biodisponibilité d'un agent thérapeutique administré par voie orale. Ce peut être, par exemple, une vitesse de dissolution insuffisante dans le cas d'une molécule hydrophobe ou la sensibilité à la dégradation enzymatique lorsqu'il s'agit d'un peptide. Dans les deux cas, l'encapsulation de principes actifs (PAs) à l'intérieur de vecteurs a permis de contourner les barrières limitant leur absorption intestinale. Dans la présente thèse, l'emploi de transporteurs micellaires obtenus à partir de polymères étoilés a été proposé pour l'administration orale d'agents thérapeutiques. Dans un premier temps, les travaux ont été consacrés au développement de micelles unimoléculaires sensibles au pH, pour l'administration de PAs peu solubles dans l'eau. Pour ce faire, un protocole de synthèse par polymérisation radicalaire par transfert d'atomes a été élaboré de façon à obtenir des polymères possédant une structure cœur hydrophobe-couronne hydrophile. Le cœur micellaire était composé d'un copolymère de méthacrylate d'éthyle et d'acide méthacrylique alors que l'enveloppe était constituée d'un dérivé de poly(éthylène glycol). Il a été démontré que ces polymères existaient sous forme unimoléculaire en solution. Néanmoins, il leur était possible de former des agrégats supramoléculaires lorsque la densité de la couronne était insuffisante pour masquer le cœur hydrophobe. La sensibilité au pH a, quant à elle, été confirmée, lors d'essais de libération *in vitro* où l'alcalinisation du milieu a permis d'accroître la vitesse de libération.

Dans un second temps, le projet s'est concentré sur la mise au point de formulations pour l'administration orale de peptides. Le système proposé repose sur la solubilisation d'un peptide dans un véhicule huileux, en présence de micelles polymères inverses (MIs). Ces micelles, solubles en milieu organique, non polaire, ont été obtenues suite à l'association de polyols alkylés (C12; C14; C18) dans l'oléate d'éthyle. Elles ont permis d'augmenter significativement l'affinité de macromolécules peptidiques pour la phase huileuse. Cet effet s'est avéré dépendant de la nature du peptide, mais aussi de la composition chimique du polymère employé. Les meilleurs résultats ont été obtenus lors de

l'encapsulation de la vasopressine à l'aide de MIs composées du dérivé C18. Cette formulation, administrée par voie orale chez le rat, a permis de prolonger l'effet antidiurétique de la vasopressine, bien que ceci ne se soit pas traduit par une élévation mesurable des taux sanguins. D'autre part, cette même formulation injectée par voie sous-cutanée a retardé significativement la diurèse et permis une libération lente du peptide encapsulé. Les MIs s'avèrent des vecteurs polyvalents pouvant être utilisés autant pour la voie orale que pour la voie parentérale.

Mots-clés : micelles polymères, micelles inverses, micelles unimoléculaires, voie orale, peptide, vasopressine, polymérisation radicalaire par transfert d'atomes, sensibilité au pH

Abstract

A large number of variables may influence the oral bioavailability of a therapeutic agent. For example, a low dissolution rate may affect the bioavailability of a hydrophobic drug, while a high susceptibility to enzymatic degradation may limit the absorption of peptides. In both instances, these limitations can be addressed by the encapsulation of the drug in a synthetic vector. In the present work, micelles obtained from star-shaped polymers have been proposed for the oral administration of therapeutic agents. First, pH-sensitive unimolecular polymeric micelles were developed for the administration of hydrophobic drugs. To that end, amphiphilic polymers with an inherent core-shell structure were synthesized by atom transfer radical polymerization. The hydrophobic core consisted in a copolymer of ethyl methacrylate and methacrylic acid, while the corona was formed by a poly(ethylene glycol) derivative. These polymers were shown to remain as unimolecular entities in solution, although supramolecular aggregates could be observed when the core was not efficiently shielded by the shell. pH-sensitivity was confirmed through *in vitro* release studies, where an increase in the pH yielded faster release rates.

Secondly, the objective of the projet was to optimize a formulation for the oral administration of peptides. The system proposed was based on the solubilisation of a peptide in oil, in the presence of reverse polymeric micelles (RMs). RMs were obtained following the self-association of alkylated star-shaped polyols (C12; C14; C18) in ethyl oleate. These self-assemblies were able to significantly increase the affinity of various peptides/proteins for an oil phase. This effect depended on the nature of the peptide and the micelle composition. The best results were achieved using the C18 derivative. Following oral administration to rats, the latter formulation delayed urinary output, though this could not be correlated with increased blood levels. The C18-RM formulation was also injected subcutaneously to rats where it displayed a prolonged antidiuretic effect and allowed for the sustained release of the loaded peptide. RMs were found to be versatile carriers which could be applied to both the oral and parenteral administration of peptides.

Keywords : polymeric micelles, reverse micelles, unimolecular micelles, peptide, vasopressin, atom transfer radical polymerization, pH-sensistivity

Table des matières

1. Table des matières.....	vii
2. Liste des tableaux.....	xiv
3. Liste des figures et schémas.....	xv
4. Liste de schémas.....	xxi
5. Liste des sigles et abréviations.....	xxii
6. Remerciements.....	xxvii
7. Chapitre 1: Introduction.....	1
7.1. Partie I- Physiologie gastro-intestinale.....	1
7.1.1. Cavité orale.....	2
7.1.2. Œsophage.....	3
7.1.3. Estomac.....	4
7.1.4. Intestin grêle.....	4
7.1.5. Tissu lymphoïde intestinal.....	6
7.1.6. Glandes annexes.....	7
7.1.7. Digestion et absorption intestinales.....	8
7.1.8. Gros intestin.....	9
7.2. Partie II- Administration orale d'agents thérapeutiques.....	10
7.2.1. Biodisponibilité orale.....	10
7.2.2. Barrières physiologiques à l'absorption.....	11
7.2.3. Mucus.....	11
7.2.4. Membrane cellulaire et jonctions serrées.....	12
7.2.4.1. Transport transcellulaire.....	12
7.2.4.2. Transport paracellulaire.....	14
7.2.4.3. Modulation de la perméabilité membranaire.....	14
7.2.5. Barrière biochimique.....	15
7.2.6. CYP et métabolisme de phase I.....	16
7.2.7. Protéines d'efflux et Pgp.....	17
7.2.7.1. Synergie entre l'activité intestinale du CYP3A4 et de la Pgp.....	18
7.2.8. Paramètres liés aux patients.....	19
7.2.9. Paramètres liés au PA.....	20

7.2.10.	Solubilité aqueuse	20
7.2.11.	Perméabilité membranaire	21
7.2.12.	Prédiction de la solubilité aqueuse et de la perméabilité	22
7.2.12.1.	Étude de la solubilité aqueuse	22
7.2.12.2.	Coefficient de partage et perméabilité	23
7.2.12.3.	Étude de la perméabilité	24
7.2.13.	Classification biopharmaceutique	25
7.3.	Partie III- Formulation d'agents thérapeutiques pour la voie orale.	27
7.3.1.	Interaction des vecteurs avec la membrane intestinale	28
7.3.2.	Absorption intestinale de vecteurs	28
7.3.2.1.	Ciblage actif de l'épithélium intestinal	31
7.3.2.1.1.	a. Vitamine B ₁₂	31
7.3.2.1.2.	b. Lectines	32
7.3.3.	Mucoadhésion	33
7.3.4.	Vecteurs et administration orale	36
7.3.5.	Vecteurs lipidiques	36
7.3.5.1.	Systèmes émulsifiés	36
7.3.5.1.1.	a. Choix de la phase lipidique	37
7.3.5.1.2.	b. Émulsions auto-formantes	37
7.3.5.1.3.	c. Nanoparticules lipidiques solides	39
7.3.5.1.4.	d. Émulsions solides	41
7.3.6.	Liposomes	41
7.3.6.1.	Cochléates	43
7.3.7.	Vecteurs polymères	44
7.3.8.	Conjugués macromoléculaires	44
7.3.9.	Micro- et nanoparticules de polymère	45
7.3.9.1.	Administration de PAs hydrophobes	45
7.3.9.2.	Administration orale de macromolécules hydrophiles	46
7.3.9.2.1.	a. Peptides	46
7.3.9.2.2.	b. Héparine	46
7.3.9.3.	Vaccination orale	47
7.3.10.	Micelles polymères	47
7.3.10.1.	Micelles et administration orale	48

7.3.10.1.1.	a. Solubilisation micellaire.....	49
7.3.10.1.2.	b. Absorption intestinale et inhibition de la Pgp.....	50
7.3.10.1.3.	c. Études chez l'animal	52
7.3.10.1.4.	d. Transport de molécules hydrophiles	53
7.3.10.2.	Micelles unimoléculaires (MUs).....	54
7.3.10.3.	Micelles polymères inverses	54
7.4.	Conclusion	54
7.5.	Références	55
8.	Bioactive compound carriers based on micelle-forming polymers.....	72
8.1.	Abstract	72
8.2.	Introduction	73
8.3.	Micellization	75
8.4.	Critical aggregation concentration.....	76
8.5.	Thermodynamics of micellization.....	77
8.6.	Micelle dimensions	78
8.7.	Drug loading in polymeric micelles.....	81
8.8.	Drug release from micelle formulation.....	84
8.9.	<i>In vivo</i> efficacy.....	85
8.10.	Micelle stability.....	86
8.11.	Unimolecular polymeric micelles	88
8.12.	Unimolecular polymeric micelle synthesis	88
8.12.1.	Unimolecular polymeric micelle characterization	89
8.12.2.	Size measurements.....	89
8.12.3.	Solvent sensitive behaviour of unimolecular polymeric micelles.....	89
8.12.4.	Solubilization studies	90
8.12.5.	Drug loading	91
8.12.6.	Drug release	91
8.12.7.	Inverse unimolecular polymeric micelles	92
8.13.	Conclusion	93
8.14.	Acknowledgements.....	94
8.15.	References	95
9.	Objectifs et présentation des articles.....	105
9.1.	Objectif général.....	105

9.1.1.	Objectifs spécifiques.....	105
9.2.	Présentation des articles.....	106
10.	pH-Sensitive unimolecular polymeric micelles: synthesis of a novel drug carrier.....	107
10.1.	Abstract.....	107
10.2.	Introduction.....	108
10.3.	Experimental procedures.....	110
10.3.1.	Materials.....	110
10.3.2.	Synthesis of ATRP initiator: tetra(2-bromoisobutyryl) <i>pentaerythritolate</i> 110	
10.3.3.	Synthesis of star-P(EMA- <i>co</i> -tBMA)- <i>b</i> -P(PEGMA).....	111
10.3.4.	Preparation of star-P(EMA- <i>co</i> -MAA)- <i>b</i> -P(PEGMA).....	112
10.3.5.	MW determination by size exclusion chromatography.....	112
10.3.6.	Multi-angle static light scattering experiments (MALLS).....	113
10.3.7.	Size analysis by dynamic light scattering (DLS).....	113
10.3.8.	Potentiometric titrations.....	113
10.3.9.	Fluorescence studies.....	114
10.3.10.	<i>In vitro</i> drug release studies.....	114
10.4.	Results and discussion.....	115
10.4.1.	<i>Star-P(EMA-co-tBMA)-b-P(PEGMA)</i>	115
10.4.2.	Polymer characterization.....	115
10.4.3.	MALLS.....	116
10.4.4.	¹ H NMR spectroscopy analysis.....	118
10.4.5.	Size measurements.....	119
10.4.6.	<i>Star-P(EMA-co-MAA)-b-(PEGMA)</i>	120
10.4.7.	¹ H NMR spectroscopy analysis.....	121
10.4.8.	Potentiometric titrations.....	122
10.4.9.	Size measurements.....	124
10.4.10.	Fluorescence studies.....	125
10.4.11.	<i>In vitro</i> drug release.....	127
10.5.	Acknowledgements.....	130
10.6.	References.....	130
11.	Self-assembled nanocages for hydrophilic guest molecules.....	134
11.1.	Abstract:.....	134

12. Introduction.....	135
12.1. Experimental section.....	137
12.1.1. Materials.....	137
12.1.2. Methods.....	137
12.1.3. Synthesis of star-shaped poly(glycidyl methacrylate) (PGMA).....	137
12.1.4. Synthesis of star-shaped poly(glycerol methacrylate) (PG _{OH} MA).....	138
12.1.5. Synthesis of hydrophobically modified star-shaped. (PG _{OH} MA-CX).....	138
12.1.6. Determination of the degree of alkylation.....	139
12.1.7. Particle size analysis.....	139
12.1.8. AFM imaging.....	140
12.1.9. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) analysis....	140
12.1.10. Determination of the partition coefficient of vasopressin between ethyl oleate and water.....	140
12.1.11. Extraction of myoglobin and albumin.....	141
12.1.12. Analysis of extraction data.....	141
12.2. Results and discussion.....	142
12.2.1. Polymer synthesis.....	142
12.2.2. Reverse micelle characterization.....	145
12.2.3. Protein partition between ethyl oleate and water.....	146
12.2.4. Extraction of vasopressin.....	146
12.2.5. Extraction of myoglobin and albumin.....	151
12.3. Conclusion.....	153
12.4. Acknowledgments.....	153
12.5. References.....	154
12.6. Supporting Information.....	158
12.7. Supporting Information.....	158
13. Efficacy assessment of [Arg ⁸]-vasopressin formulated in reverse polymeric micelles	161
13.1. Abstract.....	161
13.2. Introduction.....	161
13.3. Experimental Methods.....	163
13.3.1. Materials.....	163
13.3.2. <i>In vitro</i> release kinetics of vasopressin from RMs in ethyl oleate.....	163

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Physiologie des organes du TGI. Adapté de (<i>Daugherty, 1999a</i>)	3
Tableau 1.2. Agents perméabilisants (<i>Aungst, 2000</i>).....	15
Tableau 1.3. Exemples de substrats communs au CYP3A4 et à la Pgp.....	18
Tableau 1.4. Niveaux de solubilité (<i>Washington, 2001</i>)	21
Tableau 1.5. Règle des « 5 ».	22
Tableau 1.6. Classification biopharmaceutique des agents thérapeutiques	25
Tableau 1.7. Caractéristiques des différentes émulsions colloïdales auto-formantes. (<i>Brusewitz, 2007; Pouton, 2000</i>)	38
Tableau 1.8. Formulations commerciales à base d'émulsions auto-formantes.....	39
Tableau 1.9. Description de formulations orales à base de MPs.	49
Table 2.1. Amphiphilic copolymers used in the preparation of PM ^a	75
Table 2.2. Methods used in the physical entrapment of hydrophobic drugs in PM.....	82
Table 3.1. Characteristics of the star-shaped polymers.....	118
Table 3.2. Size determination of pH-sensitive UPM (10 mg/mL) by DLS	125
Table 4.1. Characterization of Alkylated PG _{OH} Mas	143
Table 4.2. Maximum protein loading in RPMs	150
Table 5.1. Characterization of amphiphilic star-shaped polymers and reverse micelles...	167
Tableau 6.1. Caractérisation des polymères étoilés amphiphiles.....	179
Tableau 6.2. Détermination de la taille des MUs par DDL.	182
Tableau 6.3. Propriétés des MAPG _{OH} alkylés.....	185

Liste des figures

- Figure 1.1. Représentation schématique de la paroi des différents organes du tube digestif 1
- Figure 1.2. Histologie de la muqueuse du jéjunum. Illustration des valvules conniventes (A), des villosités (B) et des microvillosités qui sont illustrées avec le glycocalyx (C). Reproduit de (*Welsch, 2003*) avec permission de Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München..... 6
- Figure 1.3. Région d'une plaque de Peyer provenant de l'iléon. Les flèches indiquent les lymphocytes intra-épithéliaux retrouvés au niveau de l'épithélium entre les cellules M. Reproduit de (*Welsch, 2003*) avec permission de Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München..... 7
- Figure 1.4. Illustration des mécanismes d'absorption de xénobiotiques dans l'intestin grêle. (A) diffusion passive; (B) transport actif; (C) diffusion facilitée; (D) Endocytose médiée par un récepteur; (E) transport paracellulaire; (F) pinocytose..... 12
- Figure 1.5. Représentation schématique de l'interaction entre la Pgp et le CYP3A4 au niveau de l'entérocyte. Suite à son absorption (1), le PA peut être externalisé intact du côté basolatéral (2) ou être métabolisé au niveau du CYP (3). En contre-partie, il peut se lier à la Pgp (4) et être expulsé du côté apical, d'où il peut être ré-absorbé (5). 19
- Figure 1.6. Image d'une monocouche de Caco-2 en microscopie électronique (A) et grossissement de la membrane apicale (B) où peuvent être distinguées les microvillosités [M] et les jonctions serrées [TJ]. Reproduit de (*De Boer, 1994*) avec permission de Harwood Academic Publishers..... 25
- Figure 1.7. Analyse histologique des tissus intestinaux de nature lymphoïde (Plaques de Peyer (PP)) ou non (NP) exposés à des particules de PLGA de taille variable. Les tissus proviennent d'intestins de rats. (S) = séreuse; (M)= muqueuse; (V) = villosités. Reproduit (*Desai, 1996*) avec permission de Springer. 30
- Figure 1.8. Absorption de particules de PLGA nues (F-NP) ou ciblées à l'aide de WGA (WGA-F-NPs). Reproduit de (*Yin, 2007*) avec permission de Elsevier Ltd..... 33
- Figure 1.9. Structure chimique des agents muco-adhésifs de 1^{ère} génération..... 35

- Figure 1.10. Image de cochléates obtenue par microscopie électronique. Reproduit de (Zarif, 2002) avec permission de Elsevier Ltd. 44
- Figure 1.11. Illustration des mécanismes impliqués dans l'évitement du transport d'efflux par les MPs composées de PEG-*b*-PCL. (A) Endocytose de la micelle; (B) Action perméabilisante des unimères insérés au niveau de la membrane; (C) Inhibition de l'activité ATPase de la Pgp par les unimères enchassés dans la membrane. Reproduit avec permission (Zastre, 2002). 52
- Figure 2.1. Schematic representation of PM obtained from amphiphilic copolymers. 74
- Figure 2.2. (A) Fluorescence emission spectra of pyrene as a function of PBLA-*b*-PEO-*b*-PBLA concentration in water λ_{exc} 339.0 nm. (B) Fluorescence excitation spectra of pyrene as a function of PBLA-*b*-PEO-*b*-PBLA concentration in water λ_{em} 390.0 nm. Reprinted from reference (25) with permission from Wiley-Liss Inc. 77
- Figure 2.3. TEM photographs of poly(asparagine)-*g*-PCL (45 wt% PCL content) with negative staining (phosphotungstic acid 0.1%) magnified 230K. Reprinted from reference (18) with permission from Elsevier. 81
- Figure 2.4. Plot of the apparent partition coefficient (left) and drug loading (right) as a function of the initial amount of dihydrotestosterone added during PEO-*b*-PCL PM preparation. Reprinted from reference (8) with permission from Elsevier. 84
- Figure 2.5. *In vitro* release study of progesterone encapsulated in star-shaped UPM (star (ethylmethacrylate-*co*-methacrylic acid)-*b*-PEO methacrylate (M_n 20,000; 5 wt% progesterone) as a function of pH. UPM formulations were dialyzed against simulated gastric fluid pH 1.2 for 2 hours, at which point the pH was adjusted to pH 7 (open circles). Release of free (closed squares) and UPM loaded progesterone (closed triangles) at pH 1.2 were used as controls. The arrow indicates the time point at which pH was adjusted. 92
- Figure 3.1. Theoretical drug release from a pH-sensitive UPM. It is expected that the ionization of the carboxylic functions within the micellar core will provoke an increase

in polarity which in turn will aid the release of the hydrophobic drug solubilized in the core..... 109

Figure 3.2. Study of the influence of solvent polarity on UPM conformation. ¹H-NMR spectra (300 MHz) of UPM S_E18T17P442 in CDCl₃ (A) and D₂O (B). Signals 1 to 5 can be attributed to hydrophobic EMA and tBMA monomers while signals 6 and 7 are those of hydrophilic PEGMA. The signals for both the core and the shell were visible in apolar chloroform while only the signals of PEGMA can be seen in water..... 120

Figure 3.3. Study of the influence of pH on hydrolyzed UPM conformation. ¹H-NMR spectrum (300 MHz) of S_E18M17P442 in D₂O at pH 2 (A) and pH 12 (B). Polymers were dissolved in D₂O and the pH was adjusted using small amounts of NaOH or HCl 0.01 N. The signal of EMA (0.9 ppm, as indicated by the arrow) was used as a reporter signal for the hydrophobic core..... 122

Figure 3.4. Plot of the pH as a function of the degree of ionization for S_E18M17P442 (closed circles) and S_E24T23P229 (open squares). The degree of ionization (α) was calculated as $\alpha = C_b / C_{MAA}$. Solutions of the polymers were prepared in water (1 mg/mL) and titrated using NaOH 0.05N. Results are a average of three measurements. 123

Figure 3.5. Plot of the apparent pK_a as a function of the degree of ionization (α) for S_E18M17P442 (closed circles) and S_E24T23P229 (open squares). pK_a values were obtained from $pK_a = pH + \log \frac{1-\alpha}{\alpha}$. Results are presented as the average of three experiments \pm SEM (when not visible SEM error bars are smaller than symbol)..... 124

Figure 3.6. Fluorescence study of the effect of pH on the local environment inside UPM core. Excitation spectrum of pyrene (2x10⁻⁷M) were obtained in water (closed triangles) and in the presence of S_E24M23P229 (2 mg/mL) at pH 3 (closed circles) and pH 11 (closed squares). $\lambda_{em} = 393$ nm. 126

Figure 3.7. Chemical structure of progesterone..... 127

Figure 3.8. (A) *In vitro* release profiles of free (closed triangles) and S_{E24}M₂₃P₂₉-entrapped (5% w/w) (open triangles) progesterone against in simulated gastric fluid pH 1.2 (HCl 0,06 M/NaCl 0.021 M). (B) Release profiles of S_{E24}M₂₃P₂₉-entrapped progesterone (5% w/w). UPM formulations were dialyzed against simulated gastric fluid pH 1.2 for 2 h at which point the pH was adjusted to either to pH 11 (open squares) or to pH 7 (closed circles) using, respectively, NaOH (0.25% w/v) or NaOH (0.25% w/v)/NaH₂PO₄ (0.12% w/v), respectively. Results are presented as the average of 3 independent experiments ± SEM (when not visible SEM error bars are smaller than symbol)..... 129

Figure 4.1. ¹H-NMR spectrum of PG_{OH}MA-C14 in CDCl₃. 144

Figure 4.2. Study of the morphology of reverse PG_{OH}MA-C18 micelles. The morphology of PG_{OH}MA-C18 was studied by (a) AFM in THF and (b) cryo-TEM in ethyl oleate. The inset shows a magnified RPM..... 146

Figure 4.3. The partition of vasopressin between ethyl oleate and water was studied in the presence of RPMs of (a) PG_{OH}MA-C12, (b) PG_{OH}MA-C14, and (c) PG_{OH}MA-C18. The results for the % of vasopressin retained (closed symbols) are presented as the mean ± SEM of at least three independent experiments. The partition coefficient (K_{app}; open symbols) was estimated using Eq. 3. The initial loadings are expressed in wt% of polymer (2.5 or 5 mg). 148

Figure 4.4. Fitting of the partition data according to the Langmuir isotherm for PG_{OH}MA-C12 (closed circles), PG_{OH}MA-C14 (open triangles) and PG_{OH}MA-C18 (closed diamonds)..... 149

Figure S 1. The morphology of PG_{OH}MA was studied by AFM in water . A higher molecular weight (Mn 150,000) was purposely selected here to achieve optimal resolution. The AFM study shows the 4-arm structure of the polymer. 158

Figure S 2. The partition of myoglobin between ethyl oleate and water was studied in the presence of reverse micelles of (a) PG_{OH}MA-C12, (b) PG_{OH}MA-C14, and (c)

- PG_{OH}MA-C18. The results for the % of myoglobin retained (closed symbols) are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. The partition coefficient (K_{app} ; open symbols) was estimated using Eq. 3. The initial loadings are expressed in wt% of polymer..... 159
- Figure S 3. The partition of albumin between ethyl oleate and water was studied in the presence of reverse micelles of PG_{OH}MA-C18. The results for the % of albumin retained (closed symbols) are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. The partition coefficient (K_{app} ; open symbols) was estimated using Eq. 3. The initial loadings are expressed in wt% of polymer..... 160
- Figure 5.1. Release kinetics of vasopressin from RMs prior to (A) or following (B) emulsification. The inset show the release of vasopressine between 0 and 2 h. Results are presented as mean \pm SD (n \geq 3). 169
- Figure 5.2. Biological activity of vasopressin following oral administration. The antidiuretic effect is expressed as the time required for the excretion of 30, 50 and 60% of the total water load administered. Vasopressin (30 μ g/kg) was administered 30 min before the first water dose. Results are presented as mean \pm SD (n \geq 6). * p-value \leq 0.05..... 170
- Figure 5.3. Plasma concentrations following oral administration of vasopressin (30 μ g/kg) formulated in RMs (closed circles) or as an aqueous solution (open squares). Results are presented as mean \pm SD (n \geq 5). 171
- Figure 5.4. Biological activity of vasopressin following subcutaneous injection. The antidiuretic effect was evaluated over 12 h on (A) day 1 and (B) day 2 following drug administration. Vasopressin (30 μ g/kg) was injected once 30 min before the first water dose. Results are presented as mean \pm SD (n \geq 6). 172
- Figure 5.5. Plasma concentrations following subcutaneous administration of vasopressin (30 μ g/kg) formulated in RMs (closed circles) or as an aqueous solution (open squares). Results are presented as mean \pm SD (n \geq 5). 173

Figure 6.1. Extraction du rouge de Congo en présence de micelles inverses de $\text{PMAG}_{\text{OH}}\text{-C16}_{25\%}$. La concentration initiale du rouge de Congo dans la phase aqueuse est de (A) 26 (B) 51 et (C) 108 $\mu\text{g/mL}$ 187

Liste de schémas

- Scheme 3.1. Synthesis of ATRP multifunctional initiator tetra(2-bromoisobutyryl) pentaerythritolate (**2**). Pentaerythritol (**1**) (25 mmol) is esterified by 2-bromoisobutyrylbromide (200 mmol) in the presence of triethylamine (150 mmol) in THF at room temperature..... 116
- Scheme 3.2. Synthesis of pH-sensitive star-shaped amphiphilic polymers by ATRP. The initiator (**2**) is first reacted with hydrophobic EMA and tBMA to yield the micellar core star-P(EMA-*co*-tBMA) (**3**). The hydrophilic shell is formed by the polymerization of PEGMA which is added to the reaction pot to obtain the star-shaped amphiphilic polymer (**4**). Hydrolysis of tBMA units of compound 4 yields the pH-sensitive UPM (**5**). 117
- Scheme 4.1. Synthesis of alkylated star-shaped PG_{OH}MA. A: pentaerythritol (**1**) was esterified with 2-bromoisobutyrylbromide in the presence of triethylamine in THF at room temperature. B: the ATRP initiator (**2**) was reacted with glycidyl methacrylate (GMA) in THF in the presence of Cu(I)Br/1,2-bipyridyl. C: PGMA (**3**) was hydrolyzed in a mixture of NMP/H₂O (5:1) to yield star-shaped PG_{OH}MA. D: PG_{OH}MA (**4**) was partially esterified using alkanoyl chlorides in pyridine in the presence of 1-methylimidazole at 140°C..... 142

Liste des sigles et abréviations

- % p/p** : pourcentage poids/poids
- AFM** : atomic force microscopy
- AMA** : acide méthacrylique
- ASC** : aire sous la courbe
- ATRP** : atom transfer radical polymerization
- AUC** : area under the curve
- C12** : lauric
- C14** : myristic
- C18** : stearic
- CAC**: critical aggregation concentration
- Caco-2** : cellules humaines d'adénocarcinome du colon
- CES** : chromatographie d'exclusion stérique
- CMC** : concentration micellaire critique
- CMT** : critical micellization temperature
- Cryo-TEM** : cryogenic transmission electron microscopy
- CsA** : cyclosporine A
- CYP** : cytochrome P450
- DA** : degree of alkylation
- DCM** : dichlorométhane
- DEX** : dextran
- DG** : diglycérides
- D_H**: hydrodynamic diameter
- DL** : drug loading
- DL**: diffusion de la lumière en mode statique
- DDL** : diffusion de la lumière en mode dynamique
- DLS** : dynamic light scattering
- DMF** : *N,N*-diméthylformamide

DMSO : dimethyl sulfoxide
DMSO- d_6 : deuterated dimethyl sulfoxide
DSPE : distéroylphosphatidyléthanolamine
DOX: doxorubicin
DP : degree of polymerization
EDTA : ethylene diamine tetra acetic acid
EMA : ethyl metacrylate
EO : ethyl oleate
EPP : effet de premier passage
Equiv : équivalent
FI : facteur intrinsèque
FITC : fluorescein-isothiocyanate
GCSF : facteur de croissance des granulocytes
GHP : hydrophilic propylene
H/E : émulsion d'huile dans l'eau
HIV : human immunodeficiency virus
HPC : hydroxypropylcellulose
LALLS : low angle laser light scattering
Log P_{oct} : coefficient de partage octanol-eau
LT : lectine de tomate
MAA : methacrylic acid
MAE : méthacrylate d'éthyle
MALLS : multiangle static light scattering
MAtB: méthacrylate de *tert*-butyle
MeOD : deuterated methanol
MI: micelle inverse
 M_n : number average
 M_p : masse moyenne en poids
MRP : Protéines associées à la résistance pléïotrope
MU : micelle unimoléculaire

MW : molecular weight
M_w : weight average molecular weight
N_{agg}: aggregation number
NLS : nanoparticules lipidiques solides
NMP : 1-methyl-2-pyrrolidinone
NMR : nuclear magnetic resonance
NP : nanoparticule
PA : principe actif
P(Asp) : Poly(aspartic acid)
PAA : poly(acide acrylique)
P(AnB-*co*-AMA) : poly(acrylate de *n*butyle-*co*-acide méthacrylique)
PBLA: poly(γ -benzyl L-aspartamide)
PBLG: poly(γ -benzyl L-glutamate)
PBS: phosphate-buffered saline
PCL: poly(caprolactone)
P(CL-*co*-TMC) : poly(caprolactone-*co*-carbonate de triméthylène)
PDENA : poly(2-(4-vinylbenzyloxy)-N,N-diéthylnicotinamide)
PDLLA: poly(D,L-lactide)
PE: phosphatidylethanolamine
PEG : poly(ethylene glycol)
PEG-C16 : éther cétylique de PEG.
PEI⁺: Poly(éthylène imine) quaternisée
PEO: poly(ethylene oxide)
PEGMA : poly(ethylene glycol) methacrylate
PGMA : poly(glycidyl methacrylate)
P_{OH}MA : poly(clycerol methacrylate)
P_{OH}MA-CX : hydrophobically modified star-shaped poly(glycerol methacrylate)
PHPMA: poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide)
PLA : poly(acide lactique)
Pgp : glycoprotéine P

PI : polydispersity index
PK : pharmacokinetic
PLGA : poly(acide lactique-*co*-acide glycolique)
PM : polymeric micelles
PMDETA : *N,N,N',N',N'*-pentamethyldiethylenetriamine
PMAG_{OH} : poly(méthacrylate de glycérol)
PMAG_{OH}-CX_Y : poly(méthacrylate de glycérol) alkylé
PP : plaques de Peyer
PPO : poly(propylene oxide)
PS : poly(styrène)
PVP : poly(*N*-vinylpyrrolidone)
RMN-¹H : résonance magnétique du proton
RPM : reverse polymeric micelles
rpm : rotation per minute
RM : reverse micelles M : mol.L⁻¹
SD : standard deviation
SEC: size exclusion chromatography
SEM : standard error of the mean
tBMA : *tert*-butyl methacrylate
TG : triglycérides
TGI : tractus gastro-intestinal
THF : tetrahydrofuran
TPGS: succinate de D- α -tocopheryl-PEG
UEA : agglutinine *Ulex europaeus*
UPM : unimolecular polymeric micelles
VIH : virus de l'immunodéficiencce humaine
w/w : weight by weight
WGA : lectine de germe de blé

*À mon père qui fût Dr Jones longtemps avant
moi et à ma famille*

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers mon directeur de recherche, le Prof. Jean-Christophe Leroux. Tout d'abord pour avoir vu en moi des aptitudes en recherche alors que je terminais à peine ma 2^e année de pharmacie. Ensuite pour sa passion pour la recherche, son désir constant d'innover et de se dépasser, qualités qu'on ne peut qu'admirer. Il demeure un modèle de probité intellectuelle et d'efficacité. Au cours de mes années de doctorat, j'ai bénéficié d'un encadrement exceptionnel qui m'a néanmoins permis de développer une grande autonomie. Pour toutes ces raisons, je garderai toujours un excellent souvenir de mes années au laboratoire.

Je voudrais également remercier Maxime Ranger, mon co-directeur pour toute l'aide apportée dès mon arrivée dans le laboratoire et tout au long de mes travaux de doctorat. Je remercie les membres de mon jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour leurs commentaires constructifs. Surtout, j'aimerais souligner la diligence dont ils ont fait preuve, malgré les délais imposés.

Merci à tous mes collègues de travail passés et présents pour toutes les discussions et échanges. J'ai beaucoup appris grâce à vous et votre présence a fait du laboratoire un endroit où il était très agréable de travailler. Un merci spécial à Jeanne Chain pour avoir pris le temps de lire et corriger cette thèse et à Hui Gao pour son aide dans la synthèse des polymères. J'aimerais aussi souligner l'aide inestimable que m'ont apporté François Plourde et de Céline Bouvet. Un gros merci au djipitou, aux irréductibles du 5@7 et du Ricard, à tous les membres du CECSP, aux joueurs de cartes du midi d'avoir meubler mes temps libres entre deux expériences!

Mes plus sincères remerciements à Emmanuelle, Dorothee et Claire. Vous faites partie de la première génération de la « secte Leroux ». Je garde un excellent souvenir des années passées en votre compagnie.

Je tiens à exprimer une reconnaissance toute particulière à Marie-Hélène Dufresne, Marie-Andrée Yessine, Pierre Simard et Geneviève Gaucher qui m'ont accompagné tout au long de ces années. Marie-Hélène ton intelligence et ta vivacité m'ont inspirés à me surpasser. Je te remercie de ton aide, de ton soutien et de ton amitié. Marie-Andrée, ta passion pour la recherche est contagieuse. J'apprécie beaucoup ta spontanéité et je me rappellerai longtemps de nos après-midi passés aux TPs de galénique. Pierre, je tiens à te remercier de ta présence, de ton écoute et de ta grande générosité. « Pour sûr » je me souviendrais toujours de nos grandes discussions scientifiques. Après tout, j'ai été « micelle » toute ma vie, mais grâce à toi je suis devenue un peu « liposome ». Geneviève, je te remercie de ton aide surtout dans les derniers moments.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma famille. Adline, Konrad et Serge, sans votre support, cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Merci de votre patience, de votre compréhension et de vos encouragements. Merci d'avoir toujours été là.

Chapitre 1. Introduction

Partie I- Physiologie gastro-intestinale

Le système digestif comprend l'ensemble des organes et glandes impliqués dans l'extraction et l'absorption des éléments nutritifs provenant de l'alimentation (Marieb, 1992). Chaque élément présente une anatomie et une physiologie qui lui est propre et dont dépend son rôle dans le processus digestif. Cependant, une certaine homologie structurelle peut être mise en évidence. Ainsi, hormis la cavité buccale, la paroi de tous les organes du tractus gastro-intestinal (TGI) partage une organisation caractérisée par la présence de 4 couches superposées. De la lumière à la périphérie, ce sont la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (Bannister, 1995; Marieb, 1992) (Figure 1.1).

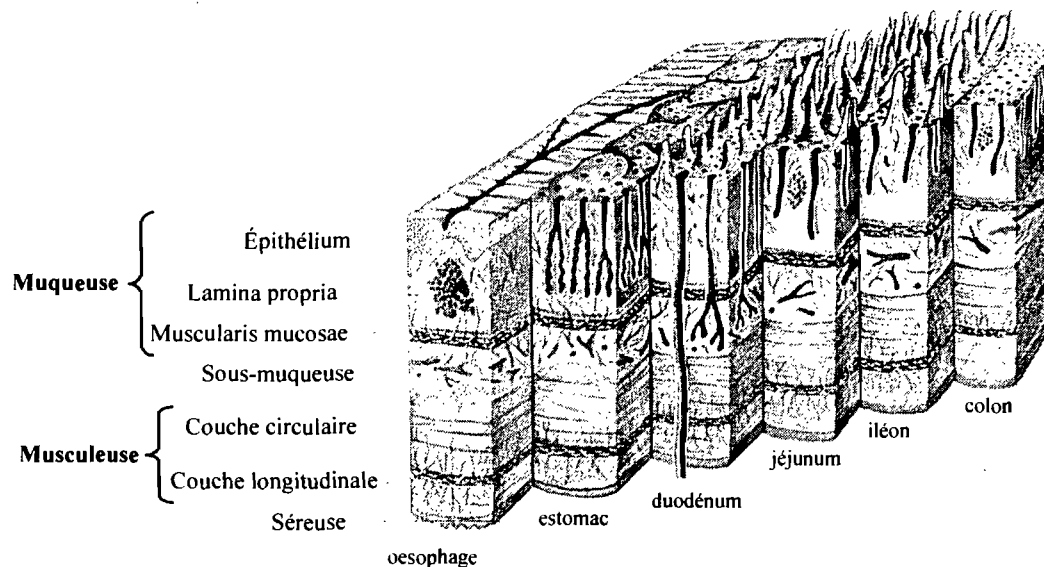


Figure 1.1. Représentation schématique de la paroi des différents organes du tube digestif
Reproduit de (Bannister, 1995) avec permission de Elsevier Ltd.

La muqueuse comprend une couche épithéliale qui tapisse la lumière et est impliquée aussi bien dans l'absorption de nutriments que dans la sécrétion d'enzymes/mucus ou la défense immunitaire de l'organisme (Bannister, 1995; Marieb, 1992). L'importance relative de chacune de ces fonctions varie selon le type cellulaire et la composition cellulaire. L'épithélium mucosal repose sur une fine couche de muscle lisse

(*muscularis mucosae*) ainsi qu'une faible quantité de tissu conjonctif (*lamina propria*) qui assure de façon exclusive l'irrigation sanguine et lymphatique de l'épithélium. Dans tous les organes, l'épithélium est tapissé d'une couche de mucus, une sécrétion visco-élastique composée en majorité d'eau et de glycoprotéines (mucine). Cette couche protège la muqueuse de l'action protéolytique des enzymes digestives (*Khanvilkar, 2001*). Dans le TGI, le mucus est sécrété par les cellules caliciformes dispersées à travers l'épithélium mucosal (*Marieb, 2005*).

La sous-muqueuse abrite un tissu conjonctif plus ou moins dense qui contient les principaux réseaux vasculaire et lymphatique du tube digestif (*Marieb, 1992*). Le système nerveux autonome y possède des terminaisons au niveau du plexus de Meissner d'où il contrôle les sécrétions endocrines et les contractions des muscles lisses de la musculature. Toutefois, la majorité des terminaisons nerveuses se concentrent dans le plexus myentérique, situé entre les couches musculaires de la musculature. Les influx nerveux qui y parviennent assurent le contrôle des mouvements du TGI et permettent à la musculature de remplir son rôle, essentiellement mécanique. La couche la plus externe, la séreuse, est formée d'un épithélium squameux et permet de relier les organes digestifs à la cavité abdominale (*Marieb, 1992*). Dans le cas des organes situés dans la cavité thoracique, tel l'oesophage, la dernière couche est constituée d'un tissu conjonctif et adopte le nom d'adventice.

Cavité orale

La cavité orale constitue la porte d'entrée du système digestif. La fonction première de la bouche étant mécanique (mastication), celle-ci est tapissée d'un épithélium apte à résister aux chocs mécaniques (*Hao, 2003*). Une protection supplémentaire est assurée par la présence de mucus et de salive qui lubrifient la surface buccale (*Marieb, 1992*). La salive, composée en grande majorité d'eau, contient également du mucus, des protéines, des

sels minéraux et des enzymes (*Washington, 2001*). Parmi celles-ci se trouve l'amylase qui initie le processus digestif en décomposant les polysaccharides tels le glycogène et l'amidon (Tableau 1.1). Suite à la mastication, les aliments imprégnés de salive forment le bol alimentaire qui sera dirigé par la langue vers le pharynx où il sera dégluti.

Tableau 1.1. Physiologie des organes du TGI. Adapté de (*Daugherty, 1999a*)

	Surface d'absorption	Longueur	Temps de résidence	pH	Activité métabolique
Cavité Buccale	100 cm ²			6.5	polysaccharides
Oesophage	200 cm ²	23-25 cm		-	-
Estomac	3.5 m ²	0.25 cm (variable)	1.5 h	1-2	Protéase, lipases
Duodénum	1.9 m ²	0.35 m	0.5-0.75 h	4-5.5	Polysaccharides, protéases, peptidases, lipases, nucléases
Jéjunum	184 m ²	2.8 m	1.5-2.0 h	5.5-7.0	Oligosaccharidases, peptidases, lipases
Iléon	276 m ²	4.2 m	5-7 h	7.0-7.5	Oligosaccharidases; peptidases, lipases, nucléases, nucléotidases
Colon- rectum	1.3 m ²	1.5 m	1-60 h	7.0-7.5	Enzymes bactériennes

Œsophage

L'œsophage est un tube musculueux qui relie la cavité buccale à l'estomac et est responsable d'y acheminer le bol alimentaire, suite à la déglutition. La fonction de l'œsophage est purement mécanique et aucune activité liée à la digestion ou à l'absorption n'y a lieu (*Marieb, 1992*).

Estomac

L'estomac constitue le premier véritable organe de digestion; là, le bol alimentaire est transformé en chyme. L'estomac peut être divisé en trois parties : le fundus, le corps et l'antrum. Ce dernier se termine par le pylore qui contrôle l'accès à l'intestin. Chaque segment est recouvert d'une muqueuse comprenant une variété de glandes sécrétrices, localisées sous l'épithélium dont la composition varie d'une région à l'autre (*Washington, 2001*). Ainsi, les cellules principales et les cellules pariétales, responsables, respectivement, de la sécrétion du pepsinogène (précurseur de la pepsine) et de l'acide chlorhydrique (HCl) se retrouvent principalement au niveau du corps et du fundus. La diminution du pH gastrique produite par le HCl permet l'hydrolyse du pepsinogène en pepsine. Cette dernière est une protéase qui s'attaque préférentiellement aux liaisons impliquant des acides aminés hydrophobes. Elle compose, avec la lipase et l'amylase gastriques, la totalité de l'arsenal enzymatique de l'estomac. Les cellules productrices de mucus, quant à elles, peuvent être trouvées dans la plupart des glandes gastriques, mais demeurent concentrées au niveau des jonctions oesophago-gastrique et gastro-intestinale (*Washington, 2001*). Le mucus qu'elles sécrètent sert notamment, à protéger la muqueuse de l'acide et de l'action protéolytique persistante de la pepsine en cours de digestion. La fonction de l'estomac étant d'abord mécanique, l'absorption de nutriments demeure minimale. Bien que l'épithélium gastrique soit perméable à certains nutriments, l'intervention de l'estomac dans le processus d'absorption se limite à la sécrétion du facteur intrinsèque, essentiel à l'absorption intestinale de la vitamine B₁₂ (*Marieb, 1992*).

Intestin grêle

L'intestin grêle est l'organe du TGI qui présente la plus importante surface d'absorption (Tableau 1.1). Trois structures distinctes permettent lorsqu'elles sont combinées, une augmentation significative de l'aire disponible : les valvules conniventes, les villosités et les microvillosités (Figure 1.2). Les valvules conniventes et les villosités

amplifient la surface d'absorption de 3 et 30 fois, respectivement. Les premières sont des replis grossiers de la membrane intestinale et jouent un rôle mécanique dans la digestion (Figure 1.2A); les secondes sont des projections épithéliales longiformes de 0.5 à 1 mm recouvertes d'un épithélium composé d'un mélange de cellules absorptives (entérocytes), productrices de mucus (cellules caliciformes) ou endocrines (Figure 1.2B) (*Washington, 2001*). Chaque entérocyte est chapeauté de microvillosités, haute d'environ 1 μm , qui elles seules augmentent de 600 fois la surface d'absorption (Figure 1.2C). Les microvillosités forment avec le glycocalyx associé (un mélange de protéines, cholestérol et glycoprotéines ancrées dans la membrane), ce qui est communément nommé la bordure en brosse. Cette dernière, en plus de constituer une barrière physique importante possède une activité enzymatique florissante.

Physiologiquement, l'intestin peut être divisé en 3 régions qui se distinguent par la nature des sécrétions que l'on y retrouve et par leur capacité d'absorption, soit le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Tableau 1.1). Le duodénum couvre les premiers 20-30 cm et reçoit le chyme après son passage dans l'estomac. La présence de glandes de Brunner assure la production de sécrétions alcalines qui viendront neutraliser l'acidité du chyme. Le jéjunum possède une paroi plus épaisse et plus vascularisée que le duodénum; les villosités y sont plus longues et plus nombreuses qu'ailleurs dans l'intestin de sorte que la surface est maximisée pour l'absorption. En revanche, l'iléon est plus riche en follicules lymphoïdes et joue un rôle prédominant dans la défense de l'organisme contre les pathogènes (*Washington, 2001*).

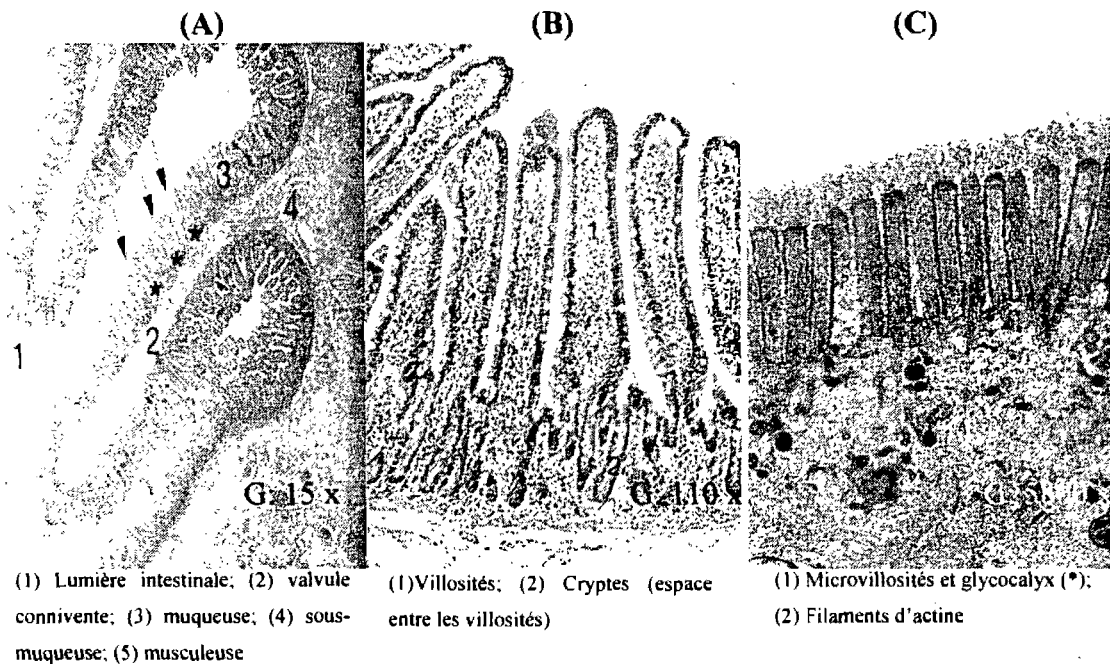


Figure 1.2. Histologie de la muqueuse du jéjunum. Illustration des valvules conniventes (A), des villosités (B) et des microvillosités qui sont illustrées avec le glycocalyx (C). Reproduit de (Welsch, 2003) avec permission de Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München.

Tissu lymphoïde intestinal

Le tube digestif constitue une porte d'entrée potentielle pour de nombreux pathogènes. De ce fait, le système lymphoïde y est très développé (*p.ex.* les amygdales dans la cavité buccale) (Washington, 2001). Dans l'intestin, l'immunité mucoale est assurée par la présence de lymphocytes intra-épithéliaux (Figure 1.3), mais aussi par un ensemble de structures hautement organisées réparties parmi les villosités, les plaques de Peyer. Les plaques de Peyer se composent d'agrégats de tissu lymphoïde recouvert d'un épithélium dit spécialisé (Figure 1.3). La composition de ce dernier diffère de l'épithélium intestinal normal par une production enzymatique et mucoïde moindre, mais surtout par la présence de cellules M, une variation morphologique des cellules intestinales. Les cellules M, contrairement aux entérocytes, ne possèdent pas de bordure en brosse (absence de

glycocalyx). Les microvillosités, quoique présentes, sont moins nombreuses, plus distancées et laissent transparaître de larges portions de la membrane cellulaire (*des Rieux, 2005*). Les antigènes qui se fixent à la paroi des cellules M, seront internalisés par endocytose, acheminés aux macrophages présents dans les tissus sous-jacents pour ensuite être présentés aux lymphocytes T (*Washington, 2001*). Les anticorps produits à l'issue de cette suite d'événements sont retournés à la lumière intestinale où ils pourront exercer leur fonction. Cette réaction immunitaire résultant de l'absorption de matériel antigénique par les cellules M est à la base du développement de vaccins oraux. En contre-partie, la reconnaissance de l'antigène peut déclencher une réaction tissulaire menant, notamment à la production de lymphocytes T cytotoxiques.



(1) Follicule lymphatique; (2) *lamina propria*; (3) épithélium formé de cellules M; (4) villosité entérocytaire.

Figure 1.3. Région d'une plaque de Peyer provenant de l'iléon. Les flèches indiquent les lymphocytes intra-épithéliaux retrouvés au niveau de l'épithélium entre les cellules M. Reproduit de (*Welsch, 2003*) avec permission de Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München.

Glandes annexes

Le processus de digestion dépend du bon fonctionnement de glandes annexes qui déversent leurs sécrétions dans l'intestin grêle. Ainsi, le foie et le pancréas produisent les éléments nécessaires à la dégradation et à l'absorption des lipides, glucides et protéines. En ce qui a trait à la digestion, le rôle du foie se limite à la production de la bile, une solution

composée de sels biliaires, de lipides et de cholestérol qui participe à l'émulsification et à l'absorption des matières grasses (*Marieb, 1992*). Le pancréas, quant à lui, produit et sécrète la plupart des enzymes digestives, incluant la trypsine et la chymotrypsine, les deux principales protéases. Le suc pancréatique comprend également un certain nombre d'amylases, d'estérases et de nucléases qui complètent le processus digestif (*Washington, 2001*).

Digestion et absorption intestinales

Les processus digestifs entamés dans la cavité buccale et l'estomac culminent dans l'intestin grêle qui demeure le lieu principal de digestion et d'absorption (*Caspary, 1992*). À ce niveau, le chyme se voit mêlé à différentes sécrétions produites localement par les entérocytes (enzymes) ou déversées dans l'intestin par les glandes annexes. Ainsi, la digestion intestinale permet de maximiser l'extraction des éléments nutritifs sous l'action combinée des différentes saccharidases, protéases et lipases. Le passage des nutriments à travers l'épithélium intestinal est assuré par différents mécanismes dont la diffusion passive ou facilitée, le transport actif et la pinocytose. La voie empruntée varie selon la molécule impliquée. Par exemple, seuls certains nutriments hydrophiles (monosaccharides, acides aminés et vitamines hydrosolubles) sont absorbés par diffusion passive. Pour la majorité, la présence d'un récepteur membranaire est obligatoire. Toutefois, l'eau traverse la membrane au gré des variations de gradients électrochimiques ou osmotiques créés lors de l'absorption des électrolytes (*Marieb, 1992*). Les molécules liposolubles, quant à elles, voient leur absorption limitée par leur faible solubilité dans les liquides intestinaux (*Caspary, 1992*). Exception faite des triglycérides à chaîne-moyenne (< 12 carbones) (*Humberstone, 1997*) qui rejoignent directement la circulation hépatique, l'absorption des lipides requiert la participation de solubilisants micellaires, sécrétés dans la bile. Au niveau du jéjunum, les micelles se déchargent de leur contenu qui sera internalisé par transport actif (*Caspary, 1992*). Les substances lipidiques présentent la particularité de transiter par les canaux lymphatiques, incorporés à l'intérieur de transporteurs (chylomicrons et lipoprotéines)

(*Caspary, 1992*). Cette voie est empruntée autant par les phospholipides, que par le cholestérol, les acides gras et les vitamines liposolubles (*i.e.* vitamines A, D, E et K).

Gros intestin

Le gros intestin représente la portion la plus distale du tube digestif et peut être divisé en quatre régions : le caecum, le colon, le rectum et le canal anal. Le colon, la section la plus importante peut être lui-même subdivisé en 4 segments, soit le colon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde (*Watkins, 1987*). Contrairement à l'intestin grêle, le gros intestin ne joue pas de rôle déterminant dans les processus de digestion et d'absorption. L'épithélium de la muqueuse colonique est dépourvu de plis circulaires et de villosités et contient peu de glandes sécrétrices d'enzymes. Cependant, un nombre élevé de cellules mucoïdes sont dispersées au sein de la muqueuse qui est plus épaisse et plus étanche que celle de l'intestin grêle (*Marieb, 1992*). En fait, seuls l'eau, les électrolytes et quelques vitamines parviennent à la traverser. L'activité métabolique est assurée par la microflore bactérienne et se résume à la fermentation des polysaccharides et protéines ayant échappé à la digestion (*Caspary, 1992*). Ce qui reste du chyme sera donc concentré et stocké dans le colon jusqu'à l'élimination dans les matières fécales.

Partie II- Administration orale d'agents thérapeutiques

L'étude anatomique et physiologique du TGI met en évidence la complexité du processus digestif, de nombreux éléments agissant de concert pour assurer l'apport nutritionnel essentiel au fonctionnement de l'organisme. Ces mécanismes, pourtant nécessaires à l'extraction des nutriments ou à la protection des muqueuses, représentent des barrières potentielles au passage de molécules exogènes. La section qui suit présente un survol des paramètres physiologiques, liés au patient ou à l'agent thérapeutique, pouvant influencer l'absorption intestinale.

Biodisponibilité orale

La biodisponibilité est un concept qui définit la vitesse et l'étendue de l'absorption d'un composé thérapeutique. En considérant que les concentrations plasmatiques sont représentatives des concentrations au site d'action, il ressort que seule la voie intraveineuse est assurée d'une biodisponibilité de 100%. En effet, toute voie d'administration extravasculaire présente un certain nombre de barrières physiques et/ou physiologiques auxquelles sera confrontée le PA avant d'atteindre la circulation sanguine (Hillery, 2001). L'impact de ces barrières se mesure par le calcul de la biodisponibilité absolue (F) qui prend la forme suivante pour l'administration orale :

$$F = \frac{ASC_{po}}{ASC_{iv}} \times \frac{Dose_{iv}}{Dose_{po}} \times 100 \quad (\text{équation 1})$$

où ASC_{po} et ASC_{iv} représentent les aires sous la courbe concentration plasmatique-temps obtenues après administration d'une dose par voie orale ($Dose_{po}$) et intraveineuse ($Dose_{iv}$).

De façon empirique, la dose biodisponible (F) après une administration entérique se définit par la fraction de la dose absorbée (F_{abs}) demeurant intacte après le passage du PA dans l'entérocyte (F_1) et dans le foie (F_H). La valeur F représente donc la fraction de la dose

qui pourra être détectée dans le sang et qui sera disponible pour exercer un effet thérapeutique.

$$F = F_l \cdot F_H \cdot F_{abs}$$

(équation 2)

Barrières physiologiques à l'absorption

Mucus

L'épithélium intestinal est recouvert d'une couche de mucus que doit traverser le principe actif (PA) afin de rejoindre son site d'absorption (*Lee, 2001*). L'impact de la présence du mucus se fait surtout sentir sur les molécules capables d'interagir avec les différentes composantes mucineuses (*Khanvilkar, 2001*). C'est le cas des molécules cationiques qui pourront former des liaisons électrostatiques avec la mucine, chargée négativement, mais aussi des molécules aptes à participer à des interactions hydrophobes ou à la formation de ponts hydrogène. L'importance réelle du mucus comme barrière à l'absorption est encore sujet de débat, notamment en raison de l'obtention de résultats contradictoires selon la source du mucus (*Larhed, 1997*) ou le protocole expérimental employé. Une uniformisation des méthodes d'étude est donc nécessaire afin de clarifier le rôle exact du mucus.

Membrane cellulaire et jonctions serrées.

Le caractère semi-perméable de la membrane intestinale restreint l'absorption d'agents thérapeutiques à l'une de deux voies, soit à travers la membrane cellulaire (transport transcellulaire) ou à travers l'espace intercellulaire (transport paracellulaire) (Figure 1.4).

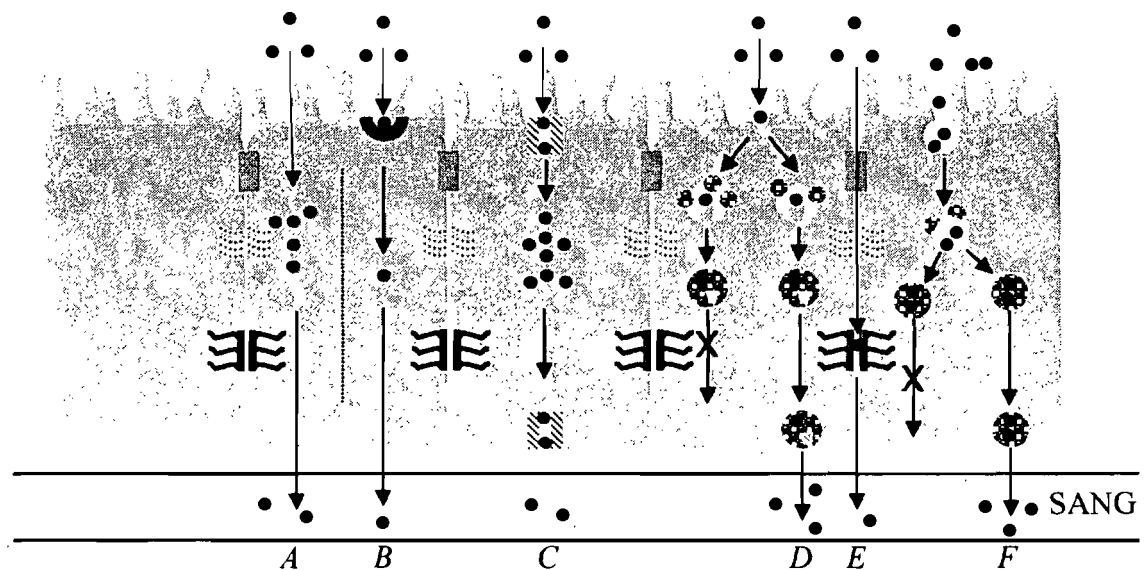


Figure 1.4. Illustration des mécanismes d'absorption de xénobiotiques dans l'intestin grêle. (A) diffusion passive; (B) transport actif; (C) diffusion facilitée; (D) Endocytose médiée par un récepteur; (E) transport paracellulaire; (F) pinocytose.

Transport transcellulaire

Différents modes de transport transcellulaire ont été décrits. Par un premier mécanisme, les molécules liposolubles de faible masse moléculaire peuvent diffuser librement à travers l'épithélium intestinal (Figure 1.4A). Les PAs ainsi absorbés doivent traverser la membrane cellulaire à deux reprises, soit au versant apical en contact avec la

lumière intestinale, puis du côté basolatéral d'où ils atteindront la circulation sanguine. Dans les deux cas, le mouvement du PA se fait dans le sens du gradient de concentration à une vitesse déterminée par la loi de Fick (Hillery, 2001) :

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{Dk \cdot A \cdot \Delta C}{h} \quad (\text{équation 3})$$

où dQ/dt représente la vitesse de diffusion à travers une membrane, D est le coefficient de diffusion; k , le coefficient de partage du PA dans la membrane; h , l'épaisseur de la membrane; A , l'aire de surface disponible pour l'absorption et ΔC , le gradient de concentration de part et d'autre de la membrane intestinale.

Un second mécanisme passif, la diffusion facilitée, implique la liaison du PA à un transporteur membranaire, mais est réservé aux molécules présentant une forte homologie structurale avec le substrat naturel du récepteur (Hillery, 2001). Le mouvement du PA se fait dans le sens du gradient de concentration et ne requiert pas d'énergie.

Le transport transcellulaire de macromolécules est possible et peut se faire par pinocytose: le PA est alors incorporé à l'intérieur de vésicules résultant de l'invagination de la membrane cellulaire (Figure 1.4F). Cette voie d'absorption non spécifique est indépendante du gradient de concentration (Hillery, 2001). Une fois dans le compartiment intracellulaire, il y a fusion entre les vésicules et les lysosomes, ce qui, plus souvent qu'autrement, entraîne la dégradation du PA (Hillery, 2001). Dans certains cas, la formation de vésicules peut résulter de l'interaction entre le PA et un récepteur membranaire (Figure 1.4D). Toutefois, tout comme la pinocytose, cette voie conduit à la dégradation du matériel internalisé et constitue une voie minimale d'absorption (Daugherty, 1999a).

Transport paracellulaire

La voie paracellulaire est empruntée par les PAs hydrophiles de faible masse moléculaire, pour lesquelles la voie transcellulaire demeure inaccessible (Figure 1.4E). La présence de jonctions entre les cellules constitue une barrière qui s'oppose efficacement au passage de ces molécules (Daugherty, 1999b). En fait, la cohésion de la membrane intestinale résulte de la présence de jonctions serrées. Ces dernières sont caractérisées par la fusion des membranes de cellules voisines, amenée par l'interaction de protéines spécifiques établissant des liens à travers l'espace intercellulaire (Hillery, 2001). Deux autres complexes protéiques, les jonctions adhérentes et les desmosomes viennent resserrer les liens entre cellules adjacentes, sans toutefois entraîner la fusion des membranes cellulaires (Daugherty, 1999).

Modulation de la perméabilité membranaire

Quel que soit le mécanisme, la vitesse d'absorption dépend des propriétés physico-chimiques du PA et de l'état de la membrane (transport transcellulaire) ou des jonctions intercellulaires (transport paracellulaire). L'étanchéité de la membrane intestinale peut être modulée par l'administration d'agents perméabilisants (Tableau 1.2) (Daugherty, 1999a). Ces derniers sont, pour la plupart, des composés amphiphiles et se classent parmi les surfactants synthétiques, les acides gras/sels biliaires ou les chélateurs d'ions divalents. Ils exercent leur fonction en modifiant de façon réversible la rhéologie de la couche de mucus ou de la membrane intestinale, ou, plus simplement, en augmentant la solubilité aqueuse du PA. Dans le cas particulier des jonctions serrées, la perméabilité membranaire peut être modulée par l'emploi de toxines (toxine du *Vibrio cholerae*) et de certains polymères (poly(acide acrylique) (PAA), chitosan) (Aungst, 2000). Malgré une efficacité indéniable, l'utilisation d'agents perméabilisants s'accompagne d'un risque accru de toxicité pouvant résulter de l'entrée de pathogènes par l'épithélium rendu moins étanche. Les stratégies n'impliquant aucun dommage à la membrane, reposant, entre autre, sur un contrôle du

métabolisme intestinal et sur l'augmentation des concentrations au site d'absorption sont donc préférées.

Tableau 1.2. Agents perméabilisants (*Aungst, 2000*)

Classe	Exemples	Mécanisme	Spécificité	
			Transcellulaire	Paracellulaire
Surfactants synthétiques	Polysorbate 80	Modification de la fluidité membranaire	√	
Acides gras	Chaîne longue	Modification de la fluidité membranaire	√	
	Chaîne courte	Modification de la fluidité membranaire		√
Acides biliaires		Modification de la fluidité du mucus		√
Cyclodextrines		Modification de la fluidité membranaire (extraction du cholestérol)	√	√
		Ouverture des jonctions serrées		√
		Augmentation de la solubilité	√	
Chélateurs	EDTA	Complexation de calcium		√
	PAA	Ouverture des jonctions serrées; mucoadhésion; inhibition enzymatique	√	√
Polymères cationiques	Chitosan	Interaction avec les composantes négatives du glycocalyx; mucoadhésion		√

Barrière biochimique

La barrière opposée par la multitude d'enzymes vient s'ajouter à celle, physique, du mucus et de la membrane cellulaire. D'une part les enzymes digestifs, particulièrement les protéases et nucléases, peuvent s'attaquer aux PAs de nature peptidique ou à base d'acides nucléiques. D'autre part, les PAs peuvent être métabolisés par différents enzymes au niveau des entérocytes ou lors de leur passage dans le foie. Ensemble, ces processus métaboliques subis par le PA avant d'atteindre la circulation générale constituent ce qu'il convient d'appeler l'effet de premier passage (EPP) (*Thummel, 1997*). L'EPP regroupe une série

d'évènements qui se décline en 2 temps. La première phase est majoritairement l'œuvre des enzymes oxydatifs de la superfamille du cytochrome P450 (CYP). La seconde phase englobe les réactions de conjugaison et vise, notamment, la détoxification des métabolites de phase I en vue de leur élimination (*Schuetz, 1996a; Xu, 2005*). De plus, parallèlement à cette activité enzymatique, l'existence de transporteurs d'efflux, dont la glycoprotéine P (Pgp), contribue à diminuer la biodisponibilité orale des agents thérapeutiques (*Zhang, 2001*). Étant donné leur rôle déterminant dans le processus d'absorption, les mécanismes impliqués dans le métabolisme de phase I et l'expulsion de xénobiotiques seront examinés plus en détail.

CYP et métabolisme de phase I

Agents principaux du métabolisme de phase I, les enzymes du complexe du CYP sont localisés au niveau du réticulum endoplasmique lisse dans le cytoplasme (*Zhang, 2001*). Ils peuvent être classés en familles (*p.ex.* CYP2) puis en sous-familles (*p.ex.* CYP2C), lesquelles se composent de nombreux isoenzymes ou isotypes (*p.ex.* CYP2C9; CYP2C19) (*Thummel, 1997; Xu, 2005*). Chez l'Homme, cinq isotypes seraient impliqués dans l'EPP : CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 et CYP3A4. Le CYP3A4 demeure le plus important quant à sa distribution et au nombre de substrats qu'il possède (*Schuetz, 1996b; Wacher, 2001*). D'ailleurs, le CYP3A4 est, de manière directe ou indirecte, responsable du métabolisme de plus de la moitié des xénobiotiques (*Wilkinson, 2001*).

Dans le système digestif, le CYP se concentre principalement dans le foie, au niveau des hépatocytes (*Wacher, 2001*). Vers la fin des années 1980, la présence extra-hépatique d'isoenzymes du CYP et leur participation à l'EPP intestinal ont été confirmées (*Murray, 1988*). Le CYP3A4 reste l'isotype le plus abondant (70% du CYP intestinal) et se distribue tout au long de l'intestin en quantité décroissante du duodénum à l'iléon (*Schuetz, 1996b*). Les isoenzymes CYP1A1, 2C8-10, 2D6, 2E1 et 3A5 ont également été détectés dans l'intestin et participent à l'EPP intestinal (*Wacher, 2001*). Les substrats du CYP3A4 incluent un large éventail de substances thérapeutiques (*Wilkinson, 2001*). Bien que de structures chimiques variées, ces derniers ont en commun une certaine hydrophobie qui est

à l'origine de leur interaction avec l'enzyme. L'expression du CYP peut être modulée (inhibée ou induite) suite à la liaison du substrat à la protéine. Par conséquent, le CYP est impliqué dans de nombreuses interactions médicamenteuses qui peuvent affecter le devenir d'un agent thérapeutique administré oralement.

Protéines d'efflux et Pgp

Les protéines d'efflux sont des transporteurs membranaires dont la fonction consiste à expulser les agents exogènes, considérés comme potentiellement toxiques, hors de la cellule. De ce fait, leur présence dans le tube digestif est associée à une réduction de la biodisponibilité orale. De tous les complexes identifiés ce jour, celui de la Pgp demeure le plus étudié, bien que la présence de transporteurs de la famille des protéines associées à la résistance pléiotrope (MRP) ou des transporteurs de cations/anions organiques puisse également affecter la biodisponibilité orale de certains PAs (*Wagner, 2001*).

La Pgp est une protéine transmembranaire de 170 kDa encodée, chez l'Homme, par le gène MDR1 et dont l'activité dépend de la présence d'énergie sous la forme de triphosphate d'adénosine (ATP) (*Benet, 1999*). D'abord étudiée pour son rôle dans le développement de la résistance pléiotrope par les cellules cancéreuses, l'expression de la Pgp a été mise en évidence dans plusieurs tissus sains incluant le foie, l'intestin grêle et le colon (*Thiebault, 1987*). Dans l'intestin, elle s'insère au niveau de la membrane apicale des entérocytes, mais possède un site de liaison intracellulaire. Contrairement au CYP, l'expression de la Pgp croît de façon distale au sein du TGI et est maximale dans le colon (*Mouly, 2003; Zhang, 2001*).

Les substrats de la Pgp sont de nature très différente et incluent autant des agents pharmacologiques que des produits naturels (*p.ex* les flavonoïdes retrouvés dans le jus de pamplemousse) (Tableau 1.3). Récemment, au terme d'une étude exhaustive, *Didziapetris et al.* (2003) ont identifié les éléments de structure les plus fréquents chez les substrats de la Pgp : une masse moléculaire élevée (> 400 g/mol), une forte capacité à agir comme

accepteur de ponts hydrogène (présence d'oxygène et d'azote) et un caractère alcalin. En dehors de cette dernière particularité, les substrats de la Pgp semblent définis par des critères similaires aux molécules faiblement perméables (*Lipinski, 2001*).

L'activité de la Pgp peut être modulée de façon à limiter son influence sur l'absorption d'un PA. Les premiers inhibiteurs proposés étaient eux-mêmes des substrats de la protéine (*p.ex.* vérapamil, cyclosporine, paclitaxel). Par la suite, des divers composés ont démontré la capacité d'inhiber la Pgp, dont le millepertuis et certains surfactants. L'action des ces agents n'étant pas spécifique à la Pgp, leur administration peut s'accompagner d'effets secondaires indésirables. À l'heure actuelle, la recherche d'inhibiteurs se concentre sur le développement de molécules biologiquement inactives, possédant une forte affinité pour la Pgp.

Tableau 1.3. Exemples de substrats communs au CYP3A4 et à la Pgp

Inhibiteurs de la Pgp	Substrats de la Pgp	Substrats/Inhibiteurs de la Pgp
Amiodarone	Dexaméthasone	Cortisol
Érythromycine	Étoposide	Cyclosporine
Féلودipine	Paclitaxel	Diltiazem
Kétoconazole	Alcaloïdes de la vinca	Vérapamil
Lidocaïne		
Nifédipine		
Progestérone		
Tamoxifén		
Testostéerone		

Synergie entre l'activité intestinale du CYP3A4 et de la Pgp

La similitude des substrats/ modulateurs et la colocalisation du CYP3A4 et de la Pgp au niveau des entérocytes, a suscité un questionnement sur la possibilité d'une action concertée de ces deux complexes (*Schuetz, 1996b; Wachter, 1995; Zhang, 2001*). L'hypothèse la plus plausible voudrait que la Pgp assure au CYP un accès soutenu à son substrat qui serait piégé dans un cycle d'absorption-expulsion (*Zhang, 2001*) (Figure 1.5).

Ce postulat a été vérifié lors d'études *in vitro* sur un modèle cellulaire (Caco-2) effectuées en utilisant différentes molécules identifiées comme étant des substrats communs au CYP et à la Pgp (Benet, 2001). L'inhibition sélective de la protéine d'efflux a amené une diminution des quantités métabolisées, un effet augmenté par l'administration de cyclosporine, un inhibiteur non sélectif (Benet, 2001). Cette constatation ouvre la voie à une nouvelle façon de percevoir les interactions médicamenteuses se produisant entre les substrats et/ou modulateurs du CYP3A4 et de la Pgp, bien qu'il demeure difficile de d'identifier avec certitude l'effet de chacune des protéines.

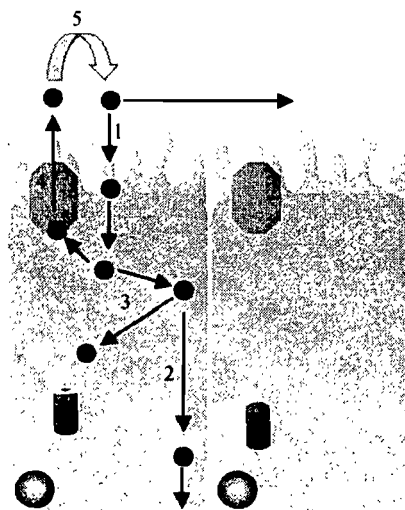


Figure 1.5. Représentation schématique de l'interaction entre la Pgp et le CYP3A4 au niveau de l'entérocyte. Suite à son absorption (1), le PA peut être externalisé intact du côté basolatéral (2) ou être métabolisé au niveau du CYP (3). En contre-partie, il peut se lier à la Pgp (4) et être expulsé du côté apical, d'où il peut être ré-absorbé (5).

Paramètres liés aux patients.

Certains facteurs relatifs au patient peuvent avoir un effet sur la biodisponibilité orale d'un PA. Outre les effets de l'âge, du sexe et de la race, le polymorphisme important noté dans l'expression de certains enzymes et/ou transporteurs peut à lui seul induire une importante variabilité inter-individuelle du profil d'absorption (Hillery, 2001).

Paramètres liés au PA.

Plusieurs propriétés physico-chimiques intrinsèques au PA ont une influence sur sa biodisponibilité orale. Par exemple, le pK_a /degré d'ionisation ou la masse moléculaire affectent la voie et l'étendue de l'absorption (Hillery, 2001), cette dernière étant généralement plus limitée pour les macromolécules ou les molécules chargées. En réalité, l'influence de la majorité des paramètres liés au PA se résume à leur effet sur la solubilité aqueuse et sur la perméabilité à travers la membrane cellulaire. Il est à noter que les paramètres liés au PA définis ici ne s'appliquent qu'aux molécules absorbées par voie transcellulaire.

Solubilité aqueuse

L'absorption efficace d'un agent thérapeutique nécessite que ce dernier puisse se dissoudre dans les liquides intestinaux, une fois libéré de la forme pharmaceutique. La dissolution d'un PA peut être décrite par l'équation de Noyes-Whitney :

$$\frac{dm}{dt} = \frac{DS}{h} (C_s - C) \quad (\text{équation 4})$$

Où dm/dt représente la vitesse de dissolution; D est le coefficient de diffusion; S est l'aire de surface du solide; C_s est la solubilité du PA; C , la concentration du PA en solution au temps t et h , l'épaisseur de la couche de diffusion.

Les valeurs de solubilité jugées acceptables dépendent de la dose administrée et du volume de liquide disponible pour la dissolution. Ainsi, pour un PA peu ou pas hydrosoluble, plus la dose administrée est faible, moins la solubilité risque de représenter un problème. Les différents niveaux de solubilité considérés par les pharmacopées sont présentés au Tableau 1.4.

Tableau 1.4. Niveaux de solubilité (*Washington, 2001*)

Solubilité	Volume d'eau (mL) nécessaire à la solubilisation de 1 g de soluté
Très soluble	< 1
Facilement soluble	Entre 1 et 10
Soluble	Entre 10 et 30
Faiblement soluble	Entre 30 et 100
Peu soluble	Entre 100 et 1000
Très peu soluble	Entre 1000 et 10 000
Insoluble	> 10 000

Divers facteurs affectent la solubilité aqueuse d'un PA. Certains sont inhérents à sa composition chimique, dont la capacité à prendre part à des liaisons hydrogène et le polymorphisme cristallin (*Dresse, 1978*). D'autres, comme le degré d'ionisation sont grandement influencés par les conditions environnementales dans le TGI (*Blum, 1991*). La plupart des solutions proposées aux problèmes de solubilité reposent sur la modification chimique de l'entité active, notamment par la formation de sels (*Serajuddin, 2007*) ou de pro-médicaments (*Stella, 2007*). Dans certains cas, la prise du PA au moment des repas peut améliorer la solubilité aqueuse en raison de la présence de solubilisants micellaires (*Karali, 1992; Luner, 1994*). Lorsque aucune de ces solutions n'est envisageable, la formulation devra être adaptée de façon à assurer une solubilité aqueuse adéquate.

Perméabilité membranaire

La plupart des facteurs affectant la solubilité aqueuse ont aussi une influence sur la perméabilité intestinale (degré d'ionisation, liaison hydrogène). Un ensemble de règles a été édicté afin de prédire les molécules pour lesquelles la perméabilité risque de représenter l'étape limitante à l'absorption (*Lipinski, 2001*). Cette règle, dite la règle des « 5 », est

couramment utilisée afin de discriminer les molécules tôt dans le processus de développement (Tableau 1.5). Tout PA présentant deux de ces critères ou plus risque de voir son absorption limitée par une perméabilité insuffisante.

Tableau 1.5. Règle des « 5 ».

Paramètres physico-chimiques	
Donneurs de ponts hydrogène	> 5
Accepteurs de ponts hydrogène	> 10
Masse molaire	> 500
Log P	< 5

Prédiction de la solubilité aqueuse et de la perméabilité

Diverses méthodes ont été développées afin de prédire le comportement *in vivo* de molécules thérapeutiques et ce, bien avant d'effectuer des essais sur des organismes vivants. Ces tests font partie du dépistage précoce des nouvelles entités actives et permettent de déceler rapidement celles dont la formulation pourrait s'avérer problématique.

Étude de la solubilité aqueuse

De façon usuelle, la solubilité d'une molécule est déterminée à l'équilibre suite à la préparation d'une solution saturée en PA (Bhattachar, 2006; Delivaney, 2006). Cette technique a l'avantage d'être très simple à exécuter, mais requiert une quantité importante de produit, sous sa forme cristalline la plus stable (Bhattachar, 2006; Delivaney, 2006). C'est en réponse à ces problèmes qu'une série de mesures théoriques de la solubilité ont été proposées. Ainsi, de nombreuses méthodes basées sur la prédiction de la solubilité à partir de la structure ou de paramètres physico-chimiques expérimentaux (*p.ex.* coefficient de partage, aire de surface polaire, accepteur/donneur de ponts hydrogène, *etc.*), ont

récemment été évaluées (*Delivaney, 2006; Jorgensen, 2002*). Ces procédés souffrent de l'absence de données de solubilité précises qui permettraient de tester la validité des modèles (*Jorgensen, 2002*). Pour le moment, l'alternative la plus utilisée consiste à étudier la précipitation du PA dissous dans un solvant organique, souvent le diméthylsulfoxyde suite à son introduction en milieu aqueux (*Bhattachar, 2006*). Cette technique permet l'évaluation sommaire d'un grand nombre de composés et ne requiert que de faibles quantités de PA (*Bhattachar, 2006*). Toutefois, la présence d'un solvant organique peut fausser les résultats en modifiant l'arrangement cristallin, de sorte que la mesure ne reflète pas nécessairement la solubilité réelle du PA (*Dresse, 1978*).

Coefficient de partage et perméabilité

Le coefficient de partage entre l'octanol et l'eau ($\log P_{\text{oct}}$) demeure l'indicateur de la perméabilité membranaire le plus fréquemment employé. La pertinence du modèle repose sur la similitude entre la lipophilie démontrée par l'octanol et celle des membranes cellulaires (*Artursson, 2001*). Selon cet indice, la perméabilité d'un PA augmente de façon linéaire avec le $\log P_{\text{oct}}$ jusqu'à ce que les concentrations atteintes dans la phase organique soient 100 fois plus élevées que celles obtenues dans la phase aqueuse ($\log P_{\text{oct}} = 2$). À ce moment, l'absorption est maximale. Une augmentation supplémentaire de la lipophilie s'accompagne de problèmes de solubilité, ce qui finirait par freiner l'absorption. Aussi, un $\log P_{\text{oct}} > 3-4$ est associé à une affinité importante pour les composantes lipidiques qui peut limiter la diffusion du PA hors de la membrane (*Varma, 2004*).

L'utilisation du $\log P_{\text{oct}}$ permet surtout de prédire le transport transcellulaire d'une molécule neutre. Le plus souvent une bonne corrélation peut être établie avec les résultats de perméabilité déterminés sur un modèle cellulaire. Avec le temps, quelques ajustements ont été proposés afin, notamment, de tenir compte des différentes interfaces traversées par le PA lors de son absorption ou de l'importance du degré d'ionisation (*Burton, 1992*).

Étude de la perméabilité

En dehors du $\log P_{oct}$, l'étude expérimentale de la perméabilité repose sur l'évaluation du coefficient de diffusion d'un PA à travers une membrane mimant les propriétés de l'épithélium intestinal. La surface de diffusion peut être artificielle et constituée de vésicules lipidiques (Flaten, 2006) ou naturelle, composée de cellules (Balimane, 2005), ou même d'un sac épithélial isolé (Castella, 2006). De tous les modèles proposés, celui des cellules humaines d'adénocarcinome du colon (Caco-2) demeure le plus couramment utilisé. Les Caco-2 ont la particularité de se différencier en un épithélium intestinal mature lorsqu'elles sont cultivées sur une membrane perméable (Hidalgo, 1989). Ainsi, le film cellulaire obtenu présente les propriétés caractéristiques de la membrane intestinale incluant la bordure en brosse, les jonctions serrées et la majorité des transporteurs membranaires (Figure 1.6) (Balimane, 2005; Sambuy, 2005). Contrairement aux modèles théoriques, l'utilisation de Caco-2 permet d'évaluer la perméabilité de PAs transportés à la fois par voie transcellulaire que paracellulaire. Néanmoins, une meilleure corrélation *in vitro-in vivo* est obtenue lorsque le transport transcellulaire est étudié. Pour les molécules plus hydrophiles, il est recommandé de sélectionner des modèles cellulaires plus perméables, dont les 2/4/A1 (cellules épithéliales foetales), qui représentent de manière plus fidèle l'étanchéité des jonctions serrées intestinales (Balimane, 2005; Shah, 2006). Bien que fort utile, le modèle Caco-2 présente certaines lacunes, notamment l'absence de cellules M et la sous-expression du CYP3A4, qui peuvent mener à une estimation erronée de la perméabilité d'un PA. Différentes modifications ont donc été apportées au modèle incluant l'utilisation de co-culture (Balimane, 2005) ou de cellules transfectées (Crespi, 1990).

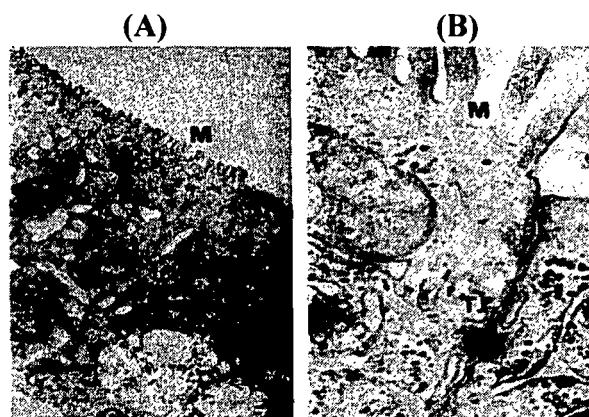


Figure 1.6. Image d'une monocouche de Caco-2 en microscopie électronique (A) et grossissement de la membrane apicale (B) où peuvent être distinguées les microvillosités [M] et les jonctions serrées [TJ]. Reproduit de (De Boer, 1994) avec permission de Harwood Academic Publishers.

Classification biopharmaceutique

En 1995, Amidon *et al.* ont proposé un système de classification des molécules thérapeutiques basé sur leur solubilité aqueuse et leur perméabilité membranaire. Selon ce modèle, quatre classes peuvent être identifiées (Tableau 1.6).

Tableau 1.6. Classification biopharmaceutique des agents thérapeutiques

	Haute perméabilité ^[a]	Faible perméabilité
Haute solubilité aqueuse ^[a]	Classe I	Classe III
Faible solubilité aqueuse	Classe II	Classe IV

[a] Un PA sera considérée comme hautement perméable lorsque la fraction de la dose absorbée est d'au moins 85%; il sera considéré hautement soluble si la dose maximale utilisée en clinique est complètement soluble dans 250 mL d'eau ou de tampon sur un large intervalle de pHs (1 à 7.5).

Développé au départ comme une alternative aux essais *in vivo* de bioéquivalence, ce système est maintenant couramment employé en développement afin de prédire le comportement *in vivo* d'un PA, à partir de données expérimentales obtenues *in vitro* (Varma, 2004). Ce modèle montre que, en dehors des molécules de la classe I, la majorité des agents thérapeutiques risquent de présenter des problèmes d'absorption intestinale, que ces derniers soient dus à un manque de solubilité aqueuse (classe II), lipidique (classe III) ou les deux (classe IV). Alors qu'un nombre limité de solutions a été proposé au manque de perméabilité, les problèmes de solubilité pourront être adressés de manières relativement aisée par une modification du PA ou de la forme galénique utilisée.

Partie III- Formulation d'agents thérapeutiques pour la voie orale.

Le système de classification décrit à la section précédente résume l'influence que peuvent avoir les propriétés physico-chimiques d'une molécule sur son absorption intestinale. Lorsqu'il est question de molécules plus fragiles (*p.ex.* peptides, protéines et poly(acides nucléiques)), la biodisponibilité orale sera également affectée par l'instabilité en milieu acide ou en présence d'enzymes digestifs.

Pour certains principes actifs (PAs), la biodisponibilité orale peut être améliorée par une modification chimique, par exemple, par le développement d'une forme sel pour une molécule hydrophobe ou d'un dérivé lipidique pour un PA hydrophile. Toutefois, lorsque ces solutions ne sont pas réalisables ou qu'elles ne produisent pas les résultats escomptés, d'autres stratégies reposant sur la modification de la formulation doivent être envisagées. Les problèmes de solubilité peuvent être contournés par une réduction de la taille des particules de PA, par l'ajout d'un co-solvant ou l'utilisation d'agents solubilisants incluant les cyclodextrines (*Brewster, 2007*) ou les tensioactifs (*Takahashi, 2002*). À l'opposé, l'emploi de promoteurs de l'absorption est recommandé pour les agents hydrophiles afin d'augmenter le transport paracellulaire.

Par ailleurs, les difficultés posées par l'administration entérique d'agents thérapeutiques, quels qu'ils soient, peuvent être résolues par l'utilisation de vecteurs synthétiques, notamment les colloïdes. Dans les sections suivantes, les différents vecteurs seront décrits en portant une attention particulière aux applications potentielles des différents systèmes.

Interaction des vecteurs avec la membrane intestinale

Absorption intestinale de vecteurs

Les mécanismes impliqués dans l'absorption intestinale de particules colloïdales ont longtemps été associés à une certaine controverse. Les premiers exemples rapportés faisaient état du transport paracellulaire de larges particules d'amidon (150 μm) sous l'effet du péristaltisme intestinal (*Volkheimer, 1968*). Ce postulat a été plus tard réfuté lorsqu'il a été démontré que la taille des pores au niveau des jonctions serrées pouvait, au plus, atteindre 30 Å et ce, en présence d'agents perméabilisants. Un second contentieux concernait le type de cellules impliqué dans le processus d'absorption. Il a longtemps été présumé que les cellules M étaient les seules responsables de l'internalisation des particules, étant donné la production limitée d'endosomes par les entérocytes (*Yeh, 1998*). Aujourd'hui, il est généralement entendu que la voie transcellulaire est la voie majeure d'absorption des vecteurs et que les entérocytes y participent au même titre que les cellules M (*Norris, 1998*).

Au niveau des entérocytes, le transport transcellulaire de particules se fait généralement par pinocytose ou endocytose (voir Figure 1.4). En l'absence de ligand, l'endocytose est déclenchée suite à l'interaction non spécifique du vecteur avec la membrane cellulaire (endocytose de contact). La vésicule membranaire ainsi formée est transportée à travers la cellule, puis externalisée au niveau de la membrane basolatérale. Des mécanismes similaires sont impliqués dans l'internalisation de particules par les cellules M (*Yeh, 1998*). La trajectoire suivie par la particule absorbée semble influencée par sa taille. Ainsi, les particules de taille inférieure à 5 μm seraient externalisées puis dirigées vers des poches de tissu lymphoïde alors que les particules plus larges seraient retenues à l'intérieur de la cellule (*Yeh, 1998*).

De façon générale, l'efficacité du transport transcellulaire dépend des propriétés physico-chimiques des particules (*Jung, 2000*). Plus précisément, la discrimination se fait

sur la taille et les propriétés de surface. Ainsi, les entérocytes participent plus activement à l'absorption des petites particules (< 500 nm), alors que les plus grandes sont exclusivement internalisées par les cellules M (Desai, 1997). Toutefois, peu importe le lieu d'absorption, les particules de petit diamètre seront internalisées de façon plus importante, comme le démontrent les résultats de l'étude de Desai *et al.* (1996) qui ont évalué l'influence de la taille sur l'absorption intestinale de particules de poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLGA) (Figure 1.7).

L'absorption de particules par les entérocytes requiert un équilibre adéquat entre les propriétés hydrophiles et lipophiles, de manière à permettre au vecteur de traverser la couche de mucus puis d'interagir avec la membrane cellulaire (Norris, 1998). Ces considérations sont moins importantes pour les cellules M qui présentent une barrière muqueuse moins épaisse. Dans ce cas, l'internalisation des particules hydrophobes est favorisée. En dehors de ce critère de base, l'impact de modifications apportées aux propriétés de surface peut être extrêmement dur à prédire. Ainsi, alors que certains auteurs ont montré que l'ajout d'un polymère hydrophile peut améliorer l'interaction entre les particules et la membrane cellulaire (Vila, 2002), d'autres ont noté une diminution du taux d'absorption (Behrens, 2002). De la même façon, la présence de charges (positives ou négatives) s'est avérée autant bénéfique que délétère (Jung, 2000; Shakweh, 2005). De telles disparités résultent le plus souvent de différences expérimentales, soit au niveau du modèle (cellules ou animal) étudié ou de la méthode employée.

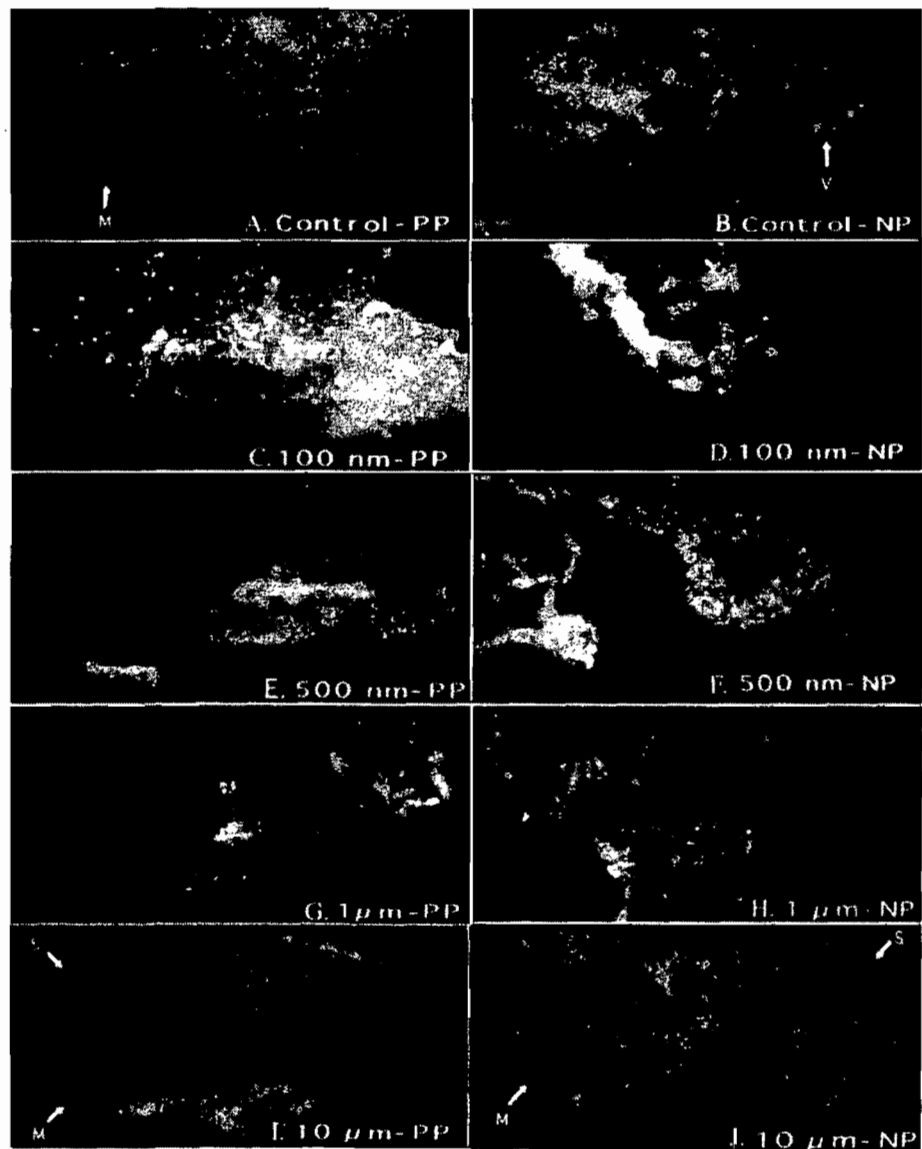


Figure 1.7. Analyse histologique des tissus intestinaux de nature lymphoïde (Plaques de Peyer (PP)) ou non (NP) exposés à des particules de PLGA de taille variable. Les tissus proviennent d'intestins de rats. (S) = séreuse; (M)= muqueuse; (V) = villosités. Reproduit (Desai, 1996) avec permission de Springer.

Tous facteurs considérés, l'absorption d'un vecteur administré oralement totalise rarement plus de 10% de la dose administrée, selon le modèle animal employé (*Chen, 1998; Russell-Jones, 2004*). Ceci est dû à l'importante barrière formée par le glycocalyx entérocytaire combiné à une faible distribution des cellules M (< 1% des cellules intestinales). Cependant, diverses stratégies peuvent être employées afin de maximiser l'absorption.

Ciblage actif de l'épithélium intestinal

Le ciblage actif, soit l'ajout d'une molécule de reconnaissance (ligand) à la surface d'un vecteur a été proposé afin de promouvoir son absorption intestinale. Le principe sous-jacent veut que le vecteur soit absorbé de façon concomitante au ligand, généralement par endocytose médiée par un récepteur. En dehors des lectines, les molécules de reconnaissance employées diffèrent selon le type cellulaire visé: vitamines et transporteurs d'oligoéléments pour les entérocytes; molécules d'adhésion, anticorps et toxines bactériennes pour les cellules M (*Russell-Jones, 2001*). Seules la vitamine B₁₂ et les lectines, qui ont été les plus étudiées, seront vues ici.

a. Vitamine B₁₂

La cyanocobalamine (vitamine B₁₂), une vitamine hydrosoluble, est absorbée au niveau de l'iléon liée au facteur intrinsèque (FI), sécrété par les cellules pariétales dans gastriques. Le potentiel de la vitamine B₁₂ a d'abord été démontré lors de l'administration orale de peptides (*Habberfield, 1996; Russell-Jones, 1995*). *In vivo*, l'administration intra-duodénale de conjugués de vitamine B₁₂ a permis d'augmenter l'absorption du facteur de croissance des granulocytes (GCSF) de plus de 100 fois par rapport au contrôle (*Habberfield, 1996*). Cette stratégie a été par la suite appliquée au ciblage de particules colloïdales. Francis *et al.* (2005) ont étudié l'effet de la présence de vitamine B₁₂ sur le transport de la cyclosporine A (CsA) encapsulée à l'intérieur de micelles composées de dextran modifié à l'aide d'un dérivé éther cétylique de poly(éthylène glycol) (PEG). La présence du ligand a été associée à une augmentation de la perméabilité du PA de deux fois

par rapport aux micelles nues, un effet amélioré en présence de FI. De la même façon, le ciblage de nanoparticules de dextran à l'aide de vitamine B₁₂ a permis d'augmenter l'activité biologique de l'insuline de 2.6 fois par rapport aux nanoparticules non modifiées (Chalasan, 2007).

b. Lectines

Les lectines sont des protéines pouvant se lier de façon spécifique aux saccharides présents à la surface des cellules (Woodley, 2000). Par conséquent, les lectines peuvent interagir avec les sucres de la mucine ou les glycoprotéines et glycolipides du glycocalyx (Bies, 2004). L'affinité des lectines pour les composantes de la mucine a principalement été exploitée dans le développement de formulations muco-adhésives. Cette application sera discutée à la section suivante.

Il a été démontré que l'interaction des lectines avec les saccharides du glycocalyx des entérocytes pouvait provoquer l'endocytose du complexe formé (Ertl, 2000; Wirth, 2002). L'utilisation de lectines comme agent de ciblage repose donc sur leur capacité à provoquer l'internalisation du vecteur. Par ailleurs, selon la lectine employée, il est possible de cibler préférentiellement un type de cellules plutôt que l'autre. Par exemple, l'agglutinine *Ulex europaeus* (UEA) reconnaît les glycoconjugués présents à la surface des cellules M, alors que la lectine de tomate (LT) se lie préférentiellement au glycocalyx des entérocytes (Clark, 2001; Zhang, 2005). La lectine de germe de blé (WGA), quant à elle, peut adhérer aux deux types cellulaires (Yin, 2007).

L'efficacité du ciblage à l'aide de lectines a été démontrée *in vitro* sur des Caco-2 lors d'essais effectués avec des nanosphères de poly(styrène) (PS) (50-100 nm) (Russell-Jones, 1999) et des microparticules de PLGA (4.2 µm) (Ertl, 2000) toutes deux modifiées à l'aide de WGA. *In vivo*, la présence de WGA a permis d'augmenter significativement l'absorption de nanoparticules fluorescentes de PLGA (240 nm) administrées par gavage chez le rat. La présence du vecteur a pu être décelée dans le sang, la rate, le foie et les reins, bien que la majorité des particules soient demeurées au niveau de l'intestin. Au total, de 7 à

16% de la dose administrée a été retrouvée à l'extérieur de l'intestin, comparé à ~ 4.8 à 5% pour les particules non ciblées (Figure 1.8) (Yin, 2007). Une distribution similaire a été observée suite à une administration quotidienne sur 7 jours. Ceci confirme que l'effet cyto-adhésif n'est pas totalement entravé en présence de mucus, ce qui n'avait pu être démontré lors des études *in vitro*.

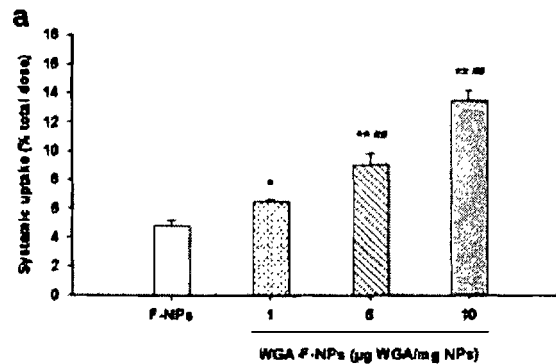


Figure 1.8. Absorption de particules de PLGA nues (F-NP) ou ciblées à l'aide de WGA (WGA-F-NPs). Reproduit de (Yin, 2007) avec permission de Elsevier Ltd.

Donc, le ciblage permet d'augmenter l'absorption intestinale. Cette approche s'avère particulièrement intéressante dans le cadre de l'administration orale de vaccin où la présence d'un ligand peut améliorer l'absorption par les cellules M.

Mucoadhésion

Le terme « mucoadhésion » définit tout phénomène par lequel un matériau donné se lie à la couche de mucus (Sudhakar, 2006). Étant donné la présence ubiquitaire de mucus dans le TGI, cette propriété peut être exploitée afin de prolonger le temps de résidence d'une forme pharmaceutique dans différents segments du tube digestif.

L'agent mucoadhésif type est souvent un polymère hydrophile capable d'interagir avec le mucus par le biais d'interactions non spécifiques et non covalentes, notamment par la formation de ponts hydrogène, de liaisons électrostatiques, hydrophobes ou de van der Waals (Smart, 2005; Sudhakar, 2006). Ces propriétés sont caractéristiques des agents de

première génération qui incluent le poly(acide acrylique) (PAA), le chitosan, l'alginate de sodium et les dérivés de cellulose (Figure 1.9) (*Smart, 2005*). Par la suite, différents dérivés du chitosan ou du PAA ont été proposés. Ces polymères ont été modifiés de façon à consolider l'interaction avec la mucine. Ceci a été réalisé par l'introduction de groupements thiolés (-SH) qui peuvent se lier de façon covalente aux résidus cystéine de la mucine et entraîner la formation de ponts disulfure (*Leitner, 2003; Roldo, 2004*).

Il est intéressant de noter que pour plusieurs agents, l'effet mucoadhésif s'accompagne d'un effet perméabilisant. C'est le cas, par exemple, du chitosan et du PAA. Ainsi l'amélioration de la biodisponibilité produite par ces agents repose sur l'effet combiné d'une prolongation du temps de résidence intestinal et d'une action sur les jonctions serrées (*Bernkop-Schnurch, 2003*).

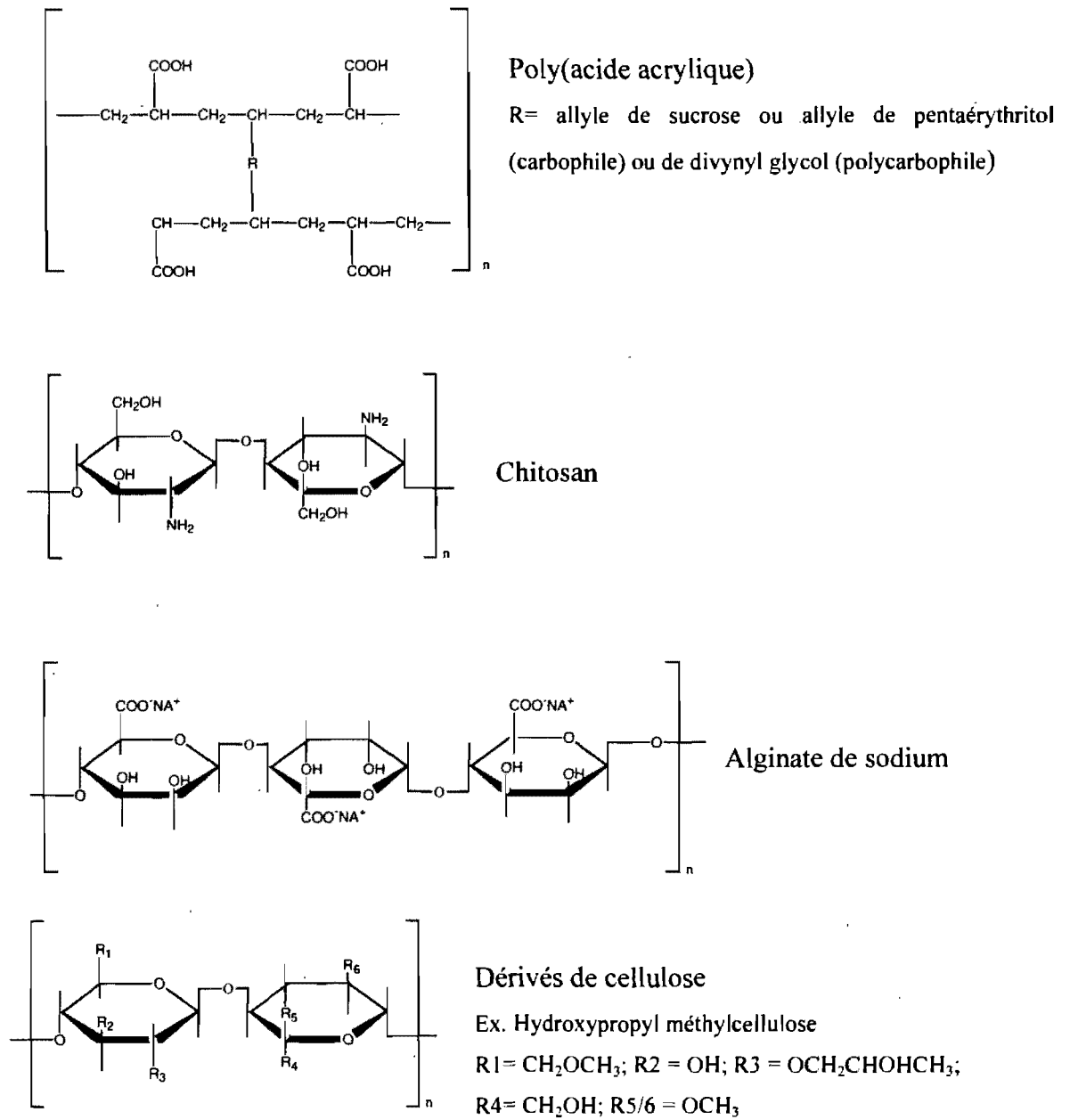


Figure 1.9. Structure chimique des agents muco-adhésifs de 1^{ère} génération.

Les lectines représentent les uniques membres de la seconde génération. Elles se distinguent des polymères par leur aptitude à se lier de manière spécifique et avec une forte affinité aux saccharides de la mucine (*Woodley, 2000*). L'emploi de lectines a permis d'augmenter le temps de résidence de formulations à base de liposomes (*Zhang, 2005*), nanoparticules (*Yeh, 1998*) et microparticules (*Kim, 2005*). Dans plusieurs cas, cet effet était accompagné d'une absorption plus importante du vecteur (*Zhang, 2005*) permettant d'améliorer le profil pharmacocinétique de PAs faiblement biodisponibles. Cependant, certaines lectines ont été associées à de la toxicité (destruction de la bordure en brosse) et ont démontré un potentiel immunogène. Ces effets peuvent limiter leur utilisation à long terme (*Naisbett, 1995; Woodley, 2000*). De plus amples études sont nécessaires afin d'évaluer le risque réel posé par l'ingestion de lectines.

L'utilisation de formulations mucoadhésives a été maintes fois proposée afin de prolonger le temps de résidence intestinal d'un vecteur (*Bernkop-Schnurch, 2005*). Cependant, le renouvellement rapide de la couche de mucus (12-24 h) impose un intervalle de temps limite à l'intérieur duquel une dose suffisante de PA devra être libérée et absorbée. Aussi, l'adsorption aux surfaces mucoales autres que l'intestin (*e.g.* muqueuse de l'œsophage ou muqueuse gastrique) pourrait s'accompagner de problèmes de reproductibilité de dose et même de toxicité. Cet inconvénient peut aisément être réglé par l'administration du vecteur contenu dans des comprimés ou capsules entériques.

Vecteurs et administration orale

Vecteurs lipidiques

Systèmes émulsifiés

L'impact positif des lipides sur la biodisponibilité orale d'une PA est démontré par l'effet post-prandial observé pour certains PAs hydrophobes (*Fleisher, 1999*). En favorisant la sécrétion de sels biliaires et donc la formation de micelles, la présence de matières grasses peut modifier le profil de dissolution (solubilisation micellaire) et le mécanisme

d'absorption (voie lymphatique) (*Humberstone, 1997*). Ces mêmes bénéfices sont observés lors de l'inclusion de lipides dans une formulation. À cela s'ajoute un effet possible sur la perméabilité membranaire (*Gursoy, 2004*) et sur la P-gp (*Constantinides, 2007*), deux propriétés associées soit au lipide lui-même soit aux surfactants généralement ajoutés à la formulation. Seulement, l'instabilité à long terme des composantes lipidiques et les difficultés de fabrication de telles formulations sont un frein à leur utilisation plus répandue. Ce n'est que depuis la démonstration de leur efficacité clinique, notamment pour l'administration de CsA que les formes émulsifiées connaissent un regain d'intérêt (*Fleisher, 1999*).

a. Choix de la phase lipidique

La sélection de la phase lipidique constitue une des premières étapes du processus de fabrication. Ce choix se fait généralement de façon empirique de manière à assurer la solubilisation de quantités raisonnables de PAs (*Fleisher, 1999*). Toutefois, la majorité des PAs, mêmes hydrophobes, sont relativement peu solubles dans les huiles (triglycérides), ce qui peut affecter les rendements d'encapsulation (*Pouton, 2000*). L'utilisation d'huiles végétales hydrolysées (mono/diglycérides) ou modifiées est souvent préférée en raison de leur meilleur pouvoir solubilisant (*Gursoy, 2004*).

b. Émulsions auto-formantes

Les émulsions auto-formantes diffèrent des émulsions classiques. Il s'agit de systèmes thermodynamiquement stables et isotropiques. Elles sont constituées d'un mélange d'huile, de PA et de tensioactifs. La proportion des différents ingrédients est ajustée, à l'aide d'un diagramme de phase, de façon à ce que le mélange forme spontanément une dispersion huile-dans-l'eau (H/E) dans l'intestin. Généralement, ceci requiert d'importantes quantités de tensioactifs (Tableau 1.7). Typiquement, l'usage d'un tensioactif neutre est préféré de façon à limiter la toxicité sur la muqueuse intestinale. Parfois, l'ajout d'un co-solvant hydrophile (*p.ex.* éthanol, propylène glycol, PEG) s'avère nécessaire afin d'aider la solubilisation du surfactant ou du PA (*Gershanik, 2000*).

Tableau 1.7. Caractéristiques des différentes émulsions colloïdales auto-formantes. (Brusewitz, 2007; Pouton, 2000)

	<i>Émulsions auto-formantes</i>		
	Émulsions classiques	Micro-émulsions	Nano-émulsions
% Triglycérides ou diglycérides	40-80	<20	45-60
Surfactants (% p/p)	20-60	30-60	30-60
Co-solvants hydrophiles		20-50	« 10
Diamètre des particules de la phase dispersée (nm)	100-300	<50	10-200
Aspect	Laiteux	Micro-émulsion transparente	Transparent ou translucide

Les émulsions auto-formantes ont été surtout étudiées pour l'administration de PAs hydrophobes. L'exemple le plus connu demeure celui de la CsA, qui illustre l'efficacité de ce type de formulation, mais aussi l'effet des propriétés physico-chimiques du système utilisé. La CsA (1202.6 g/mol) est un peptide cyclique, hydrophobe utilisé comme immunomodulateur dans la prévention du rejet de greffes. Elle a d'abord été commercialisée sous la forme d'une solution huileuse, le Sandimmune[®], qui forme une émulsion macroscopique au contact des liquides gastro-intestinaux. La biodisponibilité moyenne du peptide ainsi formulé pouvait atteindre 30%, mais pouvait varier de 2 à 89%, selon les individus (Mueller, 1994; Vonderscher, 1994). Ceci était dû au fait que l'absorption de CsA à partir du Sandimmune[®] nécessite la digestion préalable de la phase lipidique (solubilisation par les sels biliaires) et peut donc varier selon le moment de la prise par rapport aux repas (Gursoy, 2004). La volonté de réduire la variabilité inter-individuelle et d'améliorer le

profil pharmacocinétique de la CsA a mené à la mise en marché d'une seconde formulation, une micro-émulsion, le Neoral[®]. La comparaison des paramètres pharmacocinétiques a révélé une absorption plus rapide (1.5-2 vs 3.5 h) et plus importante de la CsA à partir du Neoral[®], se traduisant par une biodisponibilité de 1.7 à 2.4 fois plus élevée. De surcroît, contrairement à son prédécesseur, l'aire sous la courbe (ASC) du Neoral[®] varie de façon linéaire avec la dose, ce qui facilite grandement les ajustements de dose (Mueller, 1994). D'autres exemples de formulations commerciales à base d'émulsions auto-formantes sont présentés au Tableau 1.8.

Tableau 1.8. Formulations commerciales à base d'émulsions auto-formantes

Formulation	Phase Huileuse	Tensioactif % (p/p)	Co-solvant % (p/p)	Contenu en PA % (p/p)	Forme pharmaceutique
Cyclosporine A (Neoral [®])	Huile de maïs hydrolysée	Huile de ricin hydrogénée poly(oxyéthylée)	Propylène glycol Éthanol	10	Capsules Solution orale
Ritonavir (Norvir [®])	Acide oléique Acide oléique & huile de noix de coco fractionnée	Cremophor EL	Éthanol & propylène glycol Éthanol,	8	Solution orale Capsule
Saquinavir (Fortavase [®])	dl- α - tocopherol	Diglycérides à chaîne moyenne		16	Capsule

c. Nanoparticules lipidiques solides

Les nanoparticules lipidiques solides (NLS) sont des particules colloïdales obtenues à partir d'un mélange de lipides solides, de surfactants et d'eau. Plus précisément, les NLS sont isolées suite à la précipitation ou à la solidification de la phase organique d'une émulsion H/E. Les lipides sélectionnés peuvent être des triglycérides, glycérides ou des

acides gras. Ils ont en commun une température de fusion suffisamment élevée pour demeurer solides à 37°C. Le PA est généralement ajouté aux lipides fondus lors de l'émulsification. Dans le cas de molécules fragiles, un procédé ne nécessitant pas le chauffage de la phase huileuse est préféré (*p.ex.* émulsion-évaporation) (Müller, 2000).

Comme les émulsions auto-formantes, les NLS ont le plus souvent été étudiées pour le transport de molécules hydrophobes (Luo, 2006; Venkateswarlu, 2004; Yang, 1999), la solubilisation du PA dans la matrice lipidique ayant un impact positif sur son profil de dissolution et donc sur sa biodisponibilité orale. Ceci a été confirmé *in vivo* lors de l'administration de vinpocétine, un supplément naturel utilisé dans le traitement de troubles de la mémoire, formulé à l'aide de NLS de monostéarate de glycéryle. Lors de cette étude, l'influence de la nature (polysorbate 80 ou Cremophor EL) et de la concentration de tensioactif (1-2 % *p/p*) a également été évaluée. Une augmentation de l'ASC de 3 à 4 fois par rapport au contrôle (solution aqueuse) a été notée, les meilleurs résultats ayant été obtenus aux plus fortes concentrations de surfactant. En contrepartie, la nature du tensioactif employé n'a eu aucune influence sur l'absorption intestinale de la molécule (Luo, 2006).

Garcia-Fuentes *et al.* (2002) ont décrit un procédé de double émulsion permettant l'incorporation d'insuline à l'intérieur de NLS de tripalmitine, enrobées ou non d'un polymère hydrophile (poloxamer 188 ou PEG). En fait, il ressort de cette étude que la présence d'un polymère à la surface des NLS peut avoir un impact positif à la fois sur la stabilité en milieu acide et en présence d'enzymes digestifs. Toutefois, les auteurs n'ont fourni aucune donnée quant au rendement d'incorporation, ou à l'effet thérapeutique. Plus tard, Liu *et al.* (2007) ont proposé un protocole impliquant la dispersion de micelles inverses de surfactant (phosphatidylcholine de soya, cholate sodique et eau) et d'insuline au sein d'une matrice lipidique composée d'un mélange d'acides stéarique et palmitique. Ce procédé a permis d'augmenter significativement l'affinité du peptide pour la phase lipidique, générant des taux d'encapsulation de ~ 19% (*p/p*). Encore une fois, l'absence de

données expérimentales *in vivo* ne permet pas de prédire l'efficacité réelle des NLS pour ce type d'application.

d. Émulsions solides

Les émulsions solides sont des dispersions H/E dont la phase aqueuse a été retirée par lyophilisation, évaporation sous vide ou atomisation (*Pedersen, 1998*). La formation de particules colloïdale solides se fait en présence de lactose ou de maltodextrine qui sont ajoutés au moment de l'émulsification (*Dollo, 2003; Jang, 2006*). Le PA peut être solubilisé directement dans la phase huileuse (*Jang, 2006*) ou encore dispersé en présence de tensioactifs (*Dollo, 2003*). Suite à l'administration orale, l'émulsion d'origine est reconstituée spontanément dans les liquides gastro-intestinaux, sous l'action du péristaltisme. Dès lors, le comportement de la formulation est dicté par les propriétés physico-chimiques de la dispersion nouvellement formée. En plus d'une stabilité accrue permettant un entreposage à long terme, ce type de formulation peut être administré sous la forme de comprimés ou de capsules.

Liposomes

Les liposomes naissent de l'auto-assemblage de phospholipides en bicouche concentriques autour d'un compartiment aqueux (*Simard, 2006*). Selon le nombre de bicouches formées, ils peuvent être unilamellaires (une couche) ou multilamellaires (> 1 couches). Les liposomes ont été utilisés autant pour le transport de molécules hydrophiles qu'hydrophobes qui seront, respectivement, solubilisées dans le compartiment central ou enchâssées dans la membrane (*Simard, 2006*).

L'instabilité des liposomes dans les liquides gastro-intestinaux représente la préoccupation majeure liée à leur administration orale. Les liposomes doivent être en mesure de résister à l'acidité gastrique, à l'action de la phospholipase A₂ et à la solubilisation des composantes lipidiques par les sels biliaires (*Kisel, 2001; Rogers, 1998*). La stabilité des liposomes est déterminée principalement par leur composition, leur taille et

le nombre de bicouches (Rogers, 1998). De façon générale, une variation seule de la composition lipidique ne suffit pas à assurer une stabilité adéquate aux liposomes. Néanmoins, l'utilisation de dérivés stéarique ou palmitique de phosphatidylcholine est préférée puisque ces lipides offrent une certaine rigidité à la membrane (Maitani, 1996), qui peut être accrue davantage par l'ajout de 10 à 40 mol% de cholestérol ou de glucosides (Iwanaga, 1997). Une alternative consiste à modifier les propriétés de surface des vésicules. Ceci peut se faire en introduisant un lipide anionique, de préférence présentant une température de transition élevée (Kisel, 2001) ou plus simplement en enrobant les liposomes d'un polymère hydrophile. Bien que le poly(éthylène glycol) (PEG) demeure le polymère le plus employé (Iwanaga, 1997), l'utilisation d'un agent muco-adhésif tels le chitosan (Takeuchi, 1996), la méthylcellulose (Degim, 2004) ou même les lectines (Zhang, 2005) a également été proposée afin d'améliorer le temps de résidence intestinal et promouvoir l'internalisation cellulaire. Outre le choix des lipides, la stabilité dans le TGI peut être modulée par l'emploi de vésicules multilamellaires (Anderson, 2001) ou encore de liposomes polymérisés. Ces derniers sont obtenus suite à la réticulation de lipides fonctionnalisés dont le 1,2-di(2,4-octadécadiénoyl)-sn-glycérol-3-phosphorylcholine en présence de $\text{NaHSO}_3/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Chen, 1996; Clark, 2001).

L'insuline constitue le modèle le plus souvent utilisé lors de l'étude de formulations liposomales orales, en raison de la facilité avec laquelle son effet pharmacologique peut être mesuré (*i.e.* diminution de la glycémie) (Iwanaga, 1997; Katayama, 2003; Kisel, 2001; Zhang, 2005). Selon la composition lipidique, des taux de chargement allant jusqu'à 8% (*p/p*) ont été atteints: les meilleurs rendements ont été généralement obtenus lorsqu'une interaction électrostatique était possible entre l'insuline et les lipides (Kisel, 2001). Dans la majorité des cas, l'efficacité thérapeutique de l'hormone a été conservée et même améliorée, quoique l'absence de contrôles adéquats rende parfois l'interprétation des données difficile. En résumé, les résultats obtenus sont venus corroborer les principes théoriques énoncés précédemment, à savoir qu'une augmentation de la rigidité (Kisel, 2001), l'addition d'un polymère hydrophile (Iwanaga, 1997) ou d'un ligand permettait

d'améliorer l'efficacité. Ce dernier point a été particulièrement bien illustré par Zhang *et al.* (2005) qui ont évalué l'efficacité *in vivo* d'une formulation liposomale d'insuline ciblée à l'aide de WGA. Contrairement aux vésicules nues (lécithine de soya/cholestérol) qui n'ont démontré aucune différence pas rapport à la solution aqueuse du peptide (absence d'effet), les liposomes ciblés ont permis une réduction de la glycémie atteignant 60% au nadir. Cela s'est traduit par une biodisponibilité orale d'environ 9% (relative à la voie sous-cutanée).

Cochléates

Un second type de colloïde constitué de phospholipides, les cochléates, a récemment été proposé pour l'administration orale d'agents thérapeutiques. Les cochléates diffèrent des liposomes par l'arrangement des phospholipides en feuillets enroulés et l'absence de compartiment central aqueux (Figure 1.10). Ils sont généralement obtenus suite à la fusion de liposomes constitués de dérivés de phosphatidylsérine en présence de calcium (Mannino, 1998). L'utilisation de cochléates a permis d'augmenter la biodisponibilité orale de divers agents hydrophobes, dont l'amphotéricine B, un antifongique. Lors d'une étude *in vivo*, l'administration quotidienne de formulations d'amphotéricine B à base de cochléates sur une période de 15 jours a permis de prévenir le décès de souris infectées au *Candida albicans*, à une dose aussi faible que 0.5 mg/kg. À cet égard, la formulation de cochléates s'est comparée avantageusement à la préparation micellaire commerciale (Fungizone[®]). La formulation liposomale, quant à elle, a nécessité une dose 20 fois plus élevée (10 mg/kg) pour produire le même effet (90% de survie) (Santangelo, 2000).

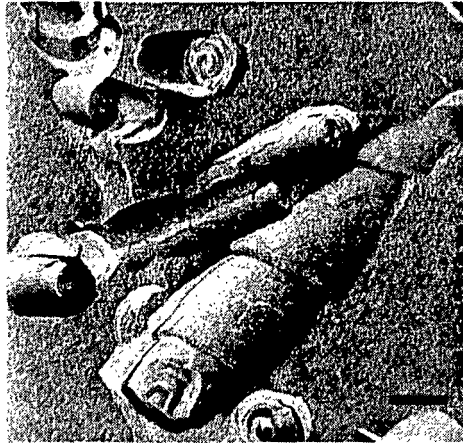


Figure 1.10. Image de cochléates obtenue par microscopie électronique. Reproduit de (Zarif, 2002) avec permission de Elsevier Ltd.

Vecteurs polymères

Conjugués macromoléculaires

La conjugaison ou la complexation d'une entité active hydrophobe à une macromolécule hydrophile représente un des moyens les plus simples pour améliorer sa solubilité dans les liquides biologiques. Pourtant, en dehors des cyclodextrines (Brewster, 2007) et des dendrimères de poly(amidoamine) (D'Emanuele, 2004; Najlah, 2007) cette voie a été relativement peu explorée. En fait, la formation de conjugués a surtout été évaluée pour l'administration orale de peptides. Le but recherché est alors de prévenir la dégradation de la molécule liée et de promouvoir son absorption intestinale. L'approche la plus courante consiste à conjuguer le peptide à un polymère hydrophile, généralement le PEG. L'efficacité d'un tel procédé à soustraire le peptide de l'action des protéases a été démontré à plusieurs reprises (Calceci, 2004; Jensen-Pippo, 1996; Youn, 2006). Cet effet serait dépendant de la masse molaire du PEG (Youn, 2006) et du nombre de chaînes conjuguées (Calceci, 2004) et s'expliquerait par l'encombrement stérique créé par le PEG. Lors d'essais *in vitro* sur des Caco-2, la présence de PEG n'a cependant pas permis d'augmenter le transport du peptide lié, que ce soit l'insuline (Calceci, 2004) ou la

calcitonine (Youn, 2006). Ceci s'explique par la perméabilité limitée du PEG en raison de sa masse molaire élevée et de son caractère hydrophile.

Micro- et nanoparticules de polymère

Les micro- et nanoparticules de polymère sont des structures matricielles obtenues par émulsion simple (H/E) ou double (E/H/E), selon la nature, hydrophobe ou hydrophile, du PA incorporé (De Jaeghere, 2000; Meissner, 2007). Les poly(ester)s ont longtemps été le matériau de choix dans la fabrication de particules en raison de leur biocompatibilité et biodégradabilité. Avec le temps, la démonstration des bienfaits de la mucoadhésion a popularisé l'emploi de chitosan (Varma, 2006) ou d'alginate de sodium (Kim, 2005). Les particules peuvent également être préparées de façon à répondre aux variations de pH. À cet égard, les dérivés d'acide (méth)acrylique demeurent les plus utilisés soit comme constituants de la matrice (De Jaeghere, 2000) ou comme enrobage (Hillery, 2001). En modulant le profil de libération, l'introduction d'un polymère sensible au pH permet également de contrôler, du moins partiellement, la libération rapide et précoce du PA (effet de « *burst* ») en évitant qu'elle ne se produise dans l'estomac (Cui, 2007).

Administration de PAs hydrophobes

Les particules polymères solides ont le potentiel d'augmenter significativement la biodisponibilité de PAs faiblement solubles. Cet effet serait dû entre autre à une meilleure solubilisation de l'agent thérapeutique au sein de la matrice, ce qui lui permet d'être libéré à l'état moléculaire dans le milieu intestinal (équation 4). Ce fut le cas, par exemple, lors de l'incorporation de carbamazépine (solubilité 113 µg/mL, 25°C) à l'intérieur de microparticules composées d'Eudragit® L100-55 (poly(acide méthacrylique-co-méthacrylate de méthyle 1:1)). En effet, l'encapsulation a permis d'améliorer significativement le profil d'absorption du PA (ASC de 27.2 vs 5.8 µgh/mL, pour le mélange physique) ce, malgré la libération prématurée d'une forte proportion de PA (~ 75% du PA en <10 min) (Dong, 2007).

Administration orale de macromolécules hydrophiles

a. Peptides

L'administration orale de peptides représente l'application la plus souvent rapportée pour les particules de polymère (*des Rieux, 2006*). Les bénéfices démontrés sont liés à la protection du PA contre la dégradation enzymatique. Souvent, l'encapsulation du peptide permet d'obtenir un effet thérapeutique plus important et plus soutenu que le peptide en solution. Par exemple, la diminution de la glycémie (40% de la valeur de base) détectée suite à l'administration d'insuline formulée à l'aide de nanoparticules de PLGA a été maintenue durant au moins 18 h (*Cui, 2007*). Toutefois, malgré une amélioration significative de l'activité biologique, la biodisponibilité orale de l'insuline (20 IU/kg) a à peine atteint 5% (*Cui, 2007; Damgé, 2007*). De meilleurs résultats ont été obtenus lors de l'utilisation de nanoparticules cationiques composées d'Eudragit® RS ($F = 13.21\%$), bien que la dose d'insuline administrée soit également plus élevée (50 IU/kg).

b. Héparine

L'héparine est un glycosaminoglycan utilisé en clinique pour son action anticoagulante. À l'instar des peptides/protéines, cette macromolécule doit être administrée par la voie parentérale en raison de sa faible biodisponibilité orale. L'absorption intestinale de l'héparine est limitée principalement par sa masse molaire élevée et par la présence de multiples charges négatives. Aussi, l'encapsulation de ce PA à l'intérieur de particules de polymère a-t-elle été proposée afin d'améliorer son profil d'absorption (*Jiao, 2002b*).

Jiao et al. (2002a) ont évalué l'effet de la composition et de la taille des particules sur la biodisponibilité orale de l'héparine (*Jiao, 2002a; Jiao, 2002b*). Dans un premier temps, ils se sont attardés à mesurer l'efficacité de nanoparticules de PLGA, poly(caprolactone) (PCL) ou de dérivés acryliques (Eudragit RS ou RL^{®1}) ou d'un mélange

¹ Les Eudragit RS/RL[®] sont des copolymères de dérivés (méth)acrylate et d'ammoniums quaternaires.

des deux (RL/PCL; RS/RL/PLGA; RS/PLGA 1 :1) (Jiao, 2002b). Les taux d'encapsulation les plus élevés ont été obtenus avec les nanoparticules à base d'Eudragit RL ou RS[®], combinés ou non au PCL (~ 10-20 kIU/g polymère). Ces polymères ont aussi été associés aux profils de libération les plus avantageux. *In vivo*, les NPs de RL/PCL et de RS/RL/PLGA se sont révélées les plus efficaces, avec une biodisponibilité orale absolue de 23 et 12%, comparé à ~ 10% pour les particules de RS +/- PLGA. En comparaison, l'emploi de microparticules de RS/RL/PLGA ou de RS/PLGA a permis d'élever la biodisponibilité orale de l'héparine au-dessus de 40% malgré un taux d'encapsulation similaire (~ 20% p/p).

Vaccination orale

L'emploi de microparticules pour l'administration orale de vaccins a été rapportée, autant pour l'acheminement d'antigènes protéiques (des Rieux, 2006) que de vaccins à base d'ADN (O'Hagan, 2004). L'attrait de ces particules repose sur leur internalisation préférentielle par les cellules M par rapport aux entérocytes (Eldridge, 1990). Le bien fondé de cette approche a été illustré lors de l'administration orale de l'agglutinine filamenteuse du *Bordetella pertussis* encapsulée à l'intérieur de microparticules de PLGA (2 µm). La présence d'anticorps spécifiques (IgG et/ou IgA) pouvait être détectée non seulement dans le sérum mais aussi dans la salive et les fèces (Jones, 1996). L'immunisation a également permis aux animaux de mieux résister à l'infection bactérienne lors d'une exposition subséquente au *B. pertussis*. Malgré une certaine efficacité, les microparticules sont lentement délaissées au profit des nanoparticules particulièrement depuis l'émergence de données indiquant une internalisation plus efficace des particules de ~500 nm par les cellules M. Bien que l'utilisation de nanoparticules à cette fin en soit encore à ses débuts, les premiers résultats, prometteurs, semblent justifier l'approche (des Rieux, 2006).

Micelles polymères

Les micelles polymères se forment au-dessus d'une concentration critique lors de l'association de chaînes amphiphiles dans un solvant sélectif. Lorsque le solvant est

aqueux, la micelle présente un cœur hydrophobe entouré d'une couronne hydrophile. Les micelles polymères (MPs) diffèrent des micelles de surfactant notamment par une stabilité accrue en milieu dilué en raison d'une concentration micellaire critique (CMC) plus faible et d'une cinétique de dissociation plus lente. Malgré cela, suite à l'administration orale, l'importante dilution subie par les MPs peut mener à la dissociation du vecteur, à la libération prématurée du PA et possiblement à sa précipitation dans les liquides intestinaux. Récemment, un nouveau type de micelles, intrinsèquement stables en milieu dilué, a été décrit. Ces micelles dites « unimoléculaires » (MUs) ont été obtenues à partir de polymères branchés; les chaînes amphiphiles sont donc liées les unes aux autres de façon covalente et la micelle ne peut se dissocier. L'utilisation de polymères branchés amphiphiles a également été proposée dans l'élaboration de micelles inverses (Mis). Ces dernières présentent une structure cœur-couronne. Cependant, la région centrale est hydrophile et l'enveloppe, hydrophobe. Les MIs sont insolubles dans l'eau, mais peuvent être employées dans la solubilisation de composés hydrophiles en milieu organique ou peu polaire.

Les caractéristiques des différents types de MPs ont fait l'objet d'une revue de littérature qui est présentée au chapitre suivant. Par conséquent, le texte qui suit se limite aux applications des MPs pour la voie orale.

Micelles et administration orale

L'administration orale de formulations à base de MPs a fait l'objet d'un nombre limité d'études (Tableau 1.9). Pourtant, à l'instar des nanoparticules de polymères, les MPs peuvent solubiliser des quantités appréciables d'un PA hydrophobe et permettre sa libération à l'état moléculaire. Cette propriété est en partie responsable de l'attrait des MPs pour l'administration d'agents thérapeutiques, autant pour la voie parentérale que orale.

Tableau 1.9. Description de formulations orales à base de MPs.

Polymères ^(a)	Taille (nm)	PA % (p/p) incorporé	Référence
mPEG- <i>b</i> -PLA : PLA-COOH :PLA-COONa	27	Itraconazole (> 8 %)	(Yi, 2007)
PEG- <i>b</i> -PDENA	20	Paclitaxel (18.4-37.4 %)	(Lee, 2007)
PEG- <i>b</i> -P(CL- <i>co</i> -TMC)	n.d. ^(b)	Rispéridone (n.d.)	(Ould-Ouali, 2005)
PEG- <i>b</i> -P(AnB- <i>co</i> -AMA)	31	Fénofibrate (15.6%)	(Sant, 2005)
PEG- <i>b</i> -PLA	27	Griséofulvine (0,4-0,7%)	(Pierri, 2005)
PEG-DSPE/TPGS	14	Paclitaxel (3.5%)	(Dabholkar, 2006)
PEI ⁺ -C16	100-300	CsA (n.d) ^(b)	(Cheng, 2006)
Poloxamère- <i>g</i> -PEI	60-240 (avec PA)	Oligonucléotide (0,7-1.11 nmol/mg))	(Vinogradov, 2004)
Poloxamère	165 nm	plasmide	(Chang, 2004)
DEX/ HPC- <i>g</i> -PEG-C16 +/- Vitamine B ₁₂	11-44 (dextran) 78-90 (HPC)	CsA (1-9 %)	(Francis, 2003a; Francis, 2003b)
PEG-DSPE	6 (avec PA)	Porphyrine méso-tétraphényle (10%)	(Sezgin, 2007)

^(a) **PLA** : poly(acide lactique); **PDENA** : poly(2-(4-vinylbenzyloxy)-N,N-diéthylnicotinamide); **P(CL-*co*-TMC)** : poly(caprolactone-*co*-carbonate de triméthylène); **P(AnB-*co*-AMA)** : poly(acrylate de *n*butyl-*co*-acide méthacrylique); **DSPE** : distéroylphosphatidyléthanolamine; **TPGS**: succinate de D- α -tocophéryl-PEG; **PEI+**: Poly(éthylène imine) quaternisée; **DEX** : dextran; **HPC** : hydroxypropyl cellulose. **PEG-C16** : éther cétyle de PEG.

^(b) n.d. : non disponible.

a. Solubilisation micellaire

La capacité de solubilisation des MPs varie selon le soluté et selon le polymère employé. Il est donc possible d'améliorer le taux de chargement en modifiant la composition des micelles. Par exemple, les quantités d'itraconazole (antifongique)

contenues à l'intérieur de micelles de PEG-*b*-PLA, ont pu être augmentées de plus de 8 fois suite à l'introduction de chaînes de PLACOOH ou PLACOO⁻Na libres dans le cœur micellaire. Administrée par voie orale, cette formulation a généré des taux plasmatiques comparables à la formulation commerciale, le Sporanox[®], dans laquelle le PA est solubilisé grâce à la 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (Yi, 2007).

b. Absorption intestinale et inhibition de la Pgp

L'interaction des micelles avec la membrane intestinale a été peu caractérisée. Bien qu'en théorie, la petite taille des micelles puisse faciliter leur diffusion à travers la couche de mucus, l'importante hydrophilie de la couronne risque de limiter l'absorption du vecteur (Behrens, 2001). Méthot *et al.* (2006) se sont intéressés au phénomène et ont étudié l'absorption de MPs de PEG₇₅₀-*b*-poly(caprolactone-*co*-carbonate de triméthylène) PEG-*b*-P(CL-*co*-TMC) radiomarqué, sur un modèle cellulaire de Caco-2, puis *in vivo* chez le rat. *In vitro*, l'absorption du polymère s'est révélée dépendante de la concentration, une augmentation du nombre de micelles en solution étant associée à une diminution du coefficient de perméabilité (P_{app}). Une telle constatation suggère que les MPs sont probablement internalisées par un processus saturable, comme c'est le cas de l'endocytose de contact ou de la pinocytose. *In vivo*, suite à une administration orale chez le rat (1 mg/kg), la présence de radioactivité a pu être détectée dans le sang, le foie, les reins et la rate. En tout, jusqu'à 5% de la dose de MPs a été retrouvée en dehors de l'intestin, ce 8 h après l'administration. Ces niveaux d'absorption sont comparables à ceux qui avaient été observés dans le cas de nanoparticules de PLGA (240 nm) (Yin, 2006). Toutefois, le mécanisme exact d'internalisation n'est pas totalement élucidé.

Zastre *et al* (2002) se sont quant à eux, penchés plus particulièrement sur l'impact que peuvent avoir les MPs sur l'activité de la Pgp. Pour ce faire, ils ont étudié l'influence du PEG₁₇-PCL₂ et du PEG₁₇-PCL₅ sur la diffusion d'un substrat de la Pgp (rhodamine-123) à travers un film de Caco-2. Ils ont observé que les polymères augmentaient l'accumulation de la rhodamine-123 à des concentrations 4 à 100 fois supérieures à la

CMC. Cette accumulation s'est avérée deux fois plus importante que celle observée avec les contrôles, soit le vérapamil (50 μM) et la CsA (4 μM). Les auteurs ont émis différentes hypothèses pour expliquer ces observations, notamment l'inhibition directe de la Pgp par les unimères, la promotion du passage transcellulaire de la PA ou l'endocytose de la micelle entière (Figure 1.11). Une étude exhaustive des mécanismes impliqués semble indiquer que l'inhibition de la Pgp serait due à une augmentation de la rigidité membranaire suite à l'insertion d'unimères dans la membrane (Zastre, 2004; Zastre, 2007). À l'inverse, en présence de Pluronic[®] P85, l'inhibition de la Pgp était maximale à des concentrations légèrement inférieures à la CMC (Batrakova, 1998a; Batrakova, 1998b). Dans ce cas, l'effet inhibiteur serait dû à l'accroissement de la fluidité membranaire et à une inhibition de l'activité ATPase nécessaire au fonctionnement de la Pgp.

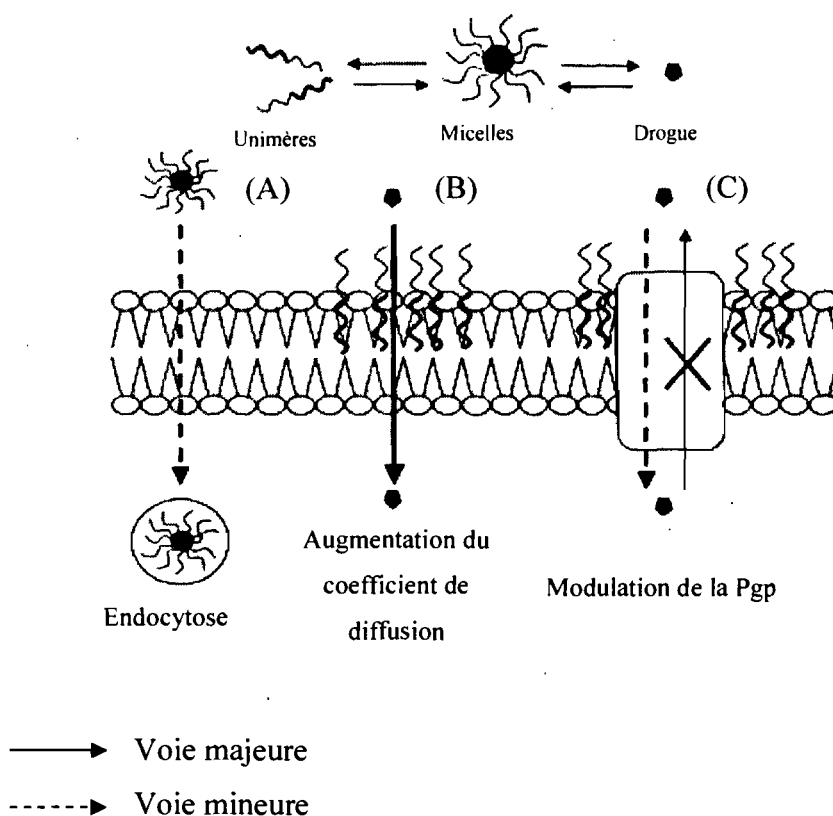


Figure 1.11. Illustration des mécanismes impliqués dans l'évitement du transport d'efflux par les MPs composées de PEG-*b*-PCL. (A) Endocytose de la micelle; (B) Action perméabilisante des unimères insérés au niveau de la membrane; (C) Inhibition de l'activité ATPase de la Pgp par les unimères enchassés dans la membrane. Reproduit avec permission (Zastre, 2002).

c. Études chez l'animal

La plupart des systèmes évalués ont démontré une bonne performance *in vitro*, que ce soit en terme du rendement d'encapsulation (Lee, 2007), du profil de libération (absence de « burst ») (Dabholkar, 2006) ou de la stabilité en présence de sels biliaries (Pierri, 2005). *In vivo*, ceci s'est généralement traduit par une augmentation de la biodisponibilité du PA encapsulé. Par exemple l'incorporation de paclitaxel (3.8 mg/kg) à l'intérieur de

micelles de PEG-*b*-poly(2-(4-vinylbenzyloxy)-*N,N*-diéthylnicotinamide) a permis d'augmenter sa biodisponibilité orale de près de 2 fois, atteignant 12.4% (Lee, 2007), comparé à une valeur de 6.5% pour la formulation commerciale (Taxol[®]). À l'inverse, l'encapsulation de rispéridone à l'intérieur de MPs n'a pas permis d'augmenter la biodisponibilité orale du PA. Ceci serait dû à une rétention trop importante du soluté par les micelles (Ould-Ouali, 2005).

À cet égard, l'introduction de groupements ionisables à l'intérieur du cœur micellaire tel que proposé par Sant *et al.* (2005) représente une solution intéressante afin de d'assurer la libération du PA. Il est attendu que ces micelles, sensibles au pH demeurent intactes dans l'estomac à pH acide pour n'être déstabilisées que dans l'intestin, suite à l'ionisation des fonctions carboxyliques. Cette hypothèse a d'abord été confirmée *in vitro* lors des essais de libération d'une molécule hydrophobe modèle à partir de micelles. Par la suite, les résultats des études de biodisponibilité *in vivo* chez le rat sont venus réaffirmer le bien-fondé de l'approche. En effet, l'encapsulation de fénofibrate à l'intérieur de telles MPs a permis d'augmenter la biodisponibilité de la PA de 156% et 15% comparé à une suspension de fénofibrate dans la carboxyméthyl cellulose sodique et à la formulation commerciale de fénofibrate micronisé (Lipidil Micro[®]), respectivement.

d. Transport de molécules hydrophiles

L'usage des MPs ne s'est pas limité aux PAs hydrophobes. En effet, des micelles de poly(éthylène imine) (PEI) greffée à un polymère tribloc de type poloxamère ont été exploitées pour l'administration orale d'oligonucléotides chez la souris immunodéprimée (Chang, 2004). Les résultats de cette étude ont mis en évidence une augmentation de l'efficacité de transfection suite à l'encapsulation du plasmide. Cet effet pouvait être potentialisé en présence d'un promoteur de l'absorption.

Micelles unimoléculaires (MUs)

L'utilisation de MUs à des fins thérapeutiques a été peu décrite dans la littérature (*Liu, 2000a; Liu, 2000b*). Pourtant, ces micelles constituent une alternative attrayante aux MPs conventionnelles. Cependant, les taux d'encapsulation obtenus avec les MUs sont généralement plus faibles qu'avec les MPs conventionnelles. Néanmoins *Liu et al. (2000b)* ont rapporté des taux d'environ 10% (*p/p*), ce qui se rapproche des valeurs obtenues pour certaines formulations micellaires conventionnelles .

Micelles polymères inverses

L'encapsulation d'un composé hydrophile à l'intérieur de micelles inverses permet d'augmenter sa solubilité en milieu organique ou apolaire. Cependant, les molécules thérapeutiques ne comptent que pour une très faible proportion des solutés étudiés. En effet, la majorité des systèmes développés l'ont été pour des applications en chimie organique (*Mecking, 2000; Slagt, 2002*). Par conséquent, le type de polymère utilisé ou le véhicule organique sélectionné revêtait une moindre importance. *Tripathi et al. (2002)* furent les premiers à rapporter l'utilisation de micelles inverses pour le transport d'un agent thérapeutique, le 5-fluorouracile (*Tripathi, 2002*). Cependant, leur système ne tire pas avantage des propriétés particulières des MIs puis qu'elles sont administrées sous forme d'une dispersion aqueuse. Une partie des travaux effectués dans le cadre de cette thèse a porté sur l'utilisation de MIs dans la mise au point de formulations oléagineuses de peptide.

Conclusion

Bien que la voie orale demeure la voie privilégiée pour l'administration d'agents thérapeutiques, la mise au point d'une formulation ne se fait pas sans heurt. Quoique différentes approches puissent être envisagées, l'utilisation de vecteurs synthétiques s'est avérée une voie intéressante. Cependant, malgré un nombre impressionnant d'études, les caractéristiques d'un vecteur idéal ne peuvent être clairement définies. Certaines propriétés

sont essentielles, notamment une capacité de chargement adéquate ou la stabilité dans les liquides gastro-intestinaux. Le vecteur doit aussi retenir efficacement le PA de façon à éviter que ce dernier ne soit libéré prématurément au contact des liquides intestinaux (effet de « *burst* »). En dehors de ces quelques critères de base, le choix d'un vecteur semble se faire de façon empirique. Malgré cela, la plupart des vecteurs se sont avérés efficaces et ont permis d'augmenter la biodisponibilité orale de nombreux PAs autant hydrophobes (*i.e* paclitaxel, CsA, amphotéricine B, *etc.*) qu'hydrophiles (*i.e* insuline, calcitonine, GCSF, héparine, *etc.*). Toutefois, ces résultats doivent être confirmés chez l'humain, afin de déterminer le potentiel réel des différents vecteurs.

Références

- Anderson, K. E., Eliot, L. A., Stevenson, B. R. and Rogers, J. A. (2001). Formulation and evaluation of a folic acid receptor-targeted oral vancomycin liposomal dosage form. *Pharm Res* 18: 316-322.
- Artursson, P., Palm, K. and Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 46: 27-43.
- Aungst, B. J. (2000). Intestinal permeation enhancers. *J Pharm Sci* 39: 429-442.
- Balimane, P. V. and Chong, S. (2005). Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discov Today* 10: 335-343.
- Bannister, L. (1995). Alimentary system In *Gray's anatomy: the anatomical basis of medicine and surgery*. L. H. Bannister, M. M. Berry, P. Collins, M. Dyson, J. E. Dussek and M. W. J. Ferguson. Eds. Churchill Livingstone, New York. 1683-1812.
- Batrakova, E. V., Han, H. Y., Alakhov, V. Y., Miller, D. W. and Kabanov, A. V. (1998a). Effects of pluronic block copolymers on drug absorption in caco-2 cell monolayers. *Pharm Res* 15: 850-855.
- Batrakova, E. V., Han, H. Y., Miller, D. W. and Kabanov, A. V. (1998b). Effects of Pluronic P85 unimers and micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells. *Pharm Res* 15: 1525-1532.

- Behrens, I., Stenberg, P., Artursson, P. and Kissel, T. (2001). Transport of lipophilic drug molecules in a new mucus-secreting cell culture model based on HT29-MTX cells. *Pharm Res* 18: 1138-1145.
- Behrens, I., Pena, A. I., Alonso, M. J. and Kissel, T. (2002). Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport. *Pharm Res* 19: 1185-1193.
- Benet, L. Z., Izumi, T., Zhang, Y. C., Silverman, J. A. and Wachter, V. J. (1999). Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release* 62: 25-31.
- Benet, L. Z. and Cummins, C. L. (2001). The drug efflux-metabolism alliance: biochemical aspects. *Adv Drug Deliv Rev* 50: S3-S11.
- Bernkop-Schnurch, A., Hornof, M. and Zoidl, T. (2003). Thiolated polymers--thiomers: synthesis and in vitro evaluation of chitosan-2-iminothiolane conjugates. *Int J Pharm* 260: 229-237.
- Bernkop-Schnurch, A., Pinter, Y., Guggi, D., Kahlbacher, H., Schöffmann, G., Schuh, M., Schmerold, I., Dorly deliv Curto, M., D'antonio, M., Esposito, P. and Huck, C. (2005). The use of thiolated polymers as carrier matrix in oral peptide delivery--proof of concept. *J Controlled Rel* 106: 26-33.
- Bhattachar, S. N., Deschenes, L. A. and Wesley, J. A. (2006). Solubility: it's not just for physical chemists. *Drug Discov Today* 11: 1012-1018.
- Bies, C., Lehr, C. M. and Woodley, J. F. (2004). Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 425-435.
- Blum, R. A., D'Andrea, D. T., Florentino, B. M., Wilton, J. H., Hilligoss, D. M., Gardner, M. J., Henry, E. B., Goldstein, H. and Schentag, J. J. (1991). Increased gastric pH and the bioavailability of fluconazole and ketoconazole. *Ann Intern Med* 114: 755-757.

- Brewster, M. E. and Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 645-666.
- Brusewitz, C., Schendler, A., Funke, A., Wagner, T. and Lipp, R. (2007). Novel poloxamer-based nanoemulsions to enhance the intestinal absorption of active compounds. *Int J Pharm* 329: 173-181.
- Burton, P. S., Conradi, R. A., Hilgers, A. R. and Ho, N. F. H. (1992). The relationship between peptide structure and transport across epithelial cell monolayers. *J Controlled Release* 19: 87-98.
- Calceti, P., Salmaso, S., Walker, G. and Bernkop-Schnürch, A. (2004). Development and in vivo evaluation of an oral insulin-PEG delivery system. *Eur J Pharm Sci* 22: 315-323.
- Caspary, W. F. (1992). Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am J Clin Nutr* 55: 299S-308S.
- Castella, M. E., Reist, M., Mayer, J. M., Turban, J. J., Testa, B., Boursier-Neyret, C., Walther, B., Delivbos, J. M. and Carrupt, P. A. (2006). Development of an in vitro rat intestine segmental perfusion model to investigate permeability and predict oral fraction absorbed. *Pharm Res* 23: 1543-1553.
- Chalasani, K. B., Russell-Jones, G. J., Yandrapu, S. K., Diwan, P. V. and Jain, S. K. (2007). A novel vitamin B₁₂-nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin. *J Controlled Release* 117: 421-429.
- Chan, L. M. S., Lowes, S. and Hirst, B. H. (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 21: 25-51.
- Chang, S. F., Chang, H. Y., Tong, Y. C., Chen, S. H., Hsiao, F. C., Lu, S. C. and Liaw, J. H. (2004). Nonionic polymeric micelles for oral gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther* 15: 481-494.
- Chen, H. M., Torchilin, V. and Langer, R. (1996). Lectin-bearing polymerized liposomes as Potential oral vaccine carriers. *Pharm Res* 13: 1378-1383.

- Chen, H. M. and Langer, R. (1998). Oral particulate delivery: status and future trends. *Adv Drug Deliv Rev* 34: 339-350.
- Cheng, W. P., Gray, A. I., Tetley, L., Hang Tle, B., Schatzlein, A. G. and Uchegbu, I. F. (2006). Polyelectrolyte nanoparticles with high drug loading enhance the oral uptake of hydrophobic compounds. *Biomacromolecules* 7: 1509-1520.
- Clark, M. A., Blair, H., Liang, L., Brey, R. N., Brayden, D. and Hirst, B. H. (2001). Targeting polymerised liposome vaccine carriers to intestinal M cells. *Vaccine* 20: 208-217.
- Constantinides, P. P. and Wasan, K. M. (2007). Lipid formulation strategies for enhancing intestinal transport and absorption of P-glycoprotein (P-gp) substrate drugs: in vitro/in vivo case studies. *J Pharm Sci* 96: 235-248.
- Crespi, C. L., Langenbach, R. and Penman, B. W. (1990). The development of a panel of human cell lines expressing specific human cytochrome P450 cDNAs. *Prog Clin Biol Res* 340B: 97-106.
- Cui, F.-D., Tao, A.-J., Cun, D.-M., Zhang, L.-Q. and Shi, K. (2007). Preparation of insulin PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery. *J Pharm Sci* 96: 421-427.
- D'Emanuele, A., Jevprasesphant, R., Penny, J. and Attwood, D. (2004). The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability. *J Controlled Release* 95: 447-53.
- Dabholkar, R. D., Sawant, R. M., Mongayt, D. A., Devarajan, P. V. and Torchilin, V. P. (2006). Polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine conjugate (PEG-PE)-based mixed micelles: Some properties, loading with paclitaxel, and modulation of P-glycoprotein-mediated efflux. *Int J Pharm* 315: 148-157.
- Damgé, C., Maincent, P. and Ubrich, N. (2007). Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rat. *J Controlled Rel* 117: 163-170.
- Daugherty, A. L. and Mrsny, R. J. (1999a). Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier- part one. *Pharm Sci Technol Today* 2: 144-151.

- Daugherty, A. L. and Mersny, R. J. (1999b). Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier. *Pharm Sci Technol Today* 2: 281-287.
- De Boer, A. G., Noach, A. B. J., Breimer, D. D. and Hurm, M. A. (1994). The paracellular approach: Drug transport and its enhancement via the paracellular pathway In *Drug absorption enhancement: Concepts, possibilities, limitations and trends*. A. G. De Boer. Eds. Harwood Academic Publishers, Chichester.
- De Jaeghere, F., Allemann, E., Kubel, F., Galli, B., Cozens, R., Doelker, E. and Gurny, R. (2000). Oral bioavailability of a poorly water soluble HIV-1 protease inhibitor incorporated into pH-sensitive particles: effect of the particle size and nutritional state. *J Controlled Release* 68: 291-298.
- Degim, Z., Ünal, N., Essiz, D. and Abbasoglu, U. (2004). The effect of various liposomes formulations on insulin penetration across Caco-2 cell monolayer. *Life Sci* 75: 2819-2827.
- Delivaney, J. S. (2006). Predicting aqueous solubility from structure. *Drug Discov Today* 10: 289-295.
- des Rieux, A., Ragnarsson, E. G. E., Gullberg, E., Preat, V., Schneider, Y. J. and Artursson, P. (2005). Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium. *Eur J Pharm Sci* 25: 455-465.
- des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.-J. and Pr at, V. (2006). Nanoparticle as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J Controlled Rel* 116: 1-27.
- Desai, M. P., Labhasetwar, V., Amidon, G. L. and Levy, R. J. (1996). Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm Res* 13: 1838-1845.
- Desai, M. P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R. J. and Amidon, G. L. (1997). The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pham Res* 14: 1568-1573.

- Didziapetris, R., Japertas, P., Avdeef, A. and Petrauskas, A. (2003). Classification analysis of P-glycoprotein substrate specificity. *J Drug Target* 11: 391-406.
- Dollo, G., Le Corre, P., Guerin, A., Chevanne, F., Burgot, J. L. and Leverage, R. (2003). Spray-dried redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *Eur J Pharm Sci* 19: 273-280.
- Dong, W. Y., Maincent, P. and Bodmeier, R. (2007). In vitro and in vivo evaluation of carbamazepine-loaded enteric microparticles. *Int J Pharm* 331: 84-92.
- Dresse, A., Gerard, M. A., Lays, A., Tempero, K. F. and Verhaest, L. (1978). Human pharmacokinetics of two crystalline and galenic forms of diflunisal, a new analgesic. *Pharm Acta Helv* 53: 177-181.
- Eldridge, J. H., Hammond, C. J., Meulbroek, J. A., Staas, J. K., Gilley, R. M. and Tice, T. R. (1990). Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. *J Controlled Release* 11: 205-214.
- Ertl, B., Heigl, F., Wirth, M. and Gabor, F. (2000). Lectin-mediated bioadhesion: Preparation, stability and Caco-2 binding of wheat germ agglutinin-functionalized poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-microspheres. *J Drug Target* 8: 173-184.
- Faller, B. and Ertl, P. (2007). Computational approaches to determine drug solubility. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 533-545.
- Flaten, G. E., Dhanikula, A. B., Luthman, K. and Brandl, M. (2006). Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *Eur J Pharm Sci* 27: 80-90.
- Fleisher, D., Li, C., Zhou, Y., Pao, L. H. and Karim, A. (1999). Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 36: 233-254.
- Fojo, A. T., Ueda, k., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1987). Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 265-269.

- Francis, M. F., Lavoie, L., Winnik, F. M. and Leroux, J.-C. (2003a). Solubilization of cyclosporin A in dextran-g-polyethyleneglycolalkylether polymeric micelles. *Eur J Pharm Biopharm* 56: 337-346.
- Francis, M. F., Piredda, M. and Winnik, F. M. (2003b). Solubilization of poorly water soluble drugs in micelles of hydrophobically modified hydroxypropylcellulose copolymers. *J Controlled Release* 93: 59-68.
- Garcia-Fuentes, M., Torres, D. and Alonso, M. J. (2002). Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids and Surfaces B: biointerfaces* 27: 159-168.
- Gershanik, T. and Benita, S. (2000). Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 50: 179-188.
- Gursoy, R. N. and Benita, S. (2004). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother* 58: 173-182.
- Habberfield, A. D., Jensen-Pippo, K. E., Ralph, L., Westwood, S. and Russell-Jones, G. J. (1996). Vitamin B12-mediated uptake of erythropoietin and granulocyte colony stimulating factor in vitro and in vivo. *Int J Pharm* 145: 1-8.
- Hao, J. S. and Heng, P. W. S. (2003). Buccal delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 29: 821-832.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J. and Borchardt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96: 736-749.
- Hillery, A. M. (2001). Drug delivery: the basic concepts In *Drug delivery and targeting*. G. L. Hillery, A. W. Lloyd and J. Swarbrick. Eds. Taylor&Francis, London. 1-48.
- Humberstone, A. J. and Charman, W. N. (1997). Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 25: 103-128.
- Hunter, J. and Hirst, B. H. (1997). Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 25: 129-157.

- Iwanaga, K., Ono, S., Narioka, K., Morimoto, K., Kakemi, M., Yamashita, S., Nango, M. and Oku, N. (1997). Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes - improvement of stability of insulin in GI Tract. *Int J Pharm* 157: 73-80.
- Jang, D. J., Jeong, E. J., Lee, H. M., Kim, B. C., Lim, S. J. and Kim, C. K. (2006). Improvement of bioavailability and photostability of amlodipine using redispersible dry emulsion. *Eur J Pharm Sci* 28: 405-411.
- Jensen-Pippo, K. E., Whitcomb, K. L., DePrince, R. B., Ralph, L. and Habberfield, A. D. (1996). Enteral bioavailability of human granulocyte colony stimulating factor conjugated with poly(ethylene glycol). *Pharm Res* 13: 102-7.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Hoffart, V., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffamn, M. and Maincent, P. (2002a). Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits. *J Pharm Sci* 91: 760-768.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffamn, M., T., L. and Maincent, P. (2002b). In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticle in rabbits. *Circulation* 105: 230-235.
- Jones, D. H., McBride, B. W., Thornton, C., O'Hagan, D. T., Robinson, A. and Farrar, G. H. (1996). Orally administered microencapsulated Bordetella pertussis fimbriae protect mice from B. pertussis respiratory infection. *Infect Immun* 64: 489-494.
- Jorgensen, W. L. and Duffy, E. M. (2002). Prediction of drug solubility from structure. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 355-366.
- Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J. X. and Kissel, T. (2000). Biodegradable nanoparticle for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake. *Eur J Pharm Biopharm* 50: 147-160.
- Karali, T. T. and Gupta, V. W. (1992). Solubilization and dissolution properties of a leucotriene-D4 antagonist in micellar solutions. *J Pharm Sci* 81: 483-485.

- Katayama, K., Kato, Y., Onishi, H., Nagai, T. and Machida, Y. (2003). Double liposomes: Hypoglycemic effects of liposomal insulin on normal rats. *Drug Dev Ind Pharm* 29: 725-731.
- Khanvilkar, K., Donovan, M. D. and Flanagan, D. R. (2001). Drug transfer through mucus. *Adv Drug Deliv Rev* 48: 173-193.
- Kim, B. Y., Jeong, J. H., Park, K. and Kim, J. D. (2005). Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin-microparticle conjugates in oral insulin delivery system. *J Controlled Release* 102: 525-538.
- Kisel, M. A., Kulik, L. N., Tsybovsky, I. S., Vlasov, A. P., Vorob'yov, M. S., Kholodova, E. A. and Zabarovskaya, Z. V. (2001). Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. *Int J Pharm* 216: 105-14.
- Lam, K. S., Wat, M. S., Choi, K. L., Ip, T. P., Pang, R. W. and Kumana, C. R. (1996). Pharmacokinetics, pharmacodynamics, long-term efficacy and safety of oral 1-deamino-8-D-arginine vasopressin in adult patients with central diabetes insipidus. *Br J Clin Pharmacol* 42: 379-385.
- Larhed, A. W., Artursson, P., Grasjo, J. and Bjork, E. (1997). Diffusion of drugs in native and purified gastrointestinal mucus. *J Pharm Sci* 86: 660-665.
- Lavelle, E. C. (2001). Targeted delivery of drugs to the gastrointestinal tract. *Crit Rev Drug Deliv Carrier Syst* 18: 341-386.
- Lee, S. C., Huh, K. M., Lee, J., Cho, Y. W., Galinsky, R. E. and Park, K. (2007). Hydrotropic polymeric micelles for enhanced paclitaxel solubility: In vitro and in vivo characterization. *Biomacromolecules* 8: 202-208.
- Lee, V. H. L. and Yang, J. J. (2001). Oral drug delivery In *Drug delivery and targeting*. A. M. Hillery, A. W. Lloyd and J. Swarbrick. Eds. Taylor&Francis Inc., London. 145-183.
- Leitner, V. M., Marschutz, M. K. and Bernkop-Schnurch, A. (2003). Mucoadhesive and cohesive properties of poly(acrylic acid)-cysteine conjugates with regard to their molecular mass. *Eur J Pharm Sci* 18: 89-96.

- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. and Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 46: 3-26.
- Liu, H., Farrell, S. and Urich, K. (2000a). Drug release characteristics of unimolecular polymeric micelles. *J Controlled Release* 68: 167-174.
- Liu, J., Gong, T., Wang, C., Zhong, Z. and Zhang, Z. (2007). Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: preparation and characterization. *Int J Pharm* 340: 153-162.
- Liu, M., Kono, K. and Fréchet, J. M. J. (2000b). Water-soluble dendritic unimolecular micelles: their potential as drug delivery agents. *J Controlled Release* 65: 121-131.
- Luner, P. E., Babu, S. R. and Radebaugh, G. W. (1994). The effects of bile salts and lipids on the physico-chemical behavior of gemfibrozil. *Pharm Res* 11: 1755-1760.
- Luo, Y., Chen, D., Ren, L., Zhao, X. and Qin, J. (2006). Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. *J Controlled Release* 114: 53-59.
- Maitani, Y., Hazama, M., Tojo, Y., Shimoda, N. and Nagai, T. (1996). Oral Administration Of Recombinant Human Erythropoietin In Liposomes In Rats - Influence Of Lipid Composition And Size Of Liposomes On Bioavailability. *J Pharm Sci* 85: 440-445.
- Mannino, R. J., Canki, M., Feketeova, E., Scolpino, A. J., Wang, Z., Zhang, F., Kheiri, M. T. and Gould-Fogerite, S. (1998). Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 32: 273-287.
- Marieb, E. N. and Laurendeau, G. (1992). *Anatomie et physiologie humaines*. The Benjamin/Cummings publishing company, Saitn-Laurent. 1014.
- Marieb, E. N., Mallatt, J. and Wilhelm, P. B. (2005). *Human anatomy*. 4e. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Mathot, F., van Beijsterveldt, L., Preat, V., Brewster, M. and Arien, A. (2006). Intestinal uptake and biodistribution of novel polymeric micelles after oral administration. *J Controlled Release* 111: 47-55.

- Mecking, S., Thomann, R., Frey, H. and Sunder, A. (2000). Preparation of catalytically active palladium nanoclusters in compartments of amphiphilic hyperbranched polyglycerols. *Macromolecules* 33: 3958-3960.
- Meissner, Y., Ubrich, N., El Ghazouani, F., Maincent, P. and Lamprecht, A. (2007). Low molecular weight heparin loaded pH-sensitive microparticle. *Int J Pharm* 335: 147-153.
- Mouly, S. and Paine, M. F. (2003). P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine. *Pharm Res* 20: 1595-1599.
- Mueller, E. A., Kowarik, J. M., van Bree, J., Tetzloff, W., Grevel, J. and Kutz, K. (1994). Improved dose linearity of cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *Pharm Res* 11: 301-304.
- Müller, R. H., Mäder, K. and Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery- a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 50: 161-177.
- Murray, G. I., Barnes, T. S. and Sewell, H. F. (1988). The immunocytochemical localization and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *Br J Clin Pharmacol* 25: 465-475.
- Naisbett, B. and Woodley, J. (1995). The Potential Use of Tomato Lectin for Oral Drug Delivery.4. Immunological Consequences. *Int J Pharm* 120: 247-254.
- Najlah, M., Freeman, S., Attwood, D. and D'Emanuele, A. (2007). In vitro evaluation of dendrimer prodrugs for oral drug delivery. *Int J Pharm* 336: 183-90.
- Norris, D. A., Puri, N. and Sinko, P. J. (1998). The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Adv Drug Deliv Rev* 34: 135-154.
- O'Hagan, D. T., Singh, M., Dong, C., Ugozzoli, M., Berger, K., Glazer, E., Selby, M., Wininger, M., Ng, P., Crawford, K., Paliard, X., Coates, S. and Houghton, M. (2004). Cationic microparticles are a potent delivery system for a HCV DNA vaccine. *Vaccine* 23: 672-680.

- Ould-Ouali, L., Noppe, M., Langlois, X., Willems, B., Riele, P. T., Timmerman, P., Brewster, M. E., Arien, A. and Preat, V. (2005). Self-assembling PEG-p(CL-co-TMC) copolymers for oral delivery of poorly water-soluble drugs: a case study with risperidone. *J Controlled Release* 102: 657-668.
- Pedersen, G. P., Fäldt, P., Bergenståhl, B. and kristensen, H. G. (1998). Solid state characterisation of a dry emulsion: a potential drug delivery system. *Int J Pharm* 171: 257-270.
- Pierri, E. and Avgoustakis, K. (2005). Poly(lactide)-poly(ethylene glycol) micelles as a carrier for griseofulvin. *J Biomed Mater Res Part A* 75A: 639-647.
- Pouton, C. W. (2000). Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and "self-microemulsifying" drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci* 11: S93-S98.
- Rogers, J. A. and Anderson, K. E. (1998). The potential of liposomes in oral drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 15: 421-80.
- Roldo, M., Hornof, M., Caliceti, P. and Bernkop-Schnurch, A. (2004). Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis and in vitro evaluation. *Eur J Pharm Biopharm* 57: 115-121.
- Russell-Jones, G. J., Westwood, S. W. and Habberfield, A. D. (1995). Vitamin B12 mediated oral delivery systems for granulocyte-colony stimulating factor and erythropoietin. *Bioconjug Chem* 6: 459-465.
- Russell-Jones, G. J., Veitch, H. and Arthur, L. (1999). Lectin-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 and OK cells. *Int J Pharm* 190: 165-174.
- Russell-Jones, G. J. (2001). The potential use of receptor-mediated endocytosis for oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 46: 59-73.
- Russell-Jones, G. J. (2004). Use of targeting agents to increase uptake and localization of drugs to the intestinal epithelium. *J Drug Target* 12: 113-123.
- Sambuy, Y., Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A. and Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and

- culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 21: 1-26.
- Sant, V. P., Smith, D. and Leroux, J. C. (2005). Enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs by poly(ethylene glycol)-*block*-poly(alkyl acrylate-co-methacrylic acid) self-assemblies. *J Controlled Release* 104: 289-300.
- Santangelo, R., Padeu, P., Delivams, G., Chen, Z.-W., Mannino, R., Zarif, L. and Perlin, D. S. (2000). Efficacy of oral coxleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2356-2360.
- Schuetz, E. G., Beck, W. T. and Schuetz, J. D. (1996a). Modulators And Substrates Of P-Glycoprotein And Cytochrome P4503a Coordinately Up-Regulate These Proteins In Human Colon Carcinoma Cells. *Molec Pharm* 49: 311-318.
- Schuetz, E. G., Schinkel, A. H., Relling, M. V. and Schuetz, J. D. (1996b). P-Glycoprotein - A Major Determinant Of Rifampicin-Inducible Expression Of Cytochrome P4503a In Mice And Humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4001-4005.
- Serajuddin, A. T. M. (2007). Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 603-616.
- Sezgin, Z., Yuksel, N. and Baykara, T. (2007). Investigation of pluronic and PEG-PE micelles as carriers of meso-tetraphenyl porphine for oral administration. *Int J Pharm* 332: 161-167.
- Shah, P., Jogani, V., Bagchi, T. and Misra, A. (2006). Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog* 22: 186-198.
- Shakweh, M., Besnard, M., Nicolas, V. and Fattal, E. (2005). Poly(lactid-co-glycolide) particles of different physicochemical properties and their uptake by peyer's patches in mice. *Eur J Pharm Biopharm* 61: 1-13.
- Simard, P., Leroux, J. C., Allen, C. and Meyer, O. (2006). Liposomes for drug delivery In *Nanoparticles for pharmaceutical applications*. A. J. Domb and M. Kumar.Eds. American Scientific Publishers, Valencia.

- Slagt, M. Q., Stiriba, S.-E., Klein Gebbink, R. J. M., Kautz, H., Frey, H. and van Koten, G. (2002). Encapsulation of hydrophilic pincer-platinum(II) complexes in amphiphilic hyperbranched polyglycerol nanocapsules. *Macromolecules* 35: 5734-5737.
- Smart, J. D. (2005). The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 1556-1568.
- Stella, V. J. and Nti-Addae, K. W. (2007). Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 677-694.
- Sudhakar, Y., Kuotsu, K. and Bandyopadhyay, A. K. (2006). Buccal biadhesive drug delivery- A promising option for orally less efficient drugs. *J Controlled Release* 114: 15-40.
- Takahashi, Y., Kondo, H., Yasuda, T., Watanabe, T., Kobayashi, S. and Yokohama, S. (2002). Common solubilizers to estimate the Caco-2 transport of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm* 246: 85-94.
- Takeuchi, H., Yamamoto, H., Niwa, T., Hino, T. and Kawashima, Y. (1996). Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharm Res* 13: 896-901.
- Thiebault, F., Tsuruo, T., Hamda, H., Goettesman, M. M., Pastan, I. and Willingham, M. C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7735-7738.
- Thummel, K. E., Kunze, K. L. and Shen, D. D. (1997). Enzyme-catalysed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Adv Drug Deliv Rev* 27: 99-127.
- Tripathi, P., Khopade, A. J., Nagaich, S., Shrivastava, S., Jain, S. and Jain, N. (2002). Dendrimer grafts for delivery of 5-fluorouracil. *Pharmazie* 57: 261-264.
- Varma, M. V. S., Khandavilli, S., Ashokraj, Y., Jain, A., Dhanikula, A., Sood, A., Thomas, N. S., Pillai, O., Sharma, P., Gandhi, R., Agrawal, S., Nair, V. and Panchagnula, R. (2004). Biopharmaceutic classification system: A scientific framework for pharmacokinetic optimization in drug research. *Curr Drug Metab* 5: 375-388.

- Varma, M. V. S., Perumal, O. P. and Panchagnula, R. (2006). Functional role of P-glycoprotein in limiting peroral drug absorption: optimizing drug delivery. *Curr Opin Chem Biol* 10: 367-373.
- Venkateswarlu, V. and Manjunath, K. (2004). Preparation, characterization and *in vitro* release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *J Controlled Release* 95: 627-38.
- Vila, A., Sanchez, A., Tobio, M., Calvo, P. and Alonso, M. J. (2002). Design of biodegradable particles for protein delivery. *J Controlled Release* 78: 15-24.
- Vinogradov, S. V., Batrakova, E. V., Li, S. and Kabanov, A. V. (2004). Mixed polymer micelles of amphiphilic and cationic copolymers for delivery of antisense oligonucleotides. *J Drug Target* 12: 517-526.
- Volkheimer, G. and Schulz, F. H. (1968). The phenomenon of persorption. *Digestion* 1: 213-218.
- Vonderscher, J. and Meinzer, A. (1994). Rationale for the development of Sandimmune Neoral. *Transplant Proc* 26: 2925-2927.
- Wacher, V. J., Wu, C. Y. and Benet, L. Z. (1995). Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinogen* 13: 129-134.
- Wacher, V. J., Salphati, L. and Benet, L. Z. (2001). Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 46: 89-102.
- Wagner, D., Spahn-Langguth, H., Hanafy, A., Koggel, A. and Langguth, P. (2001). Intestinal drug efflux: formulation and food effects. *Adv Drug Deliv Rev* 50: S13-S31.
- Washington, N., Wshington, C. and Wilson, C. G. (2001). *Physiological Pharmaceutics: barriers to drug absorption*. 2nd. Taylor and Francis, London. 312.
- Watkins, P. B., Wrighton, S. A., Schuetz, E. G., Molowa, D. T. and Guzelian, P. S. (1987). Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man. *J Clin Invest* 80: 1029-1036.

- Welsch, U. (2003). *Précis d'histologie*. Lavoisier, Paris.
- Wilkinson, G. R. (2001). Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution and elimination In *The pharmacological basis of therapeutics*. L. E. Limbird, J. G. Hardman and A. Goodman Gilman. Eds. McGraw-Hill Companies, New York. 1-26.
- Wirth, M., Gerhardt, K., Wurm, C. and Gabor, F. (2002). Lectin-mediated drug delivery: influence of mucin on cytoadhesion of plant lectins in vitro. *J Controlled Release* 79: 183-191.
- Woodley, J. F. (2000). Lectins for gastrointestinal targeting- 15 years on. *J Drug targeting* 7: 325-333.
- Xu, C. J., Li, C. Y. T. and Kong, A. N. T. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 28: 249-268.
- Yang, S., Zhu, J., Lu, Y., Liang, B. and Yang, C. (1999). Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. *Pharm Res* 16: 751-757.
- Yeh, P., Ellens, H. and Smith, P. L. (1998). Physiological considerations in the design of particulate dosage forms for oral vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 34: 123-133.
- Yi, Y., Yoon, H. J., Kim, B. O., Shim, M., Kim, S. O., Hwang, S. J. and Seo, M. H. (2007). A mixed polymeric micellar formulation of itraconazole: Characteristics, toxicity and pharmacokinetics. *J Controlled Release* 117: 59-67.
- Yin, Y., Chen, D., Qiao, M., Lu, Z. and Hu, H. (2006). Preparation and evaluation of lectin-conjugates PLGA nanoparticles for oral delivery of thymopentin. *J Controlled Release* 116: 337-345.
- Yin, Y., Chen, D., Qiao, M., Wei, X. and Hu, H. (2007). Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: ex vivo bioadhesion and in vivo biodistribution. *J Controlled Release* 123: 27-38.
- Youn, Y. S., Jung, J. Y., Oh, S. H., Yoo, S. D. and Lee, K. C. (2006). Improved intestinal delivery of salmon calcitonin by Lys¹⁸-amine specific PEGylation: stability, permeability, pharmacokinetic behavior and in vivo hypocalcemic efficacy. *J Controlled Release* 114: 334-342.

- Zarif, L. (2002). Elongated supramolecular assemblies in drug delivery. *J Controlled Release* 81: 7-23.
- Zastre, J., Jackson, J., Bajwa, M., Liggins, R., Iqbal, F. and Burt, H. (2002). Enhanced cellular accumulation of a P-glycoprotein substrate, rhodamine-123, by Caco-2 cells using low molecular weight methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers. *Eur J Pharm Biopharm* 54: 299-309.
- Zastre, J., Jackson, J., Bajwa, M., Liggins, R., Iqbal, F. and Burt, H. (2002). Enhanced cellular accumulation of a P-glycoprotein substrate, rhodamine-123, by Caco-2 cells using low molecular weight methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers. *Eur J Pharm Biopharm* 54: 299-309.
- Zastre, J., Jackson, J. and Burt, H. (2004). Evidence for modulation of P-glycoprotein-mediated efflux by methoxypolyethylene glycol-block-Polycaprolactone amphiphilic diblock copolymers. *Pharm Res* 21: 1489-1497.
- Zastre, J., Jackson, J. K., Wong, W. and Burt, H. M. (2007). Methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers reduce P-glycoprotein efflux in the absence of a membrane fluidization effect while stimulating P-glycoprotein ATPase activity. *J Pharm Sci* 96: 864-875.
- Zhang, N., Ping, Q. N., Huang, G. H. and Xu, W. F. (2005). Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. *Int J Pharm* 294: 247-259.
- Zhang, Y. C. and Benet, L. Z. (2001). The gut as a barrier to drug absorption - Combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 40: 159-168.

Chapitre 2. Bioactive compound carriers based on micelle-forming polymers²

Marie-Christine Jones[†], Maxime Ranger[‡] and Jean-Christophe Leroux^{†*}

[†] Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

[‡] Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

**Corresponding author:*

University of Montreal
Faculty of Pharmacy
2900 Edouard-Montpetit
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville
Montreal, Quebec, Canada
H3C 3J7

Email: [REDACTED]

Tel: (514) 343-6455

Fax: (514) 343-7738

Abstract

Self-assembly of amphiphilic copolymers into micelles has been extensively studied since polymeric micelles were first introduced over a decade ago. Polymeric micelle are water-soluble nanoparticles that present tunable properties depending on the building block used for micelle formation. Because of their potential applications in that particular field, polymeric micelles are considered of great interested in pharmaceutical technology as drug delivery systems for poorly water-soluble or polyionic drug. Many factors have to be taken

² Paru dans Phys Can (2004) 60 : 177. Reproduit avec permission. © Physics in Canada (2004)

into consideration when formulating micelle-drug complexes since the therapeutic efficacy of the carrier will depend on size, loading capacity and stability. This mini-review intends on providing an overview of polymeric micelle technology including micelle formation and physico-chemical characterization. Parameters that may influence drug loading, release and micelle stability will also be discussed. Furthermore, a summary of recent advances in the development of unimolecular micelles will be presented.

Introduction

Polymeric micelles (PM) are soluble nanosized self-assemblies that form above a critical concentration as a result of the association of amphiphilic copolymers chains in a selective solvent. In water, the hydrophobic moiety collapses to form the micelle core, which is surrounded by a polymeric hydrophilic shell. From a pharmaceutical viewpoint, PM possess interesting properties that can be exploited in the delivery of poorly water soluble drugs. The core-shell structure of micelles allows for the solubilization of hydrophobic guests in an apolar micro-environment segregated from the surrounding milieu. The shell, which is composed of highly hydrated polymer chains, solubilizes the micelle core, limits its interaction with blood components and provides the carrier with long circulation times *in vivo* after parenteral administration.

Physico-chemical and biological properties of PM, such as size, drug loading capacity, drug release rate, *in vivo* half-life and biodistribution, are determined mainly by the nature and composition of the amphiphilic copolymer. The shell is typically composed of poly(ethylene oxide) (PEO) whereas a large variety of hydrophobic polymers have been used as core-forming blocks (Table 2.1; Figure 2.1). PM have been primarily studied as parenteral delivery systems but may also find applications for the oral administration of poorly bioavailable hydrophobic molecules ⁽¹⁾.

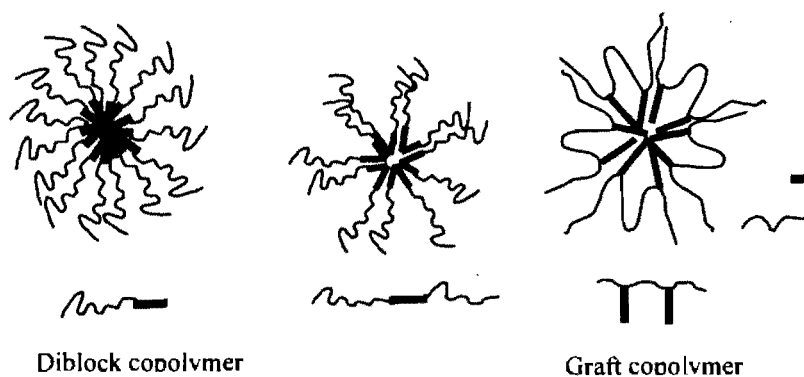


Figure 2.1. Schematic representation of PM obtained from amphiphilic copolymers.

In vivo stability of the carrier is an important concern that needs to be addressed when the micelles are to serve as delivery systems. Dissociation of the micelle upon administration leads to premature drug leakage and inadequate targeting. On this issue, PM constitute an improvement over micelles obtained from low molecular weight surfactants. Nevertheless, disassembly of PM might still occur more or less rapidly as the carrier is diluted in biological fluids. In recent years, efforts have been made towards developing PM with improved stability, including PM where either the shell or the core has been cross-linked. Recently, unimolecular polymeric micelles (UPM) in which the polymer chains are covalently linked together have been proposed. UPM are usually prepared from amphiphilic star-shaped polymers or dendrimers. This promising new drug carrier shares a lot of similarities with PM but is intrinsically stable towards dilution. This review intends to provide an overview of PM technology in drug delivery. The first section deals with the design and characterization of multimolecular PM while the second section is dedicated to UPM

Table 2.1. Amphiphilic copolymers used in the preparation of PM^a

	Hydrophilic block	Hydrophobic block	Reference
Diblock copolymer	PEO	PDLLA	(2-5)
	PEO	PCL	(6-9)
	PEO	PBLA	(10,11)
	PEO	Poly(N-hexyl aspartamide)	(12)
	PAA	PS	(13)
	PEO	PS	(14)
	PEO	P(Asp)-DOX	(15)
	PVP	PDLLA	(16)
	PEO	DOPE	(17)
	Graft copolymers	Poly(asparagines)	PCL
PEO		Poly(hydroxyethylaspartamide)-C18	(19,20)
Triblock	PEO	PCL	(21,22)
	PEO	PPO	(23,24)
	PEO	PBLG	(25,26)
	PVP	PCL	(27)
	PHPM	PCL	(27)

^a**Abbreviations:** DOX= doxorubicin; P(Asp)= poly(aspartic acid); PBLA= poly(γ -benzyl L-aspartate); PBLG= poly(γ -benzyl L-glutamate); PCL= poly(ϵ -caprolactone); PDLLA= poly(D,L,-lactide); PE= 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine; PEO= poly(ethylene oxide); PHPMA= Poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide); PVP= poly(N-vinylpyrrolidone); PPO= poly(propylene oxide); PS= poly(styrene).

Micellization

Self-assembly of copolymer chains into micelles is a thermodynamically driven process resulting from attractive forces between solvophobic moieties that associate to minimize interactions with the external medium. Concurrently, repulsive forces arising from the steric hindrance provided by the shell limit chain aggregation⁽²⁸⁾. Intermolecular interactions leading to micelle formation can be solely hydrophobic or can consist of a combination of electrostatic and hydrophobic forces. Micelles formed through electrostatic interactions will not be discussed here and the reader is referred to a recent review by Kataoka *et al.*⁽²⁹⁾ for further discussion on the subject. Aggregation of polymer chains can also be driven by hydrogen bonding^(30,31) or metal-complex formation. The latter was

exploited by Nishiyama *et al.*⁽³²⁾ in the development of cis-dichlorodiammineplatinum(II) (cisplatin)-PEO-*b*-poly(aspartic acid) (PEO-*b*-P(Asp) micellar formulation.

Critical aggregation concentration

Association of polymer chains into micelles occurs only above a threshold concentration termed the critical aggregation concentration (CAC). Theoretically, micelle formation can be detected as a sudden change in the physical properties of a solution (*e.g.* surface tension, osmotic pressure and particle size) as the amphiphile concentration reaches the CAC. However, for PM, the CAC is low and often falls below the sensitivity of classical methods. CAC of amphipatic copolymers is generally determined using hydrophobic fluorescent probes (*e.g.* pyrene), which display polarity-sensitive variations in their fluorescence pattern⁽³³⁾. For instance, the photophysical properties of pyrene are altered as a result of the change of micropolarity it experiences upon diffusion from bulk water (hydrophilic environment) into the micelle core (hydrophobic environment). Decreased micropolarity at the CAC is associated with modifications in the vibrational fine structure of pyrene emission spectra (Figure 2.2a). The CAC is often determined by monitoring the ratio of the intensities I_1 and I_3 of the (Ould-Ouali, 2005 #780) and [1,3] bands, respectively. The CAC can also be obtained by monitoring the changes in the ratio of pyrene excitation spectra intensities at $\lambda = 333\text{-}334$ nm in water, and $\lambda = 335\text{-}339$ nm for pyrene in a hydrophobic medium (Figure 2.2b)⁽²⁵⁾. The CAC of PM prepared from amphiphilic copolymers is greatly influenced by the strength of the hydrophobic interactions participating in micelle formation. Thus, any alterations that result in increased hydrophobicity positively affects the thermodynamic stability of PM⁽¹⁸⁾ and lowers the CAC. Conversely, lengthening the hydrophilic segment has the opposite effect⁽³⁴⁾.

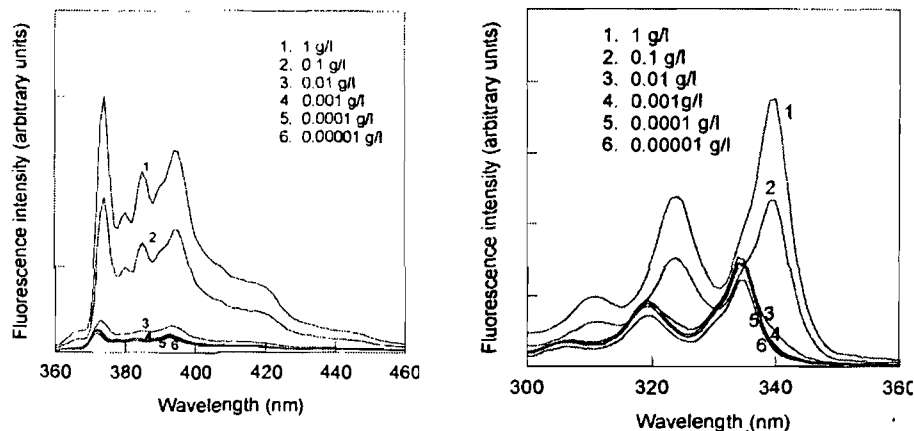


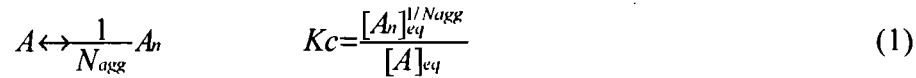
Figure 2.2. (A) Fluorescence emission spectra of pyrene as a function of PBLA-*b*-PEO-*b*-PBLA concentration in water λ_{exc} 339.0 nm. (B) Fluorescence excitation spectra of pyrene as a function of PBLA-*b*-PEO-*b*-PBLA concentration in water λ_{em} 390.0 nm. Reprinted from reference (25) with permission from Wiley-Liss Inc.

If the micellization process is studied as a function of temperature instead of concentration, then the critical micellization temperature (CMT) can be determined. The CMT represents the temperature at which the presence of micelles is detected in solution^(3,35). CMT values in the 20-50°C range were measured for different poly(ethylene oxide)-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-poly(ethylene oxide) (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO) triblock copolymers at a concentration of 0.1% (w/v) in water⁽³⁵⁾. The CMT was greatly influenced by the length of the PPO segment, while PEO had a less marked effect. Below the CMT, both blocks are hydrated and the triblock copolymer is water-soluble. As the temperature increases, micelles form as a result of the dehydration of the PPO block⁽³⁶⁾.

Thermodynamics of micellization

A closed association model was developed to describe the thermodynamics of micellization. Assuming that micelles are small, spherical, narrowly distributed aggregates

with an aggregation number (N_{agg}) independent of temperature, the equilibrium between polymer chains in solution (A) and in micelles (A_n) can be expressed as:



For N_{agg} values over 50, the equilibrium constant (K_c) can be estimated from $K_c = 1/[A]_{eq}$, where $[A]_{eq}$ can be taken to be the CAC⁽³⁷⁾. The free energy ($\Delta_{mic}G^\circ$) and standard enthalpy of micellization ($\Delta_{mic}H^\circ$) are given by equations (2) and (3):

$$\Delta_{mic}G^\circ = -RT \ln(K_c) = RT \ln(CAC) \quad (2)$$

$$\Delta_{mic}H^\circ = \frac{-Rd \ln(K_c)}{d(1/T)} = \frac{Rd \ln(CAC)}{d(1/T)} \quad (3)$$

From these two parameters, the net change in standard entropy ($\Delta_{mic}S^\circ$) is given by:

$$\Delta_{mic}S^\circ = (\Delta_{mic}H^\circ - \Delta_{mic}G^\circ)/T \quad (4)$$

Thermodynamically, micelle formation is an entropy driven process. As micelles are formed, the hydrogen-bonding structure of water is restored thereby producing a net gain in entropy⁽³⁵⁾. For example, $\Delta_{mic}G^\circ$ of PEO-*b*-poly(styrene) (PEO-*b*-PS) (M_n 4300) in water is -34 KJ/mol and is determined mainly by the standard entropy since no net change in enthalpy was observed ($\Delta_{mic}H^\circ = 0$ KJ/mol)⁽³⁸⁾.

Micelle dimensions

Small particle size is generally recognized as one of the most interesting characteristics of PM for drug delivery applications^(34,39). Steric protection combined with size in the range 10-100 nm limits rapid clearance of PM by the mononuclear phagocyte system, which in turn leads to prolonged circulation times in the bloodstream. It also enables the carrier to extravasate through the leaky vasculature often associated with diseased tissues, thus favouring carrier accumulation at the target site. Control over micelle

size depends on several factors that are mainly related to the copolymer nature and/or composition (molecular weight (MW), hydrophobicity)^(28,40).

Although micelle size seldom reaches over 100 nm, the presence of larger secondary aggregates is often observed^(6,20,41). Secondary aggregates are formed as a result of incomplete shielding of the attractive hydrophobic interactions between micelle cores. The effect of multimodal size distribution on the *in vivo* properties of the drug carrier will depend on the aggregate stability upon dilution. If the aggregates are unstable in a highly diluted environment, they will readily dissociate upon mixing with biological fluids, and biodistribution or circulation times should not be affected.

Light scattering is the most widely used method for studying micelle dimensions in solution. Dynamic light scattering yields both hydrodynamic radius (R_h) and size distribution of the particles. Parameters such as micelle weight-average molecular weight (M_w) and radius of gyration (R_g) can be obtained from static light scattering (equation 5)

$$\frac{Kc_p}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} \langle R_g^2 \rangle q^2 \right) + 2A_2c + \dots \quad (5)$$

where c is the polymer concentration, A_2 the second virial coefficient, R_g the gyration radius, R_θ the Rayleigh ratio, $q = (4\pi n / \lambda) \sin(\theta / 2)$ (where θ is the scattering angle) and $K = 4\pi^2 n^2 (dn/dc_p)^2 / \lambda^4 N$, where n is the refractive index of the solvent, (dn/dc_p) the refractive index increment and N , the Avogadro's number.

The aggregation number (N_{agg}) can be extracted from equation 6 where MW_m and MW_u are MW of the micelles and unimers, respectively.

$$N_{agg} = \frac{MW_m}{MW_u} \quad (6)$$

N_{agg} and micelle MW are influenced mainly by the properties of the core forming block. An increase in hydrophobicity results in an increase in the number of chains participating in micelle formation and thus in a higher micelle MW.

R_g relates to the distribution of polymer chains away from the centre of mass and is influenced by the hydrophilic/lipophilic balance. For PEO-*b*-poly(d,l-lactide) (PEO-*b*-PDLLA) micelles, raising the PDLLA molar ratio from 22 to 51% resulted in a 1.8-fold decrease in R_g ⁽⁴²⁾.

The R_g/R_h ratio can be used to provide insight into micelle shape. This ratio takes a value of 0.776 for a polymer chain in a hard sphere conformation, while it reaches 1.30 for polymers in a random coil. In the case of PM, values close to 0.776 are typically obtained, meaning that PM form spherical aggregates in solution. Deviation from the theoretical value expected for a hard sphere can be explained by the fact that the shell-forming segment expands in water to adopt a coil-like conformation which results in a higher R_g . Particles for which the shell motion is restricted exhibit lower R_g/R_h ratios ⁽⁴²⁾. PM shape can be determined from DLS measurements performed at multiple angles. The angular dependence of scattered light intensity can be estimated from plots of the scaled characteristic line width (Γ/K^2) as a function of the scattering vector (K^2). This plot is linear for spherical particles since the intensity of light scattered is the same in all directions ⁽⁴⁰⁾. Micelle shape can also be visualized by microscopic methods such transmission electron microscopy and atomic force microscopy (Figure 2.3).

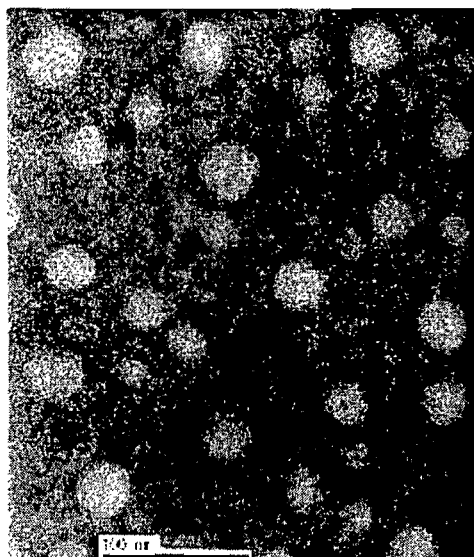


Figure 2.3. TEM photographs of poly(asparagine)-*g*-PCL (45 wt% PCL content) with negative staining (phosphotungstic acid 0.1%) magnified 230K. Reprinted from reference (18) with permission from Elsevier.

Drug loading in polymeric micelles

Conventional methods used in physical loading of therapeutics inside micelles are summarized in Table 2.2. Recently, a new method was developed within our research group. It involves the freeze-drying of PM-drug complexes prepared in mixtures of *tert*-butanol (TBA) and water⁽¹⁶⁾. Using this procedure, monodisperse stable micelles (50 nm) loaded with 5 wt% paclitaxel, were obtained from poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*b*-PDLLA (PVP-*b*-PDLLA) (M_n 4400; 37 mol% PDLLA).

Table 2.2. Methods used in the physical entrapment of hydrophobic drugs in PM.

Description	Polymer	Drug	Loading levels (wt%)	Reference
Dissolution of the drug in a preformed micelle solution. The hydrophobic drug is added to an aqueous solution of preformed micelles	PEO- <i>b</i> -PPO- <i>b</i> -PEO	Doxorubicin	0.01	(43)
Dialysis: both drug and polymer are dissolved in a common water-miscible organic solvent and dialyzed against water. Micellization and loading occur as water replaces the organic solvent	PCL- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PCL	Clonazepam	8-12	(21)
Oil-in-water emulsion: the drug is dissolved in an organic volatile solvent and emulsified in the presence of a solution of the polymer in water. The drug partition at the solvent/water interface is incorporated as the solvent evaporates	PEO- <i>b</i> -PBLA	Indomethacin	22	(10)
Solution casting: both drug and polymer are dissolved in a common solvent which is then evaporated. The resulting film is rehydrated in hot water	PEO- <i>b</i> -PDLLA	Paclitaxel	25	(2)

Characteristics of both drug and copolymer may affect loading levels achieved with PM⁽³⁴⁾. Loading of poorly water-soluble drugs is favoured in more hydrophobic environments^(21,22). The presence of crystalline domains in the core may impair entrapment efficiency due to limited free space⁽¹⁹⁾. Still, it is the compatibility between the drug and the solvophobic block that influences most drug loading. The Flory-Huggins interaction parameter (χ_{sp}) was proposed as a means to quantify the affinity between the solubilize and the core-forming block. It is obtained from the Scatchard-Hillebrand equation:

$$\chi_{sp} = (\delta_s - \delta_p)^2 \frac{V_s}{RT} \quad (7)$$

where δ_s and δ_p are the solubility parameters of the solubilize and core-forming block, respectively, V_s is the molar volume of the solubilize, R is the gas constant and T is the temperature.

Best loading results are achieved when the solubility parameters of the drug and core-forming block are similar, *i.e.* when χ_{sp} is low^(44,45). Since all drugs present unique properties, it thus becomes unlikely that a single hydrophobic segment can serve to solubilize every drug nor, can one drug be solubilized by all block copolymers. The compatibility between a drug and the micelle core can be increased by covalently linking drug molecules to the hydrophobic segment. For example, the chemical fixation of doxorubicin (DOX) on PEO-*b*-P(Asp) (M_n 14,000) was shown to cause an increase in the level of physically-loaded DOX due to enhanced affinity resulting from π - π interactions⁽¹⁵⁾. Another predictor of drug loading is the partition coefficient (K_v) of the solubilize between the core and the surrounding environment (Equation 8)⁽⁴⁶⁾:

$$\frac{C_m}{C_w} = \frac{K_v \phi_{core} C}{\rho_{core}} \quad (8)$$

where C_m and C_w are the concentrations of the solubilize in micelles and water, respectively; C is the copolymer concentration, ϕ_{core} and ρ_{core} are the core-forming block's weight fraction and density, respectively.

Allen *et al.*⁽⁸⁾ have studied the correlation between K_v and testosterone levels in PEO-*b*-poly(ϵ -caprolactone) (PEO-*b*-PCL) PM (M_n 4400; 31 mol% PCL) micelle formulations. Partition of the drug in micelles increased with feed ratio to attain a maximum, which corresponded approximately to the highest drug loading levels (*i.e.* 240 wt%)⁽⁸⁾ (Figure 2.4).

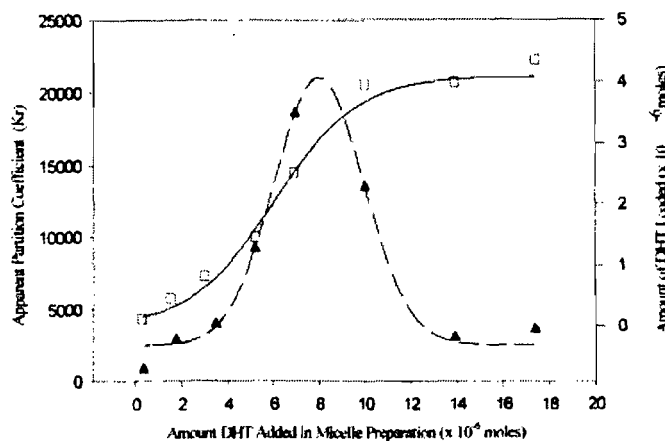


Figure 2.4. Plot of the apparent partition coefficient (left) and drug loading (right) as a function of the initial amount of dihydrotestosterone added during PEO-*b*-PCL PM preparation. Reprinted from reference (8) with permission from Elsevier.

Drug release from micelle formulation

Drug release can result from either degradation of the polymer (*e.g.* PDLLA), micelle dissociation or from simple drug diffusion. In the case of stable and non- or slowly degradable PM, the drug release is mostly determined by the rate of diffusion of the drug out of the micelle. The rate of diffusion of a micelle-entrapped drug through a semi-permeable membrane is often used as an *in vitro* model to study drug release. Given that polymer concentration is usually kept above the CAC and that the polymer does not degrade over the time period of the experiment, it is generally the diffusion driven-release that is observed *in vitro*. Release kinetics are often biphasic and exhibit an initial burst associated with the fast release of drug molecules located in the shell or at the core-shell interface, followed by a slower release phase corresponding to the diffusion of the drug from the core⁽⁸⁾. Factors that influence drug loading also affect drug release. In general, increased compatibility or favourable partition of a drug in the core reduces its release rate^(22,26). It was demonstrated that increasing the loading of dihydrotestosterone from

8 to 40 mM in PEO-*b*-PCL (M_n 4400; 31 mol% PCL) extended the release time from a few days to over a month⁽⁸⁾. This drug-loading effect may be explained by an increase in the drug's affinity for the core (see Section 4) or by the crystallization of the incorporated drug. Jeong *et al.*⁽⁴⁷⁾ have shown a similar trend as a function of drug loading for clonazepam encapsulated in PEO-*b*-poly(γ -benzyl L-glutamate) (PEO-*b*-PBLG) (M_n 20,400; 12 mol% PBLG) micelles. Differential scanning calorimetry studies performed on these formulations demonstrated that the drug crystallizes in the core as the loading increases.

Results of *in vitro* studies often do not correlate with *in vivo* release behaviour. Burt *et al.*⁽⁵⁾ showed that, upon *in vivo* intravenous injection, paclitaxel (10 wt%) incorporated into PEO-*b*-PDLLA (M_n 5,400; 40% wt PDLLA) micelles was released within minutes and both drug and vehicle were rapidly and almost totally eliminated within 15 hours. *In vitro*, the same PM behaved as highly stable particles.

***In vivo* efficacy**

In vivo efficacy studies using PM formulations have been conducted primarily with anticancer drugs. Although incorporation of a drug into micelles does not necessarily result in increased efficacy^(48,49), antitumoral activity is maintained in most cases. Also, PM drug formulations are generally better tolerated than the drug administered alone or in low molecular weight surfactant micelles, and thus permit the administration of higher doses^(2,50). For more information on this topic, the reader is referred to a recent review on the use of micelles in cancer therapy⁽⁵¹⁾. Other applications include the development of PM for the delivery of radioisotopes for bone imaging⁽⁹⁾, neurotrophic agents⁽⁶⁾ and amphotericin B, a hydrophobic antifungal drug⁽⁵²⁾.

In vivo efficacy of a parenteral micellar formulation is closely related to the capacity of the carrier to circulate in blood for prolonged periods. This allows for preferential accumulation in diseased tissues due to the enhanced permeation and retention effect.

Indeed, tumoral and inflamed tissue present leaky vasculature and impaired lymphatic drainage, which help retain particulate carriers at the targeted site. Accumulation at the site of action can be further increased by actively targeting the micelles. Active targeting is achieved by introducing environment-sensitive (pH or temperature) moieties⁽⁵³⁾ or by attaching a ligand (sugar⁽⁵⁴⁾, antibodies⁽¹⁷⁾, folic acid⁽⁵⁵⁾) at the micelle surface. PEO-1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (PEO-DOPE) micelles were modified using a monoclonal antibody fragment with nucleosome-restricted specificity. The immunomicelles thus obtained were loaded with paclitaxel and studied *in vivo* on mice bearing murine Lewis lung carcinoma. Preferential accumulation at the tumoral site was observed for the targeted micelles compared with both non-targeted PM and the commercial formulation (Taxol[®])⁽¹⁷⁾.

Micelle stability

PM developed for drug delivery applications should be stable enough to present long circulation times in the blood while being able to slowly dissociate into unimers or degrade *in situ* in order to ensure carrier elimination. PM stability can be described in terms of thermodynamic and kinetic stability. As previously discussed, thermodynamic stability is associated with the equilibrium between unimers and micelles, and micelles are said to be thermodynamically stable above their CAC⁽³⁴⁾ [see Section 2]. The kinetic stability relates to the rate at which micelles dissociate when diluted at concentrations below their CAC. Consequently, even micelles presenting a high CAC may be kinetically stable if they dissociate slowly. The dissociation rate of the micelle into unimers is partly determined by the physical state of the core. As a result of limited chain mobility⁽⁵⁾, micelles prepared with copolymers containing a core-forming segment with an elevated glass transition temperature (T_g) will dissociate at a slower rate^(5,34) than will micelles with a low T_g . Both thermodynamic and kinetic stabilities in water can be improved by enhancing the core's

hydrophobicity. This can be done by introducing additional hydrophobes (therapeutic or not) into the micellar core^(12,23,56).

Several strategies based on chemical modification of PM structure have been proposed to stabilize PM. Shell cross-linked micelles are obtained by chemically cross-linking the corona in aqueous solution following micelle formation. The hydrogel-like shell acts as a semi-permeable membrane through which small molecules can diffuse⁽⁵⁷⁾. Diffusion of molecules in and out of the shell cross-linked micelles is mainly controlled by shell thickness and permeability, which in turn are determined by the cross-linking density⁽⁵⁸⁾. The influence of cross-linking density on the loading of 6-fluorotryptophan in PS-*b*-PAA has been studied by Huang *et al.*⁽⁵⁹⁾ It was observed that increasing the cross-linking density from 15 to 55% abolished the diffusion of the molecule inside the micelle. Thus, for drug delivery applications, a proper balance between high micelle stability, acceptable loading and release rate must be obtained.

Core cross-linked PM can be prepared by introducing polymerizable functions (*e.g.* methacryloyl) at the hydrophobic end of the amphiphilic copolymer chain⁽⁶⁰⁾. Core-stabilized micelles prepared from PEO-*b*-PDLLA-methacryloyl (M_n 7000)⁽⁶¹⁾ have been studied as carriers for paclitaxel. Loading values of 3-6 wt% were obtained with these micelles, which is 4 to 8 times less than the 25 wt% levels obtained when PEO-*b*-PDLLA unstabilized micelles (M_n 5240) were used⁽⁶²⁾. Thus, cross-linking of the micelle core may have a negative impact on drug loading by diminishing the free volume available for drug entrapment. Although stabilized PM present undeniable potential as stable drug delivery agents, studies on the applicability of such carriers in drug delivery have not yet been conducted. Covalently linking the polymer chains to one another may have a favourable impact on stability and circulation time, but may also hamper the proper elimination of the carrier by preventing micelle dissociation and/or biodegradation.

Unimolecular polymeric micelles

In the previous section, core or shell cross-linked micelles were described as a potential solution to the instability of PM. However, the preparation of such assemblies requires multiple steps since micelle stabilization is performed after micelle formation. A more straightforward approach resides in the use of amphipatic branched polymers—*i.e.* UPM—that mimic PM structural characteristics but which are inherently stable to dilution. The concept of UPM was first introduced in the late eighties by Newkome *et al.*⁽⁶³⁾. This early description of UPM consisted of an amphiphilic polymer presenting a tree-like structure (*i.e.* arborol). However, no data was provided on structure, size or encapsulation capacity. Inspired by that pioneer work, Tomalia *et al.*⁽⁶⁴⁾ described UPM (3–6 nm) of poly(amidoamine) dendrimers. Although the concept of UPM had been introduced, it was not until a few years later that Newkome *et al.*⁽⁶⁵⁾ proposed UPM as potential carriers for hydrophobic compounds. In the succeeding years, non water-soluble UPM (inverse UPM) presenting a hydrophilic core were synthesized as potential delivery agents for hydrophilic compounds⁽⁶⁶⁾. Although the use of UPM as a drug delivery system is still in its infancy, the next section is dedicated to this promising novel nanocarrier.

Unimolecular polymeric micelle synthesis

UPM are amphiphilic polymers in which all the polymer chains are covalently linked to one another. UPM can be prepared from either amphiphilic dendrimers^(67,68), star-shaped, arborescent⁽⁶⁹⁾ or hyperbranched polymers⁽⁷⁰⁾. Dendrimers may be considered as an evident choice as scaffolds for UPM, since they are inherently spherical and present high peripheral functionalities that can be exploited in active targeting. However, dendrimer synthesis often requires several steps that render their preparation difficult. UPM can be obtained from star-shaped polymers, given that they present a sufficient number of arms emanating from the central core⁽⁷¹⁾. Star-shaped polymers are prepared by a convergent or

divergent method. In the convergent or arm-first method, amphiphilic linear polymers are first synthesized and then cross-linked using a bifunctional coupling agent⁽⁷²⁾. In the divergent or core-first method, a multifunctional initiator is used for the polymerization of the star polymer and yields UPM in a single step⁽⁷³⁻⁷⁶⁾. Arborescent polymers are highly branched structures prepared by successive grafting reactions of well-defined polymeric building blocks onto substrates with randomly distributed coupling sites⁽⁶⁹⁾.

Similar to PM, the properties of UPM depend on the nature of the building block. Numerous polymers can be used in UPM synthesis, and while PEO remains the gold standard for the shell-forming block, the hydrophobic moiety can be tailored to impart specific properties to the micelle, such as pH-sensitivity⁽⁷⁴⁾ or biodegradability^(75,77).

Unimolecular polymeric micelle characterization

Size measurements

It was shown that 4-nm star-shaped polymers could be prepared by a divergent method that is 10 times smaller than the size of the equivalent multimolecular PM prepared from linear polymer chains⁽⁷²⁾. Similarly, Newkome *et al.*⁽⁶⁵⁾ described star-shaped UPM of 3-5 nm. However, such small size, which is also classically obtained with dendritic polymers⁽⁷⁸⁾, may be too small to insure long circulation times in the blood, since the carrier may experience non-specific extravasation through small capillary pores or sinusoids in healthy tissue⁽⁷⁹⁾. Larger UPM with sizes in the range of 10 to 50 nm have also been obtained and may be more suitable for drug delivery applications.

Solvent sensitive behaviour of unimolecular polymeric micelles

Although they retain their micellar architecture in unselective solvents, UPM still undergo solvotrophic conformational changes. Yoo *et al.*⁽⁷³⁾ studied the effect of solvent on the conformation of 6-arm UPM composed of poly(methylmethacrylate) (PMMA) and PAA. ¹H-NMR studies revealed that signal from either the core or shell could be selectively

suppressed depending on the solvent used for analysis. Selective collapse of the PMMA core was further demonstrated by steady-state fluorescence studies, using pyrene-labelled PMMA-*b*-PAA (Py-PMMA-*b*-PAA). Pyrene is known to form excimers when the distance between two molecules is less than 0.5 nm. Accordingly, excimer formation is favoured in a collapsed core, since the distance between two incorporated pyrene molecules is reduced. The extent of excimer formation can be assessed from the ratio of the intensity of pyrene excimer (I_e)-to-monomer (I_m) bands. The I_e/I_m ratio was measured for Py-PMMA-*b*-PAA dissolved in methanol, a non-selective solvent, containing increasing amounts of chloroform, which is selective for the PMMA block⁽⁸⁰⁾. This ratio was found to decrease with increasing amounts of chloroform. Other UPM built using either dendrimers or star-shaped polymers have shown similar solvent-dependent behavior^(67,71).

Solubilization studies

Part of the interest of multimolecular PM as drug delivery agents arises from their capacity to solubilize hydrophobic compounds in water. Due to the similarity between multimolecular PM and UPM, the latter are expected to demonstrate similar properties but over a larger range of concentrations and conditions than conventional PM⁽⁸¹⁾. Hydrophobic fluorescent probes, such as pyrene, are commonly used as model water-insoluble compounds to evaluate the efficacy of UPM as solubilizing agents^(68,81). Hawker *et al.*⁽⁶⁸⁾ were able to solubilize 0.45 molecule of pyrene in each poly(benzylether)-PEO dendrimer, which was associated with a 120-fold increase in the solubility of pyrene in water (dendrimer concentration 213 μ M). In this case, π - π interaction between the aromatic benzene of both pyrene and the core may explain the relatively high solubilizing power of the dendrimers. Solubilization of pyrene was studied over a large range of concentrations, and UPM were able to solubilize, albeit in small amounts, hydrophobic compounds at concentrations as low as 5×10^{-7} M^(68,81).

Drug loading

In multimolecular PM, the drug may be incorporated during micelle formation or diffuse into a preformed micelle [see Section 4]. Since UPM do not present a CAC, drug loading necessarily occurs by diffusion of the drug into the micellar core. Loading of UPM is often achieved by simply mixing the polymer and drug in a good solvent for both entities. Following addition of water, the core-forming block collapses, entrapping drug molecules in the process⁽⁶⁸⁾. Liu *et al.*⁽⁷⁵⁾ used this method to load lidocaine into biodegradable UPM composed of mucic acid and alkyl chains of variable length surrounded by a PEO shell. Loading of 0.7 wt% was achieved when a propyl (C3) chain was used as the core-forming block. The payload increased to 1.0 and 1.6 wt%, respectively⁽⁷⁵⁾, when the length of the alkyl chain was increased to 6 and 12 carbons⁽⁷⁵⁾. In another study, loadings of 11 wt% were achieved for indomethacin, using third-generation poly(benzylether)-PEO dendrimers⁽⁶⁸⁾, which corresponds to 9-10 drug molecules per micelle. Although this is 2 times lower than the amount of the same drug solubilized in PEO-poly(benzyl L-aspartate) (PEO-b-PBLA) PM, these UPM still present remarkable loading capacity for their size.

Drug release

Use of UPM as drug carriers was not proposed until recently, and studies on this subject matter are scarce. Liu *et al.*⁽⁷⁷⁾ studied the *in vitro* release of lidocaine from biodegradable UPM through a semi-permeable membrane. The drug was assumed to be incorporated more favourably in the hydrophobic core than into the shell, and to be released by diffusion from the central core to the surrounding environment. The UPM were shown to sustain the release of lidocaine over 24 hours. Comparable results were obtained for indomethacin-loaded dendritic UPM⁽⁶⁸⁾, where release of free indomethacin was completed within 4 hours, while it took more than 24 hours to deplete UPM from their content. Introduction of stimuli-responsive functions in the core can be used to prepare UPM in

which release rate is controlled by an external trigger. We indeed showed that the presence of carboxylic groups in the core of star-shaped UPM render release of progesterone sensitive to pH (Figure 2.5)⁽⁷⁴⁾.

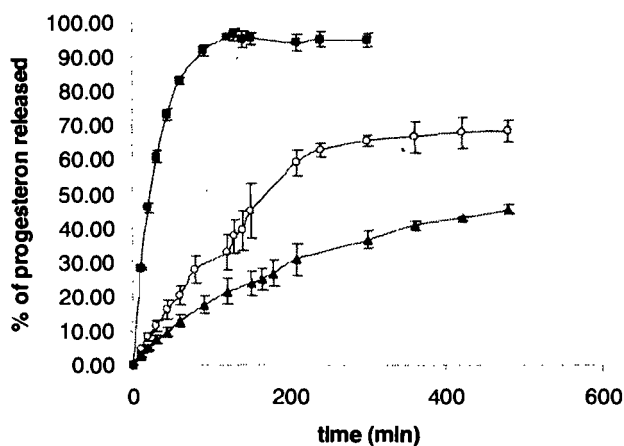


Figure 2.5. *In vitro* release study of progesterone encapsulated in star-shaped UPM (star (ethylmethacrylate-*co*-methacrylic acid)-*b*-PEOmethacrylate (M_n 20,000; 5 wt% progesterone) as a function of pH. UPM formulations were dialyzed against simulated gastric fluid pH 1.2 for 2 hours, at which point the pH was adjusted to pH 7 (open circles). Release of free (closed squares) and UPM loaded progesterone (closed triangles) at pH 1.2 were used as controls. The arrow indicates the time point at which pH was adjusted.

Inverse unimolecular polymeric micelles

Inverse UPM have been designed and studied as non-aqueous solubilizers for hydrophilic compounds. They consist of a polar core surrounded by a hydrophobic corona. Frey *et al.*⁽⁸²⁾ prepared inverse UPM from hyperbranched poly(glycerol) grafted with alkyl chains. The capacity of these micelles to solubilize water-soluble molecules has been

repetitively demonstrated^(83,84). The amount of incorporated guest molecules depended on the polymer MW and length of the alkyl chain⁽⁸⁴⁾, whereas the degree of substitution had a limited effect. Indeed, for poly(glycerol)-C16 derivatives, tripling the MW of the poly(glycerol) portion resulted in a 4-fold increase in the number of Congo red (a hydrophilic dye) molecules encapsulated per polymer. This is thought to result from increased hydrogen bonding between the dye and available hydroxyl groups within the core⁽⁸⁴⁾. Increasing the length of the alkyl chain from C8 to C16 was associated with a 2-fold increase in the amount of dye molecules solubilized in the polymer. A similar trend was observed for inverse UPM dendrimers of poly(propylene imine)-alkyl esters where a 2-fold increase in the number of generations caused a 7-fold increase in the number of hydrophilic guest molecules entrapped in the core⁽⁸⁵⁾. For hyperbranched poly(glycerol) with C16 alkyl chains grafted through either ester⁽⁸⁴⁾ or acetal bonds⁽⁸³⁾, the release of encapsulated molecules was shown to occur only after removal of the alkyl chains following acid-catalyzed hydrolysis. The opposite pH-dependent behaviour was observed for poly(ethyleneimine)-C16, for which amputation of the corona occurred at basic pH⁽⁸³⁾. Inverse UPM may find applications in the oral delivery of water-soluble drug. It was indeed shown that incorporation of 5-fluorouracil into poly(amidoamine)-C16 dendrimers doubled their oral bioavailability when administered to albino rats at a dose of 10 mg⁽⁸⁶⁾.

Conclusion

In the past two decades, PM have been the object of growing interest as potential delivery agents owing to their capacity to solubilize substantial amounts of hydrophobic drugs. However, the design of an optimal micelle formulation remains an intricate process. Multiple parameters, related to the nature of both the drug and the polymer must be taken into account, although hydrophobicity and drug-copolymer compatibility seem to be the most influential factors. Recently, new and more stable UPM have been introduced, with these promising carriers being studied as delivery agents for both hydrophobic and

hydrophilic therapeutic compounds. PM thus constitute versatile drug carriers that may find applications for the delivery of a large variety of bioactive compounds.

Acknowledgements

Funding from the Canada Research Chair Program, Labopharm Inc., the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds de Recherche en Santé du Québec is acknowledged. The authors extend their gratitude to Marie-Hélène Dufresne and Pierre Simard for their critical reading of the manuscript.

References

1. M. F. Francis, L. Lavoie, F. M. Winnik and J.-C. Leroux. Solubilization of cyclosporin A in dextran-g-polyethyleneglycolalkylether polymeric micelles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56:337-346 (2003).
2. X. Zhang, H. M. Burt, D. Von Hoff, D. Dexter, G. Mangold, D. Degen, A. M. Oktaba and W. L. Hunter. An investigation of the antitumor activity and biodistribution of polymeric micellar paclitaxel, *Cancer Chemother Pharmacol.* 40:81-86 (1997).
3. Y. Yamamoto, K. Yasugi, A. Harada, Y. Nagasaki and K. Kataoka. Temperature-related changes in the properties relative to drug delivery of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu, *J. Controlled Release.* 82:359-371 (2002).
4. E. Jule, Y. Nagasaki and K. Kataoka. Lactose-installed poly(ethylene glucol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles exhibit fast-rate binding and high affinity toward a protein bed simulating a cell surface. A surface plasmon resonance study, *Bioconjugate Chem.* 14:177-186 (2003).
5. H. M. Burt, X. Z. Zhang, P. Toleikis, L. Embree and W. L. Hunter. Development of copolymers of poly(D,L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel, *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 16:161-171 (1999).
6. C. Allen, Y. Yu, D. Maysinger and A. Eisenberg. Polycaprolatone-*b*-poly(ethylene oxide) block copolymer micelles as a novel delivery vehicle for neurotrophic agents FK506 and L-685,818, *Bioconjugate Chem.* 9:564-572 (1998).
7. D. Maysinger, O. Berezovska, R. Savic, P. Lim Soo and A. Eisenberg. Block copolymer modify the internalization of micelle-incorporated probes into neural cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 1539:205-217 (2001).
8. C. Allen, J. Han, Y. Yu, D. Maysinger and A. Eisenberg. Polycaprolactone-*b*-poly(ethylene oxide) copolymer micelles as a delivery vehicle for dihydrotestosterone, *J. Controlled Release.* 63:275-286 (2000).

9. J.-S. Park, J. Y. Lee, Y. Chang, J. M. Jeong, J. K. Chung, M. C. Lee, K. B. Park and S. J. Lee. Radioisotope carrying polyethylene oxide-polycaprolactone copolymer micelles for targetable bone imaging, *Biomaterials*. 23:873-879 (2002).
10. S. B. La, T. Okano and K. Kataoka. Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly(ethylene oxide)-Poly(β -benzyl L-aspartate) block copolymer micelles, *J. Pharm. Sci.* 85:85-90 (1996).
11. K. Kataoka, T. Matsumoto, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto and G. S. Kwon. Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(β -benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance, *J. Controlled Release*. 64:143-153 (2000).
12. M. L. Adams, D. R. Andes and G. S. Kwon. Amphotericin B encapsulated in micelles based on poly(ethylene oxide)-*block*-poly(L-amino acid) derivatives exerts reduced in vitro hemolysis but maintains potent in vivo antifungal activity, *Biomacromolecules*. 4:750-757 (2003).
13. C. Burguière, C. Chassenieux and B. Charleux. Characterization of aqueous micellar solutions of amphiphilic block copolymers of poly(acrylic acid) and polystyrene prepared via ATRP. Toward the control of the number of particles in emulsion polymerization, *Polymer*. 44:509-518 (2003).
14. M. Wilhelm, C.-L. Zhao, Y. Wang, R. Xu, M. A. Winnik, J.-L. Mura, G. Riess and M. D. Croucher. Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymers micelle formation in water: fluorescence probe study, *Macromolecules*. 24:1033-1040 (1991).
15. M. Yokoyama, S. Fukushima, R. Uehara, K. Okamoto, K. Kataoka, Y. Sakurai and T. Okano. Characterization of physical entrapment and chemical conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for in vivo delivery to solid tumor, *J. Controlled Release*. 50:79-92 (1998).
16. E. Fournier, M. Ranger and J.-C. Leroux. Characterization of water/tert-butanol mixtures in the preparation of diblock copolymer micelles, *AAPS Pharmsci 2003*. AAPS Annual Meeting and Exposition, Salt Lake City, USA.

17. V. P. Torchillin, A. N. Lukyanov, Z. Gao and B. Papahadjopoulos-Sternberg. Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs, *Proceed. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:6039-6044 (2003).
18. J. H. Jeong, H. S. Kang, S. R. Yang and J.-D. Kim. Polymer micelle-like aggregates of novel amphiphilic biodegradable poly(asparagine) grafted with poly(caprolactone), *Polymer.* 44:583-591 (2003).
19. H. Kang, J.-D. Kim, S.-H. Han and I.-S. Chang. Self-aggregates of poly(2-hydroxyethyl aspartamide) copolymers loaded with methotrexate by physical and chemical entrapment, *J. Controlled Release.* 81:135-144 (2002).
20. H. S. Kang, S. R. Yang, J.-D. Kim, S.-H. Han and I.-S. Chang. Effects of grafted alkyl groups on aggregation behavior of amphiphilic poly(aspartic acid), *Langmuir.* 17:7501-7506 (2001).
21. J.-G. Ryu, Y.-I. Jeong, I.-S. Kim, J.-H. Lee, J.-W. Nah and S.-H. Kim. Clonazepam release from core-shell type nanoparticles of poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone) triblock copolymers, *Int. J. Pharm.* 200:231-242 (2000).
22. H. Ge, Y. Hu, X. Jiang, D. Cheng, Y. Yuan, H. BI and C. Yang. Preparation, characterization and drug release behaviors of drug nimodipine-loaded poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(ϵ -caprolactone) amphiphilic triblock copolymer micelles, *J. Pharm. Sci.* 91:1463-1473 (2002).
23. N. Rapoport. Stabilization and activation of Pluronic micelles for tumor-targeted drug delivery, *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 16:93-111 (1999).
24. J. Liaw, S.-F. Chang and F.-C. Hsiao. In vivo gene delivery into ocular tissues by eye drops of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) polymeric micelles, *Gene Ther.* 8:999-1004 (2001).
25. J.-W. Nah, Y.-I. Jeong, C.-S. Cho and S.-I. Kim. Drug-delivery system based on core-shell-type nanoparticles composed of poly(γ -benzyl-L-glutamate) and poly(ethylene oxide), *J. Appl. Polym. Sci.* 75:1115-1126 (2000).

26. Y.-I. Jeong, J.-W. Nah, H.-C. Lee, S.-H. Kim and C.-S. Cho. Adriamycin release from flower-type polymeric micelles based on star-block copolymer composed of poly(γ -benzyl L-glutamate) as the hydrophobic part and poly(ethylene oxide) as the hydrophilic part, *Int. J. Pharm.* 188:49-58 (1999).
27. B. S. Lele and J.-C. Leroux. Synthesis and characterization of novel amphiphilic A-B-A triblock copolymers of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide or N-vinyl-2-pyrrolidone with poly(ϵ -caprolactone), *Macromolecules*. 35:6714-6723 (2002).
28. T. Riley, T. Govender, S. Stolnik, C. Xiong, M. C. Garnett, L. Illum and S. S. Davis. Colloidal stability and drug incorporation aspects of micellar-like PLA-PEG nanoparticles, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 16:147-159 (1999).
29. Y. Kakizawa and K. Kataoka. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:203-222 (2002).
30. E. Yoshida and S. Kunugi. Micelle formation of nonamphiphilic diblock copolymers through noncovalent bond cross-linking, *Macromolecules*. 35:6665-6669 (2002).
31. X. Yuan, M. Jiang, H. Zhao, M. Wang, Y. Zhao and C. Wu. Noncovalently connected polymeric micelles in aqueous medium, *Langmuir*. 17:6122-6126 (2001).
32. N. Nishiyama and K. Kataoka. Preparation and characterization of size-controlled polymeric micelles containing cis-dichlorodiamineplatinum(II) in the core, *J. Controlled Release*. 74:83-94 (2001).
33. I. Astafieva, X. Zhong and A. Eisenberg. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions, *Macromolecules*. 26:7339-7352 (1993).
34. C. Allen, D. Maysinger and A. Eisenberg. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery, *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 16:3-27 (1999).
35. P. Alexandridis, J. F. Holzwarth and T. A. Hatton. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association, *Macromolecules*. 27:2414-2425 (1994).

36. A. V. Kabanov, E. V. Batrakova and V. Alakhov. Pluronic[®] block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, *J. Controlled Release*. 82:189-212 (2002).
37. C. Booth and D. Attwood. Effects of block architecture and composition on the association properties of poly(oxyalkylene) copolymers in aqueous solution, *Macromol. Rapid Commun*. 21:501-527 (2000).
38. A. Kelarakis, V. Havredaki, C. J. Rekasas and C. Booth. Thermodynamics of micellization of diblock copolymers of ethylene oxide and styrene oxide in water, *Phys. Chem. Chem. Phys*. 3:5550-5552 (2001).
39. M.-C. Jones and J.-C. Leroux. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers, *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 48:101-111 (1999).
40. K. Yasugi, Y. Nagasaki, M. Kato and K. Kataoka. Preparation and characterization of polymer micelles from poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers as potential drug carriers, *J. Controlled Release*. 62:89-100 (1999).
41. A. Benahmed, M. Ranger and J.-C. Leroux. Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide), *Pharm. Res*. 18:323-328 (2001).
42. C. Scholz, M. Iijima, Y. Nagasaki and K. Kataoka. Polymeric micelles as drug delivery systems: a reactive polymeric micelle carrying aldehyde groups, *Polym. Adv. Technol*. 9:768-776 (1998).
43. N. Rapoport, W. G. Pitt, H. Sun and N. J.L. Drug delivery in polymeric micelles: from in vitro to in vivo, *J. Controlled Release*. 91:85-95 (2003).
44. R. Nagarajan, M. Barry and E. Ruckenstein. Unusual selectivity in solubilization by block copolymer micelles, *Langmuir*. 2:210-215 (1986).
45. F. Gabelle, W. J. Koros and R. S. Szechter. Solubilization of aromatic solutes in block copolymers, *Macromolecules*. 28:4883-4892 (1995).

46. J. Zhao, C. Allen and A. Eisenberg. Partitioning of pyrene between "crew cut" block copolymer micelles and H₂O/DMF solvent mixtures, *Macromolecules*. 30:7143-7150 (1997).
47. Y.-I. Jeong, J.-B. Cheon, S.-H. Kim, J.-W. Nah, Y.-M. Lee, Y.-K. Sung, T. Akaike and C.-S. Cho. Clonazepam release from core-shell type nanoparticles in vitro, *J. Controlled Release*. 51:169-178 (1998).
48. Y. Mizumura, Y. Matsumura, M. Yokoyama, T. Okano, T. Kawaguchi, F. Moriyasu and T. Kakizoe. Incorporation of the anticancer agent KRN5500 into polymeric micelles diminishes the pulmonary toxicity, *Jpn. J. Cancer Res.* 93:1237-1243 (2002).
49. Y. Mizumura, Y. Matsumura, T. Hamaguchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, T. Kawaguchi, W. J. M. Hrushesky, F. Moriyasu and T. Kakizoe. Cisplatin-incorporated polymeric micelles eliminate nephrotoxicity, while maintaining antitumor activity, *Jpn. J. Cancer Res.* 92:328-336 (2001).
50. S. C. Kim, D. W. Kim, Y. H. Shim, J. S. Bang, H. S. Oh, S. W. Kim and M. H. Seo. In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy, *J. Controlled Release*. 72:191-202 (2001).
51. D. Le Garrec, M. Ranger and J.-C. Leroux. Micelles in anticancer drug delivery, *Am. J. Drug Deliv.* 2: 15-42 (2003).
52. M. L. Adams and G. S. Kwon. Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly(ethylene glycol)-*block*-poly(N-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugate micelles: effect of acyl chain length, *J. Controlled Release*. 87:23-32 (2003).
53. D. Le Garrec, J. Taillefer, J. E. Van Lier, V. Lenaerts and J.-C. Leroux. Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model, *J. Drug Target*. 10:429-437 (2002).

54. Y. Nagasaki, K. Yasugi, Y. Yamamoto, A. Harada and K. Kataoka. Sugar-installed block copolymer micelles: their preparation and specific interaction with lectin molecules, *Biomacromolecules*. 2:1067-1070 (2001).
55. E. S. Lee, K. Na and Y. H. Bae. Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting, *J. Controlled Release*. 91:103-113 (2003).
56. Y. Li and G. S. Kwon. Methotrexate esters of poly(ethylene oxide)-block-poly(2-hydroxyethyl-L-aspartamide). Part I: effects of the level methotrexate conjugation on the stability of micelles and on drug release, *Pharm. Res.* 17:607-611 (2000).
57. K. L. Wooley. Shell crosslinked polymer assemblies: nanoscale constructs inspired from biological systems, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 38:1397-1407 (2000).
58. K. S. Murthy, Q. Ma, C. G. Clark, E. E. Remsen and K. L. Wooley. Fundamental design aspects of amphiphilic shell-crosslinked nanoparticles for controlled release applications, *Chem. Commun.* 773-774 (2001).
59. H. Huang, K. L. Wooley and J. Scafer. REDOR determination of the composition of shell cross-linked amphiphilic core-shell nanoparticles and the partitioning of sequestered fluorinated guests, *Macromolecules*. 34:547-551 (2001).
60. M. Iijima, Y. Nagasaki, T. Okada, M. Kato and K. Kataoka. Core-polymerized reactive micelles from heterotelechelic amphiphilic block copolymers, *Macromolecules*. 32:1140-1146 (1999).
61. J.-H. Kim, K. Emoto, M. Iijima, Y. Nagasaki, T. Aoyagi, T. Okano, Y. Sakurai and K. Kataoka. Core-stabilized polymeric micelle as potential drug carrier: increased solubilization of taxol, *Polym. Adv. Technol.* 10:647-654 (1999).
62. X. Zhang, J. K. Jackson and H. M. Burt. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol, *Int. J. Pharm.* 132:195-206 (1996).
63. G. R. Newkome, Z. Yao, G. R. Baker and V. K. Gupta. Cascade molecules: A new approach to micelles. A [27]-Arbopol, *J. Org. Chem.* 50:2003-2004 (1985).

64. D. A. Tomalia, V. Berry, M. Hall and D. M. Hedstrand. Starburst dendrimers. 4. Covalently fixed unimolecular assemblages reminiscent of spheroidal micelles, *Macromolecules*. 20:1164-1167 (1987).
65. G. R. Newkome, C. N. Moorefield, G. R. Baker, M. J. Saunders and S. H. Grossman. Unimolecular micelle, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30:1178-1179 (1991).
66. M. Q. Slagt, S.-E. Stiriba, R. J. M. Klein Gebbink, H. Kautz, H. Frey and G. van Koten. Encapsulation of hydrophilic pincer-platinum(II) complexes in amphiphilic hyperbranched polyglycerol nanocapsules, *Macromolecules*. 35:5734-5737 (2002).
67. L.-Z. Gong and L. Pu. Synthesis of a chiral micelle-like dendrimer with phenylene dendrons and a 1,1'-binaphthyl core, *Tetrahedron Lett.* 42:7337-7340 (2001).
68. M. Liu, K. Kono and J. M. J. Fréchet. Water-soluble dendritic unimolecular micelles: their potential as drug delivery agents, *J. Controlled Release*. 65:121-131 (2000).
69. M. Gauthier, J. Li and J. Dockendorff. Arborescent polystyrene-graft-poly(2-vinylpyridine) copolymers as unimolecular micelles. Synthesis from acetylated substrates, *Macromolecules*. 36:2642-2648 (2003).
70. C. Gao, D. Yan and W. Chen. Water-soluble degradable hyperbranched polyesters: novel candidates for drug delivery, *Biomacromolecules*. 4:704-712 (2003).
71. J. L. Hedrick, M. Trollsas, C. J. Hawker, B. Atthoff, H. Claesson, A. Heise, R. D. Miller, D. Mecerreyes, R. Jérôme and P. Dubois. Dendrimer-like star block and amphiphilic copolymers by combination of ring opening and atom transfer radical polymerization, *Macromolecules*. 31:8691-8705 (1998).
72. S. Antoun, J. F. Gohy and R. Jérôme. Micellization of quaternized poly(2-dimethylamio)ethyl methacrylate)-block-poly(methyl methacrylate) copolymers in water, *Polymer*. 42:3641-3648 (2001).
73. A. Heise, J. L. Hedrick, C. W. Frank and R. D. Miller. Starlike block copolymers with amphiphilic arms as models for unimolecular micelles, *J. Am. Chem. Soc.* 121:8647-8648 (1999).

74. M.-C. Jones, M. Ranger and J.-C. Leroux. pH-sensitive unimolecular polymeric micelles: synthesis of a novel drug carrier, *Bioconjugate Chem.* 14:774-781 (2003).
75. H. Liu, A. Jiang, J. Guo and K. E. Uhrich. Unimolecular micelles: synthesis and characterization of amphiphilic polymer systems, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 37:703-711 (1999).
76. L. Frauchiger, H. Shirota, K. E. Uhrich and E. W. J. Castner. Dynamic fluorescence probing of the local environment within amphiphilic starlike macromolecules, *J. Phys. Chem. B.* 106:7463-7468 (2002).
77. H. Liu, S. Farrell and K. Uhrich. Drug release characteristics of unimolecular polymeric micelles, *J. Controlled Release.* 68:167-174 (2000).
78. T. Glauser, C. M. Stancik, M. Möller, S. Voytek, A. P. Gast and J. L. Hedrick. Dendritic-linear miktoarm star polymers from orthogonal protected initiators, *Macromolecules.* 35:5774-5781 (2002).
79. M. El-Sayed, M. F. Kiani, M. D. Naiark, A. H. Hikal and H. Ghandehari. Extravasation of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers across microvascular network endothelium, *Pharm. Res.* 18:23-28 (2001).
80. M. Yoo, A. Heise, J. L. Hedrick, R. D. Miller and C. W. Frank. Photophysical characterization of conformational rearrangement from amphiphilic 6-arm star block copolymers in selective solvent mixtures, *Macromolecules.* 36:268-271 (2003).
81. C. J. Hawker, K. L. Wooley and J. M. J. Fréchet. Unimolecular micelles and globular amphiphiles dendritic macromolecules as novel recyclable solution agents, *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. I.* 1287-1297 (1993).
82. R. Haag, J.-F. Stumbé, A. Sunder, H. Frey and A. Hebel. An approach to core-shell type architecture in hyperbranched polyglycerols by selective chemical differentiation, *Macromolecules.* 33:8158-8166 (2000).

83. M. Krämer, J.-F. Stumbé, H. Türk, S. Krause, A. Komp, L. Delineau, S. Prokhorova, H. Kautz and R. Haag. pH-responsive molecular nanocarriers based on dendritic core-shell architectures, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41:4252-4256 (2002).
84. A. Sunder, M. Krämer, R. Hanselmann, R. Mülhaupt and H. Frey. Molecular nanocapsules based on amphiphilic hyperbranched polyglycerol, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38:3552-3555 (1999).
85. S. Stevelmans, J. C. M. Hest, J. F. G. A. Jansen, D. A. F. G. Van Boxtel, E. M. M. Da Brabander-van den Berg and E. W. Meijer. Synthesis characterization and guest-host properties of inverted unimolecular dendritic micelles, *J. Am. Chem. Soc.* 118:7398-7399 (1996).
86. S. A. Khopade, A. J. Khopade, A. S. Chauhan, P. Tripathi and N. K. Jain. A unimolecular reverse micellar dendrimer for oral delivery of 5-fluorouracil, *Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 26:953-954 (1999).

Objectifs et présentation des articles

Objectif général

La biodisponibilité d'un agent thérapeutique administré par la voie orale peut être affectée par différents facteurs, notamment par les propriétés physico-chimiques du principe actif (PA) lui-même. L'incorporation du PA à l'intérieur des vecteurs synthétiques a été proposée dans le but de contourner les principales barrières à l'absorption. Pour un PA hydrophobe, le but recherché est d'améliorer le profil de dissolution par une augmentation de la solubilité dans les liquides gastro-intestinaux. Dans le cas de molécules hydrophiles fragiles, tels les peptides, l'encapsulation permet surtout de protéger le PA de l'action des enzymes digestifs. Récemment, de nouveaux types de micelles polymères ont été décrits : d'une part, les micelles unimoléculaires (MUs) qui sont intrinsèquement stables en milieu dilué et d'autre part, les micelles polymères inverses (MIs) qui peuvent solubiliser d'importantes quantités d'agents hydrophiles en milieu organique non polaire. Jusqu'à ce jour, peu d'exemples de l'utilisation de tels vecteurs à des fins thérapeutiques ont été décrits.

L'objectif général de la thèse était donc d'évaluer le potentiel de vecteurs micellaires unimoléculaires et inverses pour l'administration orale de PAs.

Objectifs spécifiques.

Nous avons en premier lieu mis au point une formulation à base de MUs sensibles au pH. L'introduction de groupements ionisables devait permettre de moduler le caractère hydrophobe du cœur micellaire et promouvoir la libération du principe actif encapsulé, suite à une augmentation du pH. Les travaux de cette section visaient à :

- 1) Synthétiser les polymères étoilés amphiphiles
- 2) Étudier la conformation des polymères en solution aqueuse;
- 3) Évaluer la sensibilité au pH des micelles;
- 4) Étudier la libération d'un PA hydrophobe modèle en fonction du pH.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de MIs pour la formulation de peptide. Ces micelles ont permis de solubiliser des molécules peptidiques dans un véhicule huileux. Les objectifs propres à cette section étaient de :

- 1) Synthétiser des polymères amphiphiles hydrophobes;
- 2) Étudier la conformation des polymères en milieu organique;
- 3) Étudier l'interaction entre les MIs et diverses molécules peptidiques;

Ces essais ont confirmé que les MIs pouvaient solubiliser de fortes quantités de peptides dans des véhicules huileux. Les meilleurs rendements d'encapsulation ont été obtenus avec la vasopressine. Différentes formulations de vasopressine ont donc été évaluées lors d'essais *in vitro* puis *in vivo* chez le rat. Les travaux réalisés visaient à :

- 1) Étudier la cinétique de libération de la vasopressine encapsulée;
- 2) Évaluer l'activité pharmacologique et la pharmacocinétique de formulations micellaires de vasopressine administrée par voie orale;
- 3) Évaluer l'activité pharmacologique et la pharmacocinétique de formulations micellaires de vasopressine administrée par voie sous-cutanée.

Présentation des articles

Chapitre 3 : Cet article présente les résultats obtenus lors de la conception de MUs sensibles au pH. La première partie traite de la synthèse et de la caractérisation des copolymères amphiphiles étoilés. Par la suite, nous rapportons les résultats de l'étude du comportement de MUs sensibles au pH en solution. Finalement, nous avons évalué l'effet du pH sur la libération d'un principe actif hydrophobe modèle.

Chapitre 4 : Cet article présente la synthèse et la caractérisation physico-chimique de polymères étoilés amphiphiles. Sont également inclus, les résultats de l'incorporation de molécules peptidiques à l'intérieur de micelles inverses obtenues à partir de ces polymères ainsi que la détermination de leur coefficient de partage entre l'eau et l'oléate d'éthyle.

Chapitre 5 : Cet article présente les résultats de l'évaluation *in vitro* (cinétique de libération) et *in vivo* de formulations de micelles inverses. L'efficacité et la pharmacocinétique de formulations micellaires de vasopressine ont été étudiées suite à leur administration par voie orale et sous-cutanée chez le rat.

Chapitre 3. pH-Sensitive unimolecular polymeric micelles: synthesis of a novel drug carrier³

Marie-Christine Jones[†], Maxime Ranger[‡] and Jean-Christophe Leroux^{†*}

[†] Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7. [‡] Technology Innovation, Labopharm Inc., 1208 Bergar, Laval, Québec, Canada

Abstract

Novel amphiphilic star-shaped polymers showing pH-sensitivity were synthesized by atom transfer radical polymerization. These new polymers present a core-shell structure similar to polymeric micelles, but are inherently stable to dilution and can be referred to as unimolecular polymeric micelles. A 4-armed multi-functional initiator was used for the sequential polymerization of hydrophobic ethylmethacrylate and *tert*-butylmethacrylate and hydrophilic poly(ethylene glycol)methacrylate. Polymers of molecular weight ranging from 9,000 to 20,000 were obtained. Results of dynamic light scattering showed micelle size ranging from 11 to 40 nm. Unimolecular micelles were also analyzed by static light scattering in aqueous environment. Star-shaped polymers which presented the highest molar ratio of hydrophobic monomers tended to form high molecular weight aggregates in water. Hydrolysis of the *tert*-butylmethacrylate units permitted the introduction of ionizable methacrylic acid functions. Size distributions were bimodal at both acidic and basic pH. Since, the polymers were designed as potential delivery systems for the oral administration of hydrophobic drugs, they were titrated to evaluate the degree of ionization as a function of pH. In the stomach, the carboxylic functions are expected to be fully protonated. However, in the intestine, the micelles will be more than 40% ionized. Fluorescence studies

³ Paru dans *Bionjugate Chem*, (2003) 14 :774. Reproduit avec permission.© American Chemical Society (2003).

were conducted in order to evaluate the polarity of the micellar core. Results showed an increase in polarity with pH due to the ionization of the acid functions present along the polymer chains. The pH rise was associated with an increase in the *in vitro* release rate of progesterone, which was used as hydrophobic drug model.

Introduction

Polymeric micelles (PM) have been extensively studied as carriers for water-insoluble drugs (1). However, because micelle formation is a thermodynamic phenomenon, micelles are relatively unstable to infinitely dilute environments such as those encountered after oral or parenteral administration. To improve micelle stability, the synthesis of polymeric structures that mimic PM regarding their morphological properties has been proposed. Such polymers are referred to as unimolecular polymeric micelles (UPM) (2) and consist of covalently bound amphiphilic polymer chains. These colloids are intrinsically stable upon dilution since their formation is independent on polymer concentration. UPM have been obtained from both dendrimers (3,4) and star polymers (5-7). The latter form presents the advantage of being simpler to prepare since fewer synthetic steps are involved. Star polymers can be produced by the arm or core-first methods. The arm-first method involves the use of a multifunctional termination agent or the cross-linking of linear polymer chains prepared by “living”/controlled polymerization with a difunctional vinylic compound (8). In the core-first method, polymer chains are grown from a multifunctional initiator. In the present work, the latter method has been applied to the synthesis of UPM by atom transfer radical polymerization (ATRP). ATRP is a controlled radical polymerization procedure that allows control over both molecular weight and architecture. It has been previously employed to prepare polymers of varying morphologies, including linear (9,10) and star polymers (11-13). Heise et al. (5) have reported the synthesis of amphiphilic star polymers bearing an ionizable core and a hydrophobic shell. However, in that case, the micelle insolubility in water limits its application in drug delivery.

In this study, novel non-biodegradable water-soluble UPM with an ionizable core were developed as potential carriers for the oral delivery of hydrophobic drugs. To our knowledge, this is the first report on the use of ATRP to produce water-soluble UPM with an ionizable core. While diffusion is the sole mechanism by which drugs are released from non-biodegradable UPM, the introduction of ionizable functions within the core is expected to modify the partition coefficient of the drug between the hydrophobic core and the surrounding aqueous milieu upon a change in pH. In the stomach, the drug would remain inside the core, protected from interactions with stomach contents by the hydrophilic shell (Figure 3.1). As the carrier moves towards the jejunum, the increase in polarity resulting from the ionization of acidic units would promote the release of the drug. Poorly water-soluble drugs with low or variable oral bioavailability, such as HIV-1 protease inhibitors, may mostly benefit from incorporation in the proposed UPM formulations. Although this work focuses mainly on the preparation of novel ionizable anionic UPM for the oral delivery of drugs, other types of UPM (non-ionic and cationic) could be prepared by the proposed synthetic procedure (14).

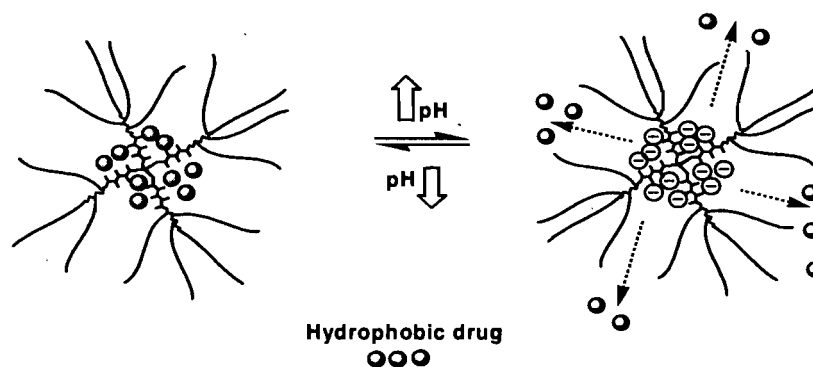


Figure 3.1. Theoretical drug release from a pH-sensitive UPM. It is expected that the ionization of the carboxylic functions within the micellar core will provoke an increase in polarity which in turn will aid the release of the hydrophobic drug solubilized in the core.

Experimental procedures

Materials

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI) except where otherwise stated. Tetrahydrofuran (THF) was dried over sodium using benzophenone as a dryness indicator, and distilled under nitrogen prior to use. Ethylmethacrylate (EMA) and *tert*-butylmethacrylate (tBMA) were distilled under vacuum prior to use. Poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA) (475 g/mol) was passed through a hydroquinone-monomethylhydroquinone inhibitor remover column and then washed with a 5% sodium hydroxide solution. PEGMA of lower molecular weight (MW) (200 and 400 g/mol) were purchased from Polysciences (Warrington, PA) and used without further purification. All other reagents were used as received. Deuterated chloroform (CDCl₃), water (D₂O) and methanol (MeOD) were purchased from CDN Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada). Radiolabeled ³H-progesterone was obtained from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

Synthesis of ATRP initiator: tetra(2-bromoisobutyryl)pentaerythritolate

2-Bromoisobutyrylbromide (0.200 mol) was slowly added to a slightly cooled solution of pentaerythritol (0.025 mol) and triethylamine (0.15 mol) in THF (Scheme 1). The solution was allowed to reach room temperature and stirred for 24 h. The mixture was then transferred to a separation funnel with 300 mL of dichloromethane, and extracted successively with 10% HCl, 10% NaOH and brine. The organic extracts were dried over MgSO₄, and the solvent removed by rotary evaporation. The crude extract was dissolved in a small amount of dichloromethane and recrystallized in methanol. MS (positive FAB) 728,9 (MH⁺). ¹H NMR (δ, ppm, CDCl₃): 4.33 (s, 8H); 1.94 (s, 24H). ¹³C NMR (δ, ppm,

CDCl₃): 171.3; 77.4; 63.2; 55.6; 44.0; 31.0. Elemental analysis C (34.60±0.07%), H (4.44±0.01%).

Synthesis of star-P(EMA-co-tBMA)-b-P(PEGMA)

ATRP was carried out in THF using copper bromide (CuBr(I)) as a catalyst and N,N,N',N',N''-pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA) as a ligand (Scheme 2). ATRP tetra-initiator (1 mol) was added to CuBr (1.8 mol), PMDETA (3 mol), EMA (16 or 40 mol) and tBMA (16 or 40 mol) in THF (0.4 M). The mixture was degassed under argon for 15 min at room temperature and then heated to 65°C. The hydrophobic core was reacted for 1 h at which point PEGMA (200, 400 or 475 g/mol) was added to the reaction pot. The mixture was left to further react and then poured in THF containing ethanol. The polymer was passed through a silica gel column to remove CuBr, using THF as the eluent. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude polymer extract was dialyzed against water for 36 h (Spectra/Por no. 1, MW cut-off 6,000-8,000). The polymer was recovered by freeze-drying. All polymers are referred to by S_{E_x}T_xP_{Y_x} where X is the DP of EMA (E), tBMA (T) or PEGMA (P) and Y is the MW of the PEGMA monomer divided by 100. S_{E₁₆}T₁₆P₂₂₅, ¹H-NMR (δ, ppm, CDCl₃): 4.08 (m, 82H); 3.65 (m, 760H); 3.39 (s, 77H); 1.82 (m, 118H); 1.42 (s, 144H); 1.26 (m, 65H); 0.87 (m, 174H). S_{E₁₃}T₁₁P₄₃₄, ¹H NMR (δ, ppm, CDCl₃): 4.08 (m, 95H); 3.65 (m, 1258 H); 3.38 (s, 116H); 1.79 (m, 117H); 1.42 (s, 105H); 1.26 (m, 47H); 0.86 (m, 177H). S_{E₁₈}T₁₇P₄₄₂, ¹H-NMR (δ, ppm, CDCl₃): 4.08 (m, 124H); 3.65 (m, 1265H); 3.39 (s, 126H); 1.82 (m, 244H); 1.42 (s, 153H); 1.26 (m, 53H); 0.87 (m, 219H). S_{E₂₄}T₂₃P₂₂₉, ¹H NMR (δ, ppm, CDCl₃): 4.08 (m, 98H); 3.65 (m, 411 H); 3.38 (s, 84H); 1.79 (m, 177H); 1.42 (m, 208H); 1.26 (m, 47H); 0.86 (m, 218H).

Preparation of star-P(EMA-co-MAA)-b-P(PEGMA).

pH-responsiveness was introduced by the hydrolysis of tBMA units into methacrylic acid (MAA). Concentrated HCl was added to a solution of the polymer bearing tBMA groups in refluxing dioxane (2.6 M). The reaction was stirred overnight. The solvent was removed by rotary evaporation, and the hydrolyzed polymer was dialyzed against water for 48 h. The polymers were recovered by freeze-drying. All hydrolyzed polymers are identified by as $S_{E_x}M_xPY_x$, where M_x is the DP of MAA. $S_{E_{16}}M_{16}P_{25}$, 1H -NMR (δ , ppm, MeOD): 4.13 (m, 92H); 3.68 (m, 760H); 3.39 (s, 61H); 1.94 (m, 117H); 0.9-1.29 (m, 379H). $S_{E_{13}}M_{11}P_{34}$, 1H -NMR (δ , ppm, MeOD): 4.13 (m, 139); 3.68 (m, 1258H); 3.39 (s, 91H); 1.94 (m, 176H); 0.9-1.29 (m, 573H). $S_{E_{18}}M_{17}P_{42}$, 1H -NMR (δ , ppm, MeOD): 4.13 (m, 140H); 3.68 (m, 1265H); 3.39 (s, 92H); 1.94 (m, 177H); 0.9-1.29 (m, 576H). $S_{E_{24}}M_{23}P_{29}$, 1H -NMR (δ , ppm MeOD): 4.13 (m, 50H); 3.68 (m, 416H); 3.39 (s, 34H); 1.94 (m, 64H); 0.9-1.29 (m, 204H).

MW determination by size exclusion chromatography

Number- (M_n) and weight- (M_w) average molecular weights were determined using a Waters 1525 size exclusion chromatography (SEC) system equipped with a 2410 refractometer (Waters, Milford, MA) and low-angle laser light scattering (PD2000DLS, Precision Detectors, Bellingham, MA) detector. Analyses were performed in DMF with 10 mM LiBr, at a flow rate of 1 mL/min using a set of 3 Styragel HT2, HT3 and HT4 columns (Waters, Milford, MA), maintained at 45° C.

Multi-angle static light scattering experiments (MALLS)

Star-P(EMA-co-tBMA)-b-P(PEGMA) were analyzed by MALLS on a Malvern Autosizer 4800 equipped with a uniphase argon ion laser (488 nm) (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.). M_w were calculated from equation 1:

$$\frac{Kc_p}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} \langle R_g^2 \rangle q^2 \right) + 2A_2c_p \quad (1)$$

where c_p is the polymer concentration, A_2 the second virial coefficient, R_g the gyration radius, R_θ the rayleigh ratio, $q = (4\pi n / \lambda) \sin(\theta / 2)$ (where θ is the scattering angle) and $K = 4\pi^2 n^2 (dn/dc_p)^2 / \lambda^4 N$, where n is the refractive index of the solvent, (dn/dc_p) the refractive index increment and N , Avogadro's number. Values of dn/dc_p were obtained using a Fisherbrand Abbe Benchtop refractometer (Fisher Scientific Ltd., ON, Canada). The calculated dn/dc_p values were of 0.1469 ml/g and 0.1552 ml/g for S_E18T17P442 and S_E24T23P229 respectively. Zimm plots were obtained by measuring the intensity of the scattered light at varying angle and concentrations to obtain M_w .

Size analysis by dynamic light scattering (DLS)

The hydrodynamic diameter were determined by DLS on a Malvern Autosizer 4800. Aqueous polymer solutions of varying concentrations were prepared and passed through a 0.22- μ m filter prior to size determination. Size measurements were performed at a 90° angle in triplicate at 25°C. In some experiments, pH was adjusted using small amounts of NaOH 0.5 N or HCl 0.5 N

Potentiometric titrations

Aqueous solutions of the polymer were prepared (1 mg/mL) and titrated with NaOH 0.05 N. pH values were plotted as a function of the degree of ionization α , where

$\alpha = C_b / C_{MAA}$ and C_b is the concentration of NaOH added to the solution, C_{MAA} is the concentration of MAA in solution. The apparent pK_a values were calculated from equation 2 (15):

$$pK_a = pH + \log \frac{1-\alpha}{\alpha} \quad (2)$$

Fluorescence studies

The local environment inside the hydrolyzed UPM was characterized by spectrofluorimetry. Pyrene was chosen as the fluorescent probe because its fluorescence is polarity-dependent. Hydrolyzed UPM solutions were prepared in water. Pyrene was added to the solution (2×10^{-7} M final concentration), and pH was adjusted to 3 or 11 with small amounts of NaOH or HCl 1 M. The solutions were stirred overnight in the dark at room temperature. Excitation spectra ($\lambda_{em} = 393$ nm) were obtained at 25°C on a Series 2 Aminco Bowman fluorimeter (Spectronic Instruments Inc., Rochester, NY).

In vitro drug release studies

Drug release experiments were carried out using progesterone as hydrophobic model drug. A solution of UPM (1% w/v), ^3H -progesterone (0.5 $\mu\text{Ci/mL}$) and cold progesterone (0.05% w/v) was prepared in acetone. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting film was hydrated in 2-mL simulated gastric buffer (HCl 0.06 M/NaCl 0.021 M; pH 1.2). The micelle-drug complex (5% w/w drug loading) was transferred into a dialysis bag (MW cut-off 6,000-8,000) and dialyzed against simulated gastric buffer at 37°C. When needed, the pH was adjusted to 7.4 or 11 after 2 h by adding NaOH (0.25% w/v)/ NaH_2PO_4 (0.12% w/v) or NaOH (0.25% w/v) to the acidic milieu. Aliquots of the dialysis milieu were taken at predetermined time intervals, and the radioactivity was measured on a LKB-Wallac 1217 Rackbeta liquid scintillation counter (Perkin-Elmer, Boston, MA). Release of free progesterone was also performed as a control.

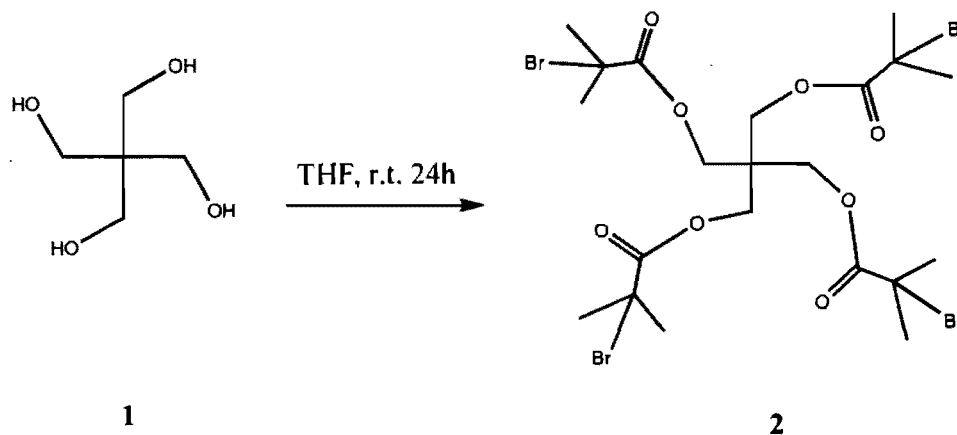
A similar procedure was used, except for the concentration of unlabeled progesterone, which was decreased by 250-fold to avoid drug precipitation in the dialysis bag.

Results and discussion

Star-P(EMA-co-tBMA)-b-P(PEGMA)

Polymer characterization.

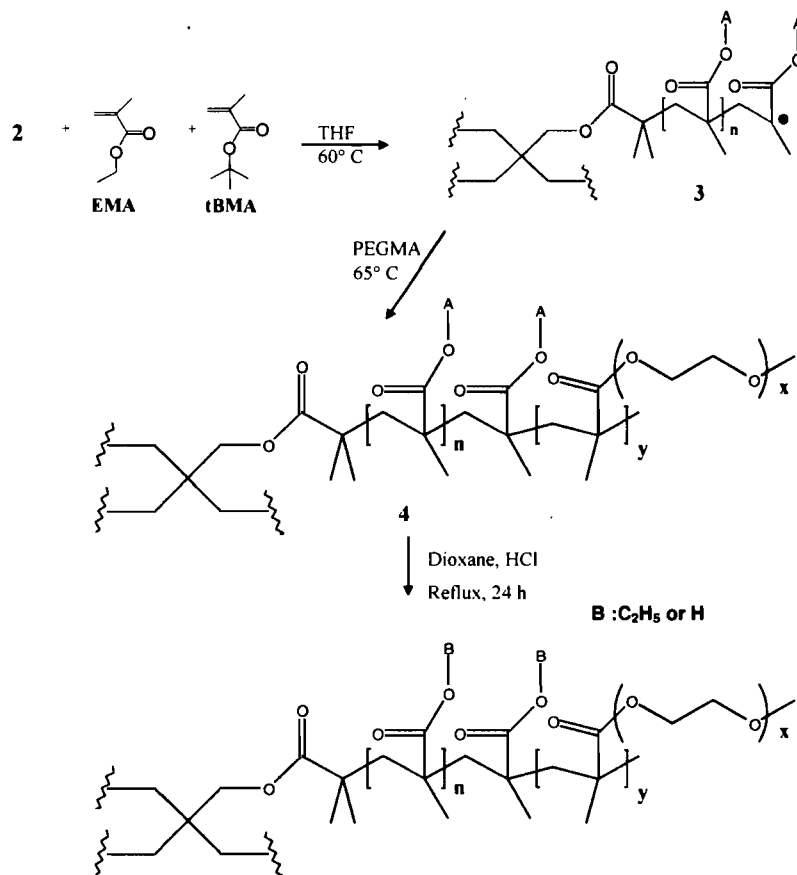
Star-shaped polymers were synthesized by the core-first method. The first step consisted in the synthesis of a multifunctional initiator, tetra(2-bromoisobutyryl)pentaerythritolate, which was obtained by the esterification of pentaerythritol in the presence 2-bromoisobutyryl bromide (Scheme 3.1). This initiator was used for the polymerization of tBMA and EMA (the core forming units) and of PEGMA (the shell forming unit) (Scheme 3.2). The characteristics of the polymers are presented in Table 1. The degrees of polymerization (DP) of S_{E18}T₁₇P₄₂ as calculated by NMR spectroscopy were slightly higher than the feed ratio, but remained within the experimental error. S_{E18}T₁₇P₄₂ and S_{E24}T₂₃P₂₉ were analyzed by SEC equipped with LALLS detector. Absolute M_n determined by LALLS for these 2 polymers were similar to those calculated by NMR spectroscopy. Relatively low polydispersity indices (<1.3) were obtained for both polymers, which is consistent with controlled radical polymerization.



Scheme 3.1. Synthesis of ATRP multifunctional initiator tetra(2-bromoisobutyryl) pentaerythritolate (**2**). Pentaerythritol (**1**) (25 mmol) is esterified by 2-bromoisobutyrylbromide (200 mmol) in the presence of triethylamine (150 mmol) in THF at room temperature.

MALLS

MALLS analysis was carried out for S_{E18T17P442} and S_{E24T23P229}. The absolute M_w obtained for S_{E18T17P442} was close to that observed in organic solvent suggesting the existence of true UPM. However, for S_{E24T23P229}, which is more hydrophobic, M_w over a million was observed (Table 3.1), indicating that polymer chains tend to aggregate in water. Indeed, this polymer presents a higher proportion of hydrophobic monomers. Also, in this case the M_w of the PEGMA chain used to form the micelle shell is half that of S_{E18T17P442} and may not completely shield the core from hydrophobic intermolecular interactions.



Scheme 3.2. Synthesis of pH-sensitive star-shaped amphiphilic polymers by ATRP. The initiator (**2**) is first reacted with hydrophobic EMA and tBMA to yield the micellar core star-P(EMA-co-tBMA) (**3**). The hydrophilic shell is formed by the polymerization of PEGMA which is added to the reaction pot to obtain the star-shaped amphiphilic polymer (**4**). Hydrolysis of tBMA units of compound **4** yields the pH-sensitive UPM (**5**).

Table 3.1. Characteristics of the star-shaped polymers

Polymer	DP EMA	DP tBMA	DP PEGMA	MW of PEGMA unit (g/mol)	NMR M_n	LALLS ^a			MALLS ^b M_w	DLS Size (nm)
						M_n	M_w	PI		
S_E16T16P2-25	16	16	25	200	9,100	N/A	N/A	N/A	N/A	15.4
S_E13T11P4-34	13	11	34	475	19,670	N/A	N/A	N/A	N/A	14.3
S_E18T17P4-42	18	17	42	400	21,200	32,000	38,700	1.20	48,500	11.0
S_E24T23P2-29	24	23	29	200	11,950	20,850	26,500	1.27	1.4x10 ⁶	(56%) 140.6 (44%)

N/A: not available; ^a determined in DMF with 10 mM LiBr; ^b determined in H₂O at 25°C. Polymer concentration: 0.5 mg/mL) to determine whether the amphiphilic polymer would behave as unimolecular micelles in water or self-assemble to form multimolecular structures.

¹H NMR spectroscopy analysis.

Amphiphilic star polymers, just as PM, have been shown to adjust to changes in their environment by changing their conformation. In order to get an insight on the interactions of the micelle core with the external environment, NMR spectra were recorded in D₂O and CDCl₃ (Figure 3.2). In CDCl₃, ¹H-NMR spectrum of the UPM showed signals from both the PEGMA shell (signal 6, δ =3.65 ppm) and the *tert*-butyl signal from tBMA (signal 1, δ =1.9 ppm, tBMA was used as a reference signal for the core) since chloroform is a good solvent for both PEGMA and the 2 hydrophobic monomers (Figure 3.2A). In D₂O, the signals observed were those of PEGMA whereas the signal corresponding to tBMA was not visible (Figure 3.2B). This indicates reduced proton mobility of the core-forming units and thus high core viscosity in aqueous media.

Size measurements.

DLS experiments were performed on aqueous solutions (0.5 mg/mL) of the polymers to evaluate their hydrodynamic diameter (Table 3.1). Small sizes (ca. 11-16 nm) were obtained for all formulations except S_{E₂₄T₂₃P₂₉}. Indeed, particle sizes exceeding 30 nm were observed for the latter, corroborating the results obtained by MALLS. Star polymer with the same amount of hydrophobic monomers but with differing PEGMA showed similar sizes (Table 3.1). Since the shell is composed of pendant PEG chains, their length may not significantly affect the hydrodynamic radius of the carrier. Hydrophobicity of the carrier seemed to be the most influential factor. S_{E₂₄T₂₃P₂₉} presented the highest molar ratio of hydrophobic monomers compared to hydrophilic PEGMA and may be more prone to aggregation. Indeed, although size distribution remained unimodal and independent of concentration for all other star polymers, size increased with concentration for S_{E₂₄T₂₃P₂₉} (data not shown), which is consistent with the presence of secondary aggregates, a phenomenon commonly observed with PM (16) and lipidic dendrimers (17).

The small size of these UPM present several advantages for drug delivery applications. Small-sized carriers (<100 nm) have the advantage of longer circulation time in blood, after intravenous administration, due to decreased interactions with the mononuclear phagocyte system. This has long been recognized as one of the most attractive characteristics of PM (1). Oral absorption of polymeric carriers is also affected by size. Indeed, the size limit for particle uptake by transcytosis was evaluated at 100 nm (18). Smaller particles (50 nm) were also shown to be better absorbed than larger particles (3 μm) (19). Also, the high specific surface area of small drug carriers facilitates the dissolution of hydrophobic drugs in gastrointestinal fluids and increases their bioavailability (20).

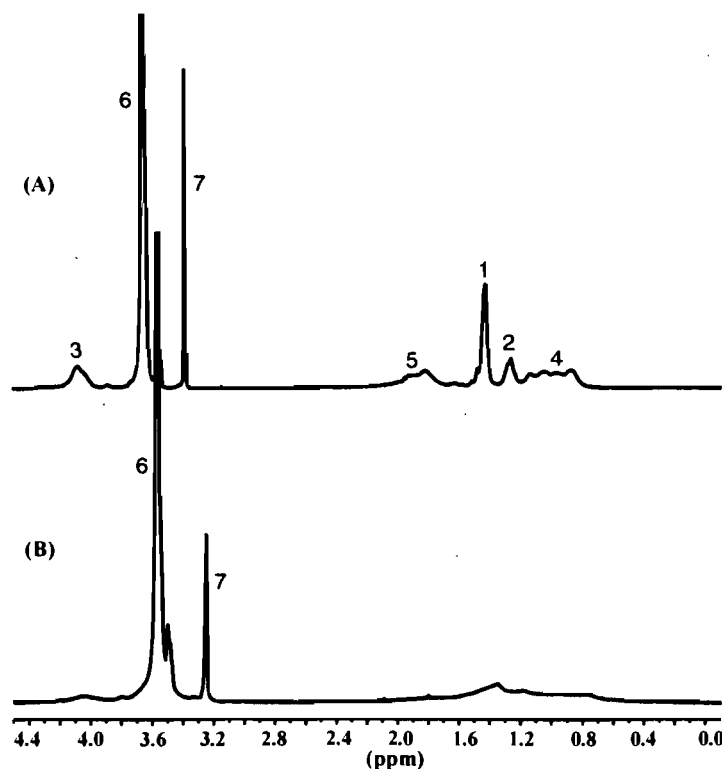
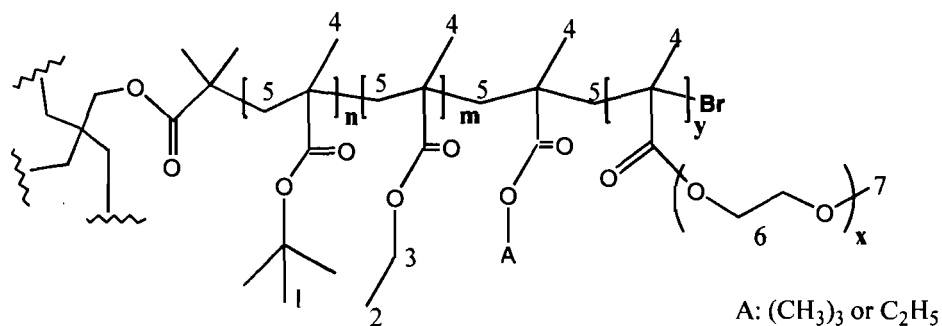


Figure 3.2. Study of the influence of solvent polarity on UPM conformation. ¹H-NMR spectra (300 MHz) of UPM S_{E18}T₁₇P₄₂ in CDCl₃ (A) and D₂O (B). Signals 1 to 5 can be attributed to hydrophobic EMA and tBMA monomers while signals 6 and 7 are those of hydrophilic PEGMA. The signals for both the core and the shell were visible in apolar chloroform while only the signals of PEGMA can be seen in water.

Star-P(EMA-co-MAA)-b-(PEGMA)

Hydrolysis of tBMA units. pH-responsiveness was introduced by the hydrolysis of tBMA units in dioxane (2.6 M) with concentrated HCl (Scheme 2). The reaction proceeded easily and was monitored by the disappearance of the tBMA peak in the ¹H-NMR spectrum

(data not shown). tBMA units were selectively hydrolyzed under these conditions since NMR did not show any signs of polymer degradation and the polymer maintained its water solubility.

¹H NMR spectroscopy analysis.

¹H NMR spectra were recorded for hydrolyzed polymers as a function of pH. At acidic pH, only the PEGMA signals were observed (Figure 3.3A). As the pH is increased, electrostatic repulsions between negatively charged MAA is thought to force the polymeric chains to adopt a more extended conformation thus allowing both the core and the shell signals to be seen (Figure 3.3B). Comparatively, the intensity of the signals associated to the protons of PEGMA was lower at acidic pH, than at pH 12, suggesting possible hydrogen bonding between the carboxylic functions of MAA and the oxygen atom of PEGMA (21), and reduction of the mobility of the protons implicated in the interaction. The presence of hydrogen bonding was also suspected for S_E₂₄M₂₃P₂₋₂₉ in MeOD and thought to account for the observed discrepancies in signal intensity between the NMR spectrum of S_E₂₄M₂₃P₂₋₂₉ and its non-hydrolyzed precursor.

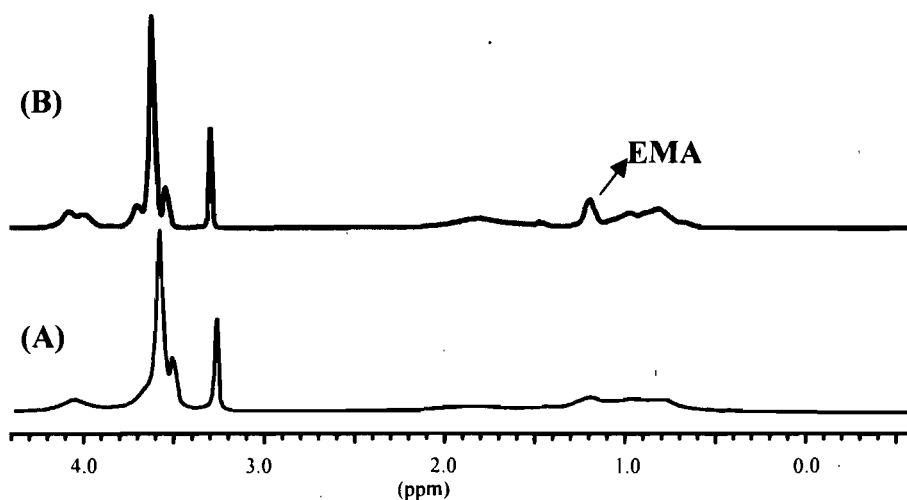


Figure 3.3. Study of the influence of pH on hydrolyzed UPM conformation. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (300 MHz) of $\text{S}_{\text{E}18}\text{M}_{17}\text{P}_{442}$ in D_2O at pH 2 (A) and pH 12 (B). Polymers were dissolved in D_2O and the pH was adjusted using small amounts of NaOH or HCl 0.01 N. The signal of EMA (0.9 ppm, as indicated by the arrow) was used as a reporter signal for the hydrophobic core.

Potentiometric titrations.

Hydrolyzed UPM were titrated in order to evaluate their MAA content. The latter was approximated from the volume of NaOH corresponding to the maximum of the first derivative of pH vs. NaOH volume plot (data not shown). For both $\text{S}_{\text{E}18}\text{M}_{17}\text{P}_{442}$ and $\text{S}_{\text{E}24}\text{M}_{23}\text{P}_{229}$, the DP of MAA was 82-88% that of the value estimated from tBMA DP (Table 3.1). This slight discrepancy may be explained by the presence of MAA units located deeper in the core that may not be readily accessible by NaOH. Also, MAA protons implicated in hydrogen bonding with PEG do not readily dissociate even in the presence of NaOH and are thus not accounted for (22). Titration curves were also used to evaluate the degree of ionization (α) as a function of pH (Figure 3.4). The resulting curve presented a single equivalent point at $\alpha = 1$, which corresponds to the complete neutralization of the MAA units (15, 23) and occurred around pH 9 for both polymers studied (Figure 3.4). Similar results were obtained for different MAA random copolymers (24). Apparent pK_a values were extrapolated from the curves and are presented in Figure 3.5.

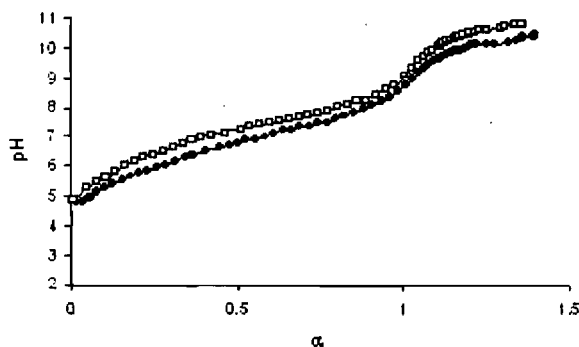


Figure 3.4. Plot of the pH as a function of the degree of ionization for S_E₁₈M₁₇P₄₄₂ (closed circles) and S_E₂₄T₂₃P₂₂₉ (open squares). The degree of ionization (α) was calculated as $\alpha = C_b / C_{MAA}$. Solutions of the polymers were prepared in water (1 mg/mL) and titrated using NaOH 0.05N. Results are a average of three measurements.

Contrarily to monomeric MAA for which a single pK_a value of 4.5 (25) can be calculated, polymeric MAA shows a dependence of the pK_a value over α and higher pK_a values are generally observed (23). Neutralization of MAA has been shown to be influenced by conformational changes of the polymer chain (15), usually evidenced by the presence of two inflection points in the plot of pK_a vs. α . However, in the present case, except for a small plateau at low α values, pK_a increased steadily with α . The electrostatic repulsion initially rising from the ionization of MAA units caused polymer chains to expand and translated into the plateau observed between $\alpha = 0.05$ to 0.10 for S_E₂₄M₂₃P₂₂₉, and between $\alpha = 0.06$ to 0.15 for S_E₁₈M₁₇P₄₄₂ (15). Although polymer chains may experience some conformational changes due to the ionization of MAA units, the fact that chains are covalently bonded to one another prevents the occurrence of marked transitions such as the coil-to-globule transition that has been observed in other studies (15,24). It is

predicted from the titration curves that changes in the ionization of the carrier will occur as it travels through the gastro-intestinal tract. Indeed, it can be hypothesized that the UPM will be fully protonated in the stomach (pH 1 to 2). As the drug carrier travels through the small intestine, the degree of ionization (20% at pH 6 in the jejunum) will reach more than 40% in the ileum (pH 7).

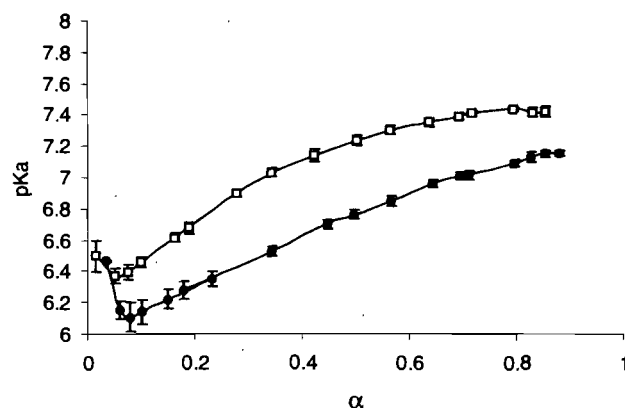


Figure 3.5. Plot of the apparent pK_a as a function of the degree of ionization (α) for S_E₁₈M₁₇P₄₄₂ (closed circles) and S_E₂₄T₂₃P₂₂₉ (open squares). pK_a values were obtained from $pK_a = pH + \log \frac{1-\alpha}{\alpha}$. Results are presented as the average of three experiments \pm SEM (when not visible SEM error bars are smaller than symbol).

Size measurements.

The size of hydrolyzed UPM was determined in water as a function of pH (Table 3.2). The polymers generally presented a bimodal size distribution with a small population size around 9-11 nm and large secondary aggregates (> 150 nm). The presence of large aggregates may either be attributed to hydrophobic interactions or to hydrogen bonding between MAA and PEGMA units, due to the relatively high concentration of polymer (10 mg/mL), which was required to obtain an adequate signal intensity. Compared to the non-ionizable polymer precursor, star-P(EMA-co-MAA)-b-P(PEGMA) scattered light less efficiently, and thus higher concentrations were used. In the case of S_E₂₄M₂₃P₂₂₉, the polymer precipitated at pH 2, indicating insufficient steric stabilization and important

hydrogen bonding between UPM . The presence of aggregates is a problem often associated with micelles leading to bimodal size distribution. Although size may influence the properties of the carrier *in vivo*, it will do so only if the aggregates are stable to the dilution encountered after oral or intravenous administration (26). Following oral administration, the micelles will find themselves diluted in the contents of the stomach and the small intestine. It is likely that this dilution will cause the breakdown of the secondary aggregates into single micellar entities, thus minimizing the possible effects of a bimodal size distribution

Table 3.2. Size determination of pH-sensitive UPM (10 mg/mL) by DLS

pH	S _{E18} M ₁₇ P ₄₂		S _{E24} M ₂₃ P ₂₉	
	Peak area (%)	Hydrodynamic diameter (nm)	Peak area (%)	Hydrodynamic diameter (nm)
2	60%	11	precipitate	precipitate
	40%	180		
4	45%	9.0	100%	136
	55%	158		
12	35%	11.4	37%	9.0
	65%	170		

Fluorescence studies.

Fluorescence studies were performed in order to evaluate the effect of pH variations on the local environment of the UPM core. Pyrene was chosen to conduct those assays because its fluorescence is polarity-sensitive (27). In the case of ionizable polymers containing MAA units, it is expected that the fluorescence of pyrene will vary as the pH inside the core changes from acidic to basic. At lower pHs values, the presence of un-ionized MAA, along with EMA, units affords a non-polar environment. This results in increased fluorescence emission intensity, compared to the value in pure water, and a red shift of the (0,0) band from 333 nm to 337 nm (Figure 3.6). At higher pH values, the

ionization of carboxylic groups renders the environment more polar, resulting in a 40% reduction of fluorescence intensity. These data confirm that pH does influence the local environment inside the core. However, even at higher pH values, the spectrum obtained is still that of pyrene in a hydrophobic environment, albeit less than at acidic pH. At least 2 hypotheses could be proposed to rationalize this observation. Firstly, although polarity is effectively increased by the ionization of MAA units, the presence of hydrophobic EMA may compensate by providing hydrophobic clusters in which pyrene might be trapped. Indeed, the EMA units are randomly distributed along the hydrophobic chains. They serve to increase the hydrophobicity of the core and afford a more favorable environment for a water-insoluble compounds than MAA units alone. Secondly, the increased polarity may promote the partial pyrene release into the aqueous milieu, which might account for the decreased emission intensity.

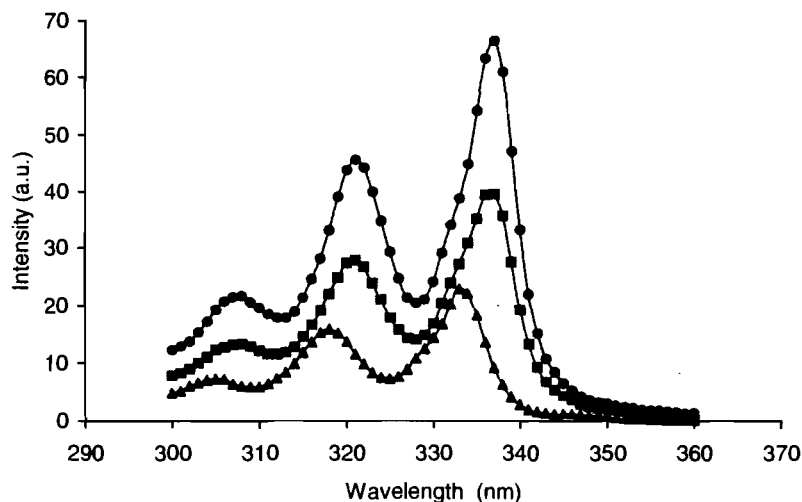


Figure 3.6. Fluorescence study of the effect of pH on the local environment inside UPM core. Excitation spectrum of pyrene ($2 \times 10^{-7} \text{M}$) were obtained in water (closed triangles) and in the presence of S_{E24}M₂₃P₂₉ (2 mg/mL) at pH 3 (closed circles) and pH 11 (closed squares). $\lambda_{em} = 393 \text{ nm}$.

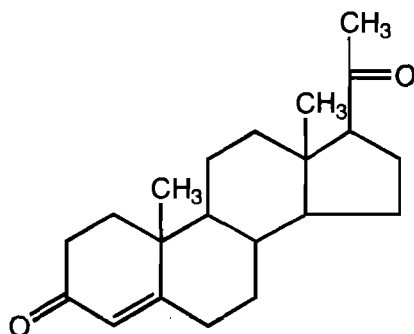


Figure 3.7. Chemical structure of progesterone.

***In vitro* drug release.**

Drug release from polymeric micelle will depend mainly on drug diffusion, on the stability of the carrier and on polymer degradation (26). As the present UPM are stable to dilution and composed of non biodegradable polymers, diffusion will be the sole mechanism for drug release. Diffusion of the drug from the micelle may be influenced by several factors, such as core hydrophobicity. The introduction of pH-sensitive acidic functions in the core is expected to influence its polarity upon pH variations. Indeed, the increased polarity ensuing from the ionization of carboxylic functions may promote the diffusion of the drug from the core. Thus, *in vitro* kinetics studies were performed to evaluate the effect of pH on the release of a hydrophobic model drug. Progesterone is a hormone synthesized naturally from cholesterol with which it shares structural similarities (Figure 3.7). It was selected as a model drug mainly due to its low solubility in water and because it does not bear any pH-sensitive functional groups, which would otherwise complicate the interpretation of the release kinetics. Figure 3.8A shows the release kinetics of free and entrapped progesterone at pH 1.2 and 37°C. Under acidic conditions and at high polymer concentration the UPM solution was opalescent, probably because of hydrogen bonding between the MAA and PEGMA. From Figure 3.8A, it can be seen that incorporation of the drug in UPM slowed down its diffusion from the dialysis bag. Indeed, in absence of polymer, 83±3% of the drug was released after 60 min and mostly all the progesterone diffused out of the bag after 2 h. Comparatively, the amount of drug released

from UPM hardly reached 30% after 1 h, with a maximum of 80% after 8 h. The pH-dependence of drug release from UPM was demonstrated by alkalizing the release medium to pH 7 or 11, after 2 h (Figure 3.8B). This increase in pH led to the disappearance of opalescence observed under acidic conditions and to a relatively sharp increase in drug release. Approximately 70% progesterone was released after 5 h vs. 45% when the pH was maintained at 1.2 (Fig. 8A). Release at pH 11 was slightly faster than at pH 7 although at this pH α stands at 42%. Composition seemed to influence the release of progesterone from the UPM. The effect of pH was less evident when similar experiments were carried out using S_E₁₈M₁₇P₄₂ instead of S_E₂₄M₂₃P₂₉ (data not shown). Although these preliminary *in vitro* release kinetics are promising, improvements are still needed in order to slow down the rate of release at acidic pH and to increase the total amount of drug discharged from the micelles at higher pH.

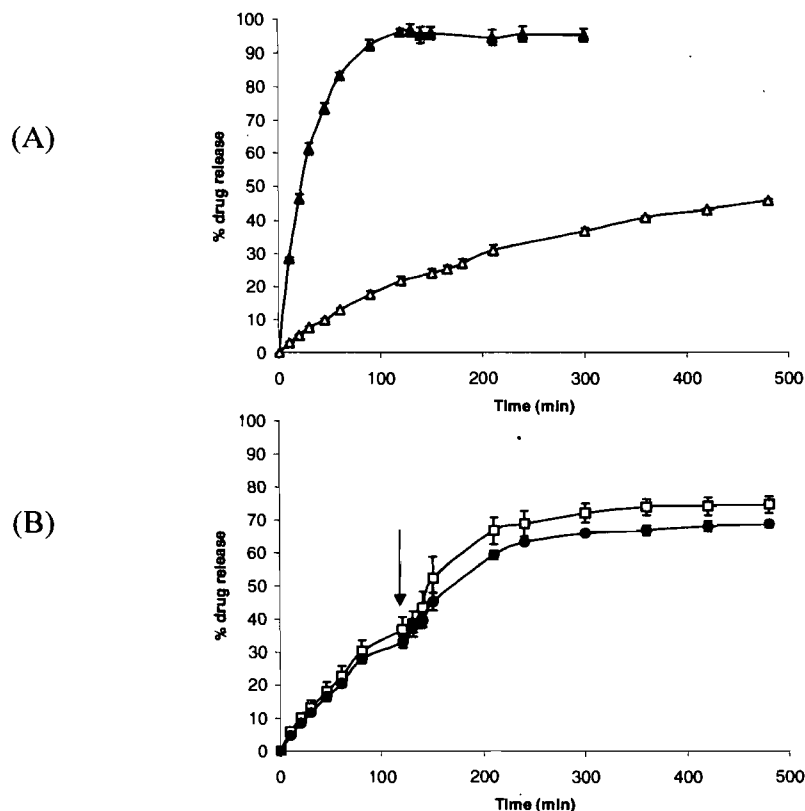


Figure 3.8. (A) *In vitro* release profiles of free (closed triangles) and S_E24M₂₃P₂₂₉-entrapped (5% w/w) (open triangles) progesterone against in simulated gastric fluid pH 1.2 (HCl 0,06 M/NaCl 0.021 M). (B) Release profiles of S_E24M₂₃P₂₂₉-entrapped progesterone (5% w/w). UPM formulations were dialyzed against simulated gastric fluid pH 1.2 for 2 h at which point the pH was adjusted to either to pH 11 (open squares) or to pH 7 (closed circles) using, respectively, NaOH (0.25% w/v) or NaOH (0.25% w/v)/NaH₂PO₄ (0.12% w/v), respectively. Results are presented as the average of 3 independent experiments \pm SEM (when not visible SEM error bars are smaller than symbol).

The above results show that pH-responsive UPM were produced from star polymers. These systems present structural properties similar to PM and are also of small size. Drug incorporation studies are presently being carried out to evaluate the loading

capacity of these novel UPM. Given a reasonable incorporation capacity, such carriers may circumvent the instability problems associated with conventional micelles. A

Acknowledgements

Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Canada Research Chair Program is acknowledged. MCJ and JCL acknowledge scholarships from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche and Fonds de Recherche en Santé du Québec

References

- (1) Jones, M.-C. and Leroux, J.-C. (1999) Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 48, 101-111.
- (2) Newkome, G. R., Moorefield, C. N., Baker, G. R., Saunders, M. J. and Grossman, S. H. (1991) Unimolecular micelle. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, 1178-1179.
- (3) Liu, M., Kono, K. and Fréchet, J. M. J. (2000) Water-soluble dendritic unimolecular micelles: their potential as drug delivery agents. *J. Controlled Release* 65, 121-131.
- (4) Hawker, C. J., Wooley, K. I. and Fréchet, J. M. J. (1993) Unimolecular micelles and globular amphiphiles dendritic macromolecules as novel recyclable solution agents. *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. I* 1287-1297.
- (5) Heise, A., Hedrick, J. L., Frank, C. W. and Miller, R. D. (1999) Starlike block copolymers with amphiphilic arms as models for unimolecular micelles. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 8647-8648.
- (6) Liu, H., Jiang, A., Guo, J. and Uhrich, K. E. (1999) Unimolecular micelles: synthesis and characterization of amphiphilic polymer systems. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 37, 703-711.
- (7) Liu, H., Farrell, S. and Uhrich, K. (2000) Drug release characteristics of unimolecular polymeric micelles. *J. Controlled Release* 68, 167-174.

- (8) Antoun, S., Gohy, J. F. and Jérôme, R. (2001) Micellization of quaternized poly(2-dimethylamio)ethyl methacrylate)-*block*-poly(methyl methacrylate) copolymers in water. *Polymer* 42, 3641-3648.
- (9) Ranger, M., Jones, M.-C., Yessine, M.-A. and Leroux, J.-C. (2001) From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization method to supramolecular assemblies. *J. Polym. Sci. Part A: Polym Chem* 39, 3861-3874.
- (10) Davis, K. A. and Matyjaszewski, K. (2000) Atom transfer radical polymerization of *tert*-butyl acrylate and preparation of block copolymers. *Macromolecules* 33, 4039-4047.
- (11) Matyjaszewski, K., Miller, P. J., Pyun, J., Kickelbick, G. and Diamanti, S. (1999) Synthesis and characterization of star polymers with varying arm number, length and composition from organic and hybrid inorganic/organic multifunctional initiators. *Macromolecules* 32, 6526-6535.
- (12) Hedrick, J. L., Trollsas, M., Hawker, C. J., Athoff, B., Claesson, H., Heise, A., Miller, R. D., Mecerreyes, D., Jérôme, R. and Dubois, P. (1998) Dendrimer-like star block and amphiphilic copolymers by combination of ring opening and atom transfer radical polymerization. *Macromolecules* 31, 8691-8705.
- (13) Angot, S., Taton, D. and Gnanou, Y. (2000) Amphiphilic stars and dendrimer-like architectures based on poly(ethylene oxide) and polystyrene. *Macromolecules* 33, 5418-5426.
- (14) Coessens, V., Pintauer, T. and Matyjaszewski, K. (2001) Functional polymers by atom transfer radical polymerization. *Prog. Polym. Sci.* 26, 337-377.
- (15) Ravi, P., Wang, C., Tam, K. C. and Gan, L. H. (2003) Association behavior of poly(methacrylic acid)-*block*-poly(methyl methacrylate) in aqueous medium: potentiometric and laser light scattering studies. *Macromolecules* 36, 173-179.

- (16) Benahmed, A., Ranger, M. and Leroux, J.-C. (2001) Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone)-*block*-poly(D,L-lactide). *Pharm. Res.* 18, 323-328.
- (17) Sakthivel, T., Toth, I. and Florence, A. T. (1999) Distribution of a lipidic 2.5 nm diameter dendrimer carrier after oral administration. *Int. J. Pharm.* 183, 51-55.
- (18) Jani, P. U., Florence, A. T. and McCarthy, D. E. (1992) Further histological evidence of the gastrointestinal absorption of polystyrene nanospheres in rat. *Int. J. Pharm.* 84, 245-252.
- (19) Florence, A. T., Hillery, A. M., Hussain, N. and Jani, P. U. (1995) Factors affecting the oral uptake and translocation of polystyrene nanoparticles: histological and analytical evidence. *J. Drug Target.* 3, 65-70.
- (20) Leroux, J.-C., Cozens, R., Roesel, J. L., Galli, B., Kubel, F., Doelker, E. and Gurny, R. (1995) Pharmacokinetics of a novel HIV-1 protease inhibitor incorporated into biodegradable or enteric nanoparticles following intravenous and oral administration. *J. Pharm. Sci.* 84, 1387-1391.
- (21) Mathur, A. M., Drescher, B., Scranton, A. B. and Klier, J. (1998) Polymeric emulsifiers based on reversible formation of hydrophobic units. *Nature* 392, 367-370.
- (22) Podhájecká, K., Stepánek, M., Procházka, K. and Brown, W. (2001) Hybrid polymeric micelles with hydrophobic cores and mixed polyelectrolyte/nonelectrolyte shells in aqueous media. 2. Studies of the shell behavior. *Langmuir* 17, 4245-4250.
- (23) Wang, C., Tam, K. C. and Jenkins, R. D. (2002) Dissolution behavior of HASE polymers in the presence of salt: potentiometric titration, isothermal titration calorimetry, and light scattering studies. *J. Phys. Chem. B* 106, 1195-1204.
- (24) Wang, C., Tam, K. C., Jenkins, R. D. and Bassett, D. R. (2000) Potentiometric titration and dynamic light scattering for hydrophobically modified alkali soluble emulsion (HASE) polymer solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 1967-1972.

- (25) Borukhov, I., Andelman, D., Borrega, R., Cloitre, M., Leibler, L. and Orland, H. (2000) Polyelectrolyte titration: theory and experiment. *J. Phys. Chem. B* 104, 11027-11034.
- (26) Allen, C., Maysinger, D. and Eisenberg, A. (1999) Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: biointerfaces* 16, 3-27.
- (27) Astafieva, I., Zhong, X. and Eisenberg, A. (1993) Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. *Macromolecules* 26, 7339-7352.

Chapitre 4. Self-assembled nanocages for hydrophilic guest molecules⁴

¹Marie-Christine Jones, ¹Pankaj Tewari, ¹Claudia Blei, ²Kelly Hales, ²Darrin J. Pochan, ¹*Jean-Christophe Leroux.

¹Canada research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, PO Box 6128, Downtown Station, H3C 3J7, Montreal, Quebec, Canada. ²Materials Science and Engineering and Delaware Biotechnology Institute, University of Delaware, Newark, Delaware, 19176, USA.

Corresponding author email [REDACTED]

Abstract:

Reverse polymeric micelles are obtained following the association of polymeric amphiphiles in apolar media. To this date, reports of pharmaceutical applications for such micelles have been scarce, mainly because these systems have been studied in solvents that are not suitable for medical use. Here, alkylated star-shaped poly(glycerol methacrylate) polymers have been proposed in the design of oil-soluble reverse polymeric micelles. Micellar behavior was studied in various apolar solvents including ethyl oleate, a pharmaceutically acceptable vehicle. The polymers were shown to assemble into spherical nanostructures (< 40 nm) as determined by cryo-TEM and AFM studies. Interestingly, the reverse micelles were able to encapsulate various peptides/proteins (vasopressin, myoglobin and albumin) in substantial amounts and facilitate their solubilization in oil. The nature of both the polymer used in micelle formation and of the guest molecules were found to influence the ability of the micelle to interact with hydrophilic compounds.

⁴ Paru dans *J Am Chem Soc* (2006) 128 :14599-14608. Reproduit avec permission. © American Chemical Society (2006).

Introduction

The ability of micellar aggregates to act as solubility enhancers stems from the dichotomy of their architecture. Indeed, the segregation of the lyophobic segment of an amphiphilic compound in the micelle core allows for the creation of a favorable micro-environment for molecules with limited affinity for the dispersing phase. Theoretically, reverse micelles should be obtained from any amphiphilic molecules placed in an organic, non-polar solvent. However, for most low-molecular weight surfactants, the presence of water or another polar solvent appears to be necessary for micelle formation (*Carvalho, 2000; Khougaz, 1997; Pileni, 2003; Price, 2005; Riter, 1997*). Consequently, these systems consist in a polar phase stabilized by a molecular surfactant layer in an arrangement reminiscent of a w/o microemulsion. Nevertheless, several reports have emerged on potential applications for these reverse micelles including their use as nanoreactors (*Mecking, 2000*), for protein encapsulation (*Luisi, 1988*), for extraction of water-soluble biomolecules (*Fadnavis, 1997*) or in protein conformational studies (*Van Horn, 2005*). The assembly of surfactant-based reverse micelles has mainly been studied in organic solvents such as saturated hydrocarbons, and few examples of their use in pharmaceutically relevant vehicles have been reported (*Ichikawa, 2000; New, 1997*).

Hydrophobically-modified dendrimers and hyperbranched polymers were recently proposed for the design of unimolecular reverse polymeric micelles. Both types of polymers are characterized by relatively compact structures with high densities of surface functionalities (*Stevelmans, 1996*). Compared to dendrimers, hyperbranched polymers present the added benefit of being easier to prepare (*Sunder, 2000*). Reverse unimolecular micelles are typically generated by the partial modification of surface hydroxyl or amine functions with fatty acids derivatives. Such polymeric structures have been shown to promote the extraction and solubilization of various hydrophilic model compounds in non-polar organic solvents. For instance, Cooper *et al.* (1997) highlighted the use of reverse polymeric micelles (RPMs) for improving the solubility of a water-soluble dye in supercritical carbon dioxide. Later, reverse micelles obtained from hyperbranched

poly(glycerol)s (*Sunder, 1999*) or poly(ethylenimine)s (*Chen, 2005a*) were shown to extract the hydrophilic dye Congo red from water into chloroform. The potential of RPMs as drug delivery systems was demonstrated using hydrophobically modified-poly(amidoamine) dendrimers for the oral administration of 5-fluorouracil, an anticancer drug (*Tripathi, 2002*). While good at solubilizing monomolecular entities, unimolecular reverse micelles present limited core space, which may not be suitable for the incorporation of larger guests such as proteins. In the present study, it was hypothesized that the encapsulation of more complex structures could be better achieved using multimolecular reverse micelles. Accordingly, RPMs were prepared from amphiphilic star-shaped poly(alcohol)s and their behavior was studied in various organic phases. More specifically, RPMs were evaluated for their ability to enhance the solubility of peptides/proteins in ethyl oleate, a solvent accepted for pharmaceutical use. It is expected that the formulation of these compounds in an oleaginous environment will improve their stability against enzymatic degradation and promote their absorption through biological barriers such as the intestinal membrane (*New, 1997*). If administered subcutaneously, the RPM formulation could also serve as a reservoir for the sustained release of peptidic drugs. Here, 4-arm poly(glycerol methacrylate)s were employed as scaffolds in the elaboration of RPMs. The hydrophobicity of the micellar shell was tailored using fatty acid derivatives of varying length. The micelles were characterized with regards to their assembly in tetrahydrofuran (THF) and ethyl oleate and their ability to interact with hydrophilic macromolecules was studied using three peptidic molecules, namely vasopressin, myoglobin and albumin.

Experimental section

Materials

Glycidyl methacrylate was obtained from Polysciences (Warrington, PA). Other reagents employed in polymer synthesis were purchased from Aldrich (Oakville, ON, Canada) and used without further purification. THF was dried over sodium using benzophenone as a dryness indicator. Myoglobin and fluorescein-isothiocyanate conjugate albumin (FITC-albumin) were obtained from Sigma (Oakville, ON, Canada).

Methods

Synthesis of star-shaped poly(glycidyl methacrylate) (PGMA)

Atom transfer radical polymerization (ATRP) was carried out in THF using copper bromide (Cu(I)Br) as a catalyst and 2,2-bipyridine as a ligand. ATRP initiator, tetrakis(2-bromoisobutyryl) pentaerythritolate (*Jones, 2003*) (1 eq.) was added to Cu(I)Br (1 eq.), 1-2,2-bipyridyl (1 eq.), and glycidyl methacrylate (106 eq.) in THF ([monomer] = 0.3 M). The mixture was degassed under argon for 15 min at room temperature and then heated to 90°C. The reaction was left to proceed for 24 h. The mixture was then poured in THF containing ethanol (95:5) and passed through a silica gel column to remove the copper. THF was used as eluent. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude polymer extract was precipitated twice in diethyl ether. The polymer was further purified by soxhlet extraction in diethyl ether. A mean degree of polymerization of 26 units per initiator arm was targeted for a total molecular weight (MW) of 15,000. Number- (M_n) and weight- (M_w) average MWs were determined using a Waters 1525 size exclusion chromatography (SEC) system equipped with a 2410 refractometer (Waters, Milford, MA) and low-angle laser light scattering (PD2000DLS, Precision Detectors, Bellingham, MA) detector. Analyses were performed in N,N-dimethylformamide with 10 mM LiBr, at a flow rate of 1 mL/min

using a set of 3 Styragel HT2, HT3 and HT4 columns (Waters, Milford, MA), maintained at 45°C. ¹H-NMR spectra were recorded on a Bruker ARX400 spectrometer in deuterated chloroform (CDCl₃). ¹H-NMR (δ, ppm, CDCl₃): 4.31 (m, 112H); 4.1 (m, 7.99H); 3.8 (m, 113H); 3.22 (m, 114H); 2.84 (m, 115H); 2.63 (m, 116H); 1.8-2.2 (m, 208H); 0.9-1.1 (m, 349H).

Synthesis of star-shaped poly(glycerol methacrylate) (PG_{OH}MA)

PG_{OH}MA was obtained following the hydrolysis of the epoxy ring of PGMA. In a typical procedure, PGMA (6 g) was dissolved in 1-methyl-2-pyrrolidinone (75 mL, NMP) under gentle stirring. After complete dissolution of the polymer, 15 mL of water was added dropwise and the mixture was left to react at 140°C for 24 h. The hydrolyzed polymer was dialyzed (Spectra/Por no.1, MW cut-off 2,000) against water for 48 h and then freeze-dried. ¹H-NMR spectra were recorded on a Bruker ARX400 spectrometer in deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d₆) ¹H NMR (δ, ppm, DMSO-d₆): 4.7-4.9 (m, 2H); 3.7-3.9 (m, 3H); 3.3 (m, 48H); 1.82 (m, 1.4H); 0.4-1.2 (m, 3H).

Synthesis of hydrophobically modified star-shaped. (PG_{OH}MA-CX)

PG_{OH}MA (212 eq. of hydroxyl group) was dried by azeotropic distillation and solubilized in pyridine (0.8 M) in the presence of catalytic amounts of 1-methylimidazole. Acyl chloride derivatives (127 eq.) were dissolved in toluene and slowly added to the reaction mixture under anhydrous and inert conditions. The reaction was left to proceed overnight under reflux. K₂CO₃ (5 g) was added following completion of the reaction. Excess pyridine was removed under reduced pressure. The mixture was then transferred to a separation funnel with 200 mL of chloroform, and pyridine residues extracted successively with HCl (0.1 M) and brine. The organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and dialyzed against chloroform for 24 h (Spectra/Por Biotech regenerated

cellulose; MW cut-off 6-8,000; Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA). The solvent was removed under reduced pressure to yield the alkylated polymer as off-white waxy flakes. All star-shaped amphiphilic polymers are referred to as PG_{OH}MA-CX where X stands for the total number of carbon atoms present on the fatty acid chain.

Determination of the degree of alkylation

The degree of alkylation (DA) was determined from the ¹H-NMR spectra of PG_{OH}MA-CXs using Equation 1:

$$DA = \frac{[(I(DP+8))/5]}{[(4(DP)(n-4))+2DP]} \quad (1)$$

where I is the intensity of the peak at $\delta = 1.2-1.3$ ppm, DP is the degree of polymerization calculated from the ¹H-NMR of PGMA and n is the number of carbon atoms in the alkyl chain.

Particle size analysis

Dynamic light scattering experiments were performed in THF and ethyl oleate (Crodamol EO[®], Croda Canada Ltd., Vaughan, ON, Canada) at 25°C and at a angle of 173° using a Malvern Zetasizer ZS (Malvern, Worcestershire, UK). The polymer concentration was kept constant at 1 g·L⁻¹, and peptide concentration was kept at 1 wt% where applicable. All polymer solutions were filtered twice prior to analysis using 0.22- μ m hydrophilic propylene (GHP) filters. Viscosity values of 0.455 and 9.29 cps (determined experimentally) were employed for THF and ethyl oleate, respectively. The theoretical diameter of a fully extended PG_{OH}MA backbone was calculated based on the length of a saturated carbon-carbon bond length (1.54 Å) and the degree of polymerization obtained by ¹H-NMR.

AFM imaging

Forty microliter (40 μL) of a solution of the polymer in THF (0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was deposited on a mica sheet (1 x 1 cm^2) and centrifuged at 2000 rpm during 2 min using a spin coater (Laurell technologies, Model; WS400-A6NPP-lite, NorthWales, PA). The samples were vacuum dried for 24 h before AFM imaging. AFM images were recorded in tapping mode on Nanoscope IIIa Dimension TM3100 (Digital Instruments, Santa-Barbara, CA).

Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) analysis

For cryo-TEM imaging, a thin film of polymer solution in ethyl oleate was transferred to carbon-coated copper grids. The grids were plunged into liquid ethane at -170°C using a FEI VitrobotTM (FEI Company, Hillsboro, OR), an automated cryo preparation system. The vitrified samples were transferred to a Gatan 626 cryoholder and cryotransfer stage. During observation of the vitrified samples, the cryoholder temperature was maintained at -170°C . Images of the vitrified samples were taken in bright-field mode with a Tecnai G2 12 transmission electron microscope (FEI Company) at 120 kV accelerating voltage.

Determination of the partition coefficient of vasopressin between ethyl oleate and water

Hydrophobically-modified $\text{PG}_{\text{OH}}\text{MAs}$ were dissolved in dichloromethane (DCM) (2.5 or 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 1ml DCM) and mixed with increasing volumes of an ethanolic solution of vasopressin (Peptide International, Louisville, KY) spiked with ^3H -vasopressin (Perkin-Elmer, Boston, MA). Ethyl oleate (500 μL) was added to the mixture. The volatile organic solvents were removed under vacuum. At this point, 500 μL of water was added. The two phases were gently mixed together for 24 h. Following complete phase separation, 100- μL aliquots of both the aqueous and organic layers were assayed for radioactivity on a

LKB-Wallac 1217 Rackbeta liquid scintillation counter (Perkin-Elmer, Boston, MA) using Ultima Gold scintillation cocktail (Perkin-Elmer). Controls without polymer were also prepared.

Extraction of myoglobin and albumin.

Small volumes of a concentrated solution ($100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) of the polymer in ethyl oleate were mixed with pre-determined volumes of a solution of myoglobin ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) or FITC-albumin ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) in phosphate buffered saline (PBS, NaCl 75 mM, Na_2HPO_4 53 mM, NaH_2PO_4 17 mM; pH 7.4) and left to stand at room temperature. In the event of gel formation, the mixture was heated at 37°C in order to destroy the organogel. Both phases were completed to their final volume (polymer concentration $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and gently stirred for 24 h. Samples were centrifuged at 5000 g (Hermle Z252M microcentrifuge, Mandel Scientific, Guelph, ON, Canada) for 3 min to induce phase separation. The protein content was assayed in the aqueous layer by spectrophotometry for both myoglobin (λ_{max} 410 nm) and FITC-albumin (λ_{max} 494 nm) on a BioTek PowerWave X (Winooski, VT) plate reader. Controls without polymer were also prepared.

Analysis of extraction data

The percentage of peptide/protein retained in ethyl oleate was calculated from Equation 2.

$$\% \text{ retained in ethyl oleate} = \frac{C_{EO}}{C_{EO} + C_W} \quad (2)$$

Where C_{EO} and C_W are the final peptide/protein concentrations in the oil and aqueous phase in the presence of RPMs, respectively. Results are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments.

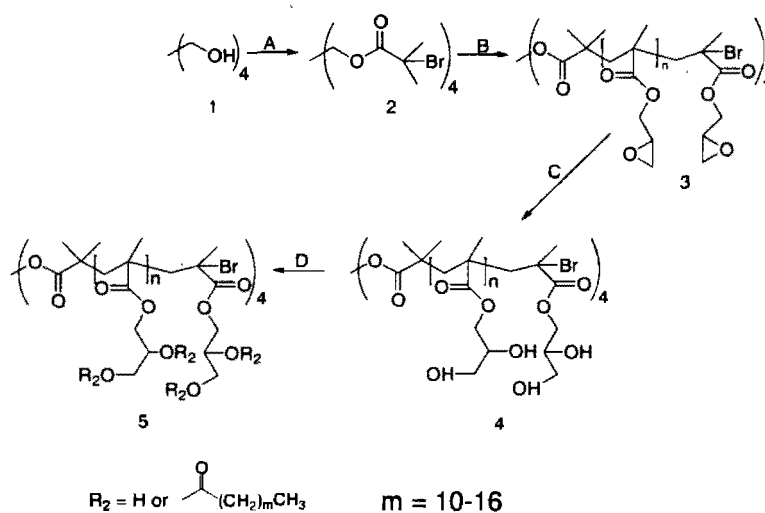
The apparent partition coefficient (K_{app}) of peptide/protein between the organic and aqueous phases was calculated using Equation 3.

$$K_{app} = \frac{C_{EO}}{C_W} \quad (3)$$

Results and discussion

Polymer synthesis

Amphiphilic PG_{OH}MA-CXs were selected as building blocks to form multimolecular RPMs. The rationale was that a star-shaped conformation would allow sufficient mobility within the polymer structure to permit hydrogen-bond formation between neighbouring polymers (*Garamus, 2004; Kim, 2001*) and subsequent aggregation. Star-shaped PGMA was synthesized by ATRP from a 4-arm multifunctional initiator, namely tetrakis(2-bromoisobutyryl) pentaerythritol (*Jones, 2003*) (Scheme 1).



Scheme 4.1. Synthesis of alkylated star-shaped PG_{OH}MA. A: pentaerythritol (1) was esterified with 2-bromoisobutyrylbromide in the presence of triethylamine in THF at room temperature. B: the ATRP initiator (2) was reacted with glycidyl methacrylate (GMA) in THF in the presence of Cu(I)Br/1,2-bipyridyl. C: PGMA (3) was hydrolyzed in a mixture of NMP/H₂O (5:1) to yield star-shaped PG_{OH}MA. D: PG_{OH}MA (4) was partially esterified using alkanoyl chlorides in pyridine in the presence of 1-methylimidazole at 140°C.

The reaction proceeded smoothly with over 85% of the monomer converted in 24 h. Polymerization was initiated equally at all sites and the star conformation was retained as

evidenced by AFM (see Supporting Information). The molecular weight of the polymer was evaluated by SEC and $^1\text{H-NMR}$ (Table 4.1). The results correlated well with the expected value.

Table 4.1. Characterization of Alkylated $\text{PG}_{\text{OH}}\text{MAs}$

polymer	PGMA properties				fatty acid derivatives			mean diameter [polydispersity index]	
	Theoretical Mn	Mn $^1\text{H-NMR}$	Mn SEC	PI	Chain length	DA (%)		ethyl oleate (nm)	THF (nm)
						theoretical	experimental		
$\text{PG}_{\text{OH}}\text{MA-C12}$	15,000	14,600	20,600	1.17	Lauric ($-\text{OC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$)	60	65.3	19 [0.3]	33 [0.24]
$\text{PG}_{\text{OH}}\text{MA-C14}$					Myristic ($-\text{OC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_3$)	60	60.1	19 [0.3]	32 [0.25]
$\text{PG}_{\text{OH}}\text{MA-C18}$					Stearic ($-\text{OC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CH}_3$)	60	61.0	19 [0.3]	32 [0.24]

* Mn was calculated from the spectrum of PGMA using the intensities of the peaks at $\delta = 3.25$ ppm and 4.2 ppm (8H).

The pendant epoxides were hydrolyzed in a mixture of NMP and water to yield the star-shaped $\text{PG}_{\text{OH}}\text{MA}$ core. The hydrophilic $\text{PG}_{\text{OH}}\text{MA}$ core was rendered more hydrophobic through chemical modification of the pendant $-\text{OH}$ functionalities (Scheme 1). The latter were partially esterified (60 mol%) using alkanoyl chlorides. The number of modified hydroxyl groups was controlled by the feed ratio. In the present case, fatty acid derivatives of varying chain length, namely lauric (C12), myristic (C14), and stearic (C18), acid were employed. These derivatives were purposely chosen in order to study the influence of alkyl chain length on the properties of the reverse polymeric micelles

The resulting $\text{PG}_{\text{OH}}\text{MA-CX}$ derivatives (Figure 4.1) were water-insoluble, but easily dissolved in organic solvents such as DCM and THF. Furthermore, all polymers were soluble in ethyl oleate, an oil approved for pharmaceutical use. Oleaginous polymeric solutions were prepared by dissolving the polymer in ethyl oleate at high temperature

(60°C), then allowing the mixture to cool down to room temperature. All star-shaped alkylated PG_{OH}MA formed thermoreversible ethyl oleate organogels. Gel formation was observed at high concentration (>100 g·L⁻¹) for both the lauric and myristic acid derivatives, while PG_{OH}MA-C18 induced gelation at a much lower concentration (≥ 10 g/L). In all cases, the sol-gel transition occurred upon cooling and was attributed to a decrease of the affinity of the polymer for the dispersing phase (Murdan, 1999). Organogelation remains an intricate and often unpredictable process in which a combination of intermolecular attractive interactions such as hydrogen bond formation and van der Waals forces are thought to participate (Kim, 2001; Motulsky, 2005). In the present case, free stearoyl chloride failed to produce an organogel in ethyl oleate at a similar concentration (10 g·L⁻¹), thus confirming the determining role of hydrogen bonding. It should be mentioned that in all further experiments involving PG_{OH}MA-C18, polymer concentrations were adjusted to prevent gelation

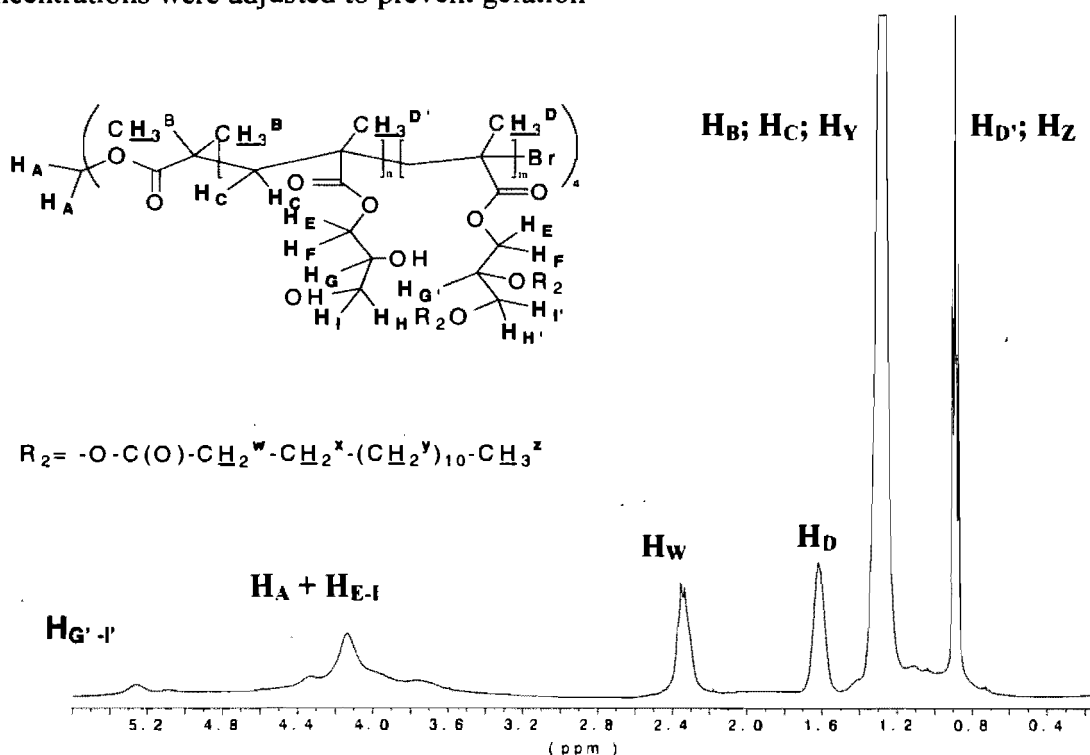


Figure 4.1. ¹H-NMR spectrum of PG_{OH}MA-C14 in CDCl₃.

Reverse micelle characterization

Micelle size was evaluated in both ethyl oleate and THF (Table 4.1). In ethyl oleate, micellar aggregates presented mean diameters of approximately 19 nm with a relatively broad size distribution (Table 4.1). The observed size did not vary between the different alkylated polymers. In THF, the average diameters experienced a 1.7-fold increase for all formulations (Table 4.1). The heightened polarity ($\epsilon = 7.6$ vs 3.2 for ethyl oleate) of this solvent is thought to contribute to the observed occurrence. Indeed, the more polar surrounding provided by THF possibly induced the swelling of the hydrophilic core and exposed some of the hydroxyl functionalities, thus promoting the aggregation of the polymer. When compared to the diameters reported for dendrimers or hyperbranched structures with similar MWs (2-10 nm) (*Garamus, 2004; Stevelmans, 1996*), the sizes observed for star-shaped micelles tend to indicate that multimolecular, rather than unimolecular micelles are formed (*Krämer, 2002*). Furthermore, the diameters observed by DLS in both solvents are higher than the theoretical diameter of a fully extended star-shaped PG_{OH}MA-CX (ca. 9-10 nm), which further supports the hypothesis that alkylated PG_{OH}MAs assemble into supramolecular structures in apolar media.

The morphology of the self-assembled nanocages in oil and THF was elucidated by AFM and cryo-TEM, respectively (Figures 4.2a and b). In both solvents, spherical aggregates were observed and the average diameters and polydispersity correlated well with the light scattering results (see Supporting Information). To date, cryo-TEM has been mainly applied to imaging in aqueous environments (*Pochan, 2004; Wittemann, 2005*), low-viscosity organic solvents (*Balmes, 2004; Boettcher, 2001*) or ionic liquids (*He, 2006*); its utilization for oleaginous media is restricted due to inherent difficulties in sample preparation (*Danino, 2002*). However, the results presented here (Figure 4.2b) confirm the feasibility of using cryo-TEM to study the self-assembly of polymeric amphiphiles in oils.

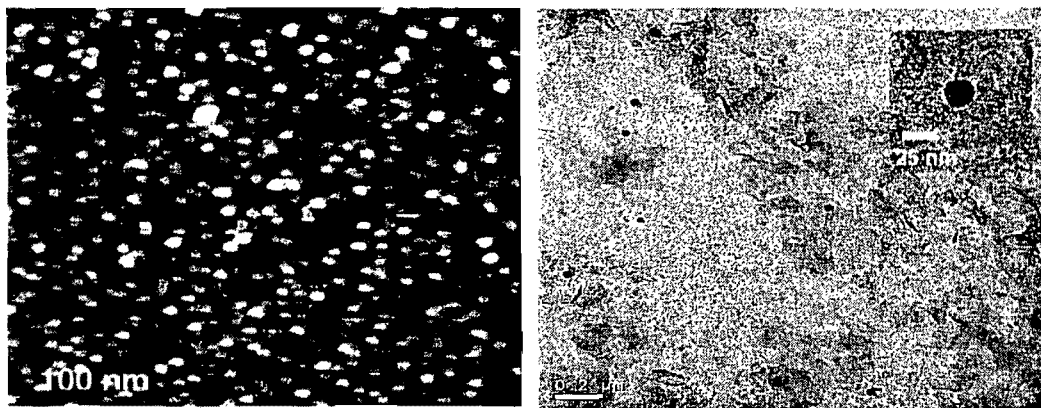


Figure 4.2. Study of the morphology of reverse PGOHMA-C18 micelles. The morphology of PGOHMA-C18 was studied by (a) AFM in THF and (b) cryo-TEM in ethyl oleate. The inset shows a magnified RPM.

Protein partition between ethyl oleate and water

Extraction of vasopressin

The ability of PGOHMA-CX RPMs to take-up a water-soluble macromolecule in ethyl oleate was first demonstrated through partition studies using vasopressin, a natural peptide (1084 Da) which plays an important role in the regulation of extracellular fluid levels in the human organism. The encapsulation of vasopressin was studied as a function of peptide concentration (0.125 to 5 wt% of polymer). RPMs were loaded with vasopressin by mixing solutions of the polymer in DCM/ethyl oleate with ethanolic solutions of the peptide. The volatile organic solvents are then removed to allow the incorporation of vasopressin. Particle size analysis performed at this point revealed a 3 to 4-fold increase in micelle size, with PGOHMA-C18 experiencing the most change with diameters around 65-70 nm. The aqueous phase was then added in order to extract the unincorporated peptide. In the absence of micelles, vasopressin was only marginally retained in the oleaginous phase (<5%; $K_{app} < 0.05$) and partitioned preferentially into the aqueous layer. Linear PGOHMA-CX also failed to take-up considerable amounts of vasopressin in ethyl oleate

(data not shown), emphasizing the importance of the polymer structure (*Chen, 2005b; Stiriba, 2002*). The addition of RPMs, however, led to a significant increase in the quantity of peptide solubilized in the organic phase. As vasopressin exhibited limited affinity for the oleaginous phase, its partition in the organic phase is attributed to its loading in the micellar core.

The retention efficiency of vasopressin in the RPMs was influenced by both the nature of the star-shaped polymer and the initial peptide loading (Figure 4.3). Under the tested experimental conditions, PG_{OH}MA-C12 reverse micelles were able to retain 0.2 to 2.4% of their weight of vasopressin in the oil phase, corresponding to entrapment efficiencies of $46.4 \pm 6.6\%$ to $69.7 \pm 6.2\%$ and K_{app} values between 0.9 and 2.3 (Figure 4.3a). PG_{OH}MA-C14 showed higher retention efficacy, with partition coefficients between 1.8 and 3.4 (Figure 4.3b). The stearic acid derivative was the most effective, with up to 10% of its weight in vasopressin solubilized in ethyl oleate and efficiencies ranging from 94.5 ± 2.5 to $98.7 \pm 0.7\%$. Accordingly, in the presence of PG_{OH}MA-C18 micelles, the peptide concentrations were 17 to 77-times higher in oil than in water (Figure 4.3c). The remarkable ability of this formulation to retain vasopressin in ethyl oleate may be attributed to the higher lipophilicity of the C18 shell. The C18 chains may act as a barrier that prevents the entrapped peptide from migrating into the apolar external phase where it could be extracted by water molecules (*Krämer, 2002; Sunder, 1999*).

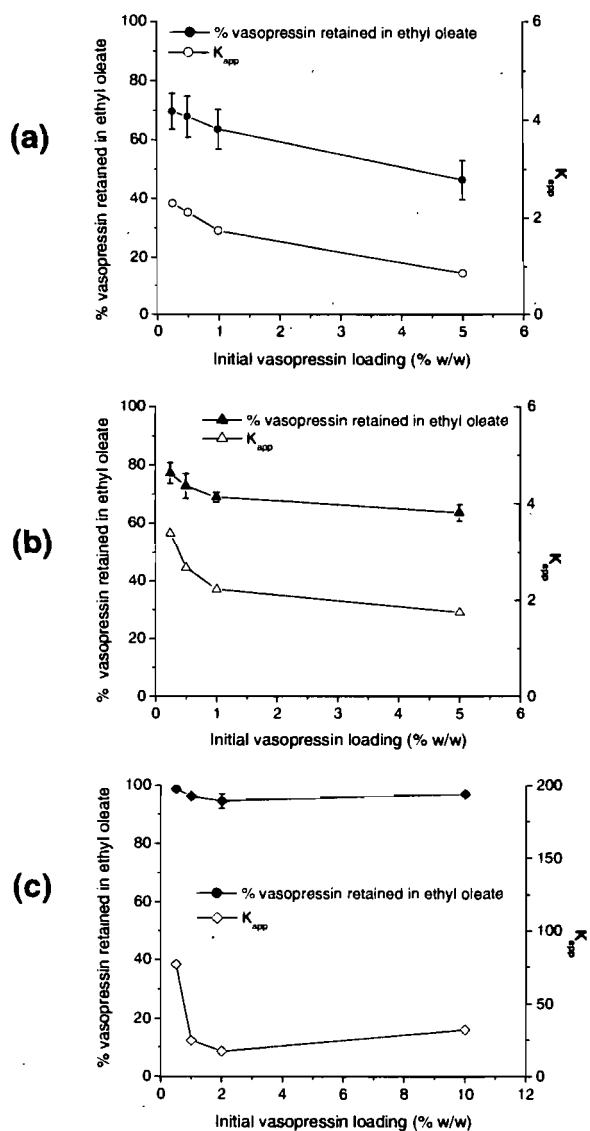


Figure 4.3. The partition of vasopressin between ethyl oleate and water was studied in the presence of RPMs of (a) PG_{OH}MA-C12, (b) PG_{OH}MA-C14, and (c) PG_{OH}MA-C18. The results for the % of vasopressin retained (closed symbols) are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. The partition coefficient (K_{app} ; open symbols) was estimated using Eq. 3. The initial loadings are expressed in wt% of polymer (2.5 or 5 mg).

In all cases, the K_{app} values were inversely related to guest concentration. Peptide molecules that are taken-up by the reverse micelles may slowly fill the core-shell interface until the space is completely occupied; from this point forward, excess peptide is transferred to the aqueous phase, shifting the K_{app} towards lower values (Sunder, 2000). The Langmuir adsorption isotherm was thus applied to evaluate the maximum amount of peptide that can be accommodated (Choucair, 2003) (Figure 4.4).

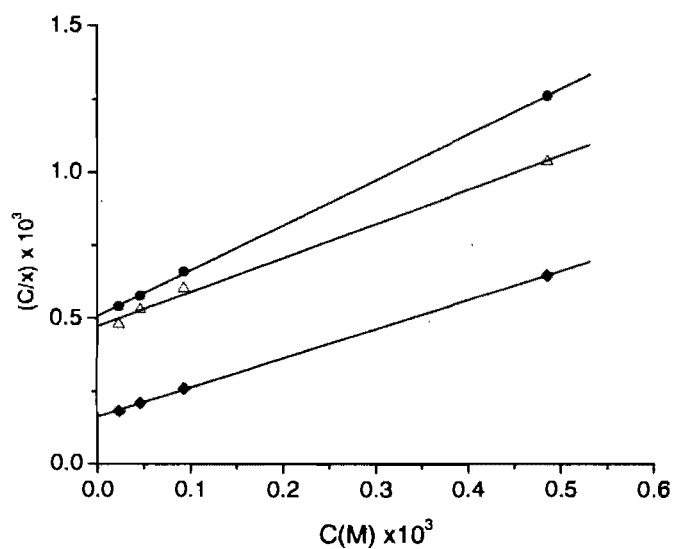


Figure 4.4. Fitting of the partition data according to the Langmuir isotherm for PG_{OH}MA-C12 (closed circles), PG_{OH}MA-C14 (open triangles) and PG_{OH}MA-C18 (closed diamonds).

The Langmuir isotherm is based on the premise that solutes will adsorb onto a surface to form a monomolecular layer and is described by the following equation (Equation 4)

$$\frac{C}{x} = \frac{1}{x_{\max} K_{ads}} + \frac{C}{x_{\max}} \quad (4)$$

where C is the molar concentration of peptide, x is the mole fraction of peptide in the micellar phase, x_{\max} is the maximum of that mole fraction value and K_{ads} is the Langmuir adsorption constant.

The partition data fitted well with the Langmuir model ($r^2 > 0.99$) supporting the hypothesis that loading can reach saturation and occurs at the core-shell interface (Choucair, 2003; Croy, 2005). Interestingly, the value of the slope was influenced by the nature of the hydrophobic segment (Figure 4.4). The slope was more pronounced for the C12 and C14 derivatives compared to $PG_{OH}MA-C18$, yielding x_{\max} values of 0.64, 0.85 and 0.99, respectively (Table 4.2). These experimental x_{\max} values were used to compute the maximum amount of drug that can be accommodated within the RPMs (Table 4.2). As expected, $PG_{OH}MA-C18$ showed the highest solubilization capacity of all formulations, which corroborates the partition data.

Table 4.2. Maximum protein loading in RPMs

RPMs	Vasopressin (MW 1048 Da)		Myoglobin (MW 17,600 Da)		FITC-Albumin (MW 66,000 Da)	
	x_{\max}	DL_{\max}^A (%w/w)	x_{\max}	DL_{\max}^A (%w/w)	x_{\max}	DL_{\max}^A (%w/w)
$PG_{OH}MA-C12$	0.64	6.5	0.08	5.0	n.d.	n.d.
$PG_{OH}MA-C14$	0.85	17.8	0.07	4.2	n.d.	n.d.
$PG_{OH}MA-C18$	0.99	77.0	0.07	3.8	0.009	1.7

^AMaximum drug loading n.d.: not determined

Extraction of myoglobin and albumin

The results obtained with vasopressin demonstrate that RPMs are able to interact with a hydrophilic molecule and to significantly increase its solubility in an oleaginous phase. The RPM's extraction capability was further challenged using a more complex polypeptide, namely myoglobin. Myoglobin is a 17,600 Da protein responsible for the transport and storage of oxygen in the muscles. Unlike vasopressin, myoglobin presents an elaborate tri-dimensional structure, which could be destroyed in the presence of ethanol. As a result, the loading method was adapted to avoid the use of potentially deleterious solvents.

As expected, increasing the MW of the guest molecule resulted in a decrease of the loading efficiency and of the K_{app} value (see Supporting Information). Still, the reverse micelles were able to load approximately 1.3 to 2.9% of their weight in myoglobin, with $PG_{OH}MA-C18$ showing the best results. At low concentrations (1-2%), the latter extracted over 80% of the myoglobin present in the aqueous phase, while $PG_{OH}MA-C12$ and $PG_{OH}MA-C14$ took up approximately 50% of the protein. The slight difference in efficacy previously observed between the two shorter-chained RPMs disappeared with the increase in guest size. The C12 derivative even proved to be somewhat more efficient in extracting myoglobin than $PG_{OH}MA-C14$.

The K_{app} values remained above unity at the lowest initial loading tested, confirming that RPMs were able to improve the partition of myoglobin between oil and water. For all formulations, the K_{app} values decreased steadily over the range of concentrations studied (see Supporting Information).

The myoglobin partition data was fitted using the Langmuir isotherm (Equation 4). Contrary to what was observed with vasopressin, there was no difference between the slopes of the different RPM formulations. Replacing vasopressin by myoglobin, led to an 8 to 13-fold decrease in the x_{max} value (Table 4.2), which correlates well with the fact that this protein is 16-times larger than vasopressin. The maximum loading values for myoglobin are reported in Table 4.2. The highest loading was obtained for $PG_{OH}MA-C12$ (5 %w/w) and slightly decreased with lengthening of the hydrophobic chain, in opposition

to what was seen for vasopressin. This difference may be ascribed to both the MW of the encapsulated compounds and the extraction methods. Vasopressin was first loaded inside the micelles with the help of ethanol and then extracted back with the aqueous phase. In order to avoid using an organic solvent in the presence of a protein, myoglobin was first dissolved in the aqueous buffer and was then incubated with the oleaginous RPM solution. As a consequence, augmenting the length of the hydrocarbon chain may increase steric hindrance, and thus lower the drug loading. Moreover, since myoglobin forms aggregates of 3-4 nm in aqueous solutions ($1/6^{\text{th}}$ of the micellar size), its diffusion through a highly shielded micelle core may be impaired.

To further investigate the effect of MW on uptake, a 66,000 Da serum protein (*i.e.* albumin) was selected for encapsulation into PG_{OH}MA-C18 RPMs. Albumin is known to interact with hydrophobic compounds, such as lauric and myristic acids. However, it has been shown that conformational rigidity limits its interactions with neutral fatty acids containing over 14 carbon atoms (*Ashbrook, 1975; Bird, 1996*); the non-specific adsorption of PG_{OH}MA-C18 RPMs and oil adsorption should therefore remain negligible. The extraction ability of the PG_{OH}MA-C18 RPMs was influenced by the initial protein concentration, similarly to what was observed for vasopressin and myoglobin. Although significantly lower than those observed for vasopressin or myoglobin, the maximal partition coefficient remained above unity at aqueous concentrations below 2% (see Supporting Information). Albumin partitioned preferentially in water at concentration above this threshold. Fitting the partition data to the Langmuir isotherm yielded an x_{max} value of 9.0×10^{-3} , which corresponds to a 116- and 8.5-fold decrease compared to vasopressin and myoglobin, respectively (Table 4.2). Further proof of the more favourable interaction of PG_{OH}MA-C18 RPMs with smaller proteins was provided through a kinetic study of the loading. In the case of vasopressin, where the peptide is loaded in the RPM prior to extraction with water, the time-dependency of guest loading was not evaluated. For both myoglobin and albumin, maximum loading was achieved in approximately 1h. After 30 min, RPMs had extracted ~20% of albumin from the aqueous phase compared to ~40% for myoglobin. Although PG_{OH}MA-C18 micelles remain somewhat effective in promoting

the solubilization of albumin, albeit at lower concentration than vasopressin or myoglobin, the analysis of the partition data indicates that these micelles are better suited for the encapsulation of poly(amino acid)s with a MW comprised between that of vasopressin and myoglobin.

Conclusion

Hydrophobically modified star-shaped PGOHMA_s were successfully employed as building blocks for supramolecular assemblies in a pharmaceutically acceptable oil. These RPMs were able to drastically increase the solubility of various proteins including vasopressin, myoglobin and, to a lesser extent, albumin in ethyl oleate. The nature of the hydrophobic segment and the guest molecule had a marked influence on the solubilizing ability of the reverse micelles. After additional processing, the system described here could be applied to the oral delivery of fragile peptidic molecules (*New, 1997*) or for their sustained release following parenteral extravascular injection (*Plourde, 2005*).

Acknowledgments

This work was financially supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Mistral Pharma Inc. (Montreal, Qc, Canada). MCJ acknowledges a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. Financial contribution from the Canada Research Chair program and NSF NIRT (Grant No. DMR-0210247) is also recognized.

Supporting Information. AFM picture of 4-arm star-shaped PGOHMA, extraction of myoglobin by RPMs, extraction of albumin by RPMs. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Ashbrook, J. D., Spector, A. A., Santos, E. C. and Fletcher, J. E. (1975). Long chain fatty acid binding to human plasma albumin. *J Biol Chem* 250: 2333-2338.
- Balmes, O., Malm, J.-O., Karlsson, G. and Bovin, J.-O. (2004). Cryo-TEM observation of 3-dimensionally ordered aggregates of 5-nm gold particles in organic solvents. *J Nanopart Res* 6: 569-576.
- Bird, D. A., Laposata, M. and Hamilton, J. A. (1996). Binding of ethyl oleate to low density lipoprotein, phospholipid vesicles, and albumin a ^{13}C NMR study. *J Lipid Res* 37: 1449-1458.
- Boettcher, C., Schade, B. and Fuhrhop, J.-H. (2001). Comparative cryo-electron microscopy of noncovalent N-dodecanoyl- (D- and L-) serine assemblies in vitreous toluene and water. *Langmuir* 17: 873-877.
- Carvalho, C. M. L. and Cabral, J. M. S. (2000). Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie* 82: 1063-1085.
- Chen, Y., Shen, Z., Frey, H., Perez-Prieto, J. and Stiriba, S.-E. (2005a). Synergistic assembly of hyperbranched polyethylenimine and fatty acids leading to unusual supramolecular nanocapsules. *Chem Commun* 755-757.
- Chen, Y., Shen, Z., Pastor-Pérez, L., Frey, H. and Stiriba, S.-E. (2005b). Role of topology and amphiphilicity for guest encapsulation in functionalized hyperbranched poly(ethylenimine)s. *Macromolecules* 38: 227-229.
- Choucair, A. and Eisenberg, A. (2003). Interfacial solubilization of model amphiphilic molecules in block copolymer micelles. *J Am Chem Soc* 125: 11993-12000.
- Cooper, A. I., Londono, J. D., Wignall, G., McClain, J. B., Samulski, E. T., Lin, J. S., Dobrynin, A., Rubinstein, M., Burke, A. L. C., Frechet, J. M. J. and Desimone, J. M. (1997). Extraction of a hydrophilic compound from water into liquid CO_2 using dendritic surfactants. *Nature* 389: 368-371.

- Croy, S. R. and Kwon, G. S. (2005). Polysorbate 80 and Cremophor EL micelles deaggregate and solubilize nystatin at the core-corona interface. *J Pharm Sci* 94: 2345-2354.
- Danino, D., Gupta, R., Satyavolu, J. and Talmon, Y. (2002). Direct cryogenic-temperature transmission electron microscopy imaging of phospholipid aggregates in soybean oil. *J Colloid Interface Sci* 249: 180-186.
- Fadnavis, N. W., Satyavathi, B. and Deshpande, A. A. (1997). Reverse micellar extraction of antibiotics from aqueous solutions. *Biotechnol Prog* 13: 503-505.
- Garamus, V. M., Maksimova, T., Kautz, H., Barriau, E., Frey, H., Schlotterbeck, U., Mecking, S. and Richtering, W. (2004). Hyperbranched polymers: structure of hyperbranched polyglycerol and amphiphilic poly(glycerol ester)s in dilute aqueous and nonaqueous solution. *Macromolecules* 37: 8394-8399.
- He, Y. Y., Li, Z. B., Simone, P. and Lodge, T. P. (2006). Self-assembly of block copolymer micelles in an ionic liquid. *J Am Chem Soc* 128: 2745-2750.
- Ichikawa, S., Sugiura, S., Nakajima, M., Sano, Y., Seki, M. and Furusaki, S. (2000). Formation of biocompatible reversed micellar systems using phospholipids. *Biochem Eng J* 6: 193-199.
- Jones, M.-C., Ranger, M. and Leroux, J.-C. (2003). pH-sensitive unimolecular polymeric micelles: synthesis of a novel drug carrier. *Bioconjug Chem* 14: 774-781.
- Khoughaz, K., Gao, Z. S. and Eisenberg, A. (1997). Distribution of water in solutions of reverse micelles of sodium bis[2-ethylhexyl] sulfosuccinate and block ionomers in toluene. *Langmuir* 13: 623-631.
- Kim, C., Kim, K. T. and Chang, Y. (2001). Supramolecular assembly of amide dendrons. *J Am Chem Soc* 123: 5586-5587.
- Krämer, M., Stumbé, J.-F., Türk, H., Krause, S., Komp, A., Delineau, L., Prokhorova, S., Kautz, H. and Haag, R. (2002). pH-responsive molecular nanocarriers based on dendritic core-shell architectures. *Angew Chem Int Ed Engl* 41: 4252-4256.
- Luisi, P. L., Giomini, M., Pileni, M. P. and Robinson, B. H. (1988). Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules. *Biochim Biophys Acta* 947: 209-246.

- Mecking, S., Thomann, R., Frey, H. and Sunder, A. (2000). Preparation of catalytically active palladium nanoclusters in compartments of amphiphilic hyperbranched polyglycerols. *Macromolecules* 33: 3958-3960.
- Motulsky, A., Lafleur, M., Couffin-Hoarau, A. C., Hoarau, D., Boury, F., Benoit, J. P. and Leroux, J. C. (2005). Characterization and biocompatibility of organogels based on L-alanine for parenteral drug delivery implants. *Biomaterials* 26: 6242-6253.
- Murdan, S., Gregoriadis, G. and Florence, A. T. (1999). Novel sorbitan monostearate organogels. *J Pharm Sci* 88: 608-614.
- New, R. R. C. and Kirby, C. J. (1997). Solubilisation of hydrophilic drugs in oily formulations. *Adv Drug Deliv Rev* 25: 59-69.
- Pileni, M. P. (2003). The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals. *Nat Mater* 2: 145-150.
- Plourde, F., Motulsky, A., Couffin-Hoarau, A. C., Hoarau, D., Ong, H. and Leroux, J. C. (2005). First report implants on the efficacy of L-alanine-based in situ-forming for the long-term parenteral delivery of drugs. *J Controlled Rel* 108: 433-441.
- Pochan, D. J., Chen, Z. Y., Cui, H. G., Hales, K., Qi, K. and Wooley, K. L. (2004). Toroidal triblock copolymer assemblies. *Science* 306: 94-97.
- Price, K. E. and McQuade, D. T. (2005). A cross-linked reverse micelle-encapsulated palladium catalyst. *Chem Commun* 2005: 1714-1716.
- Riter, R. E., Kimmel, J. R., Undikis, E. P. and Levinger, N. E. (1997). Novel reverse micelles partitioning nonaqueous polar solvents in a hydrocarbon continuous phase. *J Phys Chem B* 101: 8292-8297.
- Stevelmans, S., Hest, J. C. M., Jansen, J. F. G. A., Van Boxtel, D. A. F. G., Da Brabander-van den Berg, E. M. M. and Meijer, E. W. (1996). Synthesis, characterization, and guest-host properties of inverted unimolecular dendritic micelles. *J Am Chem Soc* 118: 7398-7399.
- Stiriba, S.-E., Kautz, H. and Frey, H. (2002). Hyperbranched molecular nanocapsules: comparison of hyperbranched architecture with the perfect linear analogue. *J Am Chem Soc* 124: 9698-9699.

- Sunder, A., Krämer, M., Hanselmann, R., Mülhaupt, R. and Frey, H. (1999). Molecular nanocapsules based on amphiphilic hyperbranched polyglycerol. *Angew Chem Int Ed* 38: 3552-3555.
- Sunder, A., Bauer, T., Mülhaupt, R. and Frey, H. (2000). Synthesis and thermal behavior of esterified aliphatic hyperbranched polyether polyols. *Macromolecules* 33: 1330-1337.
- Tripathi, P., Khopade, A. J., Nagaich, S., Shrivastava, S., Jain, S. and Jain, N. (2002). Dendrimer grafts for delivery of 5-fluorouracil. *Pharmazie* 57: 261-264.
- Van Horn, W. D., Simorellis, A. K. and Flynn, P. F. (2005). Low-temperature studies of encapsulated proteins. *J Am Chem Soc* 127: 13553-13560.
- Witte mann, A., Drechsler, M., Talmon, Y. and Ballauff, M. (2005). High elongation of polyelectrolyte chains in the osmotic limit of spherical polyelectrolyte brushes: A study by cryogenic transmission electron microscopy. *J Am Chem Soc* 127: 9688-9689.

Supporting Information

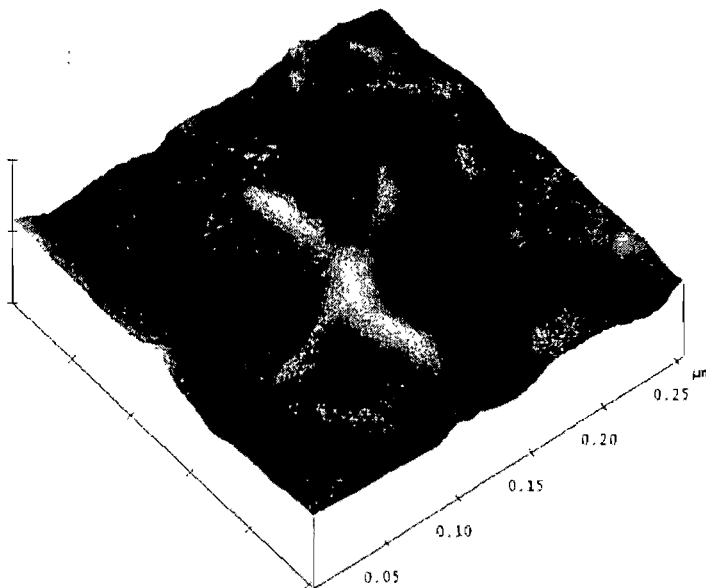


Figure S 1. The morphology of PG_{OH}MA was studied by AFM in water . A higher molecular weight (Mn 150,000) was purposely selected here to achieve optimal resolution. The AFM study shows the 4-arm structure of the polymer.

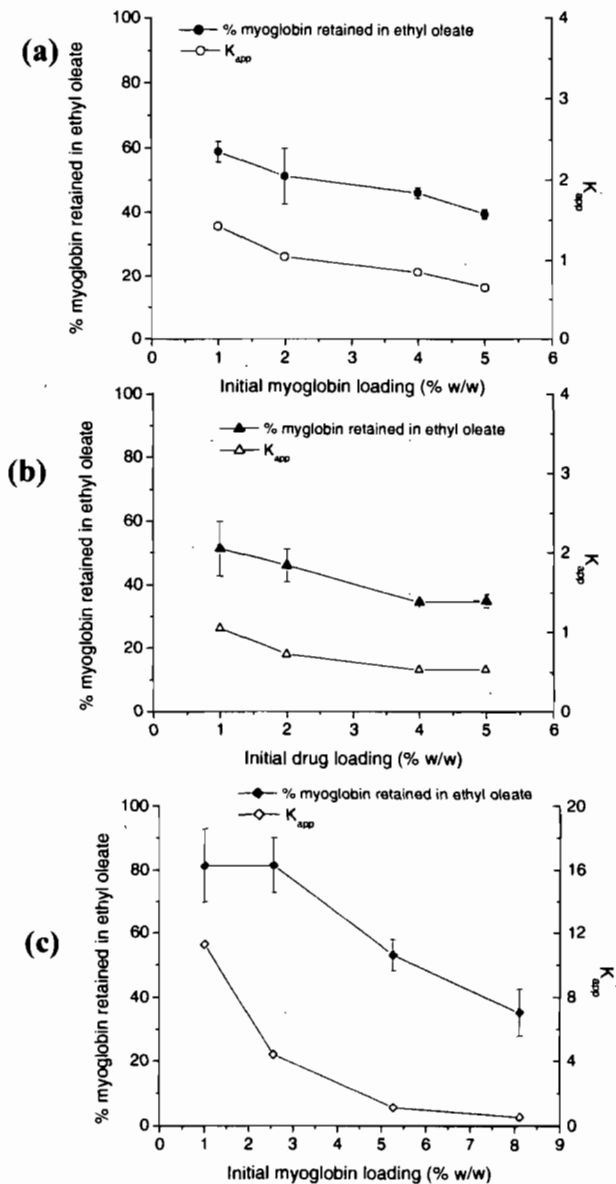


Figure S 2. The partition of myoglobin between ethyl oleate and water was studied in the presence of reverse micelles of (a) PG_{OH}MA-C12, (b) PG_{OH}MA-C14, and (c) PG_{OH}MA-C18. The results for the % of myoglobin retained (closed symbols) are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. The partition coefficient (K_{app} ; open symbols) was estimated using Eq. 3. The initial loadings are expressed in wt% of polymer.

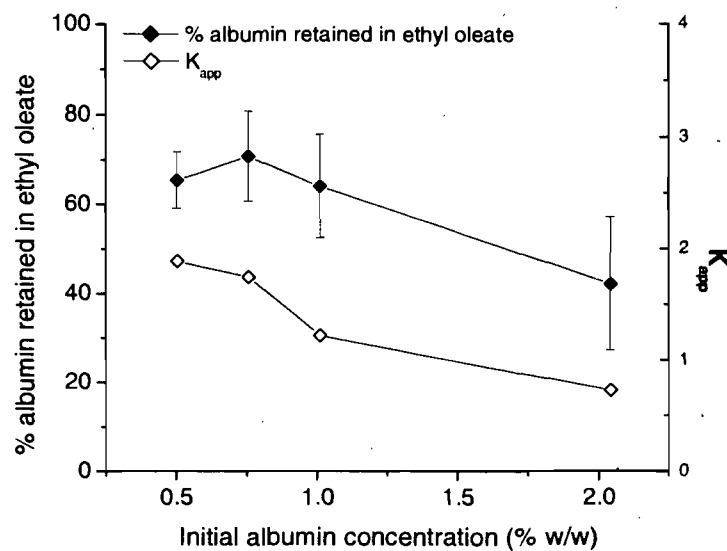


Figure S 3. The partition of albumin between ethyl oleate and water was studied in the presence of reverse micelles of PGOHMA-C18. The results for the % of albumin retained (closed symbols) are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. The partition coefficient (K_{app} ; open symbols) was estimated using Eq. 3. The initial loadings are expressed in wt% of polymer.

Chapitre 5. Efficacy assessment of [Arg⁸]-vasopressin formulated in reverse polymeric micelles

Marie-Christine Jones, Hui Gao and Jean-Christophe Leroux*.

Canada Research Chair in drug delivery. Faculty of Pharmacy. Université de Montréal.

P.O. Box 6128, Downtown station, Montreal (QC), Canada, H3C 3J7.

Abstract

Lauroyl, myristoyl and stearyl derivatives of star-shaped poly(glycerol methacrylate) were previously shown to self-assemble into reverse micelles (RMs), which could solubilize substantial amounts of peptide in ethyl oleate. This particularity was exploited for the development of water-free vasopressin formulations. *In vitro* release studies showed that the encapsulated drug slowly diffused out of an oily RM solution (< 15% in 7 days). The release rate was significantly accelerated upon emulsification of the oil phase, due to an increase in specific surface area. The antidiuretic activity and pharmacokinetics of vasopressin-loaded RMs were studied *in vivo* in rats. Following oral administration (30 µg/kg), the RMs obtained from the stearyl-derivative produced the antidiuretic effect, although this could not be correlated with an increase in plasmatic concentrations. The latter formulation was also administered subcutaneously (30 µg/kg), where it displayed a prolonged antidiuretic effect for 3 days and allowed for the sustained release of vasopressin.

Introduction

The greatest challenge in peptide delivery is to ensure sufficient drug concentrations at the site of action. Typically, this has been achieved by parenteral administration. Yet, as frequent dosing is often required to maintain therapeutic blood levels, the inconveniences

associated with multiple daily injections may lead to poor patient compliance. This issue was addressed in part by the development of sustained-released or depot formulations which reduced the requirement for daily injections (*Plourde, 2005; Schmidt, 2007*).

Still, there has been a strong incentive to administer peptides via alternate routes. Although nasal (*Hinchcliffe, 1999*) and pulmonary (*Steiner, 2002*) drug delivery have been successfully exploited to that end, the oral route remains the most convenient for chronic therapy. Unfortunately, per oral administration is associated with significant hurdles as peptides are both highly susceptible to enzymatic degradation and poorly absorbed (*Hamman, 2005*). Several avenues have been explored to cope with poor peptide absorption including the chemical modification of the peptide (*Wang, 2006*), the co-administration of permeation enhancers (*van der Merwe, 2004*) or enzyme inhibitors (*Fjellestad-Paulsen, 1996*) or its encapsulation in a colloidal drug carriers (*Damgé, 2007; Takeuchi, 1996*).

Oil-based formulations have been the subject of increasing attention as potential peptide delivery systems (*Kirby, 2000; New, 1997*). It has been shown that the presence of oil could prevent the action of digestive enzymes and promote peptide absorption (*Kirby, 2000*). Furthermore, the slow diffusion of the peptide through the oleaginous vehicle could allow its sustained release following subcutaneous administration. The preparation of such formulations, however, requires the addition of surface-active agents in order to solubilize the peptide. In oil, the low-molecular weight surfactants assemble into aggregates with the hydrophilic moiety pointing towards the peptide. However, upon mixing with the intestinal fluid this structure is rapidly lost and a large proportion of naked peptide is released in the gut.

It was recently reported that alkylated star-shaped poly(glycerol methacrylate)s (PG_{OH}MA) could form reverse micelles (RMs) in ethyl oleate, which were able to host substantial amounts of peptidic drugs (*Jones, 2006*). In the present work, these RMs were proposed as an alternative to low-molecular weight surfactants for the preparation of versatile oil-based formulation, using the antidiuretic hormone vasopressin as a model drug. More specifically, RM were evaluated as potential delivery system for the oral and subcutaneous administration of vasopressin.

Experimental Methods

Materials

Alykylated star-shaped poly(glycerol methacrylate) were synthesized as previously described (Jones, 2006). Briefly, star-shaped poly(glycerol methacrylate)s (PG_{OH}MA) were isolated following the hydrolysis of a 4-arm poly(glycidyl methacrylate) precursor synthesized by ATRP (M_n : 14 700 g/mol; polydispersity index: 1.4). PG_{OH}MA was then modified by reacting pendant hydroxyl function with acyl chlorides of varying length. In all cases, a degree of alkylation of 60 mol% was targeted. Vasopressin and ³H-vasopressin were acquired from Peptide International (Louisville, KY) and Perkin-Elmer, respectively (35 Ci/mmol; Boston MA). Ethyl oleate (Crodamol EO[®]) was obtained from Croda Canada Ltd. (Vaughan, ON, Canada).

In vitro release kinetics of vasopressin from RMs in ethyl oleate.

RMs were loaded with vasopressin as previously described. Briefly, hydrophobically-modified PG_{OH}MAs were dissolved in methylene chloride (1 mL; 1.25 or 5 mg/mL) and mixed with 51 μ L of a vasopressin solution in ethanol (1 g/L; spiked with ³H-vasopressin). Ethyl oleate (250 μ L) was added to the mixture and the organic solvents evaporated to yield oleaginous micellar solutions. These solutions were then diluted 5-folds in oil to obtain a final polymer concentration of 1 mg/mL. Dialysis membranes (Dispodialyzer[®], molecular weight cut-off of 100 kDa, Spectrum Laboratories, Rancho Domingez, CA) were filled with the solutions and placed in 40 mL of non-enzymatic gastric buffer (pH 1.2) under stirring (150 rpm). After 2 h, the release medium was changed to non-enzymatic intestinal buffer (40 mL; 0.06 M NaH₂PO₄; 0.015 M NaOH; 0.2% (w/w) polysorbate 20; pH 6.8) for the remainder of the experiment. Aliquots of the release media were taken at pre-determined time points and replaced with fresh medium. Vasopressin content was determined by radioactivity counting on a Tri-Carb beta counter (Perkin Elmer, Waltham, MA). Experiments were performed at 37°C in triplicate. The control consisted in a vasopressin solution in water.

***In vitro* release of vasopressin from an emulsified micellar formulation.**

Solutions of vasopressin-loaded RMs were prepared in ethyl oleate as described above. Following complete removal of volatile organic solvents, 100 μL of the micellar solution (RM concentration 1 mg/mL) in ethyl oleate were emulsified in water (440 μL) in the presence of polysorbate 80 as an emulsifier (10 mg). In all cases, mean droplet sizes were between 300 and 800 nm as determined by dynamic light scattering (DLS). Dialysis membranes (Dispodialyzer[®]) were filled with the emulsions and placed in 100 mL of non-enzymatic intestinal buffer. Emulsions of ethyl oleate in an aqueous solution of vasopressin were used as a control.

Animal studies

All animal experimental procedures followed a protocol approved by an in-house ethics committee in accordance with Canadian Council on Animal Care guidelines.

Preparation of the micellar formulations.

Hydrophobically-modified PG_{OH}MA were dissolved in methylene chloride (1 mL; 1.25 (C18) or 5 mg/mL (C12/C14)) and mixed with 51 μL of a vasopressin solution in ethanol (1 g/L). Ethyl oleate (250 μL) was added to the mixture and the organic solvents evaporated to yield oleaginous micellar solutions. These solutions were then further diluted with ethyl oleate so that the proper vasopressin dose was contained in 100 μL of oil.

Assessment of the biological activity of vasopressin

Oral administration

Following an overnight fast and a 2-h water restriction, male Sprague-Dawley rats (350-400 g) (Charles-River, Saint-Constant, QC, Canada) were gavaged with vasopressin (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) as an aqueous solution (100 μL in water) or a RM formulation (EO 100 μL).

The control group was also given EO (100 μ L) prior to the drug solution. The animals then received two doses of water 30 min (30 mg/kg) and 1 h (15 mg/kg) after the drug administration. After the last dose of water, the animals were placed in metabolic cages and urine was collected at pre-determined time points, until the excretion of 60% of the water load. Access to food and water was restricted for the duration of the experiment.

Subcutaneous injection

Following a 2-h water restriction, male Sprague-Dawley rats (350-400 g) were injected with vasopressin (30 μ g/kg) as an aqueous solution (100 μ L in NaCl 0.9%) or a RM formulation (EO 100 μ L). The animals then received two doses of water 30 min (30 mg/kg) and 1 h (15 mg/kg) after the drug administration. After the last dose of water, the animals were placed in metabolic cages and urine was collected at pre-determined time points over a 12-h period. Access to food and water was restricted during that time. The experiment was repeated 24 and 48 h after the initial vasopressin injection. Animals were allowed free access to food and water in between experiments.

Statistical analysis

Statistical analysis of the urinary output results was performed using the Kruskal-Wallis test. A probability level of < 0.05 was accepted as a significant difference compared to the control values. Data are reported as mean \pm SD.

Pharmacokinetic studies

Oral administration

After an overnight fast, Sprague Dawley rats (380-450 g) were gavaged with vasopressin (30 μ g/kg) either as an aqueous solution (100 μ L in water) or encapsulated in RPMs and dissolved in EO (100 μ L). The control group received free EO prior to the drug solution. The animals were allow free access to food and water during the experiment.

Subcutaneous administration

Sprague Dawley rats (380-450 g) were injected with vasopressin (30 µg/kg) either as an aqueous solution (100 µL) or encapsulated in RPMs dissolved in EO (100 µL). The animals were allowed free access to food and water during the experiment.

Blood collection and vasopressin assay

Blood samples were collected at defined time points via the jugular vein under isoflurane anesthesia and immediately transferred to pre-chilled Microtainer® tubes containing EDTA and aprotinine (500 kUI/mL of blood). Body fluids were replaced by an equivalent volume of physiological saline. Samples were centrifuged at 4°C and 1600 g for 20 min to isolate plasma. Plasma samples were kept frozen at – 80 °C until analysis. Blood concentrations of vasopressin were assessed by radioimmuno-assay following the supplier's protocol (RIA; Penninsula Laboratories, San Carlos, CA). Vasopressin extraction was carried out on C18 minicolumns (code S-196; Penninsula Laboratories), with a recovery of more than 95%. The sensitivity of the RIA was 1 pg per assay tube. Vasopressin levels are given in ng/mL plasma.

Pharmacokinetic data analysis

Standard pharmacokinetic parameters were evaluated from individual plasma concentration-time curves. Area under the curve (AUC) was calculated using the linear trapezoidal rule. The relative bioavailability (F_{rel}) following s.c. administration was calculated using eq. 1

$$F_{rel} = \frac{AUC_{RM}}{AUC_{SLN}} \quad (1)$$

where AUC_{RM} and AUC_{SLN} are the mean AUCs obtained following the administration of the RM and aqueous solution, respectively.

Results and discussion

Preparation and characterization of vasopressin-loaded RMs

The synthesis and characterization of RMs obtained from hydrophobically-modified PG_{OH}MA_s have been reported previously (*Jones, 2006*) and are summarized in Table 5.1. Briefly, star-shaped PG_{OH}MA were esterified using fatty acid derivatives of varying lengths (60 mol% compared to –OH groups) (Table 5.1). A drug loading corresponding to 1 wt% of vasopressin was selected since at that drug ratio, the entrapment efficiency remained above 50% (*Jones, 2006*).

Table 5.1. Characterization of amphiphilic star-shaped polymers and reverse micelles.

Polymer	Alkyl chain		D _{EO(a)} (nm) [PI]
	Fatty acid derivative	Degree of alkylation (%mol)	
PG _{OH} MA-C12	lauric	65.3	19 [0.3]
PG _{OH} MA-C14	myristic	60.1	19 [0.3]
PG _{OH} MA-C18	stearic	61.0	19 [0.3]

^(a) mean diameter in ethyl oleate; PI= polydispersity index

The release of vasopressin from the different RMs formulations was studied under pH conditions mimicking those encountered in the gastro-intestinal tract (Figure 5.1). The formulations were exposed first to an acidic pH for 2 h, then to a neutral buffer (pH 6.8), simulating the intestinal environment. At this point, neither formulation had released significant amounts of vasopressin (< 3%). Altering the pH had no noticeable effect on the release rate (Figure 5.1A). In comparison, over 60% of the drug had been recovered from the control aqueous solution, again with no effect of pH (Figure 5.1A). Overall, the amount of peptide released from the RM formulations barely reached 5% in 24 h (Figure 5.1A). After one week, less than 15% of the peptide had diffused out of the RMs, independently of

the nature of the polymeric scaffold. The observed sustained drug release can be explained by the slow partitioning of vasopressin between the hydrophilic core and the external oil phase, for which it has limited affinity (*Jones, 2006; Kranz, 2007*). However, this process is expected to be significantly accelerated following the emulsification of the oil phase by the biliary salts in the small intestine. Indeed, the increase in specific area thus created may act as a driving force for the release of the encapsulated peptide (*Humberstone, 1997*). This hypothesis was confirmed by the investigation of the release kinetics of vasopressin from RM-containing EO-in-water coarse emulsions (Figure 5.1B). Following emulsification, all RM formulations released 60-80% of their load within a few hours (Figure 5.1B). The slight difference observed between RM formulations may be ascribed to variations in oil globule size (300-800 nm) (*Humberstone, 1997*). After an initial fast-release, the amount of vasopressin released plateaued at values from 50-70%, depending on the formulation. This might be due to the destabilisation of the emulsion over time which leads to the separation of the RM-rich EO phase from the aqueous dispersant. As this occurs, the release rate slows down to the level previously observed for the oil solutions.

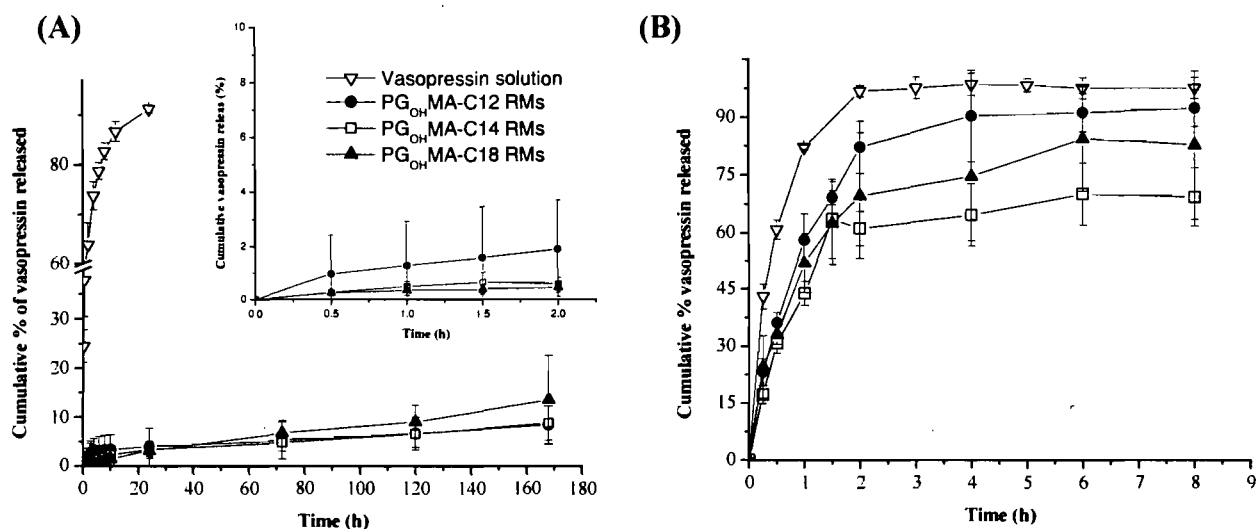


Figure 5.1. Release kinetics of vasopressin from RMs prior to (A) or following (B) emulsification. The inset show the release of vasopressine between 0 and 2 h. Results are presented as mean \pm SD ($n \geq 3$).

Biological activity and pharmacokinetics

Oral administration

The *in vivo* efficacy of the different peptide formulations was studied following oral administration. The selected method, namely the measurement of urine output, is a standard pharmacopeal procedure for the evaluation of vasopressin efficacy (*Pharmacopea, 1988*). Here, animals were fed known volumes of water 30 min and 1 h following the drug (*Crespi, 1990*). The efficacy was estimated as the time required for the excretion of 30, 50 and 60% of the water load (Figure 5.2). For all defined end points, no difference was observed between control groups. Similar results were obtained when desmopressin, a vasopressin analog, was administered to rats (*Ilan, 1996*). On the other hand, the encapsulation of vasopressin inside RMs composed of PG_{OH}MA-C18 resulted in a statistically significant prolongation of the antidiuretic effect. Indeed, the time required for

the elimination of 30, 50 or 60% of the hydric load was approximately 30 min longer than for the controls (Figure 5.2). Although the other RM formulations also provided some pharmacological effect, no statistically difference could be evidenced.

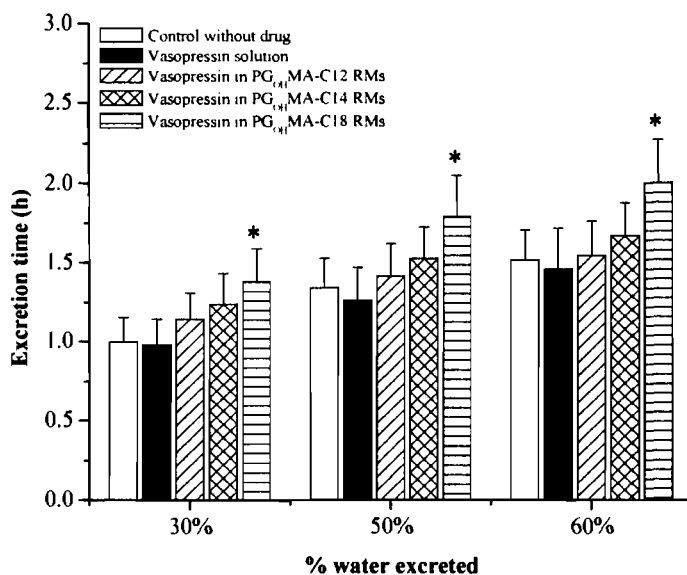


Figure 5.2. Biological activity of vasopressin following oral administration. The antidiuretic effect is expressed as the time required for the excretion of 30, 50 and 60% of the total water load administered. Vasopressin (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was administered 30 min before the first water dose. Results are presented as mean \pm SD ($n \geq 6$). * p -value ≤ 0.05 .

In light of their effectiveness, PG_{OH}MA-C18 RMs were selected for further studies. The pharmacokinetic profiles of vasopressin following oral administration were established for both the RM and aqueous solution (Figure 5.3). The results show that encapsulation did not result in higher peptide absorption. Indeed, no significant difference was observed between the blood concentrations of formulated vs. free vasopressin (Figure 5.3). Surprisingly, vasopressin even appeared to be slightly better absorbed from the aqueous solution, with an AUC_{0-24} of 2.0 ± 0.6 compared to 1.3 ± 0.3 $\text{ng}\cdot\text{h}/\text{mL}$ for the micelles, yet not biological activity was observed for the control. Such discrepancies between

pharmacodynamics and pharmacokinetics may be explained by the lack of specificity of the assay method which can not discriminate between intact and degraded vasopressin.

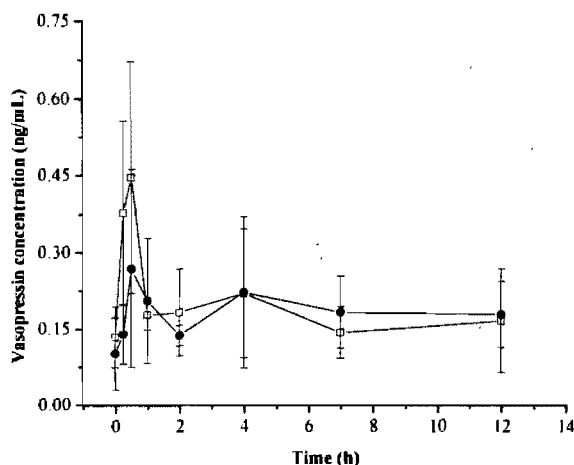


Figure 5.3. Plasma concentrations following oral administration of vasopressin (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) formulated in RMs (closed circles) or as an aqueous solution (open squares). Results are presented as mean \pm SD ($n \geq 5$).

Subcutaneous administration

The potential benefit of RMs as sustained drug delivery systems was first highlighted during the release studies, where vasopressin was slowly discharged from the oil solutions (Figure 5.1). In vivo, this may translate into a prolonged antidiuretic effect and thus, reduce the need for multiple daily injections. This assumption was challenged following the subcutaneous injection of vasopressin formulated in $\text{PG}_{\text{OH}}\text{MA-C18}$ RMs. Again, the urinary output was employed as an indicator of pharmacological efficacy. In this case, however, the volume of urine excreted was measured over 12 h for three consecutive days (Figure 5.4). Initially, both the RM and control formulations resulted in a decreased urine production which was maintained over a 8-12 h period (Figure 5.4A), in accordance with a reported mean duration of action of $\sim 8-10$ h (*d'Agay-Abensour, 1993*). At all time points, the volume of urine produced by the animals who received the aqueous solution of

vasopressin was higher than those who were given the RM formulation. This difference became statistically significant at 10 h. After 24 h, no residual antidiuretic effect could be noted for the vasopressin solution (Figure 5.4B). Instead, the urine output curve followed closely that of the control (no vasopressin). The RMs, however, maintained their efficacy over time, with no more than 20% of the water load being eliminated 24 h after the initial vasopressin injection (Figure 5.4B). Similar results were observed after 48 h (data not shown).

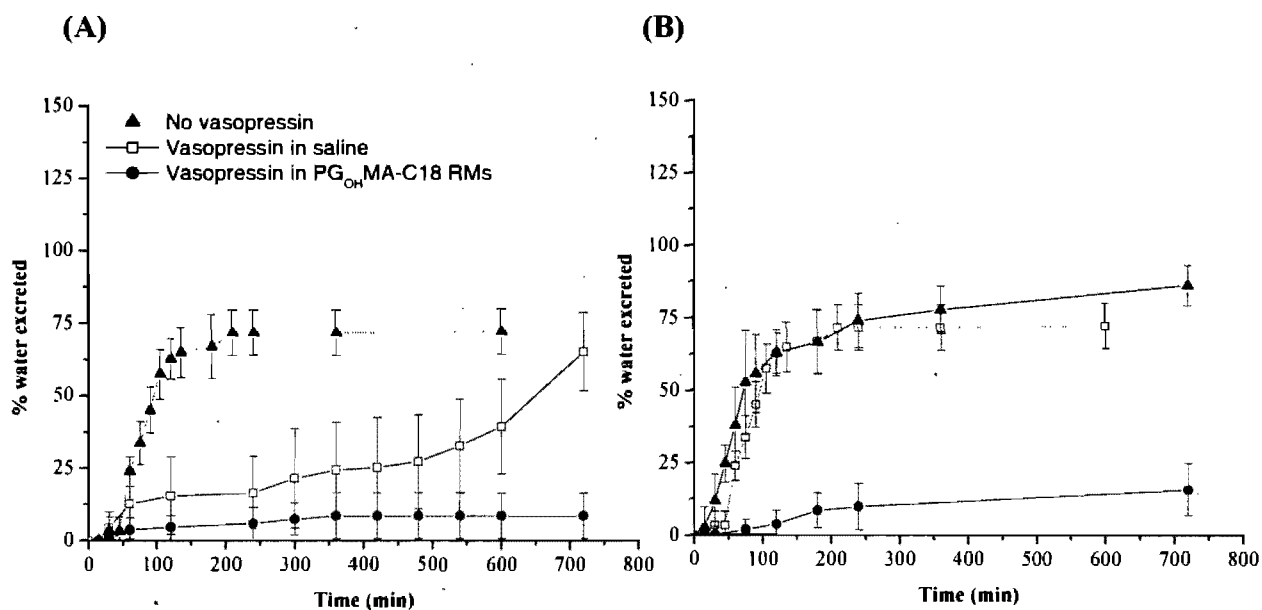


Figure 5.4. Biological activity of vasopressin following subcutaneous injection. The antidiuretic effect was evaluated over 12 h on (A) day 1 and (B) day 2 following drug administration. Vasopressin (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was injected once 30 min before the first water dose. Results are presented as mean \pm SD ($n \geq 6$).

The PK studies confirmed that encapsulation slowed the release of vasopressin *in vivo* (Figure 5.5). While the aqueous solution yielded a single C_{max} (1.4 ± 0.8 ng/mL at 0.47 ± 0.25 h), the presence of two distinct peaks can be observed in the PK profile of the RM formulations (Figure 5.5). The earliest one (0.25-0.5 h) is hypothesized to result from the

diffusion of free and/or loosely-trapped peptide while the second one (48 h), is probably due to the release of vasopressin entrapped deeper in the micelle core (Jones, 2006). Noticeably, the peptide concentrations appear to return to baseline levels between the two peaks (Figure 5.5). However, this did not prevent vasopressin from exerting its pharmacological effect as evidenced by the pharmacodynamics results (Figure 5.4). Likewise, for the control solution, plasma concentrations fell to baseline levels after 4 h, though the antidiuretic effect lasted > 8 h. Typically, very low blood concentration are required for vasopressin activity (Hvistendahl, 2005; Rembratt, 2004). The assay method may not be sensitive enough to detect such small variations in plasma concentrations, resulting in the apparent baseline levels evidenced here. Similar AUC₀₋₁₂₀ were estimated for both formulations (33.3 ± 8 vs 27.9 ± 9.6 ng·h/mL for control and RMs). Consequently the relative bioavailability of the RM formulation was estimated at approximately 82%. This indicates that the drug was almost completely released from the formulation over time contrarily to what could be predicted from the in vitro release studies.

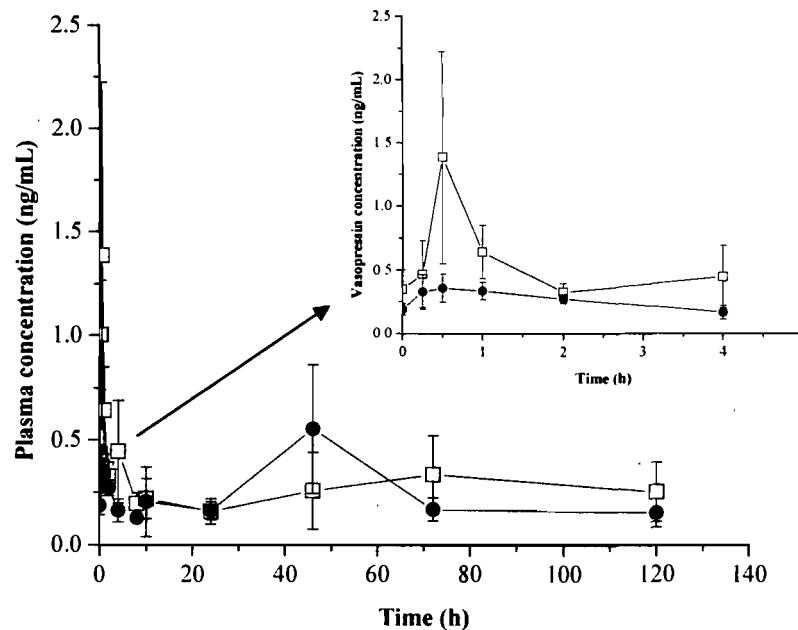


Figure 5.5. Plasma concentrations following subcutaneous administration of vasopressin ($30 \mu\text{g}/\text{kg}$) formulated in RMs (closed circles) or as an aqueous solution (open squares). Results are presented as mean \pm SD ($n \geq 5$).

Conclusion

RMs obtained from star-shaped polyols were previously shown to solubilize substantial amounts of vasopressin in EO, a pharmaceutically relevant oil. Here, the same formulations were proposed for administration of this antidiuretic hormone via the oral and s.c. route. The oral administration of vasopressin loaded RMs yielded a prolonged biological effect, as evidenced by the delayed urinary output compared to the control aqueous solution. However, this increased pharmacological effect could not be correlated with increase plasma concentrations. On the other hand, RMs acted as an efficient sustained delivery system for parenteral administration, as demonstrated by both the long-lasting antidiuretic effect and slow release of the peptide. Both applications are promising and could be further improved by optimizing the formulation, notably by replacing ethyl oleate by a digestible oil, thus improving intestinal delivery by allowing access to the lymphatic route. Injected subcutaneously, the increased viscosity of the oil phase may further prolong release.

Acknowledgment.

The authors extend their gratitude to François Plourde for technical support. This work was financially supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Mistral Pharma Inc. (Montreal, Qc, Canada). MCJ acknowledges a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. Financial contribution from the Canada Research Chair program and NSF NIRT (Grant No. DMR-0210247) is also recognized.

References

- Crespi, C. L., Langenbach, R. and Penman, B. W. (1990). The development of a panel of human cell lines expressing specific human cytochrome P450 cDNAs. *Prog Clin Biol Res* 340B: 97-106.

- d'Agay-Abensour, L., Fjellestad-Paulsen, A., Hoglund, P., Ngo, Y., Paulsen, O. and Rambaud, J. C. (1993). Absolute bioavailability of an aqueous solution of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin from different regions of the gastrointestinal tract in man. *Eur J Clin Pharmacol* 44: 473-476.
- Damgé, C., Maincent, P. and Übrich, N. (2007). Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rat. *J Controlled Release* 117: 163-170.
- Fjellestad-Paulsen, A., d'Agay-Abensour, L., Hoglund, P. and Rambaud, J. C. (1996). Bioavailability of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin with an enzyme inhibitor (aprotinin) from the small intestine in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 50: 491-495.
- Hamman, J. H., Enslin, G. M. and Kotze, A. F. (2005). Oral delivery of peptide drugs - Barriers and developments. *Biodrugs* 19: 165-177.
- Hinchcliffe, M. and Illum, L. (1999). Intranasal insulin delivery and therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 35: 199-234.
- Humberstone, A. J. and Charman, W. N. (1997). Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 25: 103-128.
- Hvistendahl, G. M., Riis, A., Norgaard, J. P. and Djurhuus, J. C. (2005). The pharmacokinetics of 400 microg of oral desmopressin in elderly patients with nocturia, and the correlation between the absorption of desmopressin and clinical effect. *BJU Int* 95: 804-809.
- Ilan, E., Amselem, S., Weisspapir, M., Schwarz, J., Yogev, A., Zawoznik, E. and Friedman, D. (1996). Improved oral delivery of desmopressin via a novel vehicle: mucoadhesive submicron emulsion. *Pharm Res* 13: 1083-1087.
- Jones, M.-C., Tewari, P., Blei, C., Hales, K., Pochan, D. J. and Leroux, J. C. (2006). Self-assembled nanocages for hydrophilic guest molecules. *J Am Chem Soc* 128: 14599.
- Kirby, C. J. (2000). Oil-based formulations for oral delivery of therapeutic peptides. *J Liposome Res* 10: 391-407.
- Kranz, H. and Bodmeier, R. (2007). A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery. *Int J Pharm* 332: 107-114.

- New, R. R. C. and Kirby, C. J. (1997). Solubilisation of hydrophilic drugs in oily formulations. *Adv Drug Deliv Rev* 25: 59-69.
- British Pharmacopeia (1988). Her Majesty's Stationery Office, London. Appendix XIV D: A173.
- Plourde, F., Motulsky, A., Couffin-Hoarau, A. C., Hoarau, D., Ong, H. and Leroux, J. C. (2005). First report implants on the efficacy of L-alanine-based in situ-forming for the long-term parenteral delivery of drugs. *J Controlled Release* 108: 433-441.
- Rembratt, A., Graugaard-Jensen, C., Senderovitz, T., Norgaard, J. P. and Djurhuus, J. C. (2004). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of desmopressin administered orally versus intravenously at daytime versus night-time in healthy men aged 55-70 years. *Eur J Clin Pharmacol* 60: 397-402.
- Schmidt, P. G., Campbell, K. M., Hinds, K. D. and Cook, G. P. (2007). PEGylated bioactive molecules in biodegradable polymer microparticles. *Expert Opin Biol Ther* 7: 1427-1436.
- Steiner, S., Pfutzner, A., Wilson, B. R., Harzer, O., Heinemann, L. and Rave, K. (2002). Technosphere/Insulin--proof of concept study with a new insulin formulation for pulmonary delivery. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 110: 17-21.
- Takeuchi, H., Yamamoto, H., Niwa, T., Hino, T. and Kawashima, Y. (1996). Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharm Res* 13: 896-901.
- van der Merwe, S. M., Verhoef, J. C., Kotze, A. F. and Junginger, H. E. (2004). N-trimethyl chitosan chloride as absorption enhancer in oral peptide drug delivery. Development and characterization of minitablet and granule formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 57: 85-91.
- Wang, J., Hogenkamp, D. J., Tran, M., Li, W. Y., Yoshimura, R. F., Johnstone, T. B. C., Shen, W. C. and Gee, K. W. (2006). Reversible lipidization for the oral delivery of leu-enkephalin. *J Drug Target* 14: 127-136.

Chapitre 6. Discussion

Les défis posés par l'administration d'un agent thérapeutique diffèrent en fonction des propriétés physico-chimiques de la molécule concernée. Par exemple, le manque de solubilité peut limiter la biodisponibilité d'un principe actif (PA) dont l'absorption dépend de la vitesse de dissolution (*Lee, 2001*). Les solutions proposées reposent alors sur une amélioration du profil de dissolution du PA dans les liquides biologiques. En contrepartie, la biodisponibilité orale de molécules hydrophiles est limitée par une perméabilité insuffisante et dans le cas des peptides et protéines, par leur sensibilité à la dégradation enzymatique. Idéalement, ces deux facteurs doivent être considérés lors du développement d'une formulation.

Il a été démontré à maintes reprises que l'encapsulation d'une molécule hydrophobe à l'intérieur d'un vecteur colloïdal permettait d'augmenter sa biodisponibilité orale en assurant sa libération à l'état moléculaire dans l'intestin (*Dong, 2007; Yang, 1999*). À cet égard, les micelles polymères s'avèrent une option particulièrement intéressante en raison de leur important pouvoir solubilisant (*Lee, 2007; Yi, 2007*). Cependant, la déstabilisation de la structure micellaire dans les fluides gastro-intestinaux peut entraîner la libération prématurée puis la précipitation du soluté encapsulé. Ici, l'utilisation de micelles unimoléculaires (MUs) a été proposée afin d'éviter de tels problèmes de stabilité (Chapitre 3). Ces MUs ont de plus été élaborées de façon à répondre aux variations de pH de sorte que la libération du PA soit favorisée à pH neutre, dans l'intestin, plutôt qu'à pH acide.

Les problèmes posés par l'administration orale de peptides peuvent également être résolus par l'emploi de vecteurs (*Cui, 2007; Iwanaga, 1999; Takeuchi, 1996; Yamabe, 2003*). Toutefois, une stratégie de plus en plus explorée consiste à formuler le peptide dans une huile. Le peptide peut soit être dispersé sous la forme d'une émulsion E/H (*Jorgensen, 2004*) ou encore, solubilisé en présence de surfactants (*Kirby, 2000*). Dans la présente thèse, une approche originale basée sur la solubilisation de peptides dans une huile en présence de micelles polymères inverses (MIs) a été présentée (Chapitres 4 et 5).

L'objectif principal de cette thèse était donc de mettre au point de nouveaux vecteurs micellaires pour l'administration orale d'agents thérapeutiques. Outre la méthode de synthèse et le caractère amphiphile des polymères, ces deux systèmes présentent peu de caractéristiques communes et seront traités séparément.

Micelles unimoléculaires sensibles au pH.

La première partie du travail effectué visait à synthétiser et caractériser des MUs sensibles au pH pour l'administration orale d'agents hydrophobes (Chapitre 3).

Les MUs sont obtenues à partir de polymères arborescents, généralement des dendrimères (*Liu, 2000b*), des polymères étoilés (*Liu, 2000a*) ou hyperbranchés (*Sunder, 1999*). Dans la présente thèse, l'utilisation de polymères étoilés a été préférée en raison de l'aisance avec laquelle ils peuvent être synthétisés.

Ainsi, différents polymères étoilés ont été synthétisés par polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (PRTA). L'initiateur choisi est un dérivé du pentaérythritol et compte 4 sites d'initiation (Chapitre 3, Schéma 3.1). Dans un premier temps, nous avons optimisé la méthode de synthèse de façon à obtenir des polymères bien définis possédant les propriétés désirées. La procédure a été élaborée de façon à ce que les polymères présentent un gradient de polarité du centre (cœur hydrophobe) vers la périphérie (enveloppe hydrophile) (Chapitre 3; Schéma 3.2). Pour ce faire, le méthacrylate de poly(éthylène glycol) (MA-PEG) n'a été ajouté qu'une fois la polymérisation des monomères hydrophobes, soit le méthacrylate d'éthyle (MAE) et le méthacrylate de *tert*-butyle (MA_tB), achevée.

Les propriétés des différents polymères synthétisés sont résumées au Tableau 6.1. Nous pouvons voir que la PRTA a permis un contrôle adéquat de la polymérisation, tel que démontré par les indices de polydispersité < 1.3 obtenus par chromatographie d'exclusion stérique (CES). Lors de la synthèse de polymères étoilés, il était impératif de limiter le degré de polymérisation à environ 80% afin d'éviter les réactions de terminaisons entre sites radicalaires adjacents (*Heise, 2001; Robello, 2001*). Nous avons démontré que ce seuil était atteint après environ 1 h dans le cas du MAE et du MA_tB et après 15-20 h pour le MA-PEG. Les copolymères amphiphiles ont ensuite été

caractérisés par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN-¹H) afin d'estimer le degré de polymérisation des différents monomères. Les résultats obtenus ont montré une bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et les valeurs attendues.

Tableau 6.1. Caractérisation des polymères étoilés amphiphiles.

Polymère	Degré de polymérisation			MA-PEG (g/mol)	RMN ¹ H M _n	CES ^a			DL ^b M _p	D _H (nm)
	MAE	MAtB	MA-PEG			M _n	M _p	IP		
S_E ₁₆ T ₁₆ P ₂₋₂₅	16	16	25	200	9,100	N/A	N/A	N/A	N/A	15
S_E ₁₃ T ₁₁ P ₄₋₃₄	13	11	34	475	19.670	N/A	N/A	N/A	N/A	14
S_E ₁₈ T ₁₇ P ₄₋₄₂	18	17	42	400	21,200	32,000	38,700	1.20	48,500	11
S_E ₂₄ T ₂₃ P ₂₋₂₉	24	23	29	200	11.950	20,850	26.500	1.27	1,4x10 ⁶	37 (56%) 141 (44%)

^(a) détermination dans le diméthylformamide ^(b) détermination dans l'eau à 25°C ^(c) D_H = diamètre hydrodynamique

Des quatre prototypes synthétisés, deux ont été caractérisés de manière plus poussée afin d'étudier leur comportement en solution. Ces polymères ont été analysés par CES et diffusion de la lumière en modes statique (DL) et dynamique (DDL). L'analyse de ces résultats a permis de confirmer l'existence de micelles unimoléculaires dans le cas du S_E₁₈T₁₇P₄₋₄₂. En contrepartie, le S_E₂₄T₂₃P₂₋₂₉ semblait plutôt former des agrégats supramoléculaires. En outre, le diamètre moyen des particules observées par DDL était plus élevé dans le cas du S_E₁₈T₁₇P₄₋₄₂ en raison la détection de deux populations de taille distincte dont une de plus de 100 nm. Par ailleurs, nous avons observé une variation de la masse molaire (MM) en fonction du solvant d'analyse. En effet, la MM en poids (M_p) de 26 500 mesurée dans le diméthylformamide, un solvant organique non sélectif, passait à 1,4x10⁶ dans l'eau, où l'agrégation était favorisée. Ces deux polymères se distinguent principalement par la composition de l'enveloppe hydrophile (Tableau 6.1). Non

seulement la chaîne de MA-PEG utilisée dans la synthèse du S_{E24}T₂₃P₂₉ est plus courte (200 g/mol vs 400 g/mol), mais le nombre d'unités monomères greffé est également plus faible (29 vs 42). Il est donc possible que la couronne hydrophile du S_{E24}T₂₃P₂₉ ne soit pas suffisamment dense pour masquer efficacement le cœur micellaire et prévenir les interactions hydrophobes entre polymères adjacents (*Benahmed, 2001; Sakthivel, 1999*).

La RMN-¹H a été employée afin de mettre en évidence l'influence de la polarité du milieu externe sur le comportement des MUs en solution (Chapitre 3; Figure 3.2). Ainsi, dans le chloroforme, un solvant non sélectif, il a été possible de déceler les signaux produits par les protons localisés tant au niveau du segment hydrophobe qu'hydrophile. En milieu aqueux, l'augmentation de la viscosité du cœur micellaire s'est traduit par la disparition des signaux associés à la fraction hydrophobe. Ces résultats confirment le caractère amphiphile des copolymères étoilés ainsi que leur capacité à réagir à des variations de la polarité du milieu environnant.

Il est à noter que les polymères décrits ci-dessus sont des précurseurs ne présentant aucun groupement ionisable. En fait, la fonction acide conférant la sensibilité au pH est introduite suite à l'hydrolyse du MAtB, un dérivé ester de l'acide méthacrylique (AMA). Suite à cette réaction, il est attendu que la polarité du cœur micellaire augmente de façon significative de sorte que l'agrégation secondaire observée pour le S_{E24}T₂₃P₂₉ ne devrait plus se produire. Diverses méthodes ont été employées afin de confirmer la sensibilité au pH des polymères, notamment la RMN¹H (Chapitre 3, Figure 3.3), le titrage des fonctions AMA (Chapitre 3, Figure 3.4 et 3.5) et la spectroscopie de fluorescence (Chapitre 3, Figure 3.6).

Le pyrène est un marqueur fluorescent dont le comportement varie en fonction de la polarité du milieu dans lequel il se trouve (*Kalyanasundaram, 1977*). Cette propriété a été mise à profit dans le but d'évaluer l'effet de variations du pH sur la polarité du cœur micellaire. Nous avons pu mettre en évidence un déplacement bathochrome du signal détecté à 333 nm ainsi qu'une augmentation de son intensité en présence de MUs (Chapitre 3; Figure 3.6). Le ratio I_{337}/I_{333} peut être employé comme indicateur de la polarité de l'environnement dans lequel se trouve le pyrène. En milieu polaire, l'intensité du signal à 333 nm est plus importante et donc, le ratio est plus faible qu'en milieu

partir des résultats présentés à la figure 3.6, le ratio I_{337}/I_{333} a été estimé à 0.6, 1.5 et 1.7 dans l'eau et en présence de MUs à pH basique et acide, respectivement. Ces résultats montrent que, en présence de MUS, le pyrène se retrouve dans un milieu hydrophobe, probablement solubilisé au sein du cœur micellaire. Cependant, l'effet de la variation du pH est moins important qu'anticipé. En effet, un ratio I_{337}/I_{333} similaire a été obtenu peu importe le pH du milieu externe. Ceci peut s'expliquer par la solubilisation du pyrène à l'intérieur de microdomaines hydrophobes constitués par les unités MAE.

La variation de la taille des polymères en fonction du pH a également été évaluée. Nous pouvons voir au Tableau 6.2 que dans le cas du $S_{E18}T_{17}P_{42}$, deux populations de tailles distinctes ont été détectées, quel que soit le pH. Dans le cas du $S_{E24}T_{23}P_{29}$, la formation d'un précipité a été notée à pH 2. La présence de particules de plus de 100 nm peut être attribuée à une interaction entre les segments de PEG et de PAMA (pont hydrogène) ou à la formation d'agrégats micellaires. À pH basique, nous avons pu observer une population de particules ayant un diamètre inférieur à 10 nm, que nous supposons être des MUs. Il est à noter que la détermination du diamètre des particules a été effectuée sur des échantillons concentrés (10 g/L) afin d'obtenir un signal d'intensité suffisante. Or, l'utilisation de fortes concentrations semble avoir favorisé la formation de larges agrégats, rendant plus difficile l'analyse des résultats. Il faut toutefois préciser que de tels agrégats seront déstabilisés en milieu dilué, par exemple suite à l'administration orale. De façon générale, les résultats obtenus à l'aide des différentes méthodes de caractérisation confirment la sensibilité au pH des copolymères étoilés.

Tableau 6.2. Détermination de la taille des MUs par DDL.

pH	S_E18M17P4.42		S_E24M23P2.29	
	Aire sous le pic (%)	D _H (nm)	Aire sous le pic (%)	D _H (nm)
2	60%	11	précipité	précipité
	40%	180		
4	45%	9.0	100%	136
	55%	158		
12	35%	11.4	37%	9.0
	65%	170	63%	178

Par la suite, nous avons évalué la cinétique de libération d'une molécule hydrophobe encapsulée en fonction du pH. Pour ce faire nous avons étudié la diffusion du principe actif à travers une membrane de cellulose poreuse en présence et en absence de MUs.

Dans le cas, présent, la progestérone (Chapitre 3, Figure 3.7), une hormone stéroïdienne a été utilisée comme composé modèle et a été encapsulée dans des micelles de S_E24M23P2.29 (5% *p/p* de PA). La libération de la progestérone a d'abord été évaluée à pH 1.2 (Chapitre 3; Figure 3.8A). À ce pH, en présence de MUs, la quantité de PA libérée a été évaluée à ~ 45% après 8 h. La cinétique de libération était quasi-linéaire. De plus aucun « burst » n'a été observé. Après environ 3 h, la vitesse de libération semblait ralentir sans toutefois atteindre de plateau. En comparaison, la totalité du PA libre avait diffusé à travers la membrane de dialyse en 2 h. Les résultats obtenus pour la formulation contrôle ont permis de confirmer que la membrane de dialyse ne constituait pas un obstacle à la diffusion du PA. Par conséquent, le ralentissement de la diffusion observé en présence de MUs était attribuable à l'encapsulation de la progestérone.

Par ailleurs nous avons étudié l'effet d'une variation du pH sur la vitesse de libération. Pour ce faire, le pH du milieu de dialyse a été ajusté à 7, après 2 h en milieu acide (Chapitre 3; Figure 3.8B). Ce changement de pH est associé à une augmentation du degré d'ionisation des groupements AMA. Après un temps de latence d'environ 10 min, la vitesse de libération a augmenté et la quantité de progestérone libérée a atteint ~ 60%,

~ 60%, 90 min après le changement de pH. Suite à cela, la vitesse de libération a diminué puis plafonné (~ 70% de principe actif libéré). Comparativement, des micelles multimoléculaires de composition semblable préparées au laboratoire avaient libéré la totalité de leur contenu en 8 h (*Sant, 2004*). Dans le cas des MUs, l'observation d'un plateau peut s'expliquer de différentes façons. Par exemple, il est possible qu'une certaine proportion du PA demeure à l'intérieur des MUs, solubilisé dans les domaines hydrophobes. De manière plus probable, le plateau observé reflète l'atteinte d'un point d'équilibre. Ceci a été confirmé notamment lorsque l'expérience a été répétée dans un volume de dialyse plus important (1000 vs 200 mL) : la progestérone était alors libérée plus rapidement et aucun plateau n'était observé (résultats non publiés). La réduction du taux d'encapsulation de la progestérone a eu un effet similaire à l'augmentation du volume (résultats non publiés).

En théorie, la libération d'un PA encapsulé à l'intérieur de micelles polymères peut se faire par diffusion ou encore faire suite à la dissociation ou la dégradation du vecteur (Chapitre 2). Dans le cas présent, puisque les micelles sont unimoléculaires et constituées d'un polymère non biodégradable, la diffusion représente l'unique mécanisme de libération possible. Par conséquent, la vitesse de libération devient tributaire du gradient de concentration établi de part et d'autre de la membrane de dialyse. Ceci explique l'effet observé suite à la variation du volume de dialyse ou du taux d'encapsulation.

Dans l'ensemble, les résultats présentés confirment que les polymères étoilés synthétisés peuvent former des MUs. De plus, l'introduction de fonctions ionisables au sein du cœur micellaire a permis d'améliorer le profil de libération d'un PA hydrophobe modèle solubilisé dans le cœur micellaire.

Caractérisation de micelles polymères inverses pour l'administration orale de peptides

La suite des travaux a été consacrée à l'élaboration de MIs. Ces micelles, solubles en milieu organique, ont été proposées pour l'administration de peptides. Les objectifs de cette partie étaient de 1) caractériser les polymères étoilés amphiphiles hydrophobes; 2)

d'étudier leur comportement en solution puis leur interaction avec diverses molécules peptidiques (Chapitre 4); 3) d'évaluer la cinétique de libération *in vitro* et l'efficacité *in vivo* de formulations de vasopressine à base de MIs (Chapitre 5).

Les polymères employés dans l'élaboration de MIs ont été synthétisés par PRTA à partir d'un initiateur multifonctionnel à 4 branches identiques à celui utilisé dans la mise au point des MUs (Chapitre 4; Figure S1). En réalité, seul le segment hydrophile constitué d'un poly(méthacrylate de glycérol) (PMAG_{OH}) est de nature polymère. L'enveloppe hydrophobe est, quant à elle, composée de chaînes d'acides gras de longueur variable (C12, C14 ou C18), greffées au polymère *via* un lien ester (Chapitre 4, Schéma 4.1). Dans le texte qui suit, les polymère étoilés alkylés sont désignés par l'abréviation suivante: PMAG_{OH}CX_Y où X et Y représentent la longueur de la chaîne alkyle et le degré d'alkylation (% molaire des groupements –OH ayant été modifiés), respectivement.

La composition des polymères a été confirmée par RMN ¹H (Chapitre 4, Figure 4.1) et analyse élémentaire. Les polymères ainsi obtenus sont amphiphiles, mais insolubles dans l'eau. Ils peuvent cependant être solubilisés dans différents solvants organiques, incluant des huiles, végétales ou non. La solubilité des polymères variait grandement selon la nature de l'huile utilisée. Par exemple, les valeurs observées dans les huiles végétales dépassaient rarement 10 g/L alors qu'elles pouvaient atteindre plus de 50 g/L dans l'oléate d'éthyle et l'acide oléique. À l'opposé, la composition du polymère (degré d'alkylation) ne semblait pas avoir d'effet significatif. Ici, l'oléate d'éthyle a été sélectionné pour la suite des expériences en raison de sa capacité à solubiliser de fortes quantités de polymères, sa faible viscosité et l'absence de toxicité envers les muqueuses (*Bookstaff, 2003*). Il est à noter que nous avons observé la gélification de l'oléate d'éthyle en présence de MIs. Cet effet a été observé à des concentrations supérieures à 100 mg/mL pour les dérivés C12 et C14 et supérieures à 5 mg/mL pour le dérivé C18. Par conséquent, lors des essais impliquant le dérivé C18, la concentration du polymère a été maintenue à 5 mg/mL.

Tableau 6.3. Propriétés des MAPG_{OH} alkylés

Polymère	Chaîne alkyle		Diamètre moyen [IP]		
	Longueur	Dégré d'alkylation (%)	oléate d'éthyl (nm)	THF (nm)	
		Théorique	Expérimental		
PMAG_{OH}-C12₆₀	Laurique (-OC(O)-(CH ₂) ₁₀ -CH ₃)	60	65.3	19 [0.3]	33 [0.24]
PMAG_{OH}-C14₆₀	Myristique (-OC(O)-(CH ₂) ₁₂ -CH ₃)	60	60.1	19 [0.3]	32 [0.25]
PMAG_{OH}-C18₆₀	Stéarique (-OC(O)-(CH ₂) ₁₆ -CH ₃)	60	61.0	19 [0.3]	32 [0.24]

Les résultats obtenus pour les polymères sensibles au pH indiquaient qu'il était possible de préparer des MUs à partir de structure en étoile. Étant donné les similarités entre ces polymères, nous avons étudié la conformation des polymères dans le tétrahydrofurane (THF) et l'oléate d'éthyle afin de déterminer la nature, uni- ou multimoléculaire, des micelles formées. Comme nous pouvons le voir au Tableau 6.3, le diamètre des particules détectées par DDL était respectivement, de 33 et 19 nm dans le THF et l'oléate d'éthyle. Ces valeurs ont ensuite été confirmées par microscopie de force atomique (MFA) (Chapitre 4, Figure 4.2A) et microscopie électronique (Chapitre 4, Figure 4.2B). Les tailles observées pour les micelles de PMAG_{OH} alkylé étaient beaucoup plus importantes que celles rapportées pour des structures unimoléculaires dendritiques ou hyperbranchées de composition et masse molaire similaires (2-10 nm) (*Garamus, 2004; Stevelmans, 1996*). Aussi, en se basant sur le diamètre théorique calculé à partir de la longueur d'un lien C-C (1.54 Å), la taille d'une molécule de PMAG_{OH} alkylé ne devrait pas dépasser 10 nm. L'ensemble des résultats semble donc indiquer que les polymères forment des agrégats multimoléculaires. Ce postulat a été confirmé lors d'une étude subséquente où nous avons pu calculer une concentration micellaire critique (CMC) pour le MAPG_{OH}-C18 dans le dichlorométhane (27 mg/L) (*Gao, 2007*). En

comparaison, des CMCs de l'ordre de 220 à 1100 mg/L ont été rapportées pour des micelles de bis(2-éthylhexyle) sulfosuccinate sodique, un surfactant de faible masse moléculaire (444, 6 g/mol). Cependant, dans le cas des surfactants, la présence d'eau ou d'un autre solvant polaire est nécessaire à la formation de micelles. Par conséquent, la structure formée se rapproche plus d'une micro-émulsion E/H que d'une micelle (*Silber, 1999*). L'association de polymères amphiphiles branchés en milieu organique a, quant à elle, rarement été rapportée. En fait, les MIs obtenues à partir de dendrimères ou de polymères hyperbranchés alkylés sont généralement unimoléculaires (*Cooper, 1997; Slagt, 2002; Sunder, 1999*). *Garamus et al.* (2004) ont cependant observé la formation de MIs plurimoléculaire à partir de polyols hyperbranchés lorsque le degré d'alkylation était inférieur à 20%. Dans le cas des MIs, l'interaction entre les groupements -OH semble donc constituer la force motrice provoquant l'agrégation des chaînes de polymères.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'interaction entre les MIs et différents solutés hydrophiles. Les premières études ont été effectuées en utilisant des micelles composées de PMAG_{OH}-C16₂₅. L'expérience consistait à étudier le partage d'une molécule hydrophile, le rouge Congo, entre une phase aqueuse et une phase organique, en présence ou non de MIs. Tel qu'illustré à la figure 6.1, la présence de MIs a permis d'augmenter significativement l'affinité du rouge de Congo pour la phase organique (dichlorométhane). Une étude similaire a ensuite réalisée avec les PMAG_{OH}-CX₆₀ qui ont pu encapsuler jusqu'à 75 mg/g de rouge de Congo (*Gao, 2007*). Des résultats comparables ont été obtenus en présence de MIs unimoléculaires (*Krämer, 2002*). Les mécanismes impliqués dans l'interaction entre le soluté hydrophile et le cœur de MIs ne sont pas totalement élucidés, mais la présence de fonctions -OH libres semble indispensable (*Zou, 2006*). L'hypothèse de base voulant que les MIs de polymères étoilés permettent la solubilisation d'entités hydrophiles en milieu organique, peu polaire a donc été confirmée.

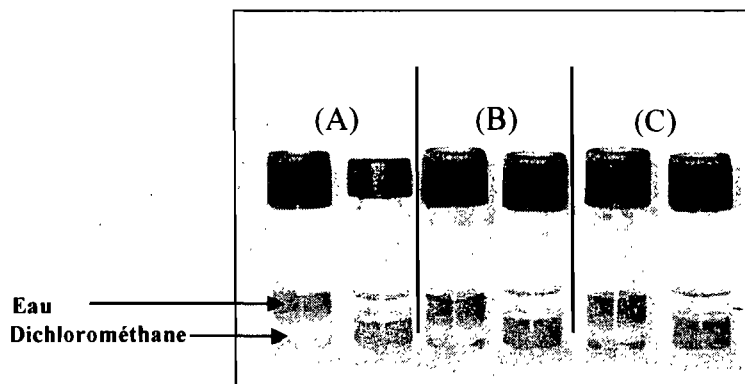


Figure 6.1. Extraction du rouge de Congo en présence de micelles inverses de $\text{PMAG}_{\text{OH}}\text{-C16}_{25\%}$. La concentration initiale du rouge de Congo dans la phase aqueuse est de (A) 26 (B) 51 et (C) 108 $\mu\text{g/mL}$.

Nous avons ensuite évalué le coefficient de partage (K_{app}) oléate d'éthyle-eau de différentes molécules peptidiques en présence de MIs composées de $\text{PMAG}_{\text{OH}}\text{-CX}_{60}$. Pour ce faire, trois dérivés peptidiques ayant naturellement peu d'affinité ($K_{\text{app}} < 0.1$) pour l'oléate d'éthyle, soit la vasopressine (1084 g/mol), la myoglobine (17 500 g/mol) et l'albumine (65 000 g/mol) ont été sélectionnés. Dans tous les cas, les meilleurs rendements d'encapsulation et donc les K_{app} les plus élevés ont été obtenus en présence de MIs de $\text{PMAG}_{\text{OH}}\text{C18}_{60}$ (Chapitre 4, Figure 4.3, S2-3). Nous avons cependant montré que la capacité de solubilisation des MIs diminuait nettement avec une augmentation de la masse molaire du soluté hydrophile. Ainsi, les rendements d'encapsulation qui étaient supérieurs à 95% lors des essais avec la vasopressine n'étaient plus que de 50-80% dans le cas de la myoglobine. Les valeurs de K_{app} ont suivi une tendance similaire. Par exemple, à une concentration de peptide ou de protéine de 1% (p/p), nous avons calculé un K_{app} de 25 pour la vasopressine et de 12 pour la myoglobine. Pour ce qui est de l'albumine, nous avons pu obtenir des rendements d'encapsulation supérieurs à 60%, mais seulement lorsque les concentrations de protéines étaient maintenues en dessous de 1% (p/p) (Chapitre 4, Figure S3). L'ensemble de ces résultats semble indiquer que les MIs sont mieux adaptées au transport de peptides de faible masse molaire. De plus, il est intéressant de noter que les taux d'encapsulation atteignaient 10% (p/p) pour la

formulation la plus efficace. Ces taux se comparent avantageusement aux niveaux atteints lors de l'encapsulation de peptides à l'intérieur de nanoparticules (Cui, 2007) ou de liposomes (Kisel, 2001). Quelle que soit la macromolécule étudiée, nous avons observé une diminution du K_{app} en fonction de la concentration de peptide ou protéine (Chapitre 4; Figures 4.3; S2;S3). Cette observation peut s'expliquer par une saturation progressive de l'espace disponible pour l'encapsulation d'un soluté au sein des micelles (Choucair, 2003), ce qui a été confirmé lors de l'analyse des données selon le modèle d'adsorption défini par l'isotherme de Langmuir (Chapite 4; Figure 4.4).

La dernière partie du projet a porté sur la mise au point de formulations oléagineuses pour l'administration de peptides. Nous avons sélectionné la vasopressine pour ces essais puisque les taux d'encapsulation les plus élevés ont été obtenus avec ce peptide. La vasopressine est un peptide de 9 acides aminés synthétisé dans l'hypothalamus et sécrétée par l'hypophyse en réponse à différents stimuli, notamment une diminution du volume sanguin ou une augmentation de l'osmolalité. Outre son action antidiurétique, la liaison de la vasopressine à son récepteur entraîne une vasoconstriction et une augmentation de la pression artérielle (Treschan, 2006). Ce peptide est présentement commercialisé sous la forme d'une solution aqueuse stérile injectable. Il existe également une formulation orale de desmopressine, un analogue synthétique de la vasopressine. Toutefois, la biodisponibilité du peptide est inférieure à 1%.

Les formulations micellaires ont été préparées en utilisant une concentration de vasopressine correspondant à 10-40 μg de peptide/mg de $\text{PMAG}_{OH}\text{-CX}_Y$, puisqu'à cette teneur, le rendement d'encapsulation était supérieur à 50% ($K_{app} > 1$), quel que soit le polymère employé. Nous avons d'abord étudié la cinétique de libération de la vasopressine *in vitro* dans des conditions de pH simulant l'environnement gastrique et intestinal. L'analyse des résultats obtenus a révélé que la vasopressine était libérée lentement des MIs et indépendamment du pH du milieu externe (Chapitre 5, Figure 5.1). Après 7 jours, moins de 15% de la quantité encapsulée avaient été libérés. Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes formulations. En comparaison, la formulation contrôle avait libéré plus de 80% de son contenu en 4 h (Chapitre 5, Figure 5.1A). Nous pouvons supposer que la libération de la vasopressine à

partir de MIs se fait en plusieurs étapes. D'abord le peptide diffuse à travers l'enveloppe hydrophobe de chaînes alkyles afin d'atteindre l'oléate d'éthyle puis le milieu aqueux. Selon les résultats de K_{app} , il semble que la diffusion du peptide à travers l'enveloppe hydrophobe constitue l'étape limitante.

Dans l'intestin, la solubilisation de la phase huileuse par les sels biliaires devrait accroître significativement la vitesse de libération du PA, suite à une augmentation de l'aire de surface. La véracité de cette hypothèse a été confirmée lors de l'étude de la cinétique de libération de la vasopressine à partir d'une émulsion H/E dont la phase huileuse était constituée d'une solution micellaire dans l'oléate d'éthyle. Dans ces conditions, de 60 à 90% de la vasopressine encapsulée s'était échappée des micelles en 2 h (Chapitre 5, Figure 5.1B). Cependant, le taux de vasopressine libéré a rapidement atteint un plateau. Ce phénomène est particulièrement marqué dans le cas du dérivé C18. Ceci pourrait être causé d'une part à l'instabilité des émulsions préparées au laboratoire qui s'est traduit par une séparation de phase (observée visuellement) et donc, un ralentissement de la libération du peptide (*Bjerregaard, 1999*). Le manque de stabilité peut s'expliquer par la taille relativement élevée des globules de la phase dispersée. En effet, nous avons ciblé un diamètre élevé afin de reproduire le plus fidèlement possible la taille des globules d'huiles produites lors de l'émulsification d'une phase lipidique dans l'intestin. Avec le temps, la coalescence des gouttelettes d'huile a provoqué une séparation de phase.

L'efficacité des différentes formulations micellaires de vasopressine a ensuite été comparée *in vivo*, suite à leur administration *per os* chez le rat. Nous avons d'abord évalué l'activité pharmacologique de la vasopressine et avons mis en évidence une influence de la nature du polymère sur l'efficacité des MIs. En effet, seule la formulation à base de $PMAG_{OH}-C18_{60}$ a entraîné un retard significatif (~20 min) dans la diurèse par rapport au contrôle (Chapitre 5, Figure 5.2). En contrepartie, aucun effet antidiurétique n'a été observé suite à l'administration d'une solution aqueuse du peptide (Chapitre 5, Figure 5.2). Ces résultats semblent indiquer que l'encapsulation du peptide a eu un effet bénéfique sur son absorption. Cette formulation a donc été retenue pour l'étude de la pharmacocinétique de la vasopressine chez le rat (Chapitre 5, Figure 5.3). Les résultats de cette étude se sont avérés peu concluants. En effet, la formulation micellaire a généré des

cette étude se sont avérés peu concluants. En effet, la formulation micellaire a généré des taux plasmatiques semblables à la solution aqueuse. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer une telle dichotomie entre la pharmacodynamie et la pharmacocinétique. Par exemple, celle-ci pourrait s'expliquer par le fait que la méthode de dosage ne permette pas de discriminer la vasopressine intacte de la vasopressine dégradée. Fredholt *et al.* (1999) ont étudié la dégradation enzymatique de la desmopressine. Lors de cette étude, les auteurs ont montré que la structure primaire était maintenue suite au clivage du peptide par la chymotrypsine. Une situation similaire pourrait se produire lors de la dégradation de la vasopressine. Il est donc possible que les produits de dégradation soient reconnus par l'anticorps employé lors du dosage au même titre que le peptide intact. Ce problème peut être résolu en préférant une méthode de chromatographie liquide à haute performance pour l'analyse des échantillons sanguins. De plus, tout au long de l'expérience, les variations du volume sanguin lors de prélèvements successifs ainsi que la libération de vasopressine provoquée par l'isoflurane (agent anesthésiant) (Ullman, 1999) ont pu contribuer à l'importante variabilité observée.

Suite à l'administration de la formulation à base de PMAG_{OH}-C18₆₀ par voie sous-cutanée chez le rat, nous avons noté une prolongation significative de l'effet antidiurétique de la vasopressine. Alors que la durée d'action du contrôle, une solution aqueuse du peptide, a été évaluée à environ 10 h, l'activité de la vasopressine encapsulée pouvait être observée 72 h après la prise du PA (Chapitre 5, Figure 5.4). L'étude de la pharmacocinétique n'a pas permis de confirmer que le peptide était libéré de façon soutenue. Cependant, nous avons remarqué la présence de deux pics, le premier à 15-30 min a été attribué à de la vasopressine libre. Le second est survenu 48 après la dose et fait suite à la libération de la vasopressine encapsulée dans le cœur micellaire (Chapitre 5, Figure 5.5).

En résumé, l'utilisation de polymères étoilés amphiphiles a permis d'augmenter significativement l'affinité de différentes molécules peptidiques pour une phase huileuse. La formulation à base de PMAG_{OH}-C18₆₀ a démontré les meilleurs rendements d'encapsulation, plus spécialement en présence de vasopressine. Cette formulation s'est également démarquée lors de l'étude de l'activité pharmacologique de la vasopressine administrée par voie orale, bien que ceci ne se soit pas nécessairement traduit par une

l'administration sous-cutanée d'une formulation huileuse de vasopressine à base de micelles de PMAG_{OH}-C18₆₀ a permis une prolongation de l'effet antidiurétique et une libération soutenue du peptide, ouvrant la porte à une utilisation du système pour l'administration parentérale extravasculaire de peptides.

Références

- Benahmed, A., Ranger, M. and Leroux, J.-C. (2001). Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone)-*block*-poly(D,L-lactide). *Pharm Res* 18: 323-328.
- Bjerregaard, S., Soderberg, I., Vermehren, C. and Frokjaer, S. (1999). Formulation and evaluation of release and swelling mechanism of a water-in-oil emulsion using factorial design. *Int J Pharm* 193: 1-11.
- Bookstaff, R. C., PaiBir, S., Bharaj, S. S., Kelm, G. R., Kulick, R. M., Balm, T. K. and Murray, J. V. (2003). The safety of the use of ethyl oleate in food is supported by metabolism data in rats and clinical safety data in humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 37: 133-148.
- Choucair, A. and Eisenberg, A. (2003). Interfacial solubilization of model amphiphilic molecules in block copolymer micelles. *J Am Chem Soc* 125: 11993-12000.
- Cooper, A. I., Londono, J. D., Wignall, G., McClain, J. B., Samulski, E. T., Lin, J. S., Dobrynin, A., Rubinstein, M., Burke, A. L. C., Frechet, J. M. J. and Desimone, J. M. (1997). Extraction of a hydrophilic compound from water into liquid CO₂ using dendritic surfactants. *Nature* 389: 368-371.
- Cui, F.-D., Tao, A.-J., Cun, D.-M., Zhang, L.-Q. and Shi, K. (2007). Preparation of insulin PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery. *J Pharm Sci* 96: 421-427.
- Dong, W. Y., Maincent, P. and Bodmeier, R. (2007). In vitro and in vivo evaluation of carbamazepine-loaded enteric microparticles. *Int J Pharm* 331: 84-92.
- Fredholt, K., Ostergaard, J., Savolainen, J. and Friis, G. J. (1999). a-chymotrypsin-catalyzed degradation of desmopressin (dDAVP): influence of pH, concentration and various cyclodextrins. *Int J Pharm* 178: 223-229.
- Gao, H., Jones, M. C., Tewari, P., Ranger, M. and Leroux, J. C. (2007). Star-shaped alkylated poly(glycerol methacrylate) reverse micelles: Synthesis and evaluation

- of their solubilizing properties in dichloromethane. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 45: 2425-2435.
- Garamus, V. M., Maksimova, T., Kautz, H., Barriau, E., Frey, H., Schlotterbeck, U., Mecking, S. and Richtering, W. (2004). Hyperbranched polymers: structure of hyperbranched polyglycerol and amphiphilic poly(glycerol ester)s in dilute aqueous and nonaqueous solution. *Macromolecules* 37: 8394-8399.
- Heise, A., Diamanti, S., Hedrick, J. L., Franck, C. W. and Miller, R. D. (2001). Investigation of the initiation behavior of a dendritic 12-arm initiator in atom transfer radical polymerization. *Macromolecules* 34: 3798-3801.
- Iwanaga, K., Ono, S., Narioka, K., Kakemi, M., Morimoto, K., Yamashita, S., Namba, Y. and Oku, N. (1999). Application of surface coated liposomes for oral delivery of peptide: Effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin. *J Pharm Sci* 88: 248-252.
- Jorgensen, L., Vermehren, C., Bjerregaard, S. and Frokjaer, S. (2004). In vitro release of insulin aspart incorporated into water-in-oil emulsions. *J Drug Del Sci Tech* 14: 455-459.
- Kalyanasundaram, K. and Thomas, J. K. (1977). Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *J Am Chem Soc* 99: 2039-2044.
- Kirby, C. J. (2000). Oil-based formulations for oral delivery of therapeutic peptides. *J Liposome Res* 10: 391-407.
- Kisel, M. A., Kulik, L. N., Tsybovsky, I. S., Vlasov, A. P., Vorob'yov, M. S., Kholodova, E. A. and Zabarovskaya, Z. V. (2001). Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. *Int J Pharm* 216: 105-14.
- Krämer, M., Stumbé, J.-F., Türk, H., Krause, S., Komp, A., Delineau, L., Prokhorova, S., Kautz, H. and Haag, R. (2002). pH-responsive molecular nanocarriers based on dendritic core-shell architectures. *Angew Chem Int Ed Engl* 41: 4252-4256.
- Lee, S. C., Huh, K. M., Lee, J., Cho, Y. W., Galinsky, R. E. and Park, K. (2007). Hydrotropic polymeric micelles for enhanced paclitaxel solubility: In vitro and in vivo characterization. *Biomacromolecules* 8: 202-208.

- Lee, V. H. L. and Yang, J. J. (2001). Oral drug delivery In *Drug delivery and targeting*. A. M. Hillery, A. W. Lloyd and J. Swarbrick. Eds. Taylor&Francis Inc., London. 145-183.
- Liu, H., Farrell, S. and Uhrich, K. (2000a). Drug release characteristics of unimolecular polymeric micelles. *J Controlled Release* 68: 167-174.
- Liu, M., Kono, K. and Fréchet, J. M. J. (2000b). Water-soluble dendritic unimolecular micelles: their potential as drug delivery agents. *J Controlled Release* 65: 121-131.
- Robello, D. R., Andre, A., Davis, T. A., Kraus, A. and Mourey, T. H. (2001). Synthesis and characterization of star polymers. *Polym Mat Sci Eng* 84: 365-366.
- Sakthivel, T., Toth, I. and Florence, A. T. (1999). Distribution of a lipidic 2.5 nm diameter dendrimer carrier after oral administration. *Int J Pharm* 183: 51-55.
- Sant, V. P., Smith, D. and Leroux, J. C. (2004). Novel pH-sensitive supramolecular assemblies for oral delivery of poorly water soluble drugs: preparation and characterization. *J Controlled Release* 97: 301-312.
- Silber, J. J., Biasutti, A., Abuin, E. and Lissi, E. (1999). Interactions of small molecules with reverse micelles. *Adv Colloid Int Sci* 82: 189-252.
- Slagt, M. Q., Stiriba, S.-E., Klein Gebbink, R. J. M., Kautz, H., Frey, H. and van Koten, G. (2002). Encapsulation of hydrophilic pincer-platinum(II) complexes in amphiphilic hyperbranched polyglycerol nanocapsules. *Macromolecules* 35: 5734-5737.
- Stevelmans, S., Hest, J. C. M., Jansen, J. F. G. A., Van Boxtel, D. A. F. G., Da Brabander-van den Berg, E. M. M. and Meijer, E. W. (1996). Synthesis, characterization, and guest-host properties of inverted unimolecular dendritic micelles. *J Am Chem Soc* 118: 7398-7399.
- Sunder, A., Krämer, M., Hanselmann, R., Mülhaupt, R. and Frey, H. (1999). Molecular nanocapsules based on amphiphilic hyperbranched polyglycerol. *Angew Chem Int Ed* 38: 3552-3555.
- Takeuchi, H., Yamamoto, H., Niwa, T., Hino, T. and Kawashima, Y. (1996). Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pham Res* 13: 896-901.

- Treschan, T. A. and Peters, J. (2006). The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology* 105: 599-612.
- Ullman, J. (1999). Vasopressin and angiotensin II in blood pressure control during isoflurane anesthesia in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 43: 860-865.
- Yamabe, K., Kato, Y., Onishi, H. and Machida, Y. (2003). Potentiality of double liposomes containing salmon calcitonin as an oral dosage form. *J Control Release* 89: 429-36.
- Yang, S., Zhu, J., Lu, Y., Liang, B. and Yang, C. (1999). Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. *Pharm Res* 16: 751-757.
- Yi, Y., Yoon, H. J., Kim, B. O., Shim, M., Kim, S. O., Hwang, S. J. and Seo, M. H. (2007). A mixed polymeric micellar formulation of itraconazole: Characteristics, toxicity and pharmacokinetics. *J Control Release* 117: 59-67.
- Zou, J. H., Zhao, Y. B. and Shi, W. F. (2006). Encapsulation mechanism of molecular nanocarriers based on unimolecular micelle forming dendritic core-shell structural polymers. *J Phys Chem B* 110: 2638-2642.

Conclusion

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont porté sur la mise au point de nouveaux vecteurs micellaires obtenus à partir de polymères étoilés amphiphiles.

Ainsi nous avons d'abord proposé l'utilisation MUs sensibles au pH pour l'administration orale de principes actifs hydrophobes. L'introduction de groupements acide a permis de contrôler la libération d'un soluté hydrophobe en fonction du pH. De plus, le PA modèle a pu être encapsulé à raison de 5% (*p/p*) dans les micelles malgré une taille relativement faible.

L'encapsulation de principes actifs faiblement solubles (classe II) vise principalement à améliorer leur vitesse de dissolution afin que ce paramètre ne constitue plus un obstacle à leur absorption. À cet égard, bien que les MUs aient démontré une certaine efficacité *in vitro*, les données disponibles sont insuffisantes pour juger du potentiel réel du système. En outre, l'effet des MUs sur la biodisponibilité d'un PA administré par voie orale n'a pas été évalué. Aussi, il serait intéressant d'étudier l'effet de la composition chimique sur la capacité de solubilisation et la sensibilité au pH des MUs. Ceci permettrait d'optimiser les vecteurs de façon à produire l'effet désiré suite à une administration orale.

Par la suite, nous nous sommes attardés à la conception de vecteurs micellaires pour l'administration orale de peptides. Pour ce faire, nous avons préconisé l'utilisation de micelles inverses (MIs) obtenues à partir de polymères étoilés. Ces micelles se sont avérées d'excellents agents pour la solubilisation de peptides dans un véhicule huileux. Les MIs ont également montré une certaine efficacité suite à l'administration orale d'une formulation d'un peptide modèle (vasopressine) chez le rat. L'administration d'une formulation par voie sous-cutanée a permis de prolonger l'activité biologique du peptide encapsulé, en plus de retarder sa libération.

Les MIs ayant été décrite à ce jour ont été surtout été employées pour l'extraction de molécules hydrophiles de faible masse molaire. Ces études étaient effectuées dans des solvants organiques non adaptés à une utilisation pharmaceutique. L'exemple présenté ici illustre pour la première fois le potentiel de MIs pour

l'administration de macromolécules hydrophiles. Cette propriété est particulièrement intéressante dans l'optique d'une administration par la voie orale. En effet, la combinaison de l'encapsulation et de la solubilisation dans une phase lipidique devrait permettre de réduire les risques de dégradation enzymatique. Aussi, bien que l'administration orale d'un peptide formulé à l'aide de MIs ait permis d'améliorer son efficacité, l'effet observé était moins important qu'escompté. Par conséquent, la formulation doit encore être optimisée afin d'améliorer la performance du système (masse molaire et composition du polymère, nature de la phase lipidique). Néanmoins, les résultats présentés dans cette thèse ont permis de mettre en évidence le bien fondé de cette approche qui pourrait permettre la formulation de nombreux peptides thérapeutiques.