



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2008

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT"

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 octobre 2008

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

Mention Pharmacologie

par **Marie SOCHA**

Née le 13 avril 1978

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

"Métabolisme et Mécanisme d'action des Médicaments – Pharmacologie Clinique"

Sujet :

**Apport des nanotechnologies dans le domaine des peptides et
des protéines : Application à l'absorption par voie orale et à
la furtivité**

MEMBRES DU JURY

Juges :

Professeur Philippe Maincent (Faculté de Pharmacie, Nancy)

Professeur Thomas Lecompte (Faculté de Médecine, Nancy)

Docteur Christiane Damgé (Faculté de Médecine, Strasbourg)

Professeur Odile Chambin (Faculté de Pharmacie, Dijon)

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Rapporteurs :

Docteur Catherine Passirani (Faculté de Pharmacie, Angers)

Docteur Gillian Barratt (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry-Paris XI)

UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN

Chantal FINANCE

Vice-Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Commission des Relations Internationales

Janine SCHWARTZBROD

Responsable de la Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la Commission Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :

Gérald CATAU

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du CEPH :

(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Jean-Michel SIMON

Doyen Honoraire : Claude VIGNERON

Professeur Emérite : Gérard SIEST

Professeurs Honoraires

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMAN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Louis SCHWARTZBROD

Maîtres de Conférences Honoraires

Marie-Claude FUZELLIER

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Assistante Honoraire

Madame BERTHE

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Alain ASTIER (en disponibilité)	Pharmacie clinique
Jeffrey ATKINSON	Pharmacologie
Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Marie-Madeleine GALTEAU	Biochimie clinique
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Dominique LAURAIN-MATTAR	Pharmacognosie
Isabelle LARTAUD	Pharmacologie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Jean-Louis MERLIN	Biologie cellulaire oncologique
Alain NICOLAS	Chimie analytique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Janine SCHWARTZBROD	Bactériologie, Parasitologie
Jean-Michel SIMON	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Claude VIGNERON	Hématologie, Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Monique ALBERT	Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et Santé
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
Catherine BOITEUX	Biophysique, Audioprothèse
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA	Physiologie
Gérald CATAU	Pharmacologie
Jean-Claude CHEVIN	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT	Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB	Parasitologie, Organisation animale
Joël COULON	Biochimie
Sébastien DADE	Bio-informatique
Bernard DANGIEN	Botanique, Mycologie
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Béatrice DEMORE	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Florence DUMARCAY	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	Hématologie

Luc FERRARI.....	Toxicologie
Stéphane GIBAUD.....	Pharmacie clinique
Françoise HINZELIN.....	Mycologie, Botanique
Thierry HUMBERT.....	Chimie organique
Frédéric JORAND.....	Santé et Environnement
Francine KEDZIEREWICZ.....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT.....	Informatique, Biostatistiques
Brigitte LEININGER-MULLER.....	Biochimie
Stéphanie MARCHAND.....	Chimie physique
Faten MEHRI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Patrick MENU.....	Physiologie
Christophe MERLIN.....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU.....	Pharmacognosie
Dominique NOTTER.....	Biologie cellulaire
Francine PAULUS.....	Informatique
Christine PERDICAKIS.....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO.....	Pharmacologie
Virginie PICHON.....	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER.....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY.....	Santé publique
Gabriel TROCKLE.....	Pharmacologie
Mohamed ZAIYOU.....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI.....	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER.....	Sémiologie
-------------------------	------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD.....	Anglais
-------------------------	---------

ASSISTANT

Annie PAVIS.....	Bactériologie
------------------	---------------

SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION DE L'UNIVERSITE (SCD)

Anne-Pascale PARRET.....	Directeur
Frédérique FERON.....	Responsable de la section Pharmacie-Odontologie

*A Nathalie,
merci.*

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Monsieur le Professeur **Philippe Maincent** de m'avoir fait découvrir le domaine de la recherche scientifique au sein de son laboratoire, de m'avoir toujours soutenue et encouragée tout au long de ce travail. Vous m'avez également permis d'acquérir de nouvelles compétences en me donnant l'occasion d'assister à des congrès en France ou à l'étranger. Trouvez ici toute ma reconnaissance pour ces années de travail sous votre direction.

J'exprime une pensée particulière à Madame le Docteur **Nathalie Ubrich** qui a dirigé ce travail sans jamais faillir jusqu'à sa disparition le 24 avril 2007. Ta joie de vivre et ta bienveillance me manquent.

Merci à Monsieur le Professeur **Thomas Lecompte** d'avoir accepté de diriger la dernière année de cette thèse en collaboration avec le Professeur Maincent. Vos conseils de Médecin, notamment pour les études impliquant l'utilisation d'héparine, m'ont été précieux.

Je remercie également Madame le Docteur **Christiane Damgé** de m'avoir apporté ses connaissances et ses compétences concernant l'insuline. Votre aide pour la réalisation des dosages RIA m'a été indispensable. Merci pour votre gentillesse, votre amitié... et vos pâtisseries.

Merci à Madame le Professeur **Odile Chambin** d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier Mesdames les Docteurs **Catherine Passirani** et **Gillian Barratt** de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. J'adresse une reconnaissance particulière à Catherine Passirani pour son accueil au sein du laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire d'Angers ainsi que pour sa sympathie et sa disponibilité lors de mes deux séjours à Angers. Merci de votre soutien et de vos conseils lors de cette dernière année de thèse.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur **Alf Lamprecht** pour sa participation primordiale aux analyses statistiques.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Pierre Leroy** pour son aide concernant les techniques de dosage analytique.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur **Jérôme Barré** pour ses conseils indispensables en pharmacocinétique.

Merci à tous les étudiants du laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie de Nancy que j'ai rencontrés au cours de ces années pour leur amitié et leur gentillesse.

Je remercie **Julien Perrin** pour sa disponibilité et ses qualifications lors des manipulations de chimiluminescence.

J'exprime des remerciements particuliers aux techniciens du laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie de Nancy pour leur aide lors des expérimentations animales, pour leurs compétences techniques ainsi que pour leur sympathie : **Audrey, Fatima** et **Emeric**, tout ceci n'aurait pas été possible sans vous.

J'adresse mes sincères remerciements à **Myriam Moreau**, technicienne du laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire d'Angers pour sa bienveillance, ses aptitudes et ses conseils concernant les dosages de l'activation du complément.

Merci à mes parents d'avoir toujours été présents tout au long de mes études ; cette thèse en est l'aboutissement final.

Merci à mes amis qui m'ont entourée et supportée lors de ce travail.

Merci à Frédéric, ta présence et ton soutien m'ont été très précieux, dans les moments de joie comme dans les instants de doute.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
RÉFÉRENCES	8
 PREMIÈRE PARTIE :	10
GÉNÉRALITES SUR LES NANOPARTICULES, APPLICATION À L'ADMINISTRATION ORALE D'INSULINE.....	10
<i>ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	11
I. Généralités sur les vecteurs polymériques de principes actifs	12
1. Les vecteurs macromoléculaires	12
2. Les vecteurs corpusculaires	13
II. L'insuline : généralités	17
1. Rôle physiologique.....	18
2. Physiopathologie.....	20
3. Administration de l'insuline	22
III. Insuline et voie orale	24
IV. Nanoparticules d'insuline	25
1. La barrière gastro-intestinale	26
2. Les formulations de nanoparticules d'insuline.....	29
3. Intérêts de l'encapsulation de l'insuline pour augmenter son absorption.....	34
4. Administration orale de nanoparticules d'insuline : études in vivo	40
V. Conclusion	51
RÉFÉRENCES	52
<i>TRAVAIL EXPÉRIMENTAL</i>	61
CHAPITRE I :	62
Influence de la concentration en polymères sur les caractéristiques in vitro de nanoparticules d'insuline destinées à l'administration orale.....	62
CHAPITRE II :	79
Nanoparticules d'Eudragit et Poly- ϵ -caprolactone pour l'administration orale d'insuline asparte dans le traitement du diabète.....	79
CHAPITRE III :	102
Effets de la microencapsulation de nanoparticules sur la diminution du "burst".....	102

DEUXIÈME PARTIE :	113
NANOPARTICULES FURTIVES, APPLICATION À L'ENCAPSULATION DE PRINCIPES ACTIFS	
MODÈLES.....	113
<i>INTRODUCTION</i>	114
<i>ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	117
I. Généralités sur les nanoparticules administrées par voie intraveineuse.....	118
1. Rappels sur la phagocytose.....	118
2. Concept des nanoparticules furtives et stratégies de recouvrement des	
vecteurs particuliers.....	120
3. Evaluation de la furtivité.....	131
II. Les nanoparticules furtives appliquées à l'encapsulation de peptides et/ou	
protéines.	155
1. Encapsulation de sérum albumine humaine (SAH).....	155
2. Encapsulation de sérum albumine bovine (SAB).....	158
3. Encapsulation de TNF α (tumor necrosis factor).....	159
RÉFÉRENCES.....	162
<i>TRAVAIL EXPÉRIMENTAL</i>	168
CHAPITRE I :	169
Augmentation du temps de résidence vasculaire de nanoparticules de propranolol	
greffées avec de l'héparine.....	169
CHAPITRE II :	180
Nanoparticules furtives greffées avec de l'héparine, transporteurs de peptides ou	
protéines.....	180
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	209
I. Développement de nanoparticules d'Eudragit et de poly- ϵ -caprolactone	
encapsulant de l'insuline.....	210
II. Nanoparticules d'insuline asparte pour l'administration orale.....	213
III. Développement de microparticules composites.....	216
IV. Nanoparticules furtives de chlorhydrate de propranolol.....	218
V. Nanoparticules furtives d'insuline.....	225

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	229
RÉFÉRENCES.....	234

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D-PAGE : électrophorèse bidimensionnelle sur gel d'acrylamide

AMM : autorisation de mise sur le marché

ATU : autorisation temporaire d'utilisation

CLHP : chromatographie liquide haute performance

FITC : fluoroisothiocyanate

HBPM : héparine de bas poids moléculaire

IV : intraveineux

MEB : microscopie électronique à balayage

MET : microscopie électronique à transmission

NP : nanoparticules

PBS : Phosphate buffer solution

PCL : poly- ϵ -caprolactone

PEG : polyéthylène glycol

pI : point isoélectrique

PLA : acide polylactique

PLGA : copolymère d'acide lactique et glycolique

POE : poly(oxyde d'éthylène)

PVA : acide polyvinylique

SAB : sérum albumine bovine

SAH : sérum albumine humaine

SC : sous-cutané

SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide

SEM : écart standard à la moyenne

SPM : système phagocytaire mononucléé

$t_{1/2}$: temps de demi-vie d'élimination plasmatique

TNF α : tumor necrosis factor alpha

UI : unités internationales

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Capsules creuses de polymère pour vectorisation.....	2
Figure 2 : Représentation schématique des différentes formes de nanoparticules.....	16
Figure 3 : Structure primaire de l'insuline humaine.....	18
Figure 4 : Biosynthèse de l'insuline à partir de la pré-proinsuline	19
Figure 5 : Réponse de l'insuline (●) et du glucose (■) sanguins après ingestion de 400 UI d'insuline combinées à 2100 mg de SNAC. (selon Kidron <i>et coll.</i> , 2004).....	25
Figure 6 : Organisation des plis circulaires de l'intestin grêle.....	27
Figure 7 : Structure d'une villosité intestinale (détail de la figure 6) (Académie de Lille, 2008).....	27
Figure 8 : Libération <i>in vitro</i> en fonction du temps d'insuline à partir de particules de PCP (acide polyméthacrylique-chitosane-PEG) à pH 1,2 et 7,4 (selon Sajeesh et Sharma, 2006b).....	34
Figure 9 : Iléon isolé de rat après administration intra-gastrique de nanocapsules chargées en insuline (NC) (b) NC adhérentes aux microvillosités des entérocytes (L : lumière intestinale), (c) Agrandissement montrant des nanocapsules se rapprochant des microfilaments de glycocalyx (gl). (Selon Pinto-Alphandary <i>et coll.</i> , 2003).....	36
Figure 10 : Microscopie électronique à balayage de nanocapsules de poly(alkylcyanoacrylate) (indiquées par les flèches) dans les espaces intercellulaires des entérocytes (E). (Selon Damgé <i>et coll.</i> , 1990).....	36
Figure 11 : Nanosphères d'alginate-dextran chargées en insuline et recouvertes d'un complexe albumine-chitosane-PEG. (Lu : lumière intestinale) (Selon Damgé <i>et coll.</i> , 2008)	37
Figure 12 : Représentation schématique de l'absorption intestinale des nanoparticules d'insuline. E : entérocyte, M : cellule M, mb : membrane basale, VS : vaisseau sanguin. (1) transport paracellulaire, (2) transport transcellulaire par les entérocytes, (3) transport transcellulaire par les cellules M, (4) transport de l'insuline libre médiée par des récepteurs. (selon Damgé <i>et coll.</i> , 2008).....	39
Figure 13 : Effet d'une administration intra-gastrique unique de nanosphères d'insuline (100 UI/kg) dispersées dans de l'eau (□), de l'eau contenant des agents tensio-actifs (poloxamer 188 1% et acide desoxycholique 0,01 M) (○), du miglyol contenant les mêmes agents tensio-actifs (●) sur la glycémie de rats diabétiques. Les animaux contrôle ont reçu une administration orale de 100 UI/kg d'insuline libre dans du miglyol contenant les agents tensio-actifs (▲). Résultats exprimés en moyenne ± S.E.M. n=8. (Selon Damgé <i>et coll.</i> , 1997)	41
Figure 14 : Variation de la glycémie en fonction du temps après administration orale à des souris diabétiques de particules de PLA-F129-PLA chargées en insuline à la posologie de 50 et 100 UI /kg. Résultats exprimés en moyenne ± écart-type, n=5 par groupe. (Selon Xiong <i>et coll.</i> , 2007)	42

Figure 15 : Représentation schématique d'une particule de CAPIC (Selon Morcol <i>et coll.</i> , 2004).....	45
Figure 16 : Représentation schématique de nanoparticules d'or recouvertes de chitosane, permettant le chargement en insuline. (selon Bhumkar <i>et coll.</i> , 2007).....	46
Figure 17 : Représentation schématique des différentes étapes de la phagocytose d'une particule opsonisée par une cellule du SPM (Selon CHU-PS, 2008).....	119
Figure 18 : Représentation schématique d'une nanoparticule constituée d'un polymère hydrophobe et recouverte par un polymère hydrophile.....	121
Figure 19 : Interactions entre une protéine et une surface hydrophobe recouverte de chaînes de polymère hydrophile.....	122
Figure 20 : Formule chimique du poly(éthylène glycol).....	123
Figure 21 : Nanoparticules de PIBCA recouvertes de PEG, avec différentes configurations de PEG en fonction de la structure chimique (A : PEG ; B : MePEG). (selon Peracchia <i>et coll.</i> , 1997a).....	124
Figure 22 : Formule chimique des poloxamères.....	126
Figure 23 : Formule chimique des poloxamines.....	126
Figure 24 : Répartition de la ¹¹¹ In-oxine libre (noir) et des nanoparticules de poly(organophosphazène) (PF) recouvertes de poloxamine 908 (blanc) ou d'un copolymère de poly(organophosphazène)-POE (PF-POE ₅₀₀₀) (rayé) 3h après injection intraveineuse à des rats. (selon Vandorpe <i>et coll.</i> , 1997).....	127
Figure 25 : Pourcentage de granulocytes fluorescents après administration intravasculaire de nanoparticules fluorescentes de PLA et de MPOE-PLA/PLA (75/25) à des cobayes en fonction du temps (8 mg/kg, n=3). (selon Zambaux <i>et coll.</i> , 2000)...	129
Figure 26 : Concentrations plasmatiques en fonction du temps après injection des suspensions des 3 types de nanoparticules (● : Nanohep, □ : Nanodex, ▲ : PMMA) à des souris. (selon Passirani <i>et coll.</i> , 1998b).....	130
Figure 27 : Formule chimique d'une héparine de bas poids moléculaire.....	131
Figure 28 : Représentation schématique de la technique du CH50 mesurant l'activation du complément. (Selon Vonarbourg <i>et coll.</i> , 2006a).....	133
Figure 29 : Consommation de CH50 de nanoparticules de PEG-PIBCA (A), MePEG-PIBCA (B) et de PIBCA (C) en fonction du volume de suspension nanoparticulaire. (D) Activation spontanée du complément. (selon Peracchia <i>et coll.</i> , 1997a).....	134
Figure 30 : Représentation schématique d'un gel d'électrophorèse après migration des échantillons.....	136
Figure 31 : Gel de SDS-PAGE de protéines de sérum associées à des nanosphères classiques (à gauche) et des nanosphères recouvertes de SAH (à droite) incubées dans un sérum. (selon Ogawara <i>et coll.</i> , 2004).....	137
Figure 32 : Représentation schématique des différentes étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel d'acrylamide.....	139

Figure 33 : Quantités totales de protéines adsorbées sur des nanoparticules de PEG-PLA avec différentes masses moléculaires de PEG. La quantité de protéines est exprimée en unités arbitraires (n=2). (selon Gref <i>et coll.</i> , 2000).....	140
Figure 34 : Gels de 2D-PAGE de protéines plasmatiques adsorbées sur des nanoparticules de PLA greffées avec (a) PEG de 2000 Da, (b) PEG de 5000 Da et (c) PEG de 10000 Da. (1) albumin ; (2) fibrinogène α ; (3) fibrinogène β ; (4) fibrinogène γ ; (5) IgG γ ; (6) Ig à chaînes courtes ; (7) apoA-IV ; (8) apoJ ; (9) apoE ; (10) apoA-I ; (11) apoC-III (selon Gref <i>et coll.</i> , 2000).....	141
Figure 35 : Quantités totales de protéines adsorbées sur des nanoparticules de PEG-PLA avec différentes proportions de PEG. La quantité de protéines est exprimée en unités arbitraires (n=2). (selon Gref <i>et coll.</i> , 2000).....	142
Figure 36 : Représentation schématique de nanoparticules de PCL recouvertes de dextran de 5000 Da (a) et de 40000 Da (b). (selon Lemarchand <i>et coll.</i> , 2006).....	143
Figure 37 : Observation de cryofracture par microscopie électronique. (A) nanoparticules de PHDCA, (B) nanoparticules PEGylées de PHDCA après incubation avec une solution de fibrinogène. Les flèches indiquent les molécules de fibrinogène libre ou associé aux particules. (selon Peracchia <i>et coll.</i> , 1999).....	145
Figure 38 : Corrélation entre l'indice phagocytaire et le potentiel zêta (dans un tampon phosphate, 5mM, pH 7,2) de nanoparticules dont la surface a été modifiée par de l'albumine en utilisant des cellules U-937 (incubation 60 min en présence de sérum humain) et des macrophages de souris (incubation 60 min sans sérum). (selon Roser <i>et coll.</i> , 1998).....	147
Figure 39 : Capture de nanoparticules chargées en amoxicilline (A1) nues, (A3) greffées avec du PEG 2000 Da et (A4) avec du PEG 4000 Da, par des macrophages murins. Les résultats sont exprimés en pourcentage de nanoparticules phagocytées comparativement au lot A1 fixé à 100 % $\pm$ écart-type. *Statistiquement différent de A1 à $p < 0,01$. (selon Fontana <i>et coll.</i> , 2001).....	148
Figure 40 : Relation entre le potentiel zêta et la phagocytose de particules de polystyrène greffées avec du mPEG (la capture des particules non recouvertes étant considérée comme 100 %). (selon Gbadamosi <i>et coll.</i> , 2002).....	149
Figure 41 : Capture des nanoparticules par des macrophages péritonéaux murins déterminée par cytométrie en flux. (A) macrophages seuls (contrôle), (B) macrophages en présence de nanoparticules de PLGA, (C) macrophages en présence de nanoparticules de PEG-PLGA. Résultats exprimés en pourcentage de nanoparticules marquées, moyenne $\pm$ écart-type, n=3.	151
Figure 42 : Radioactivité détectée dans le sang en fonction du temps après injection intraveineuse de nanoparticules furtives de poly méthoxyéthylène glycol cyanoacrylate-co-n-hexadécyl cyanoacrylate (PEG-PHDCA) ou non furtives de polyhexadécyl cyanoacrylate (PHDCA). n=6. Moyenne $\pm$ écart-type. (c) $P < 0,01$ par rapport aux particules de PHDCA. (selon Huang <i>et coll.</i> , 2005).....	153
Figure 43 : Profils de clairance sanguine de ^{111}In -oxine libre, de nanoparticules de poly(organophosphazène) (PF) recouvertes de POE et de nanoparticules de PLGA recouvertes de poloxamine 908 après injection intraveineuse à des lapins. (selon Vandorpe <i>et coll.</i> , 1997).....	153

Figure 44 : Distribution de BSA marquée à ^{125}I 3h (A) et 12h (B) après injection intraveineuse de nanoparticules de PLGA et de PEG-PLGA à des rats. (selon Li <i>et coll.</i> , 2001).....	154
Figure 45 : Courbe de clairance sanguine de nanoparticules de PEG-PLGA (●) et PLGA (○) chargées en SAB marquée à ^{125}I . (Selon Li <i>et coll.</i> , 2001).....	158
Figure 46 : Courbes de clairance sanguine du $\text{TNF}\alpha$ libre et du $\text{TNF}\alpha$ chargé dans des nanoparticules de PEG-PHDCA et de PHDCA (n=5). (Selon Fang <i>et coll.</i> , 2006)	161

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des vecteurs de médicaments (selon Benoit <i>et coll.</i> , 1986).....	14
Tableau 2 : Administration orale de nanoparticules d'insuline (selon Damgé <i>et coll.</i> , 2008).....	47
Tableau 3 : Distribution des nanoparticules de polystyrène recouvertes de poloxamine 3h après injection intraveineuse. (selon Moghimi <i>et coll.</i> , 2003).....	127
Tableau 4 : Adsorption des protéines sériques sur des nanoparticules de PEG-PHDCA et de PHDCA incubées dans un sérum murin et quantifiées par BCA. (selon Fang <i>et coll.</i> , 2006).....	138
Tableau 5 : Influence de la concentration en polymère dans le solvant organique (C_p) et de la charge théorique en SAH (L_t) sur divers paramètres (d : diamètre des nanosphères, P_i : index de polydispersité, Y_a : taux d'encapsulation, L_r : charge réelle). (Résultats exprimés en moyenne de 3 à 5 expériences distinctes) (selon Quellec <i>et coll.</i> , 1998).....	156
Tableau 6 : Récapitulatif des différentes études portant sur des vecteurs furtifs.....	222
Tableau 7 : Médicaments PEGylés disponibles ou en essais cliniques.....	228

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis de nombreuses années, la recherche en matière de pharmacie galénique n'a cessé de tenter d'améliorer le confort du patient. La prise d'un médicament se fait par deux voies d'administration principales : parentérale (avec effraction de la peau : intraveineuse, intra-musculaire, sous-cutanée,...) ou entérale (par voie digestive donc sans effraction de la peau). La voie la plus simple et la plus confortable pour le patient est évidemment la voie orale ; elle n'engendre pas de douleur, ne nécessite ni matériel spécifique, ni intervention d'un personnel extérieur spécialisé (infirmier). Cependant, lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal, certaines molécules sont dégradées par les enzymes du système digestif, d'autres présentent des caractéristiques qui empêchent leur absorption par la muqueuse digestive et ne parviennent pas à rejoindre la circulation sanguine afin d'exercer leur effet pharmacologique. Ces molécules nécessitent alors une administration parentérale.

La voie intraveineuse est parfois nécessaire dans le cas de pathologies qui requièrent un traitement très rapide : le médicament se trouve directement dans la circulation sanguine à partir de laquelle il va pouvoir être distribué dans l'organisme. Dans le cas d'un traitement chronique, lors d'une administration intraveineuse, le produit va subir une dégradation plus ou moins rapide et dépendant notamment de ses paramètres physicochimiques ; ce traitement va donc engendrer des administrations multiples afin de maintenir une concentration sanguine constante.

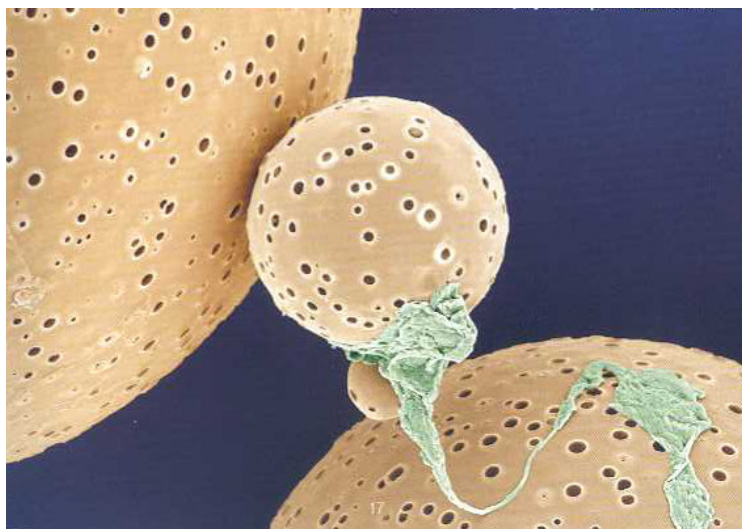


Figure 1 : Capsules creuses de polymère pour vectorisation

Une réponse de la recherche pharmaceutique face à ces inconvénients a été le développement de formes particulières capables de protéger le principe actif et de le véhiculer *in vivo*. La vectorisation des médicaments a ainsi été envisagée pour la première fois dans les années 1970 (figure 1). L'encapsulation peut s'appliquer à l'administration par voie orale de molécules instables dans le tractus gastro-intestinal (TGI), la matrice polymérique permettant de protéger le médicament d'une dégradation enzymatique et de favoriser son absorption au niveau de la barrière intestinale. Dans le cas de molécules à très faible durée de vie exigeant des injections intraveineuses répétées, l'encapsulation va modifier la cinétique de libération du principe actif ainsi que son élimination. Etant donné que la dégradation des vecteurs dans la circulation sanguine dépend notamment de leur nature chimique, la modification de leur surface va permettre de moduler cette dégradation, l'objectif principal étant d'augmenter leur durée de vie afin de diminuer le nombre d'injections à effectuer. Un autre but de l'encapsulation est de contrôler les taux sanguins d'un produit. En effet, certains médicaments présentent une marge thérapeutique étroite et des concentrations toxiques proches des concentrations thérapeutiques. Pour limiter la toxicité d'un tel principe actif, le contrôle de la libération du principe actif à partir de vecteurs polymériques permet de mieux maîtriser les concentrations sanguines.

Parce que les nanotechnologies appliquées à la biochimie et à la galénique permettent de créer des médicaments à la fois plus efficaces et plus faciles à assimiler, les laboratoires Solvay Pharma ont été parmi les premiers à s'engager dans cette voie. Ainsi, en élaborant LIPANTHYL® 145 mg, ces laboratoires donnent naissance au premier fénofibrate (médicament hypoliémiant) issu des nanotechnologies. LIPANTHYL® 145 mg est le résultat d'innovations technologiques qui ont permis l'amélioration de la biodisponibilité du fénofibrate. Après une fragmentation des cristaux de fénofibrate, ces derniers ont été stabilisés par adsorption à la surface d'un polymère. Cette miniaturisation des particules les rend désormais plus rapidement solubles dans l'eau ce qui facilite sensiblement l'absorption de la molécule au travers de la paroi intestinale. Contrairement aux précédentes formulations de fénofibrate, la concentration plasmatique maximale et l'exposition totale de la forme nanoparticulaire

est indépendante de la prise de nourriture. Par conséquent, ce médicament peut être pris sans tenir compte des repas.

Une formulation liposomale pégylée de chlorhydrate de doxorubicine (molécule anticancéreuse) ayant une longue durée de circulation sanguine est disponible sur le marché sous le nom de Caelyx®, commercialisé par les laboratoires Schering Plough. Ce médicament est indiqué principalement dans le sarcome de Kaposi, les cancers du sein et des ovaires. Les liposomes pégylés contiennent des segments greffés en surface par le polymère hydrophile de méthoxypolyéthylène glycol (MPEG). Ces groupements linéaires de MPEG sont étalés sur la surface du liposome créant ainsi une pellicule protectrice qui réduit les interactions entre la double membrane lipidique et les composés plasmatiques, permettant de limiter la reconnaissance des vecteurs par le système phagocytaire mononucléé. Cette disposition permet aux liposomes de ce médicament de se maintenir pendant des périodes prolongées dans la circulation sanguine. La pharmacocinétique plasmatique de ce médicament chez l'homme diffère donc significativement de celle des préparations conventionnelles de chlorhydrate de doxorubicine car la clairance de la doxorubicine à partir du sang dépend alors du véhicule liposomal. Les liposomes pégylés sont suffisamment petits (diamètre moyen approximatif 100 nm) pour passer intacts (extravasation) à travers les vaisseaux tumoraux altérés qui irriguent la tumeur. La doxorubicine devient disponible lorsque les liposomes s'extravasent et pénètrent dans le compartiment tissulaire. L'effet secondaire majeur d'une anthracycline (classe pharmacologique à laquelle appartient la doxorubicine) est une toxicité cardiaque cumulative. Chaque patient peut recevoir une dose maximale de doxorubicine. L'encapsulation de la doxorubicine dans les liposomes pégylés permet de diminuer la toxicité cardiaque du traitement en réduisant la dose de doxorubicine à administrer.

BioAlliance Pharma a également développé une approche nanotechnologique conçue par les chercheurs de l'UMR CNRS 8612 (Bioalliance, 2008). Il s'agit d'une formulation de nanoparticules biodégradables de polyisohexylcyanoacrylate (PIHCA) obtenue par polymérisation anionique, en l'absence de tout solvant organique. Le

premier produit à être développé à partir de cette plate-forme est la doxorubicine Transdrug®, formulation nanoparticulaire chargée en doxorubicine. Le nom de cette technique originale d'administration (Transdrug®) vient de l'anglais « translocation » car il a été montré que les nanoparticules favorisent la pénétration intracellulaire de nombreux médicaments. Le laboratoire a obtenu le statut de médicament orphelin pour ce produit. L'application majeure reste le traitement des cancers résistants et notamment le traitement du carcinome hépatocellulaire. Il a en effet été démontré qu'ainsi véhiculée, la doxorubicine (qui n'avait plus aucun effet sur les cellules résistantes) redevenait partiellement efficace grâce à la capacité des nanoparticules de contourner les phénomènes connus de résistance aux anthracyclines, via un mécanisme de paire d'ions propre à cette structure polymère (la doxorubicine chargée positivement s'associe à l'acide polycyanoacrylique, de charge négative).

L'administration de doxorubicine Transdrug® permet ainsi d'accroître de façon significative la concentration en doxorubicine au niveau hépatique tout en réduisant sa concentration au niveau cardiaque. Cette modification de la distribution tissulaire permet d'envisager une réduction des effets secondaires cardiaques qui constituent la toxicité limitante de ce produit. Par ailleurs, cette formulation présente un temps de circulation systémique prolongé, de 10 fois supérieur à celui de la doxorubicine seule. Une amélioration de l'activité anticancéreuse est donc logiquement attendue de cette modification du profil pharmacocinétique de ce produit.

Les nanoparticules constituent une forme pharmaceutique innovante d'une taille inférieure au micromètre et sont applicables à l'administration orale ou parentérale de médicaments. Parmi les multiples techniques développées pour préparer des nanoparticules, la méthode de double émulsion suivie de l'évaporation de solvant est applicable à l'encapsulation de principes actifs hydrophiles. Une phase interne aqueuse de principe actif est émulsionnée dans une phase organique de polymères. L'émulsion eau dans huile obtenue est à son tour émulsionnée dans la phase aqueuse externe contenant l'agent tensio-actif et entraîne la formation de la deuxième émulsion eau dans huile dans eau. L'évaporation du solvant organique provoque la précipitation du polymère au contact de la phase aqueuse et donc la formation des particules

renfermant le principe actif. Nous avons appliqué cette technique tout au long de notre travail pour la fabrication de nanoparticules destinées à l'administration orale et à l'administration parentérale (sous-cutanée et intraveineuse).

Notre travail se décompose en deux parties. Tout d'abord, la première partie débute par une étude bibliographique dans laquelle nous exposons des généralités concernant la vectorisation et faisons un état des lieux concernant l'administration d'un peptide : l'insuline. Cette petite molécule hydrophile est actuellement administrée exclusivement par voie parentérale en raison de sa dégradation rapide par les enzymes du tractus gastro-intestinal et de sa très faible absorption (< 0,5 %) par la muqueuse intestinale. Des travaux antérieurs ont permis d'administrer par voie orale de l'insuline encapsulée dans différents types de vecteurs polymériques (Damgé *et coll.*, 1988 ; Cournaire *et coll.*, 2002 ; Radwan et Aboul-Enein, 2002 ; Foss *et coll.*, 2004 ; Cui *et coll.*, 2006 ; Reis *et coll.*, 2007). L'insuline ainsi protégée par la matrice de polymères a été absorbée à travers la paroi intestinale et a pu, après avoir rejoint la circulation sanguine, exercer son activité hypoglycémiante.

Le travail expérimental est rédigé sous la forme de trois articles. Le premier article porte sur l'étude de l'influence du rapport de polymères (Eudragit® RS et poly- ϵ -caprolactone) sur les caractéristiques *in vitro* de nanoparticules d'insuline : diamètre moyen, potentiel de surface, taux d'encapsulation et cinétique de libération. Nous avons travaillé à partir de deux insulines différentes du commerce : Actrapid® et Novorapid®. Dans un deuxième temps, nous avons participé à une étude portant sur l'administration orale de nanoparticules de Novorapid® à des rats diabétiques. Les caractéristiques de la formulation basée sur un mélange 50/50 de polymères ont été évaluées *in vitro* avant de procéder à l'étude *in vivo* chez l'animal. Enfin, cette première partie se termine par un article portant sur la préparation de microparticules composites. En effet, un inconvénient majeur de l'encapsulation réside en une libération initiale rapide du principe actif. Pour palier ce problème, des microparticules composites de diverses natures ont été développées pour tenter de contrôler cette libération (De Rosa *et coll.*, 2005 ; Zheng *et coll.*, 2006). Le travail réalisé a porté sur

la mise au point de microparticules composites réalisées à partir de microparticules encapsulant des nanoparticules.

La deuxième partie de notre travail consiste à développer un système innovant de nanoparticules capables d'éviter le système phagocytaire mononucléé lors de leur injection par voie intraveineuse. De telles nanoparticules sont appelées particules furtives. Dans un premier temps, l'étude bibliographique rappelle les notions de phagocytose et fait le point sur les diverses molécules employées pour modifier la surface des particules afin de limiter leur reconnaissance par les cellules phagocytaires. Nous exposons ensuite les différentes techniques utilisées *in vitro* et *in vivo* pour évaluer le potentiel de furtivité et enfin, nous présentons les capacités des vecteurs furtifs à encapsuler une protéine.

Le travail expérimental est exposé sous la forme de deux articles. Dans un premier temps, nous avons mis au point une formulation de nanoparticules rendues furtives par création d'une couronne hydrophile d'héparine, glycosaminoglycane polyanionique, fixée par interactions électrostatiques avec le polymère polycationique. La furtivité a été évaluée par comparaison du temps de demi-vie plasmatique du principe actif hydrophile modèle (le chlorhydrate de propranolol) encapsulé dans les nanoparticules furtives avec celui de particules simples (non-furtives) et une solution aqueuse de ce principe actif. Le potentiel de furtivité de notre système a ensuite été confirmé par encapsulation d'une molécule présentant un temps de résidence vasculaire très court après injection intraveineuse : un peptide, l'insuline.

Les résultats obtenus dans les différentes études seront enfin discutés dans une synthèse générale et nous terminerons en exposant les conclusions et perspectives de notre travail.

RÉFÉRENCES

Bioalliance. BioAlliance Pharma obtient le statut de médicament orphelin pour la doxorubicine Transdrug® en Europe pour le traitement du carcinome hépatocellulaire, [en ligne]. <http://www.gazettelabo.fr/2002archives/breves/2004/1104/bioalliance.htm> [page consultée le 22 05 2008]

Cournarie, F., Auchere, D., Chevenne, D., Lacour, B., Seiller, M., and Vauthier, C., Absorption and efficiency of insulin after oral administration of insulin-loaded nanocapsules in diabetic rats. *Int J Pharm*, 2002. 242(1-2): p. 325-8.

Cui, F., Shi, K., Zhang, L., Tao, A., and Kawashima, Y., Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *J Control Release*, 2006. 114(2): p. 242-50.

Damgé, C., Michel, C., Aprahamian, M., and Couvreur, P., New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier. *Diabetes*, 1988. 37(2): p. 246-251.

De Rosa, G., Larobina, D., Immacolata La Rotonda, M., Musto, P., Quaglia, F., and Ungaro, F., How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA-based microspheres: the case of insulin/hydroxypropyl-[beta]-cyclodextrin system. *J Control Release*, 2005. 102(1): p. 71-83.

Foss, A.C., Goto, T., Morishita, M., and Peppas, N.A., Development of acrylic-based copolymers for oral insulin delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004. 57(2): p. 163-9.

Radwan, M.A. and Aboul-Enein, H.Y., The effect of oral absorption enhancers on the in vivo performance of insulin-loaded poly(ethylcyanoacrylate) nanospheres in diabetic rats *J Microencapsul.*, 2002. 19(2): p. 225-235.

Reis, C.P., Ribeiro, A.J., Hough, S., Veiga, F., and Neufeld, R.J., Nanoparticulate delivery system for insulin: Design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. *Eur J Pharm Sci*, 2007. 30(5): p. 392-397.

Zheng, C.H., Gao, J.Q., Liang, W.Q., Yu, H.Y., and Zhang, Y.L., Effects of additives and processing parameters on the initial burst release of protein from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2006. 60(1): p. 54-9.

PREMIÈRE PARTIE :

GÉNÉRALITES SUR LES NANOPARTICULES, APPLICATION À L'ADMINISTRATION ORALE D'INSULINE

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les vecteurs polymériques de principes actifs

Par définition, un vecteur est une structure capable de véhiculer un principe actif en modifiant sa distribution tissulaire et/ou cellulaire ou ses interactions avec des cellules cibles. Cette vectorisation permet d'une part d'éviter l'injection directe du médicament dans l'organisme et d'autre part d'améliorer les caractéristiques pharmacocinétiques du principe actif après encapsulation. Parmi les vecteurs polymériques actuellement élaborés, on distingue les espèces macromoléculaires solubles et les entités non solubles de nature corpusculaire.

1. Les vecteurs macromoléculaires

L'association d'un principe actif à des macromolécules peut être réalisée de façon covalente ou par interaction physique, ce qui permet alors :

- d'améliorer la stabilité du principe actif
- de ralentir son métabolisme et son excrétion rénale
- de masquer partiellement son antigénicité
- d'améliorer son intensité d'action
- de réduire sa toxicité

Les polymères utilisés comme vecteurs macromoléculaires sont d'origine naturelle comme les polysaccharides ou les protéines, ou synthétiques comme le poly(oxyde d'éthylène) (POE) ou la polyvinylpyrrolidone (PVP).

La liaison covalente peut être réalisée par exemple entre une fonction amine du principe actif et une fonction carboxylique de la macromolécule. Dans certains cas, la macromolécule doit préalablement être fonctionnalisée ; c'est le cas du dextran porteur essentiellement de fonctions alcools secondaires peu réactives. En contrôlant le type de liaison entre la macromolécule et le principe actif, il est également possible de maîtriser plus ou moins la libération du principe actif et ainsi améliorer sa spécificité d'action (Mehvar, 2000). Le principe actif peut être une molécule de petite taille (antibiotiques, anticancéreux) (Shiah *et coll.*, 2001 ; Yoo et Park, 2001) ou de taille

supérieure (hormone, oligonucléotides, protéines) (Tsunoda *et coll.*, 2000 ; Greenwald, 2001).

Certains polymères amphiphiles, souvent à base de poly(oxyde d'éthylène) (POE), sont également utilisés pour solubiliser et stabiliser des principes actifs de nature hydrophobe. Le médicament est alors incorporé dans le cœur des micelles formées en milieu aqueux par l'auto-association avec ces polymères amphiphiles. Dans ce cas, il est nécessaire que les polymères utilisés possèdent de faibles concentrations micellaires critiques afin de maintenir en solution les produits actifs, même après dilution dans le sang. Ainsi, des molécules actives comme la doxorubicine ou encore l'halopéridol ont été, par exemple, stabilisées dans des solutions de copolymères séquencés à base de POE (Kabanov *et coll.*, 1992 ; Kwon et Kataoka, 1995).

2. Les vecteurs corpusculaires

Les vecteurs corpusculaires sont des réservoirs de principe actif qui servent à l'isoler et à le protéger de l'environnement biologique. Selon Couvreur (1985), les principaux objectifs de la vectorisation sont :

- de protéger le principe actif des dégradations biologiques
- d'améliorer le franchissement de certaines barrières physiologiques et/ou d'augmenter la pénétration intracellulaire vers des sites inaccessibles par simple diffusion
- de permettre un ciblage vers une cible prédéfinie et/ou de détourner le principe actif de certains tissus ou organes pour lesquels il est toxique.

La distinction des vecteurs s'effectue selon 3 critères : la taille, le ciblage envisagé et le mécanisme de vectorisation (Benoit *et coll.*, 1986) (tableau 1).

2.1. Les vecteurs de première génération

Les vecteurs de première génération sont de taille supérieure au micromètre, soit de type matriciel (microsphère), soit de type vésiculaire (microcapsule). Ils sont destinés à être injectés en amont du tissu visé, principalement grâce à l'utilisation de

cathéters. La molécule active est alors libérée de manière progressive et peut diffuser dans la cible généralement tumorale : cette technique s'appelle l'embolisation.

Tableau 1 : Classification des vecteurs de médicaments (selon Benoit *et coll.*, 1986)

Génération	Première	Deuxième		Troisième
Ciblage	Organes	Tissus		Cellules
Taille	> 1 μm	< 1 μm		< 1 μm
Vecteur	Microsphères Microcapsules Microagrégats	<i>Passifs</i> Liposomes Nanosphères Nanocapsules	<i>Actifs</i> Liposomes Nanosphères Nanocapsules magnétiques ou thermosensibles	Liposomes Nanocapsules Nanosphères pilotees par des molécules de reconnaissance (anticorps, lectines...)
Mécanisme	Embolisation	Capture par le système phagocytaire mononucléé (SPM)		Reconnaissance de la cible

22. Les vecteurs de deuxième génération

La modification de la distribution naturelle des vecteurs de première génération vers d'autres organes que le foie et la rate peut être obtenue avec les vecteurs dits de deuxième génération. Ce sont des vecteurs colloïdaux de taille inférieure au micromètre permettant, après administration intraveineuse, un ciblage actif ou passif au niveau tissulaire selon que leur distribution *in vivo* est contrôlée ou non par une intervention extracorporelle (magnétisme, chaleur).

Dans certains cas, la distribution naturelle de ces vecteurs colloïdaux est dirigée vers les organes du système phagocytaire mononucléé (foie, rate et moelle osseuse). Cette distribution naturelle, dirigée majoritairement vers le foie, a été mise à profit pour permettre un ciblage hépatique des médicaments, par exemple dans le cas de traitements des métastases hépatiques par la doxorubicine vectorisée.

Parmi ces vecteurs et selon la nature des éléments les constituant, on distingue les liposomes, les émulsions sèches et les nanoparticules.

- Les liposomes

Ce sont de petites vésicules sphériques dont la paroi est constituée par une ou plusieurs bicouches phospholipidiques délimitant une cavité centrale contenant une phase aqueuse. Ils peuvent véhiculer des principes actifs de nature hydrophile, sous forme dissoute dans la phase aqueuse centrale, ou de nature lipophile par insertion dans la bicouche.

Les liposomes possèdent une bonne biocompatibilité en raison des matières premières dont ils sont constitués (phospholipides naturels, stérols, sphingolipides) et peuvent se comporter comme des formes médicamenteuses à libération modifiée. Cependant, ces structures vésiculaires sont instables chimiquement (oxydation et hydrolyse des phospholipides) et physiquement (aggrégation, fusion et perte du contenu). C'est pourquoi elles sont parfois recouvertes de poly(éthylène glycol) (Le et Cui, 2006) ou de polysaccharides (dextran, chitosane) (Henriksen *et coll.*, 1994 ; Cansell *et coll.*, 1999).

- Les émulsions sèches (Christensen *et coll.*, 2001)

Ce sont des structures de type réservoir à structure sphérique, dont la paroi est constituée de molécules tensioactives et qui comportent un cœur huileux dans lequel sont solubilisés des principes actifs organosolubles. Les émulsions sèches peuvent être préparées à partir de macromolécules amphiphiles, tels que certaines protéines ou polysaccharides (Pedersen *et coll.*, 1998). Elles se présentent sous forme de poudre facilement redispersables et sont capables de reformer les émulsions initiales huile dans eau en présence d'eau.

- Les nanoparticules (figure 2)

Ces vecteurs sont des structures colloïdales de diamètre compris entre 0,01 et 1 μm parmi lesquelles on distingue les nanosphères et les nanocapsules.

Les nanosphères sont des structures matricielles de forme sphérique constituées d'un réseau polymère. Le principe actif est soit dispersé dans le réseau polymère durant la formation des nanosphères, soit adsorbé à la surface de ces particules après préparation par l'intermédiaire de liaisons de type hydrophobes, électrostatiques ou covalentes.

Les nanocapsules sont des structures réservoirs, sphériques, à paroi polymère et comportant un cœur hydrophile ou lipophile. Le principe actif est généralement dissous dans le cœur mais peut également être adsorbé à la surface des nanocapsules.

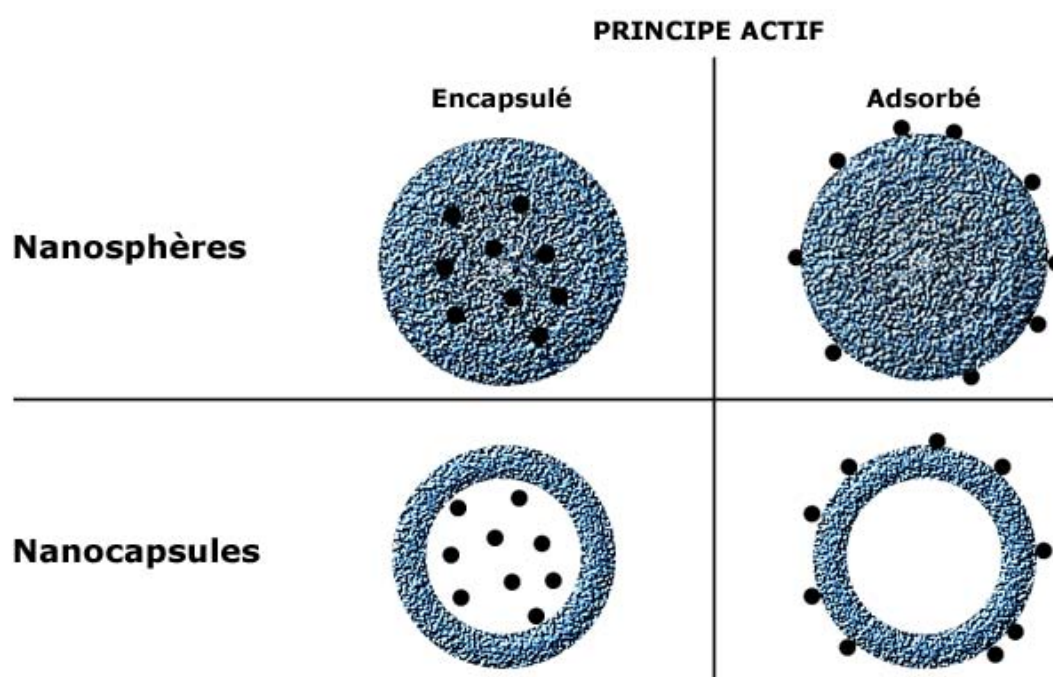


Figure 2 : Représentation schématique des différentes formes de nanoparticules

23. Les vecteurs de troisième génération

Dans le but d'augmenter l'affinité des vecteurs pour un type tissulaire ou cellulaire défini, la notion d'adressage moléculaire orienté vers des marqueurs spécifiques est apparue. Les vecteurs de troisième génération présentent la particularité de porter un système de ciblage cellulaire spécifique. Ainsi, ils correspondent à des vecteurs de deuxième génération auxquels a été fixé un élément de reconnaissance particulier pour la cible visée, le plus souvent des anticorps monoclonaux.

Ces vecteurs peuvent être utilisés dans les traitements anticancéreux. Dans ce cas, les marqueurs spécifiques peuvent être constitués par des protéines cellulaires de surface qui ne sont pas exprimées sur les cellules saines ou par des protéines qui sont surexprimées lorsque la cellule devient cancéreuse.

Le ciblage de ces marqueurs spécifiques peut être réalisé par

- des anticorps (le plus souvent monoclonaux (Brigger *et coll.*, 2002))
- des sucres (interaction avec les lectines par exemple)
- des hormones ou facteurs de croissance
- des petites molécules (acide folique par exemple)

II. L'insuline : généralités

L'insuline, peptide constitué de 21 acides aminés, a été découverte par Banting et Best en 1922 (Banting et Best, 1990). Elle comporte deux chaînes d'acides aminés : une chaîne A (21 acides aminés) reliée à une chaîne B (30 acides aminés) par deux ponts disulfures et un troisième pont disulfure intracaténaire de la chaîne A ; sa masse moléculaire est de 5800 Da (Figure 3). C'est une hormone naturelle sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas. Dans le réticulum endoplasmique des cellules β pancréatiques, la pré-proinsuline, précurseur de l'insuline, est transformée en pro-insuline qui reste un produit de sécrétion immature. Après clivage protéolytique, la proinsuline devient insuline, produit de sécrétion mature (figure 4). L'hormone peptidique efficace ainsi obtenue pourra agir via un récepteur à activité tyrosine-kinase présent sous forme de dimère dans les membranes cellulaires. Ces récepteurs sont présents essentiellement sur les cellules musculaires, les adipocytes et les hépatocytes.

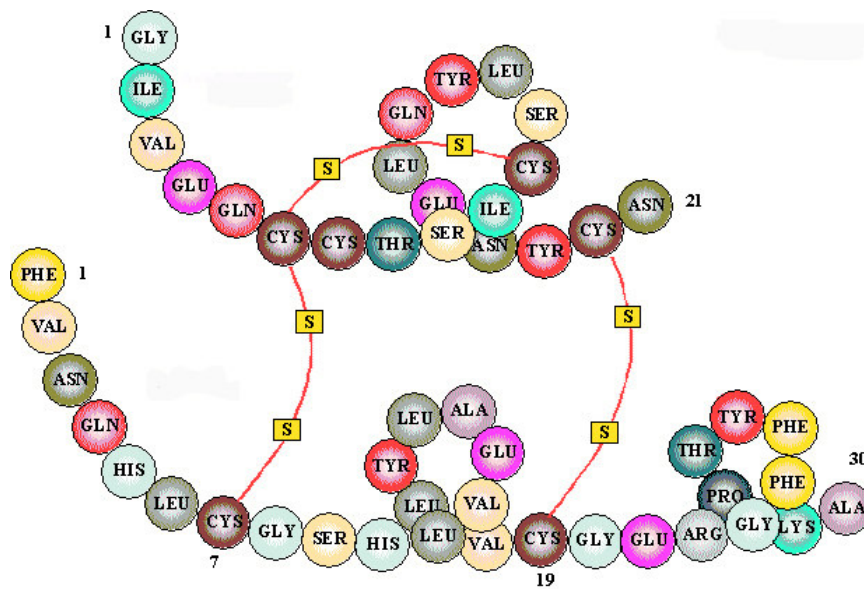


Figure 3 : Structure primaire de l'insuline humaine

1. Rôle physiologique

L'insuline possède de nombreuses propriétés pharmacologiques touchant aux métabolismes glucidique, lipidique et protéique.

11. Action sur le métabolisme glucidique

Au niveau du foie, l'insuline :

- Inhibe la dégradation du glycogène en glucose par inhibition de la glycogène phosphorylase et de la glucose-6-phosphatase.
- Favorise la synthèse du glycogène par stimulation de la glucokinase et de la glycogène synthétase.
- Inhibe la gluconéogénèse par diminution de la quantité d'acides aminés gluco-formateurs et inhibition de la phospho-énolpyruvate-carboxykinase.

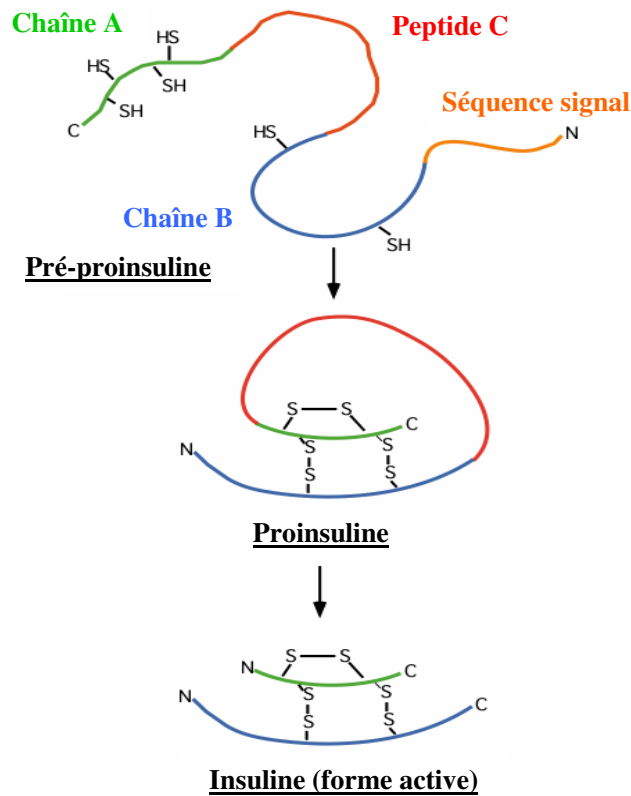


Figure 4 : Biosynthèse de l'insuline à partir de la pré-proinsuline

Au niveau des muscles et du tissu adipeux, l'insuline :

- Favorise le transport membranaire du glucose par recrutement notamment du transporteur du glucose du compartiment cellulaire vers la membrane plasmique.
- Favorise la conversion du glucose en glycogène et la synthèse d'acétylcoenzyme A avec formation d'acides gras et de triglycérides.

12. Action sur le métabolisme lipidique

L'insuline inhibe la lipolyse par son action sur la triglycéride lipase, ce qui conduit à une diminution de la sécrétion d'acides gras et de glycérol. Au niveau des hépatocytes, elle inhibe la cétogenèse et favorise la synthèse de triglycérides. Elle

stimule la synthèse de la lipoprotéine lipase au niveau hépatique, ce qui favorise la synthèse lipidique au niveau du tissu adipeux.

13. Action sur le métabolisme protéique

L'insuline possède un effet inhibiteur du catabolisme protéique et une action anabolique par stimulation de la synthèse protéique. A l'état physiologique, elle participe au maintien de l'équilibre azoté.

14. Autres actions de l'insuline

L'insuline favorise le passage des ions potassium du milieu extra-cellulaire vers le milieu intra-cellulaire et stimule la réabsorption rénale de sodium.

Elle possède également des effets sur la croissance. Pendant l'embryogenèse, l'insuline stimule la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin humain, au niveau de la bordure en brosse (Menard *et coll.*, 1999). Elle agit en stimulant la libération de polypeptides impliqués dans les mécanismes d'action de l'hormone de croissance. Compte tenu de leur affinité pour le récepteur à l'insuline, ces peptides ont été dénommés Insulin like Growth Factor (IGF I et IGF II).

Enfin, l'insuline présente un effet inhibiteur de la sécrétion de glucagon, hormone hyperglycémiante.

2. Physiopathologie

L'insuline est une hormone hypoglycémiante. Hormis une sécrétion basale, la régulation de la sécrétion physiologique dépend surtout de la glycémie. Une augmentation de la glycémie commande la sécrétion de l'insuline. Un arrêt de la sécrétion physiologique de l'insuline par destruction des cellules β des îlots de Langerhans se traduit par l'apparition du diabète insulino-dépendant (DID) ou diabète de type I. La plupart du temps, cette destruction est d'origine auto-immune et le diabète s'installe lorsque plus de 80 % des cellules β sont détruites. Celui-ci se

manifeste généralement chez le sujet jeune, avant 25 ans. Ce type de diabète concerne 10 % de la population des diabétiques en France soit 150 000 personnes.

Une anomalie de l'insulino-sécrétion associée à une insulino-résistance des tissus périphériques se traduit par le diabète non-insulino-dépendant (DNID) ou diabète de type II. Le pancréas est encore capable de produire l'insuline mais celle-ci n'est plus assez active. Le diabète de type II se manifeste souvent chez la personne âgée ou en surpoids. Ce type de diabète concerne 90 % des diabétiques en France soit 1 350 000 personnes.

Il existe d'autres types de diabètes plus marginaux. Parmi ceux-ci, l'un des plus fréquents est le diabète MODY (Maturity Onset type Diabetes of the Young). Selon les auteurs, le diabète MODY peut être classé parmi les diabètes de type II, ou mis à part, et se manifeste chez le sujet jeune (Hwang *et coll.*, 2006).

Quel que soit le type de diabète observé, l'augmentation du taux de glucose dans le sang est la cause de nombreuses complications : néphropathie, neuropathie, rétinopathie pouvant entraîner une cécité, sensibilité aux infections, maladies cardiovasculaires, amputations.

Le diabète constitue un problème majeur de santé publique : le nombre de diabétiques dans le monde a augmenté de 30 millions en 1985 à 180 millions aujourd'hui et on prévoit jusqu'à 366 millions de diabétiques d'ici 2025.

Les patients diabétiques de type II sont majoritairement traités par des médicaments administrés par voie orale (anti-diabétiques oraux : biguanides, sulfamides hypoglycémiants, inhibiteurs des alpha-glucosidases, glinides). Ces médicaments ont pour effet, selon leur classe thérapeutique, de stimuler l'insulino-sécrétion ou de diminuer l'insulino-résistance. Le diabète de type I quant à lui se traite par administration d'insuline par voie sous-cutanée. On peut considérer que durant sa vie (75 ans), un diabétique de type I reçoit environ 80000 injections. Lorsque les antidiabétiques oraux ne sont plus suffisamment efficaces pour normaliser la glycémie, le traitement du diabète de type II fait lui aussi appel à l'insulinothérapie.

3. Administration de l'insuline

Un obstacle au développement de nouvelles formes pour des voies d'administration non invasives est dû à la molécule elle-même. En effet, l'insuline est un peptide de grande taille, hydrophile et instable (Lee et Yamamoto, 1989). Un peptide tel que l'insuline nécessite une voie d'administration parentérale (Morishita *et coll.*, 2006). En réalité, l'inactivation de l'hormone par les enzymes protéolytiques du tractus gastro-intestinal et la faible perméabilité de la barrière intestinale à l'insuline constituent un obstacle majeur à l'administration orale de l'insuline.

En routine, la voie sous-cutanée (SC) est utilisée pour administrer des doses quotidiennes d'insuline. La voie intraveineuse (IV) est parfois employée en situation d'urgence. Pour le patient, les injections SC présentent plusieurs inconvénients tels qu'une douleur au point d'injection, des réactions allergiques, une hyperinsulinémie périphérique ayant pour conséquence une hypoglycémie ; ces effets secondaires peuvent conduire à une faible observance. Un autre point important est que ce type d'administration ne reproduit pas parfaitement la dynamique de libération de l'insuline endogène et peut varier selon le site d'injection, provoquant des problèmes de contrôle glycémique. Les différentes formes d'insulines commercialisées (rapides, intermédiaires, lentes et analogues) ont été optimisées dans le but de répondre au mieux aux besoins du patient. Les moyens d'injection ont aussi été améliorés afin de réduire la douleur et d'être plus pratiques et confortables pour les patients. Des stylos parfois réutilisables ou des aiguilles plus fines et adaptées à l'épaisseur de peau ont ainsi été développés. Cependant, les injections fréquentes restent douloureuses et contraignantes.

En janvier 2006, la FDA (Food and Drug Administration) a autorisé la commercialisation d'une nouvelle forme d'insuline destinée à être administrée par voie pulmonaire, commercialisée sous le nom d'Exubera® et développée par Nektar® et les laboratoires Pfizer®. Exubera® se présente sous forme d'une poudre sèche. De plus, contrairement aux formes d'insuline injectable qui se conservent au froid, cette forme est stable à température ambiante et le développement microbien y est limité. Les doses par blister sont de 1 ou 3 mg d'insuline contenues dans 5 mg de mannitol, de glycine et de citrate de sodium ; 1 mg de poudre équivaut à 3 UI d'insuline (Gomez-Perez et Rull, 2005). Les avantages ayant permis le développement de systèmes pour

cette nouvelle voie sont nombreux : les prises sont indolores, l'administration est non-invasive, l'épithélium respiratoire a une grande surface d'absorption (140 m²) et est richement vascularisé pour les échanges gazeux ; la barrière alvéolo-capillaire est fine et perméable aux macromolécules telles que l'insuline (transfert paracellulaire) et l'activité enzymatique y est très faible. Tous ces avantages permettent une absorption rapide d'insuline facilitant le contrôle post-prandial de la glycémie en complément d'un traitement par une insuline ultra-lente (glargine Lantus®). C'est la première forme permettant le traitement d'une pathologie systémique par inhalation du principe actif.

Malgré ces résultats encourageants, le Laboratoire Pfizer® a procédé à l'arrêt de commercialisation d'Exubera® en octobre 2007. En effet, après un échec commercial depuis sa mise sur le marché en 2006, il a indiqué avoir observé une augmentation des cas de cancer du poumon chez des patients utilisant l'insuline inhalée Exubera®. Pfizer précise néanmoins que tous les patients de l'essai clinique ayant développé un cancer du poumon étaient d'anciens fumeurs. La firme note aussi que le nombre de ces cas de cancer est trop faible pour dire qu'ils sont liés à l'inhalation d'Exubera® (Le Point, 2008).

D'autres voies d'administration ont été étudiées : buccale, nasale, orale, rectale, oculaire, transdermale, vaginale ou encore intra-utérine (Brange et Langkjaer, 1997 ; Owens *et coll.*, 2003 ; Peppas et Kavimandan, 2006). La voie orale semble être la plus commode, la moins douloureuse et la plus adaptée aux besoins physiologiques. L'insuline absorbée par l'épithélium intestinal pourrait rejoindre le foie directement par la veine porte. Le premier passage hépatique permet de retenir une partie de l'hormone et de ne délivrer aux tissus périphériques que la quantité nécessaire d'insuline. Ce premier passage hépatique n'est possible que par une administration orale et il permet de mimer la sécrétion physiologique de l'insuline, contrairement à l'administration sous-cutanée. Cependant, l'insuline n'est que très peu absorbée par l'épithélium intestinal (moins de 0,5 %) qui constitue une barrière majeure pour l'administration orale de protéines à la fois sur le plan chimique, biochimique et physique. Deux problèmes principaux se posent : en tant que peptide, l'insuline va subir

une dégradation par des enzymes protéolytiques et en tant que molécule hydrophile, son passage à travers la membrane intestinale est défavorisé.

III. Insuline et voie orale

Ces dernières années, un certain nombre de formulations destinées à administrer l'insuline par voie orale ont été développées et testées pour leur activité biologique chez des animaux tels que le rat ou la souris, diabétiques ou non. Trois laboratoires ont ainsi mis au point des formulations d'insuline et procédé à des essais cliniques chez l'homme.

GlaxoSmith-Kline® développe ainsi une insuline par voie orale, en partenariat avec Nobex®. L'insuline préalablement pégylée est modifiée par greffage covalent d'un ou plusieurs oligomères amphiphiles de bas poids moléculaire. L'absorption de l'insuline à travers la paroi intestinale a été démontrée chez des sujets sains et diabétiques de type II. Cette modification covalente de l'insuline permet d'augmenter sa solubilité sa stabilité face aux enzymes protéolytiques. Cette insuline administrée par voie orale à des sujets sains possède une activité équivalente à une insuline d'action rapide administrée par voie SC et diminue la glycémie post-prandiale des diabétiques de type II (Kipnes *et coll.*, 2003 ; Wajcberg *et coll.*, 2004).

Generex® travaille sur un spray buccal d'insuline appelé Oralin®. Oralin est administrée par pulvérisations fines à l'aide de Rapidmist®, dispositif mis au point par Generex®, au sein de la cavité buccale où la préparation est absorbée rapidement par la muqueuse buccale et par celle de l'oropharynx. Aucun dépôt au niveau du poumon n'est observé. L'insuline est retrouvée dans la circulation sanguine environ 10 minutes après l'administration, le pic plasmatique d'insuline apparaît entre 40 et 60 min (Modi *et coll.*, 2002). Les patients diabétiques de type I et II traités par Oralin® ont présenté un meilleur contrôle glycémique qu'après administration SC (Guevara-Aguirre *et coll.*, 2007).

La compagnie Emisphere® a mis au point un comprimé d'insuline combiné à du sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate (SNAC) (Kidron *et coll.*, 2004).

Administrée à des sujets sains, cette formulation a permis la réduction du taux de glucose et l'apparition rapide d'un pic d'insuline plasmatique après 30 min (figure 5).

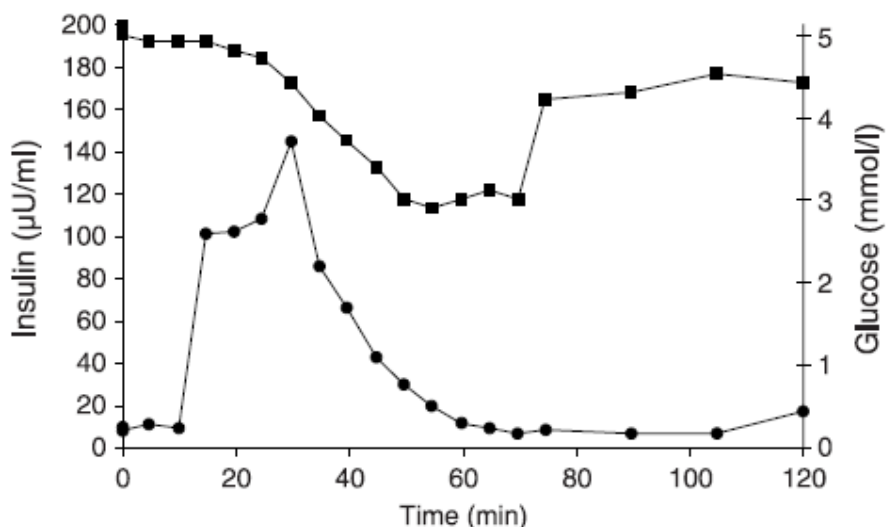


Figure 5 : Réponse de l'insuline (●) et du glucose (■) sanguins après ingestion de 400 UI d'insuline combinées à 2100 mg de SNAC. (selon Kidron *et coll.*, 2004)

Selon l'American Chemical Society, onze formulations orales d'insuline sont actuellement en développement (France-Chimie, 2008).

IV. Nanoparticules d'insuline

Pour les principes actifs peu absorbés au niveau de la muqueuse intestinale, de nombreuses études ont montré une augmentation de la biodisponibilité après avoir été incorporés dans des nanoparticules. Dès 1986, Maincent *et coll.* (1986) ont montré une augmentation de la biodisponibilité absolue de la vincamine associée à des nanoparticules de polyhexylcyanoacrylate (36 %) par rapport à une solution de vincamine (22 %). Kim *et coll.* (1997) ont observé que l'administration orale à des rats de nanosphères de nifédipine était suivie d'une augmentation de l'absorption lymphatique du principe actif et concourait donc à l'amélioration de sa biodisponibilité.

L'encapsulation de l'insuline dans des particules de polymères semble donc être un moyen de protéger la protéine des différentes attaques qu'elle est susceptible de

subir le long du tractus gastro-intestinal (pH gastrique acide, enzymes protéolytiques). De plus, les propriétés physico-chimiques du polymère utilisé dans la formulation pourraient faciliter et augmenter son passage à travers l'épithélium intestinal.

1. La barrière gastro-intestinale

11. Rappels sur la paroi intestinale

L'appareil digestif présente la même structure générale sur toute sa longueur. La paroi de l'intestin grêle dont les différents segments sont le duodénum, le jéjunum et l'iléon comporte quatre couches tissulaires distinctes : l'adventice (ou couverture externe), la couche musculaire, la couche sous-muqueuse et la bordure muqueuse.

La muqueuse est particulièrement impliquée dans les phénomènes d'absorption. Elle se compose elle-même de trois couches tissulaires :

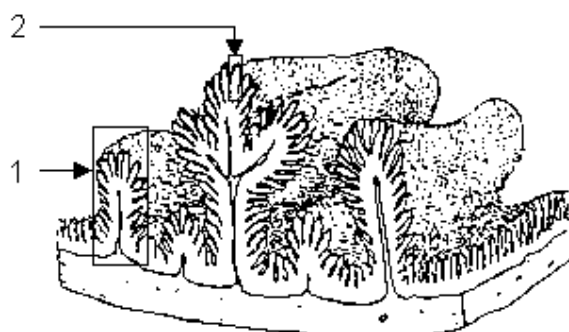
- un épithélium intestinal constitué par les entérocytes, soudés deux à deux à leur pôle apical par des jonctions serrées et des desmosomes. Leur membrane s'écarte vers la base pour laisser un espace intercellulaire relativement important où parvient la majorité des substances absorbées par la cellule. Ces substances traversent la membrane basale qui délimite la face interne de l'épithélium et qui est proche de la paroi du capillaire sanguin sous-jacent.

- la *lamina propria*, correspondant à un tissu conjonctif lâche qui soutient les vaisseaux sanguins nourrissant la couche épithéliale interne, et d'une quantité variable de tissu lymphoïde ayant une fonction de protection.

- la *muscularis mucosae*, mince couche externe de muscle lisse.

Par ailleurs, la muqueuse intestinale présente de nombreux replis appelés valvules connivents (figure 6), particulièrement développées au niveau du duodénum et du jéjunum et qui portent aussi des protubérances ou villosités (figure 7). De plus, chaque cellule épithéliale présente de multiples microvillosités à son sommet, ce qui augmente considérablement la surface de contact avec la lumière intestinale. Chaque villosité renferme une artériole et une veinule associées à un riche réseau de capillaires sanguins et un vaisseau lymphatique.

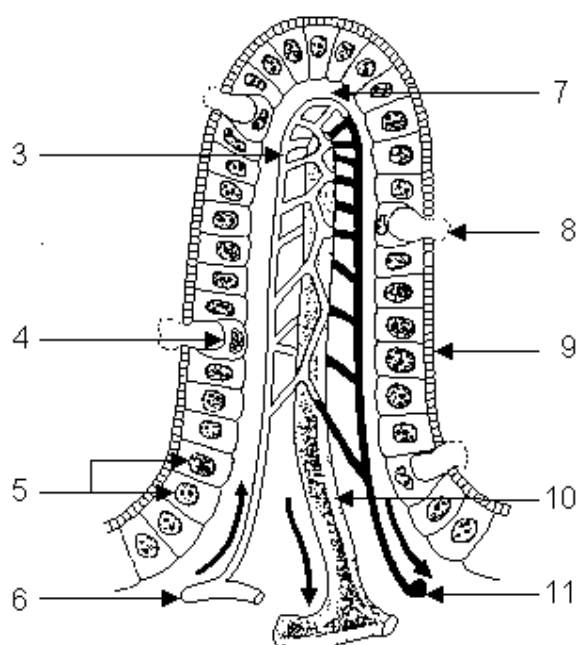
Le tractus gastro-intestinal est tapissé en totalité par du mucus dont le rôle est de protéger l'estomac et le duodénum contre le liquide gastrique. Le mucus se présente sous forme d'un gel visco-élastique adhérent à l'épithélium (Robert et Buri, 1986). Il est composé d'au moins 95 % d'eau, d'1 % d'électrolytes, de 0,5 à 1 % de glycoprotéines et d'une faible quantité de lipides. La présence d'acide sialique lui confère une charge négative.



1 : Plis circulaires – valvules conniventes

2 : Villosité intestinale

Figure 6 : Organisation des plis circulaires de l'intestin grêle



3 : Réseau de capillaires sanguins

4 : Cellule caliciforme

5 : Entérocyte

6 : Artériole

7 : Tissu conjonctif

8 : Mucus excrété

9 : Bordure en brosse, plateau strié, microvillosités

10 : Chylifère

11 : Veinule

Figure 7 : Structure d'une villosité intestinale (détail de la figure 6) (Académie de Lille, 2008)

Le tractus gastro-intestinal est un organe possédant une très grande surface d'absorption. L'intestin grêle représente une interface de 250 m² entre le milieu extérieur et le milieu interne. La principale fonction du TGI est donc d'absorber les

nutriments, l'eau et les vitamines apportés par la nourriture. Il constitue également une barrière pour les agents pathogènes et les toxiques. L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche d'entérocytes, de cellules de goblet ou cellules à mucus et de cellules M liées entre elles par des jonctions serrées qui uniformisent la surface épithéliale. L'intégrité physique de l'épithélium est due à la présence de ces jonctions serrées. Les complexes de jonction permettent de connecter les cellules entre elles à leur pôle apical, préviennent l'entrée de pathogènes par un passage paracellulaire mais peuvent également constituer un frein à l'absorption de macromolécules thérapeutiques.

13. Barrière enzymatique

En plus de la barrière physique, les principes actifs administrés par voie orale doivent affronter un autre obstacle encore plus important : la barrière enzymatique. Dans le cas de l'insuline, l'hydrolyse commence dans l'estomac avec l'intervention de la pepsine et se poursuit dans le duodénum par l'action combinée des endopeptidases (trypsine, chymotrypsine et élastase) et des exopeptidase (carboxypeptidases). La trypsine, bien qu'étant la moins spécifique, est l'enzyme la plus impliquée dans la dégradation de l'insuline. Une autre enzyme dénommée *insuline-degrading enzyme* a été isolée dans le cytoplasme de l'entérocyte du rat (Bai et Chang, 1995). Cette dernière est capable de dégrader 92 % de l'insuline.

14. Stabilité de l'insuline

La molécule monomérique d'insuline a naturellement tendance à former des dimères qui eux-mêmes s'associent par trois pour former des hexamères stabilisés par deux molécules de zinc. Ce phénomène est dû à des liaisons intermoléculaires entre des résidus d'acides aminés localisés sur la partie C-terminale de la chaîne B. Les monomères et les dimères diffusent facilement dans le sang tandis que les hexamères diffusent faiblement. C'est pourquoi, l'absorption de l'insuline des formulations contenant une grande proportion d'hexamères est retardée.

L'activité biologique des protéines est étroitement liée à leur structure interne. Toute désorganisation de la structure primaire (séquence d'acides aminés), secondaire

(structure bidimensionnelle), tertiaire (repliement) ou quaternaire (combinaison de plusieurs unités) entraîne une inactivation de la protéine. La plupart des protéines sont stables à pH neutre. Or, le TGI présente de nombreuses variations de pH, passant d'un pH acide dans l'estomac au pH neutre du duodénum, ce qui contribue à déstabiliser la molécule d'insuline.

2. Les formulations de nanoparticules d'insuline

Les premiers travaux rapportant une diminution du glucose sanguin suite à l'administration orale de nanocapsules d'insuline par Damgé et coll. en 1988 (Damgé *et coll.*, 1988) ont entraîné le développement de nombreuses recherches basées sur l'administration orale de systèmes nanoparticulaires d'insuline. Les matériaux utilisés doivent être biocompatibles.

21. Les différents polymères

Les matériaux utilisés peuvent être des polymères synthétiques comme le poly(alkylcyanoacrylate) (Damgé *et coll.*, 1988) et les copolymères d'acide acrylique et poly(méthacrylique) (Sajeesh et Sharma, 2006a). Les polyesters, seuls ou associés à d'autres polymères sont utilisés : acide poly(lactique) (PLA) (Elvassore *et coll.*, 2001), copolymère d'acide lactique et glycolique (PLGA) (Barichello *et coll.*, 1999), poly- ϵ -caprolactone (PCL) (Attivi *et coll.*, 2005). Des systèmes composés de polymères naturels ont également été développés : nanoparticules à base de chitosane (Pan *et coll.*, 2003), d'alginate (Reis *et coll.*, 2007) ou d'une combinaison des deux (Sarmiento *et coll.*, 2007).

22. Les techniques de fabrication

Le choix de la méthode de fabrication dépend non seulement des caractéristiques physico-chimiques du polymère utilisé mais aussi de celles du principe actif et notamment de sa solubilité. La stabilité du principe actif au cours de la fabrication doit être vérifiée afin de conserver son activité biologique. Les techniques

de préparation doivent donc être adaptées aux caractéristiques de la molécule thérapeutique. Ainsi, l'insuline est une molécule particulièrement sensible à la chaleur et au cisaillement (Brange et Langkjaer, 1992).

Les techniques utilisées pour préparer les nanoparticules d'insuline sont très nombreuses mais peuvent être regroupées en 2 catégories principales suivant qu'elles nécessitent une réaction de polymérisation ou qu'elles emploient directement des polymères préformés.

✓ La Polymérisation est une méthode parmi les plus rapides. La phase continue peut être de nature organique ou aqueuse. L'initiation du processus peut se faire par différents mécanismes. La polymérisation interfaciale par exemple permet d'obtenir des taux d'encapsulation importants. Les molécules résiduelles qui peuvent se retrouver dans le milieu de préparation (monomères, oligomères, surfactant) sont potentiellement toxiques et obligent à procéder à une étape de purification.

✓ La Dispersion de polymères préformés est quant à elle une technique généralement utilisée pour préparer des particules à base de polymères préformés synthétiques. On distingue plusieurs méthodes :

La *nanoprécipitation* utilise un solvant soluble en toute proportion dans la phase aqueuse continue. Le polymère est dissout dans un solvant organique avant d'être additionné dans la seconde phase liquide constituée par un non-solvant du polymère mais dans laquelle le solvant du polymère est miscible. La précipitation du polymère est alors immédiate du fait de la miscibilité des deux phases. Cette technique a été utilisée par Barichello et coll. (1999) pour formuler des nanoparticules d'insuline à base de PLGA. Les particules ainsi obtenues ont une taille d'environ 200 nm mais présentent un taux d'encapsulation relativement faible.

L'émulsion/évaporation de solvant a également permis la préparation de nanoparticules d'insuline à base de polyesters (PLGA et PCL). Elle nécessite 2 étapes : la solution organique de polymère est tout d'abord émulsionnée avec la solution aqueuse de principe actif. Puis, l'évaporation du solvant organique entraîne la précipitation du polymère hydrophobe au contact de l'eau et le piégeage du principe actif à l'intérieur de la particule. Cette méthode est également employée pour préparer

des nanoparticules lipidiques solides d'insuline à partir de lécithine et d'acide stéarique (Zhang *et coll.*, 2006).

La méthode *d'émulsion/diffusion de solvant* consiste en la formation d'une émulsion huile dans eau avec un solvant partiellement soluble dans l'eau contenant le polymère et une solution aqueuse contenant l'agent stabilisant. Le solvant dans lequel est dissout le polymère est initialement saturé en eau pour assurer l'équilibre thermodynamique des deux phases. Il est ensuite émulsifié dans la phase aqueuse contenant le tensio-actif. L'ajout d'un grand volume d'eau provoque la diffusion du solvant partiellement soluble dans l'eau vers la phase aqueuse externe et donc la formation des particules par précipitation du polymère (des Rieux *et coll.*, 2006).

La technique de *salting-out* est basée sur la séparation d'un solvant miscible à l'eau depuis une solution aqueuse par un effet de salting-out. Il consiste à ajouter, sous agitation, une solution aqueuse saturée en sel et contenant un tensio-actif, à un solvant miscible à l'eau contenant le polymère. Dans ce cas, la miscibilité des deux phases est empêchée par la saturation en sel, ce qui conduit à la formation d'une émulsion de type huile dans eau. Cette émulsion huile dans eau est ensuite diluée dans la phase aqueuse dispersante, provoquant la diffusion du solvant miscible à l'eau vers le milieu externe et donc la formation des particules (Pinto Reis *et coll.*, 2006).

La première technique employée pour fabriquer des nanoparticules d'insuline a été un processus de désolvatation. L'insuline est tout d'abord désolvatée par de l'acide chlorydrique puis resolvatée au moyen de l'hydroxyde de sodium (Allemann *et coll.*, 1998).

De nombreuses autres techniques ont été employées pour préparer des nanoparticules d'insuline : gélation ionotropique (Pan *et coll.*, 2002a), polymérisation radicalaire (Qian *et coll.*, 2006), coacervation (Li *et coll.*, 2007) ou simple adsorption (Joshi *et coll.*, 2006).

23. Paramètres influençant les propriétés des nanoparticules

Plusieurs paramètres peuvent jouer un rôle dans l'absorption d'insuline délivrée via des particules par l'épithélium intestinal et notamment la taille, la charge et l'hydrophobicité de surface des particules.

L'absorption des particules dépend de leur taille, les particules les plus petites sont mieux absorbées que les plus grosses (Norris *et coll.*, 1998). Un certain nombre de facteurs peuvent modifier la taille des particules durant leur préparation : la méthode de formulation, la vitesse d'émulsification, le type d'insuline utilisée, le pH du milieu, le volume de la phase interne, le ratio de polymères, la masse moléculaire de ceux-ci, la concentration en surfactant, le rapport phase aqueuse/phase organique. De plus, les particules préparées avec des polymères hydrophobes semblent être mieux absorbées que celles faites de polymères hydrophiles (Jung *et coll.*, 2000).

Les propriétés de surface des particules influencent leur absorption par les cellules épithéliales de l'intestin. Ces propriétés de surface peuvent être modifiées par greffage d'une molécule sur le polymère constitutif des particules. Le potentiel zêta des particules joue un rôle important au niveau de leur interaction avec la muqueuse intestinale. Le réseau de mucine qui tapisse la paroi intestinale contient de l'acide sialique dont le pKa est de 2,6. Au pH physiologique de l'intestin (7,5), la mucine présente une charge négative importante. Les nanoparticules chargées positivement (nanoparticules de chitosane par exemple) vont avoir tendance à interagir avec ces charges négatives et leur absorption pourra alors être facilitée par rapport à des particules chargées négativement (nanoparticules de poly(isobutylocyanoacrylate ou de poly-ε-caprolactone). Le potentiel zêta des particules est également impliqué dans leur stabilité et dans leur tendance à former des agglomérats. En effet, les particules suffisamment chargées se repoussent entre elles par des forces électrostatiques et leur agglomération est ainsi limitée.

24. Libération *in vitro*

L'encapsulation de l'insuline dans des nanoparticules permettrait d'augmenter son absorption intestinale, ceci en protégeant l'insuline du pH gastrique agressif et d'une dégradation enzymatique, tout en l'apportant au niveau de l'intestin grêle où elle pourra être absorbée. En effet, la libération prolongée efficace de l'insuline, possible en utilisant un vecteur polymérique, ne doit pas se faire dans l'estomac mais de façon contrôlée et progressive uniquement au niveau de l'intestin. Les profils de libération

obtenus à partir de systèmes particuliers sont tout d'abord étudiés *in vitro*. Ainsi, le profil de libération *in vitro* à partir de nanoparticules présente le plus souvent une libération initiale de l'insuline (10-20 %) au pH gastrique durant les premières heures suivie d'une libération rapide et complète au pH intestinal (figure 8) (Sajeesh et Sharma, 2006b ; Lin *et coll.*, 2007). Une étude a pourtant réussi à montrer une absence de libération d'insuline au pH gastrique et une libération rapide et complète au pH intestinal à partir de nanosphères d'alginate et de dextran (Reis *et coll.*, 2007). Concernant le processus de libération, les auteurs ne sont pas tous en accord. Certains parlent d'une simple diffusion constante de l'insuline à travers la matrice de polymères (Caliceti *et coll.*, 2004 ; Qian *et coll.*, 2006), tandis que d'autres décrivent un burst initial à partir de la surface du polymère suivi d'une diffusion lente à partir de la particule polymère gonflée d'eau (Li *et coll.*, 2006). D'autres études montrent des mécanismes différents comme une dissociation (Pan *et coll.*, 2002a) ou un burst initial depuis la surface de la particule suivi d'une érosion du polymère (Sullivan et Birkinshaw, 2004). La nature du polymère utilisé semble influencer le mécanisme de libération de l'insuline. En effet, à partir de PLGA, le profil de libération des protéines présente trois phases : une libération tout d'abord depuis la surface des particules, ensuite la molécule diffuse à travers la matrice et enfin la dégradation du polymère lui-même entraîne la libération finale (Kumar *et coll.*, 2006). La technique de fabrication des nanoparticules pourrait également jouer un rôle dans le mode de libération *in vitro* de l'insuline.

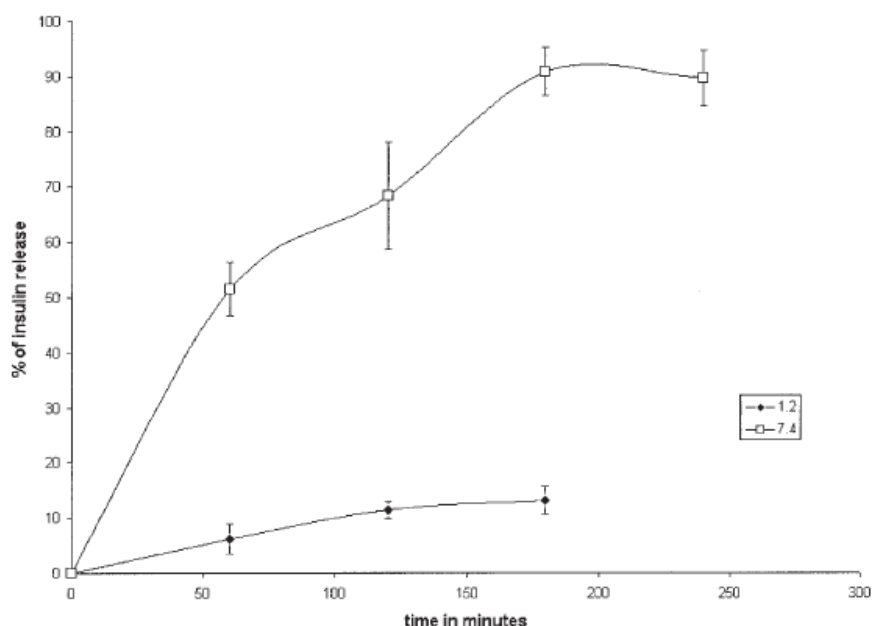


Figure 8 : Libération *in vitro* en fonction du temps d'insuline à partir de particules de PCP (acide polyméthacrylique-chitosane-PEG) à pH 1,2 et 7,4 (selon Sajeesh et Sharma, 2006b)

3. Intérêts de l'encapsulation de l'insuline pour augmenter son absorption

L'insuline encapsulée à l'intérieur de nanoparticules a démontré sa capacité à conserver son activité biologique après administration orale, tandis que l'insuline en solution ne présente aucun effet pharmacologique. L'encapsulation de l'insuline présente en effet plusieurs avantages.

31. Protection contre les enzymes protéolytiques.

Les premières études concernant la protection de l'insuline contre les enzymes du tube digestif par les nanoparticules ont été réalisées *in vitro* par l'incubation de nanocapsules de poly(alkylcyanoacrylate) ou de nanosphères en présence d'enzymes gastrique (pepsine) et pancréatiques (trypsine, chymotrypsine) (Lowe et Temple, 1994 ; Damgé *et coll.*, 1997). Ces nanoparticules ont permis de préserver au moins 75 % d'insuline alors que l'insuline en solution a été totalement dégradée. Une autre étude utilisant des nanoparticules de vitamine B12 et de dextran conjugués a démontré une

protection variant de 65 à 83 % de l'insuline contre les enzymes protéolytiques. Cette protection est plus efficace envers la pepsine que la trypsine ou la chymotrypsine (Chalasani *et coll.*, 2007). Des nanoparticules de chitosane et cyclodextrine ont également démontré leur capacité à protéger l'insuline dans un fluide intestinal simulé de pH 6,8 à 37°C (Krauland et Alonso, 2007).

32. Muco-adhésion des nanoparticules d'insuline.

Les capacités d'adhésion des nanoparticules jouent un rôle important au niveau de leur temps de résidence dans le tractus gastro-intestinal et de leur pénétration dans la couche muqueuse. Comme déjà mentionné, les nanoparticules de charge positive peuvent former des liaisons électrostatiques avec le mucus qui est globalement chargé négativement en raison de la présence de résidus d'acide sialique négatifs à pH physiologique. Ces interactions permettent une adhésion des particules au niveau de la surface du TGI et créent un gradient de concentration du principe actif vers le sang. Ces propriétés de muco-adhésion ont été observées par microscopie électronique à balayage à partir de nanocapsules d'isobutylcyanoacrylate chargées en insuline (Pinto-Alphandary *et coll.*, 2003). Ces nanocapsules ont été retrouvées en contact étroit avec la couche de mucus tapissant la bordure en brosse de l'intestin (figure 9). La charge positive des nanoparticules peut être apportée par un polymère chargé positivement comme l'Eudragit® RS (Damgé *et coll.*, 2007) ou le chitosane (Sajeesh et Sharma, 2006b).

Les mécanismes exacts de prise en charge des nanoparticules et/ou de l'insuline par les cellules intestinales sont variables. Les nanoparticules ainsi en contact étroit avec la membrane apicale des cellules épithéliales peuvent alors être absorbées par transport paracellulaire ou transcellulaire. L'insuline pourrait également être libérée à proximité de la membrane apicale pour ensuite être absorbée.

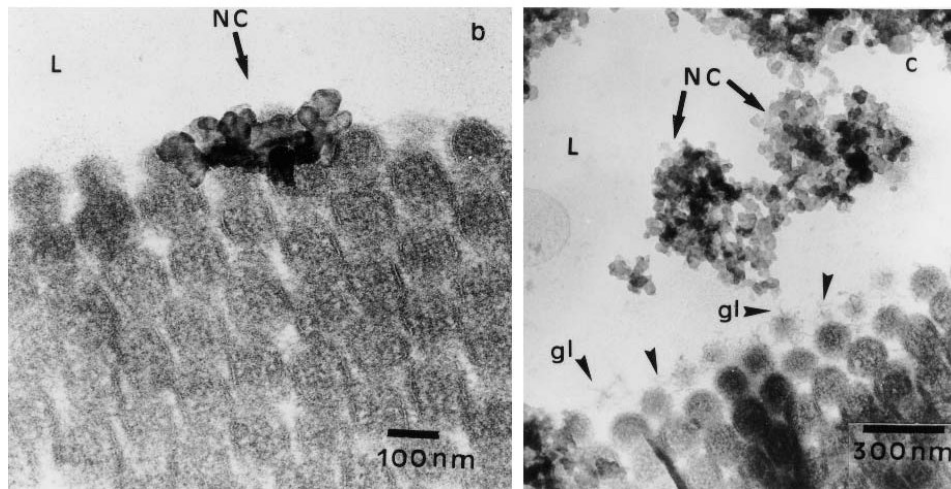


Figure 9 : Iléon isolé de rat après administration intra-gastrique de nanocapsules chargées en insuline (NC) (b) NC adhérentes aux microvillosités des entérocytes (L : lumière intestinale), (c) Agrandissement montrant des nanocapsules se rapprochant des microfilaments de glycocalyx (gl). (Selon Pinto-Alphandary *et coll.*, 2003)

33. Transport paracellulaire

Un tel transport nécessite l'ouverture des jonctions serrées qui maintiennent l'intégrité de l'épithélium intestinal. Le transport paracellulaire a été mis en évidence par Aprahamian *et coll.* (1987) par visualisation aux rayons X dans les tissus de nanocapsules de poly(cyanoacrylate d'alkyle) de 200 nm de diamètre et chargées en traceurs, après cryofixation et cryofracture. Après administration intra-jéjunale, les nanocapsules sont retrouvées après 10 à 15 minutes dans les espaces intercellulaires, et après 30 à 60 minutes au niveau des capillaires intravillositaires au contact étroit des globules rouges et dans les parois des cellules épithéliales. Aucune particule n'est retrouvée dans le cytoplasme des entérocytes. Ces résultats ont été confirmés après administration de ces mêmes particules directement dans l'iléon de rats, indiquant leur présence après 10 minutes dans les espaces intercellulaires (Damgé *et coll.*, 1990) (figure 10).

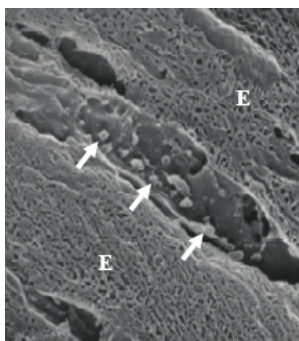


Figure 10 : Microscopie électronique à balayage de nanocapsules de poly(alkylcyanoacrylate) (indiquées par les flèches) dans les espaces intercellulaires des entérocytes (E). (Selon Damgé *et coll.*, 1990)

Le transport paracellulaire des nanoparticules d'insuline peut être augmenté grâce à la présence de polymères cationiques comme le chitosane ou le poly(acrylate), qui ouvrent les jonctions serrées et permettent ainsi le transport de macromolécules (van der Merwe *et coll.*, 2004). Le chitosane est capable de diminuer la résistance électrique transépithéliale (TEER) entre des cellules d'une monocouche de Caco 2, modèle reconnu comme mimant la barrière épithéliale *in vitro*. Il peut également activer des protéines kinases C responsables du phénomène de transduction de signal qui affecte l'intégrité des jonctions serrées (Smith *et coll.*, 2005). L'ouverture des jonctions serrées a permis d'augmenter l'absorption de l'insuline et donc de diminuer la glycémie après administration orale de nanoparticules de chitosane à des rats (Ma *et coll.*, 2005). Ces auteurs ont observé la présence de particules de chitosane marquées à la FITC à différents niveaux des villosités intestinales 3 h après administration orale à des rats diabétiques. Damgé *et coll.* (2008) ont également observé un marquage des villosités de l'épithélium intestinal après administration *in situ* dans un intestin isolé de rat de nanoparticules d'alginate-dextran chargées en insuline recouvertes d'un complexe albumine-chitosane-PEG et marquées à la FITC (figure 11). Des nanoparticules d'acide poly(gamma glutamique) chargées négativement n'ont montré aucun effet sur les jonctions serrées (Lin *et coll.*, 2007) comparativement à des nanoparticules de chitosane chargées positivement ; ceci confirme le fait que ce sont les polymères chargés positivement qui permettent l'ouverture transitoire des jonctions serrées.

Le passage paracellulaire est un phénomène de transport qui est possible pour des particules de diamètre inférieur à 150 nm.

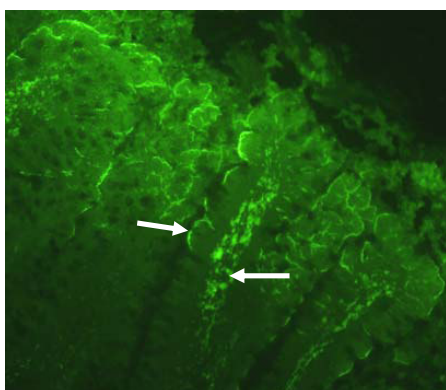


Figure 11 : Nanosphères d'alginate-dextran chargées en insuline et recouvertes d'un complexe albumine-chitosane-PEG. (Lu : lumière intestinale) (Selon Damgé *et coll.*, 2008)

34. Transport transcellulaire

Bendayan *et coll.* ont rapporté que l'insuline pourrait être transportée dans le cytoplasme des entérocytes par endocytose (Bendayan *et coll.*, 1994 ; Ziv et Bendayan, 2000). L'endocytose est un phénomène d'internalisation au cours duquel la membrane plasmique du pôle apical forme des invaginations qui vont permettre l'internalisation des particules, entraînant la formation de vésicules. L'insuline est transférée vers le côté basolatéral et libérée dans les espaces interstitiels afin de rejoindre la circulation sanguine. Les récepteurs à l'insuline présents le long du TGI pourraient jouer un rôle dans la capture de l'insuline ; il s'agit alors d'un phénomène d'endocytose médiée par des récepteurs (Swaan, 1998). Ces récepteurs, dépendants ou non des clathrines, permettraient le transport de particules de 60 à 500 nm (Jung *et coll.*, 2000). Ils pourraient également expliquer la présence de nanoparticules marquées d'or dans le cytoplasme des entérocytes après administration orale de nanoparticules chargées en insuline (Pinto-Alphandary *et coll.*, 2003). Une fois dans le cytoplasme, l'insuline peut subir une dégradation enzymatique par *l'insuline-degrading enzyme*. Ainsi, la quantité précise d'insuline qui va rejoindre la circulation sanguine par passage transcellulaire ne peut donc pas être connue.

Une autre voie d'absorption de nanoparticules concerne la translocation à travers les cellules M. Ces cellules spécialisées du TGI possèdent des propriétés de phagocytose, sont réparties sur 2 % de la surface et participent à l'immunité de la muqueuse. Elles sont capables d'absorber des particules de taille variable, jusqu'à 15 μm (O'Hagan, 1996), les particules plus petites étant mieux absorbées que les plus grosses. Cette absorption, spécifique ou non, dépend des capacités du polymère utilisé à se lier à des transporteurs spécifiques tels que des lectines ou des transferrines. Des nanoparticules ont pu être observées en microscopie électronique à balayage dans le cytoplasme de cellules M puis dans les espaces intercellulaires contenant les cellules phagocytaires (lymphocytes, macrophages) (Damgé *et coll.*, 2000). Après l'administration de nanoparticules d'alginate et chitosane chargées en insuline marquée à la FITC, Sarmiento *et coll.* (2007) ont pu mettre en évidence un marquage dans les plaques de Peyer. La présence de PEG à la surface des particules semble également augmenter la quantité de particules absorbées dans les plaques de Peyer (Damgé *et coll.*, 2007).

Enfin, les nanoparticules d'insuline ou l'insuline sous forme libre peuvent rejoindre les capillaires sanguins à travers les fenêtres de la membrane basale de diamètre variant de 500 nm à 5 μm (Kreuter, 1991).

Ainsi, l'absorption de nanoparticules d'insuline ou de l'insuline libre par l'épithélium intestinal peut se faire par différents mécanismes, résumés dans la figure 12, dépendant généralement de la nature du polymère ou de la molécule greffée à sa surface.

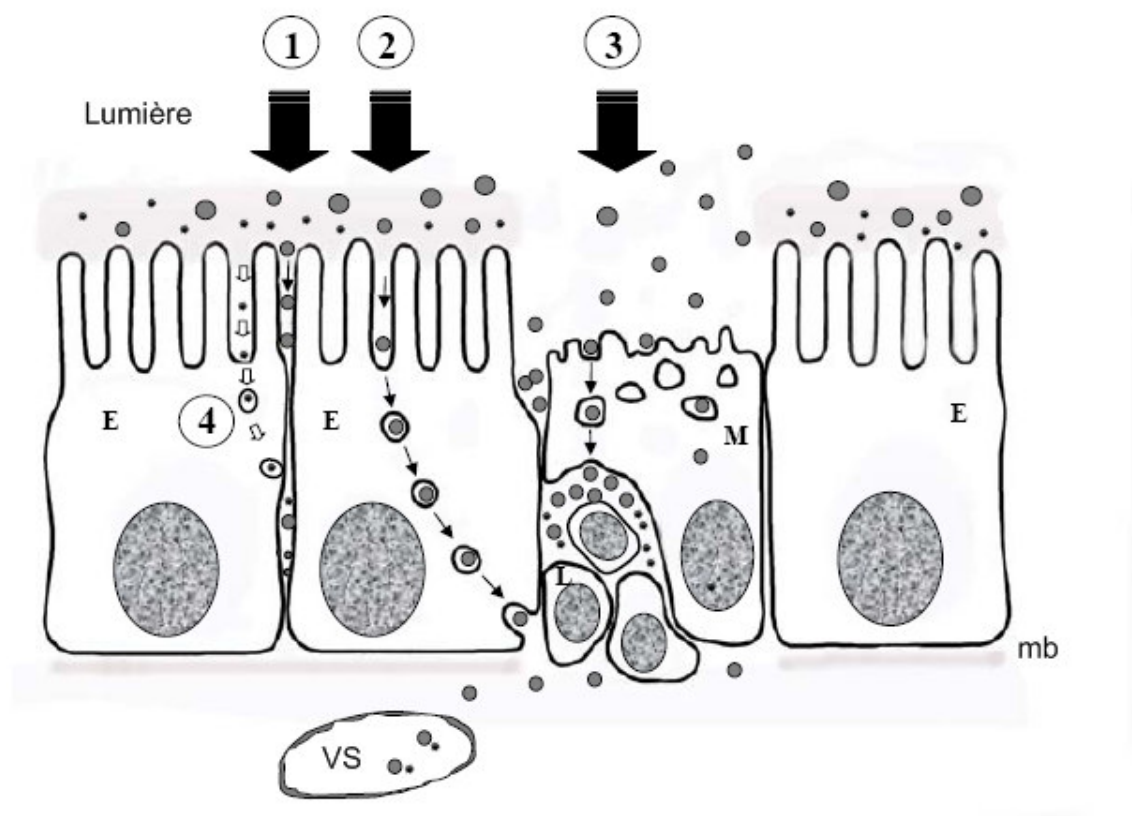


Figure 12 : Représentation schématique de l'absorption intestinale des nanoparticules d'insuline. E : entérocyte, M : cellule M, mb : membrane basale, VS : vaisseau sanguin. (1) transport paracellulaire, (2) transport transcellulaire par les entérocytes, (3) transport transcellulaire par les cellules M, (4) transport de l'insuline libre médiée par des récepteurs. (selon Damgé *et coll.*, 2008).

Les nanoparticules hydrophobes ont montré leur capacité à être mieux absorbées par l'épithélium intestinal que les particules de nature plus hydrophile (des Rieux *et coll.*, 2006). Les particules hydrophobes semblent avoir une affinité plus

grande pour les cellules M que pour les entérocytes (Jung *et coll.*, 2000). Comme vu précédemment, d'autres facteurs peuvent également affecter l'absorption des particules : leur taille, leur nature, leurs propriétés de surface.

4. Administration orale de nanoparticules d'insuline : études *in vivo*

41. Nanoparticules de poly(alkylcyanoacrylate)

C'est en 1988 que les premiers résultats *in vivo* de régulation de la glycémie après administration de particules d'insuline ont été publiés (Damgé *et coll.*, 1988). Des nanocapsules de poly(isobutylcyanoacrylate) (PIBCA) chargées d'insuline ont été administrées à des rats rendus diabétiques par administration intraveineuse de streptozotocine. La durée de la diminution de la glycémie dépendait de la dose administrée : 12,5 ; 25 ou 50 UI/kg. Une durée d'action de 20, 9 et 6 jours a été observée suite à l'administration unique de nanoparticules d'insuline aux doses respectives de 50, 25 et 12,5 UI/kg. Comparativement, une solution d'insuline administrée de la même façon n'a eu aucun retentissement sur la glycémie des animaux. L'insuline qui a été absorbée par le TGI conserve donc son activité hypoglycémiante après encapsulation dans les nanocapsules. L'intensité et la durée d'action de l'insuline administrée par voie orale via des nanoparticules semblent également liées au lieu d'absorption. En effet, Michel *et coll.* ont observé que l'effet est augmenté au niveau de l'iléon, puis de l'estomac, du duodénum et du jéjunum et enfin, l'effet est moindre au niveau du côlon (Michel *et coll.*, 1991). Le même type de particules a été administré à des chiens afin de confirmer les premiers résultats de Damgé *et coll.* (1995). Les auteurs ont alors observé une diminution de l'hyperglycémie provoquée par une administration de glucose à des chiens non diabétiques, après administration unique d'une dose de 100 UI/kg. Chez les chiens diabétiques, l'administration orale de ces nanocapsules a permis de réduire la glycémie post-prandiale, la glycosurie et le taux sanguin de glucagon, conséquences directes de la maladie diabétique.

La nature du milieu de dispersion des particules semble jouer un rôle important sur l'activité hypoglycémiante (Damgé *et coll.*, 1997). En effet, lorsque les particules

sont administrées dans une solution huileuse contenant des agents tensio-actifs (poloxamer 188 et acide désoxycholique), une réduction prolongée de la glycémie a pu être observée à partir de la deuxième heure et jusqu'à 10 jours, tandis que la même formulation dispersée dans une solution aqueuse n'a démontré aucun effet (figure 13). Les agents tensio-actifs en solution huileuse pourraient être responsables d'une protection de l'insuline contre les enzymes protéolytiques du TGI. D'autres auteurs ont confirmé cette hypothèse : Radwan et Aboul-Einen (2002) ont mis en évidence une diminution de la glycémie après administration de nanoparticules de poly(ethylcyanoacrylate) chargées en insuline chez des rats diabétiques en présence de divers inducteurs d'absorption comme l'acide caprique ou l'acide cholique.

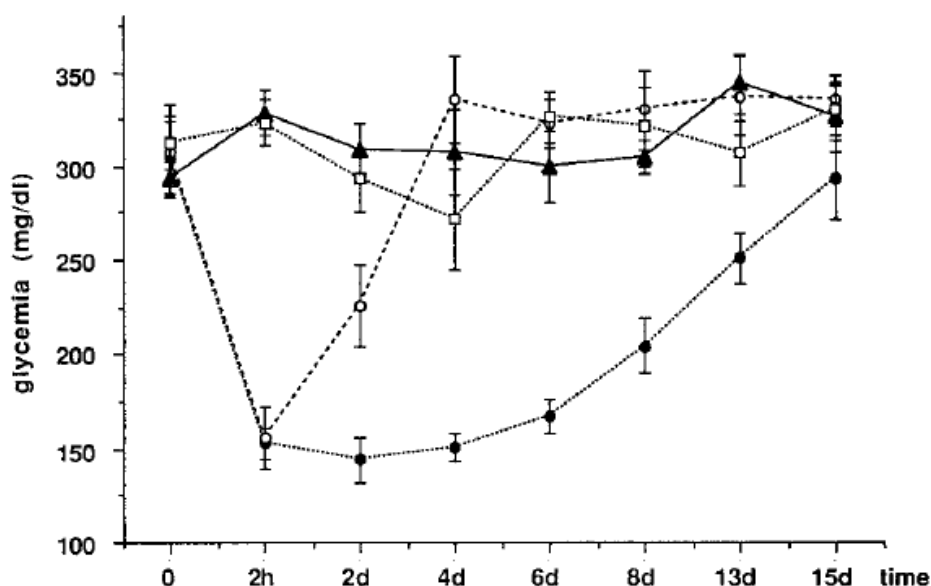


Figure 13 : Effet d'une administration intra-gastrique unique de nanosphères d'insuline (100 UI/kg) dispersées dans de l'eau (□), de l'eau contenant des agents tensio-actifs (poloxamer 188 1% et acide desoxycholique 0,01 M) (○), du miglyol contenant les mêmes agents tensio-actifs (●) sur la glycémie de rats diabétiques. Les animaux contrôle ont reçu une administration orale de 100 UI/kg d'insuline libre dans du miglyol contenant les agents tensio-actifs (▲). Résultats exprimés en moyenne $\pm$ S.E.M. n=8. (Selon Damgé *et coll.*, 1997)

Des nanoparticules de PIBCA ont été préparées par d'autres auteurs et ont également montré leur efficacité à diminuer la glycémie chez des rats diabétiques (Cournarie *et coll.*, 2002 ; Mesihah *et coll.*, 2005).

42. Nanoparticules d'acide polyméthacrylique

De nombreuses études ont été menées *in vitro* sur des nanoparticules d'insuline composées de copolymères d'acide méthacrylique, mais une équipe seulement a procédé à des investigations *in vivo* chez des rats sains et diabétiques sur les effets de nanoparticules d'acides acrylique et méthacrylique greffées avec du PEG. Ces particules ont permis de réduire la glycémie pendant au moins 6 heures après administration orale d'une dose de 50 UI/kg (Foss *et coll.*, 2004).

43. Nanoparticules d'acide polylactique (PLA) et de copolymère d'acide lactique et glycolique (PLGA)

Xiong *et coll.* (2007) ont préparé des nanoparticules à base de PLA et de Pluronic (PLA-F127-PLA) et les ont administrées à des souris rendues diabétiques par administration d'alloxane.

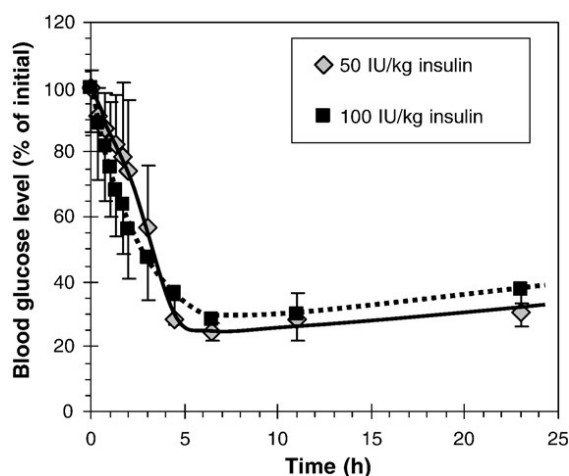


Figure 14 : Variation de la glycémie en fonction du temps après administration orale à des souris diabétiques de particules de PLA-F129-PLA chargées en insuline à la posologie de 50 et 100 UI /kg. Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type, n=5 par groupe. (Selon Xiong *et coll.*, 2007)

Ces formulations ont permis une diminution de la glycémie de 18,5 à 5,3 mmol/L en 4h30. L'effet a été prolongé pendant au moins 23 h après l'administration orale d'une dose de 50 UI/kg. L'augmentation à une dose de 100 UI/kg n'a pas démontré d'effet supérieur sur la glycémie (figure 14).

Plusieurs équipes ont testé *in vivo* des particules de PLGA. Les particules obtenues ont été administrées à des rats diabétiques et ont démontré leur capacité à réduire la glycémie pendant un temps prolongé (Kumar *et coll.*, 2006 ; Cui *et coll.*, 2007), démontrant une libération progressive de l'insuline des nanoparticules. Cependant, la biodisponibilité relative de l'insuline des nanoparticules administrées per os par rapport à la voie SC reste assez faible : 3,7 % (Cui *et coll.*, 2007). Certains ont alors proposé de modifier la surface des particules afin de mieux contrôler la libération du principe à actif, d'augmenter son absorption par la paroi intestinale et ainsi augmenter sa biodisponibilité. Le greffage de chitosane sur des nanoparticules de PLGA a permis d'augmenter la biodisponibilité de 15,4 % par rapport aux mêmes particules nues (Pan *et coll.*, 2003). Cui *et coll.* ont imaginé d'autres stratégies : augmenter la liposolubilité de l'insuline en l'associant dans un complexe avec de la phosphatidylcholine de soja (Cui *et coll.*, 2006) ou en prévenant sa libération dans l'estomac grâce à l'association à un copolymère sensible au pH (Cui *et coll.*, 2007), augmentant ainsi sa biodisponibilité à respectivement 7,7 % et 6,3 %.

44. Nanoparticules de poly- ϵ -caprolactone (PCL)

Des nanoparticules ont été préparées à base d'un mélange de PCL et d'un polymère biocompatible mais non-biodégradable chargé positivement et ayant des propriétés de muco-adhésion (Eudragit® RS) dans un mélange 50/50 (Damgé *et coll.*, 2007). Une diminution de la glycémie a été observée pendant un laps de temps important après administration orale à des rats diabétiques : de 4 à 24 h avec un pic entre 6 et 8 h de moins 40 %. La biodisponibilité relative de l'insuline de ces nanoparticules était de 13,2 % comparativement à une administration SC.

45. Nanoparticules de chitosane

Compte tenu des ses capacités à faciliter le passage des peptides et des protéines à travers les cellules épithéliales par ouverture des jonctions serrées, le chitosane a été proposé pour la fabrication de nanoparticules d'insuline. Il a été utilisé comme unique polymère, comme copolymère ou encore comme matériau de greffage

de particules polymériques. Ma *et coll.* (2005) ont préparé des particules de chitosane à deux pH différents : 5,3 et 6,1. Les particules préparées à pH 5,3 ont montré une baisse légère et prolongée du glucose sanguin chez le rat diabétique de 10 à 24 h. Celles préparées à pH 6,1 permettent une diminution plus rapide (dans les 2 h) de la glycémie mais une efficacité moindre.

Des nanoparticules à base de chitosane et d'acide poly(gammaglutamique) ont permis une diminution de la glycémie dose-dépendante de rats diabétiques entre 2 et 10 h (Lin *et coll.*, 2007). Le chitosane a également été associé à des dérivés de méthacrylate pour former des nanoparticules (Qian *et coll.*, 2006). Ces particules ont diminué le glucose sanguin de rats sains 6 à 10 h après administration orale.

46. Nanoparticules d'alginate

L'alginate a été utilisé initialement pour l'encapsulation de cellules, en particulier pour transplanter des cellules β des îlots de Langerhans. Elle a servi plus récemment en association avec du dextran pour préparer des nanoparticules recouvertes de chitosane-PEG-albumine (Reis *et coll.*, 2008). Après administration orale de nanoparticules aux doses de 50 et 100 UI/kg, une diminution importante de la glycémie des rats diabétiques a été observée à partir de 4 h et jusqu'à 48 h avec un maximum à 14 h (-75 %). Les biodisponibilités de ces formulations sont respectivement de 21 et 10 %. La présence de PEG et d'albumine en surface des particules d'alginate a permis d'augmenter leur efficacité par rapport aux mêmes particules recouvertes simplement de chitosane (Sarmiento *et coll.*, 2007).

47. Nanoparticules de dextran couplé à la vitamine B₁₂

La vitamine B₁₂ a été utilisée comme ligand spécifique sur des nanoparticules de dextran afin d'augmenter la translocation de celles-ci à travers la barrière intestinale (Chalasani *et coll.*, 2007). Une diminution importante (70-75 %) de la glycémie a pu être observée en 5 h et les valeurs de glycémie sont revenues à la normale en 8-10 h. Une deuxième libération d'insuline a permis de diminuer la

glycémie jusqu'à 54 h après l'administration orale de ces particules à des rats diabétiques.

48. Nanoparticules de phosphate de calcium-PEG-insuline-caséine (CAPIC)

Ces particules sont composées d'un cœur hydrophobe (phosphate de calcium-PEG-insuline) entouré d'une couche hydrophile (caséine) qui pourrait protéger l'insuline de l'acidité du milieu gastrique (Morcol *et coll.*, 2004) (figure 15). Après administration orale à des souris diabétiques *a jeun* à la dose de 100 UI/kg, ces particules de CAPIC ont réduit le taux de glucose sanguin de 80 % en 1 h, et l'effet a été maintenu pendant 12 h. Chez la souris non *a jeun*, les mêmes particules ont permis une diminution maximale de la glycémie d'environ 50 % à 3 h et jusqu'à 5 h. Cette formulation permet une action à la fois rapide et prolongée.

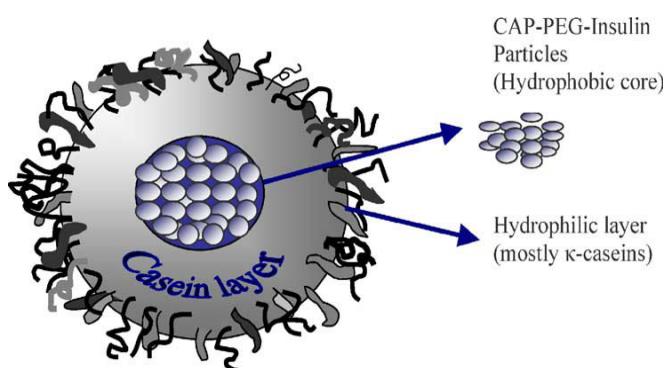


Figure 15 : Représentation schématique d'une particule de CAPIC (Selon Morcol *et coll.*, 2004)

49. Nanoparticules à base d'or

Des nanoparticules d'insuline à base d'or ont été préparées à l'aide de borohydrure de sodium (Joshi *et coll.*, 2006) ou de chitosane (figure 16) (Bhumkar *et coll.*, 2007) comme agent réducteur. L'insuline est alors située en surface, associée à l'agent réducteur. Après administration à des rats diabétiques à la dose de 50 UI/kg, une réduction du glucose sanguin a été observée de l'ordre de 18 % à 3 h pour les particules de borohydrure de sodium et d'environ 30 % à 2 h pour celles de

chitosane. L'efficacité accrue des particules d'or recouvertes de chitosane semble indiquer que celui-ci permet à la fois d'être utilisé comme agent réducteur lors de la fabrication mais permet également d'augmenter la pénétration de l'insuline au niveau de la muqueuse intestinale par rapport aux particules de borohydrure de sodium, phénomène sans doute lié à ses propriétés d'ouverture des jonctions serrées. Des taux importants d'or et d'insuline au niveau sanguin 2 h après l'administration des particules recouvertes de chitosane confirment cette hypothèse (Bhumkar *et coll.*, 2007).

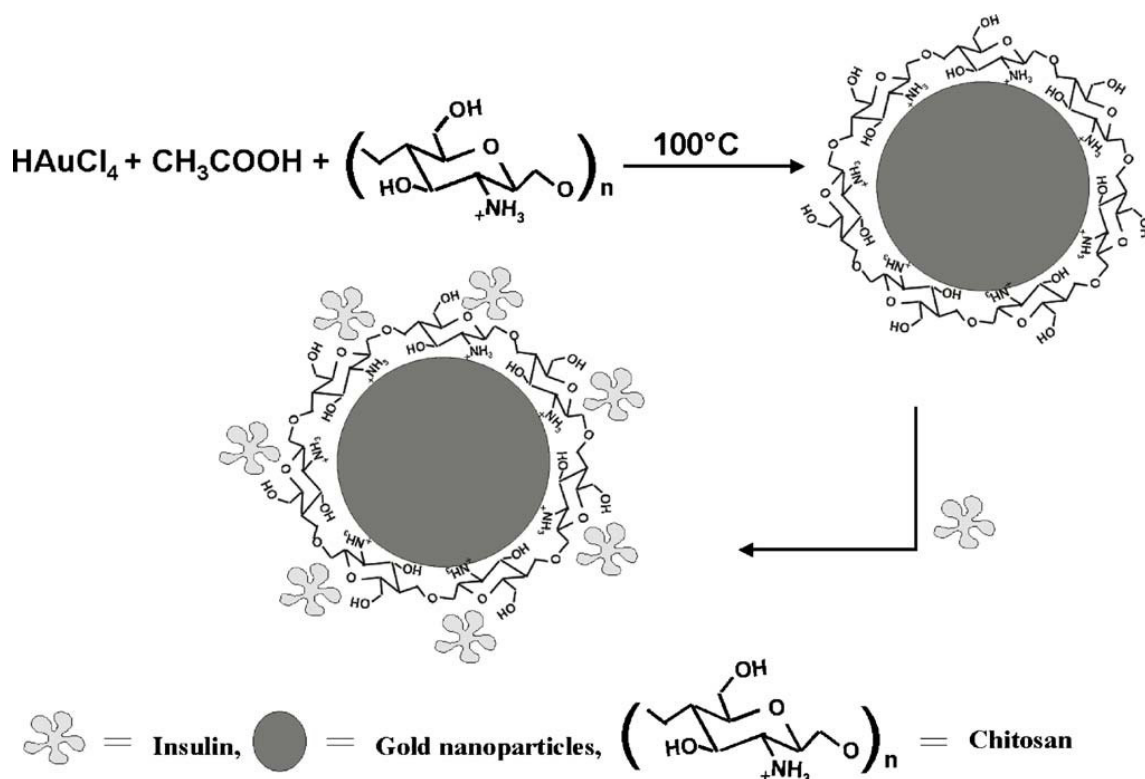


Figure 16 : Représentation schématique de nanoparticules d'or recouvertes de chitosane, permettant le chargement en insuline. (selon Bhumkar *et coll.*, 2007)

Le tableau 2 résume les études d'administration orale de nanoparticules d'insuline, de natures différentes et à divers dosages, effectuées chez l'animal et présente les résultats observés sur la glycémie.

Tableau 2 : Administration orale de nanoparticules d'insuline (selon Damgé *et coll.*, 2008)

Polymères	Modèle animal	Dose	Observations	Disponibilité biologique et pharmacologique	Réfs
PIBCA	Rat diabétique	12,5-50 IU/kg	Diminution de 50 % de la glycémie de 2 à 21 jours, dépendant de la concentration d'insuline	n.d.	(Dagné <i>et coll.</i> , 1988 ; Dagné <i>et coll.</i> , 1990)
PIBCA	Rat diabétique	100 UI/kg	Diminution prolongée et marquée du glucose sanguin de 2 à 18 jours dépendant du site d'administration : iléon > estomac > duodénum et jéjunum > colon	n.d.	(Michel <i>et coll.</i> , 1991)
PIBCA	Chiens normaux et diabétiques	100 UI/kg	Diminution durable de la glycémie et amélioration de la réponse à un test de tolérance au glucose et des paramètres métaboliques glycosurie, glucagon et somatostatine jusqu'à 6 - 8 jours	n.d.	(Dagné <i>et coll.</i> , 1995)
PIBCA	Souris diabétique non obèse	100 UI/kg	Diminution de l'incidence du diabète et de l'inflammation des îlots de Langerhans	n.d.	(Sai <i>et coll.</i> , 1996)
PIBCA	Rat diabétique	50 UI/kg	Grande variation de la concentration d'insuline à travers la barrière intestinale (pic à 1h) et absence de modification de la glycémie	n.d.	(Cournarie <i>et coll.</i> , 2002)
PIBCA, surfactants et miglyol	Rat diabétique	100 UI/kg	50 % de diminution du glucose sanguin de 2 h à 10-13 jours	n.d.	(Dagné <i>et coll.</i> , 1997)
PECA et surfactants	Rat diabétique		Diminution du glucose sanguin jusqu'à 12 jours chez 50 % des rats avec nanosphères + acide glycyrrhizique ou acide caprique	B.P. : 0,5-1 % dépendant du surfactant	(Radwan <i>et Aboul-Enein</i> , 47 2002)

PIBCA/ pluronic	Rat diabétique	100 UI/kg	Réduction du glucose sanguin à partir de 2 h et s'étendant jusqu'à 40 h	n.d.	(Mesiha <i>et coll.</i> , 2005)
PIBCA et surfactants	Rat diabétique	75 UI/kg	Diminution du glucose sanguin de 2 h et jusqu'à plus de 8 h	B.P. : 37,6 %	(Radwan, 2001)
P(MMA-g-PEG)	Rat normal et diabétique	50 UI/kg	Hypoglycémie faible mais plus de 6 h après administration	n.d.	(Foss <i>et coll.</i> , 2004)
PLA-F127-PLA	Souris diabétique	50 et 100 UI/kg	Diminution prolongée de la glycémie avec un effet max. (-75 %) de 4,5 à 24 h. Même effet avec 50 et 100 UI/kg	n.d.	(Xiong <i>et coll.</i> , 2007)
PLGA	Rats normaux		Hypoglycémie sévère après administration dans l'anse intestinale	n.d.	(Barichello <i>et coll.</i> , 1999)
PLGA	Rats diabétiques		Réduction prolongée de la glycémie	n.d.	(Kumar <i>et coll.</i> , 2006)
PLGA	Rats diabétiques	10 UI/kg	Effet hypoglycémique prolongé à partir de 4 h avec effet maximal à 10 h (-52 %)	B.P. : 10,3 %	(Pan <i>et coll.</i> , 2002b)
PLGA	Rats diabétique	20 UI/kg	Réduction prolongée de la glycémie de 4 à 24 h avec effet maximal à 16 h (-30 %)	B.R. : 3,68 %	(Cui <i>et coll.</i> , 2007)
PLGA- chitosan	Rats diabétiques		Hypoglycémie prolongée de 14 à 16 h	+ 15,4 % vs NP sans chitosan	(Pan <i>et coll.</i> , 2003)
PLGA-Hp55	Rats diabétiques	20 UI/kg	Réduction prolongée de la glycémie de 4 à 24 h avec effet maximal à 16 h (-65 %)	B.R. : 6,27 %	(Cui <i>et coll.</i> , 2007)
PLGA- complexe insuline- phospholipide	Rats diabétiques	20 UI/kg	Diminution de la glycémie de 57,4 % de 12 à 24 h	B.R. : 7,7 %	(Cui <i>et coll.</i> , 2006)
PLGA-FAO	Rats normaux	64 UI/kg	Diminution prolongée de la glycémie	B.P. : 11,4 % vs injection péritonéale	(Carino <i>et coll.</i> , 2000)

PCL-Eudragit® RS	Rats diabétiques	50-100 UI/kg	Diminution dose dépendante de la glycémie avec effet maximal entre 4 et 8 h (-40 %)	B.R. : 13,21 %	(Damgé <i>et coll.</i> , 2007)
Chitosan	Rats diabétiques	21 UI/kg	Hypoglycémie prolongée plus de 15 h	B.R. : 14,9 %	(Pan <i>et coll.</i> , 2002a)
Chitosan	Rats diabétiques	50 et 100 UI/kg	Diminution marquée et prolongée de la glycémie de 2 à 24 h	Pas d'augmentation de l'insuline plasmatique	(Ma <i>et coll.</i> , 2005)
Chitosan-acide poly(glutamic)	Rats diabétiques	15 et 30 UI/kg	Diminution dose dépendante de la glycémie 2 à 10 h après administration	n.d.	(Lin <i>et coll.</i> , 2007)
Chitosan-méthacrylate	Rats normaux	100 UI/kg	Hypoglycémie dépendante du copolymère : de -30 à -40 % de 6 à 10 h après administration	n.d.	(Qian <i>et coll.</i> , 2006)
Alginate-dextran recouvert de chitosan	Rats diabétiques	50 et 100 UI/kg	Diminution de 40 % de la glycémie prolongée après 18 h	B.P. : 6,8 % (50 UI/kg) 3,4 % (100 UI/kg)	(Sarmiento <i>et coll.</i> , 2007)
Alginate-dextran recouvert d'un complexe albumine-chitosan-PEG	Rats diabétiques	50 et 100 UI/kg	Diminution de la glycémie jusqu'à 48 h avec maximum à 14 h (-75 %)	B.P. : 21 % (50 UI/kg) 10 % (100 UI/kg)	(Reis <i>et coll.</i> , 2008)
NLS modifiée par lectine	Rats normaux	50 UI/kg	Diminution prolongée de la glycémie NLS : max à 1 h, WGA-NLS : 3-6 h	B.R. : 6,08 % (NLS) 7,11 % (WGA-NLS)	(Zhang <i>et coll.</i> , 2006)
NP d'or	Rats diabétiques	50 UI/kg	Diminution de la glycemia maximale après 3 h (50-55 %)	n.d.	(Joshi <i>et coll.</i> , 2006)

NP d'or et chitosan réduit	Rats diabétiques	50 UI/kg	Diminution prolongée de la glycémie avec un maximum 2 h après administration (-30 %)	n.d.	(Bhumkar <i>et coll.</i> , 2007)
CAPIC	Souris diabétiques	100 UI/kg	Diminution de 80 % de la glycémie de 1 à 12 h chez la souris a jeun et diminution de 50 % de 1 à 5 h chez la souris nourrie	n.d.	(Morcol <i>et coll.</i> , 2004)

NP : nanoparticules ; B.R. : biodisponibilité relative ; B.P. : biodisponibilité pharmacologique ; PIBCA : Poly(isobutylcyanoacrylate) ; PECA : Poly(ethylcyanoacrylate) ; PEG : polyethylene glycol ; P(MAA-g-PEG) : acide poly(methacrylique) greffé avec du PEG ; P(AA-g-PEG): acide poly(acrylique) greffé avec du PEG ; PLA : acide Poly(lactique) ; PLGA : copolymère d'acide lactique et glycolique ; PLGA/FAO : PLGA avec oligomères anhydres fumariques et additifs d'oxyde de fer ; NLS : NP lipidiques solides ; WGA-NLS: NP avec lectine modifiée ; CAPIC : phosphate de calcium-PEG-insuline-caséine.

V. Conclusion

L'administration orale d'insuline résulte en une biodisponibilité très faible due à sa mauvaise absorption et à sa dégradation dans le TGI. C'est pourquoi un certain nombre de techniques ont été développées afin d'augmenter cette biodisponibilité par voie orale. Parmi elles, l'association de la protéine à un vecteur polymère tel que des nanoparticules (nanosphères ou nanocapsules) de diamètre inférieur au micromètre est d'un avenir prometteur. Après administration orale à des animaux sains ou diabétiques, elles ont démontré leur capacité à diminuer la glycémie. Leur durée, ainsi que leur intensité d'action dépendent des propriétés physico-chimiques du polymère utilisé dans leur préparation. La composition des nanoparticules semble affecter également la taille des particules, leur potentiel zêta, le taux d'encapsulation de l'insuline mais aussi leur profil de libération *in vitro*. La nanoencapsulation a permis de protéger l'insuline d'une dégradation dans le TGI. En augmentant les propriétés de muco-adhésion, il a été possible d'augmenter le temps de contact de l'insuline avec la muqueuse intestinale, permettant ainsi une absorption prolongée du principe actif.

D'autre part, les nanoparticules d'insuline qui ont pu rejoindre la circulation sanguine vont pouvoir atteindre le foie par la veine porte. En effet, Damgé *et coll.* (2000) ont pu observer des nanoparticules d'insuline marquées dans divers organes et spécialement dans le foie après administration orale de nanoparticules de PIBCA chez le rat. Une fois dans le foie, les nanoparticules vont être captées par les cellules de Küpffer qui vont alors jouer un rôle de réservoir relarguant progressivement l'insuline au fur et à mesure de la dégradation du polymère et permettant ainsi une diminution prolongée de la glycémie (Lenaerts *et coll.*, 1984).

RÉFÉRENCES

Académie de Lille. *bionc01*, [en ligne]. (<http://www2b.ac-lille.fr/biotechnologies/bionc01.htm>) [page consultée le 16 07 2008]

Allemann, E., Leroux, J., and Gurny, R., *Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **34**(2-3): p. 171-189.

Aprahamian, M., Michel, C., Humbert, W., Devissaguet, J.P., and Damge, C., *Transmucosal passage of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as a new drug carrier in the small intestine*. Biol Cell, 1987. **61**(1-2): p. 69-76.

Attivi, D., Wehrle, P., Ubrich, N., Damge, C., Hoffman, M., and Maincent, P., *Formulation of insulin-loaded polymeric nanoparticles using response surface methodology*. Drug Dev Ind Pharm, 2005. **31**(2): p. 179-89.

Bai, J.P. and Chang, L.L., *Transepithelial transport of insulin: I. Insulin degradation by insulin-degrading enzyme in small intestinal epithelium*. Pharm Res, 1995. **12**(8): p. 1171-5.

Banting, F.G. and Best, C.H., *Pancreatic extracts*. 1922. J Lab Clin Med, 1990. **115**(2): p. 254-72.

Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K., and Nagai, T., *Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method*. Drug Dev Ind Pharm, 1999. **25**(4): p. 471-6.

Bendayan, M., Ziv, E., Gingras, D., Ben-Sasson, R., Bar-On, H., and Kidron, M., *Biochemical and morpho-cytochemical evidence for the intestinal absorption of insulin in control and diabetic rats. Comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa*. Diabetologia, 1994. **37**(2): p. 119-26.

Benoit, J.P., Couvreur, P., Devissaguet, J.P., Fessi, H., Puisieux, F., and Roblot, L., *Les formes vectorisées ou à distribution modulée, nouveaux systèmes d'administration des médicaments*. J. Pharm. Belg., 1986. **5**: p. 319-329.

Bhumkar, D.R., Joshi, H.M., Sastry, M., and Pokharkar, V.B., *Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin*. Pharm Res, 2007. **24**(8): p. 1415-26.

Brange, J. and Langkjaer, L., *Chemical stability of insulin. 3. Influence of excipients, formulation, and pH*. Acta Pharm Nord, 1992. **4**(3): p. 149-58.

Brange, J. and Langkjaer, L., *Insulin formulation and delivery*. Pharm Biotechnol, 1997. **10**: p. 343-409.

Brigger, I., Dubernet, C., and Couvreur, P., *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(5): p. 631-51.

- Caliceti, P., Salmaso, S., Elvassore, N., and Bertucco, A., *Effective protein release from PEG/PLA nano-particles produced by compressed gas anti-solvent precipitation techniques*. J Control Release, 2004. **94**(1): p. 195-205.
- Cansell, M., Parisel, C., Jozefonvicz, J., and Letourneur, D., *Liposomes coated with chemically modified dextran interact with human endothelial cells*. J Biomed Mater Res, 1999. **44**(2): p. 140-8.
- Carino, G.P., Jacob, J.S., and Mathiowitz, E., *Nanosphere based oral insulin delivery*. J Control Release, 2000. **65**(1-2): p. 261-9.
- Chalasani, K.B., Russell-Jones, G.J., Yandrapu, S.K., Diwan, P.V., and Jain, S.K., *A novel vitamin B12-nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin*. J Control Release, 2007. **117**(3): p. 421-9.
- Christensen, K.L., Pedersen, G.P., and Kristensen, H.G., *Preparation of redispersible dry emulsions by spray drying*. Int J Pharm, 2001. **212**(2): p. 187-194.
- Cournarie, F., Auchere, D., Chevenne, D., Lacour, B., Seiller, M., and Vauthier, C., *Absorption and efficiency of insulin after oral administration of insulin-loaded nanocapsules in diabetic rats*. Int J Pharm, 2002. **242**(1-2): p. 325-8.
- Couvreur, P., *Vecteurs nanoparticulaires de médicaments*. Tec et Doc ed. Formes pharmaceutiques nouvelles. Aspects technologique, biopharmaceutique et médical. 1985: Buri, P. Puisieux, F. Doelker, E. Benoit, J.P. 577-611
- Cui, F., Shi, K., Zhang, L., Tao, A., and Kawashima, Y., *Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation*. J Control Release, 2006. **114**(2): p. 242-50.
- Cui, F.D., Tao, A.J., Cun, D.M., Zhang, L.Q., and Shi, K., *Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery*. J Pharm Sci, 2007. **96**(2): p. 421-7.
- Damgé, C., Aprahamian, M., Humbert, W., and Pinget, M., *Ileal uptake of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules in the rat*. J Pharm Pharmacol, 2000. **52**(9): p. 1049-56.
- Damgé, C., Hillaire-Buys, D., Puech, R., Hoeltzel, A., Michel, C., and Ribes, G., *Effects of orally administered insulin nanocapsules in normal and diabetic dogs*. Diabetes, Nutrition and Metabolism - Clinical and Experimental, 1995. **8**(1): p. 3-9.
- Damgé, C., Maincent, P., and Ubrich, N., *Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats*. J Control Release, 2007. **117**(2): p. 163-170.
- Damgé, C., Michel, C., Aprahamian, M., and Couvreur, P., *New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier*. Diabetes, 1988. **37**(2): p. 246-251.

Damgé, C., Michel, C., Aprahamian, M., Couvreur, P., and Devissaguet, J.P., *Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery*. J Control Release, 1990. **13**(2-3): p. 233-239.

Damgé, C., Reis, C.P., and Maincent, P., *Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin*. Expert Opin Drug Deliv, 2008. **5**(1): p. 45-68.

Damgé, C., Vranckx, H., Balschmidt, P., and Couvreur, P., *Poly(alkyl cyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin*. J Pharm Sci, 1997. **86**(12): p. 1403-9.

des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J., and Preat, V., *Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach*. J Control Release, 2006. **116**(1): p. 1-27.

Elvassore, N., Bertucco, A., and Caliceti, P., *Production of insulin-loaded poly(ethylene glycol)/poly(l-lactide) (PEG/PLA) nanoparticles by gas antisolvent techniques*. J Pharm Sci, 2001. **90**(10): p. 1628-36.

Foss, A.C., Goto, T., Morishita, M., and Peppas, N.A., *Development of acrylic-based copolymers for oral insulin delivery*. Eur J Pharm Biopharm, 2004. **57**(2): p. 163-9.

France-Chimie. *France-chimie - Actualités*, [en ligne]. http://www.france-chimie.com/e-docs/00/09/63/9D/document_actualite.md?type=text.html [page consultée le 12 07 2008]

Gomez-Perez, F.J. and Rull, J.A., *Insulin therapy: current alternatives*. Arch Med Res, 2005. **36**(3): p. 258-72.

Greenwald, R.B., *PEG drugs: an overview*. J Control Release, 2001. **74**(1-3): p. 159-71.

Guevara-Aguirre, J., Guevara-Aguirre, M., Saavedra, J., Bernstein, G., and Rosenbloom, A.L., *Comparison of oral insulin spray and subcutaneous regular insulin at mealtime in type 1 diabetes*. Diabetes Technol Ther, 2007. **9**(4): p. 372-6.

Henriksen, I., Smistad, G., and Karlsen, J., *Interactions between liposomes and chitosan*. Int J Pharm, 1994. **101**(3): p. 227-236.

Hwang, J.S., Shin, C.H., Yang, S.W., Jung, S.Y., and Huh, N., *Genetic and clinical characteristics of Korean maturity-onset diabetes of the young (MODY) patients*. Diabetes Res Clin Pract, 2006. **74**(1): p. 75-81.

Joshi, H.M., Bhumkar, D.R., Joshi, K., Pokharkar, V., and Sastry, M., *Gold nanoparticles as carriers for efficient transmucosal insulin delivery*. Langmuir, 2006. **22**(1): p. 300-5.

Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J.X., and Kissel, T., *Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?* Eur J Pharm Biopharm, 2000. **50**(1): p. 147-60.

Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Melik-Nubarov, N.S., Fedoseev, N.A., Dorodnich, T.Y., Alakhov, V.Y., Chekhonin, V.P., Nazarova, I.R., and Kabanov, V.A., *A new class of drug carriers: micelles of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymers as*

microcontainers for drug targeting from blood in brain. J Control Release, 1992. **22**(2): p. 141-157.

Kidron, M., Dinh, S., Menachem, Y., Abbas, R., Variano, B., Goldberg, M., Arbit, E., and Bar-On, H., *A novel per-oral insulin formulation: proof of concept study in non-diabetic subjects.* Diabet Med, 2004. **21**(4): p. 354-7.

Kim, Y.I., Fluckiger, L., Hoffman, M., Lartaud-Idjouadiene, I., Atkinson, J., and Maincent, P., *The antihypertensive effect of orally administered nifedipine-loaded nanoparticles in spontaneously hypertensive rats.* Br J Pharmacol, 1997. **120**(3): p. 399-404.

Kipnes, M., Dandona, P., Tripathy, D., Still, J.G., and Kosutic, G., *Control of postprandial plasma glucose by an oral insulin product (HIM2) in patients with type 2 diabetes.* Diabetes Care, 2003. **26**(2): p. 421-6.

Krauland, A.H. and Alonso, M.J., *Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system.* Int J Pharm, 2007. **340**(1-2): p. 134-42.

Kreuter, J., *Peroral administration of nanoparticles.* Adv Drug Deliv Rev, 1991. **7**(1): p. 71-86.

Kumar, P.S., Ramakrishna, S., Saini, T.R., and Diwan, P.V., *Influence of microencapsulation method and peptide loading on formulation of poly(lactide-co-glycolide) insulin nanoparticles.* Pharmazie, 2006. **61**(7): p. 613-7.

Kwon, G.S. and Kataoka, K., *Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles.* Adv Drug Deliv Rev, 1995. **16**(2-3): p. 295-309.

Le, U.M. and Cui, Z., *Long-circulating gadolinium-encapsulated liposomes for potential application in tumor neutron capture therapy.* Int J Pharm, 2006. **312**(1-2): p. 105-12.

Le Point. *L'insuline inhalée Exubera liée à des cancers du poumon, selon Pfizer, actualités Sciences et Santé*, [en ligne]. <http://www.lepoint.fr/actualites-sciences-sante/l-insuline-inhalee-exubera-liee-a-des-cancers-du-poumon-selon/1055/0/237289> [page consultée le 16 07 2008]

Lee, V.H.L. and Yamamoto, A., *Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein absorption.* Adv Drug Deliv Rev, 1989. **4**(2): p. 171-207.

Lenaerts, V., Nagelkerke, J.F., Van Berkel, T.J., Cuvreur, P., Grislain, L., Roland, M., and Speiser, P., *In vivo uptake of polyisobutyl cyanoacrylate nanoparticles by rat liver Kupffer, endothelial, and parenchymal cells.* J Pharm Sci, 1984. **73**(7): p. 980-2.

Li, M.G., Lu, W.L., Wang, J.C., Zhang, X., Wang, X.Q., Zheng, A.P., and Zhang, Q., *Distribution, transition, adhesion and release of insulin loaded nanoparticles in the gut of rats.* Int J Pharm, 2007. **329**(1-2): p. 182-91.

Li, M.G., Lu, W.L., Wang, J.C., Zhang, X., Zhang, H., Wang, X.Q., Wu, C.S., and Zhang, Q., *Preparation and characterization of insulin nanoparticles employing chitosan and*

poly(methylmethacrylate/methylmethacrylic acid) copolymer. J Nanosci Nanotechnol, 2006. **6**(9-10): p. 2874-86.

Lin, Y.H., Mi, F.L., Chen, C.T., Chang, W.C., Peng, S.F., Liang, H.F., and Sung, H.W., *Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery*. Biomacromolecules, 2007. **8**(1): p. 146-52.

Lowe, P.J. and Temple, C.S., *Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats*. J Pharm Pharmacol, 1994. **46**(7): p. 547-52.

Ma, Z., Lim, T.M., and Lim, L.-Y., *Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats*. Int J Pharm, 2005. **293**(1-2): p. 271-280.

Maincent, P., Le Verge, R., Sado, P., Couvreur, P., and Devissaguet, J.P., *Disposition kinetics and oral bioavailability of vincamine-loaded polyalkyl cyanoacrylate nanoparticles*. J Pharm Sci, 1986. **75**(10): p. 955-8.

Mehvar, R., *Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents*. J Control Release, 2000. **69**(1): p. 1-25.

Menard, D., Corriveau, L., and Beaulieu, J.F., *Insulin modulates cellular proliferation in developing human jejunum and colon*. Biol Neonate, 1999. **75**(3): p. 143-51.

Mesiha, M.S., Sidhom, M.B., and Fasipe, B., *Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles*. Int J Pharm, 2005. **288**(2): p. 289-93.

Michel, C., Aprahamian, M., Defontaine, L., Couvreur, P., and Damge, C., *The effect of site of administration in the gastrointestinal tract on the absorption of insulin from nanocapsules in diabetic rats*. J Pharm Pharmacol, 1991. **43**(1): p. 1-5.

Modi, P., Mihic, M., and Lewin, A., *The evolving role of oral insulin in the treatment of diabetes using a novel RapidMist System*. Diabetes Metab Res Rev, 2002. **18** Suppl 1: p. S38-42.

Morcol, T., Nagappan, P., Nerenbaum, L., Mitchell, A., and Bell, S.J., *Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin*. Int J Pharm, 2004. **277**(1-2): p. 91-7.

Morishita, M., Goto, T., Nakamura, K., Lowman, A.M., Takayama, K., and Peppas, N.A., *Novel oral insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: single and multiple administration studies in type 1 and 2 diabetic rats*. J Control Release, 2006. **110**(3): p. 587-94.

Norris, D.A., Puri, N., and Sinko, P.J., *The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **34**(2-3): p. 135-154.

O'Hagan, D.T., *The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery*. J Anat, 1996. **189** (Pt 3): p. 477-82.

- Owens, D.R., Zinman, B., and Bolli, G., *Alternative routes of insulin delivery*. Diabet Med, 2003. **20**(11): p. 886-98.
- Pan, Y., Li, Y.J., Gao, P., Ding, P.T., Xu, H., and Zheng, J.M., *[Enhancement of gastrointestinal absorption of chitosan-coated insulin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles]*. Yao Xue Xue Bao, 2003. **38**(6): p. 467-70.
- Pan, Y., Li, Y.J., Zhao, H.Y., Zheng, J.M., Xu, H., Wei, G., Hao, J.S., and Cui, F.D., *Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo*. Int J Pharm, 2002a. **249**(1-2): p. 139-47.
- Pan, Y., Xu, H., Zhao, H.Y., Wei, G., and Zheng, J.M., *[Study on preparation and oral efficacy of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles]*. Yao Xue Xue Bao, 2002b. **37**(5): p. 374-7.
- Pedersen, G.P., Faldt, P., Bergenstahl, B., and Kristensen, H.G., *Solid state characterisation of a dry emulsion: a potential drug delivery system*. Int J Pharm, 1998. **171**(2): p. 257-270.
- Peppas, N.A. and Kavimandan, N.J., *Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles*. Eur J Pharm Sci, 2006. **29**(3-4): p. 183-97.
- Pinto-Alphandary, H., Aboubakar, M., Jaillard, D., Couvreur, P., and Vauthier, C., *Visualization of insulin-loaded nanocapsules: in vitro and in vivo studies after oral administration to rats*. Pharm Res, 2003. **20**(7): p. 1071-84.
- Pinto Reis, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., and Veiga, F., *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. Nanomedicine, 2006. **2**(1): p. 8-21.
- Qian, F., Cui, F., Ding, J., Tang, C., and Yin, C., *Chitosan graft copolymer nanoparticles for oral protein drug delivery: preparation and characterization*. Biomacromolecules, 2006. **7**(10): p. 2722-7.
- Radwan, M.A., *Enhancement of absorption of insulin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanospheres by sodium cholate after oral and subcutaneous administration in diabetic rats*. Drug Dev Ind Pharm, 2001. **27**(9): p. 981-9.
- Radwan, M.A. and Aboul-Enein, H.Y., *The effect of oral absorption enhancers on the in vivo performance of insulin-loaded poly(ethylcyanoacrylate) nanospheres in diabetic rats*. J Microencapsul., 2002. **19**(2): p. 225-235.
- Reis, C.P., Ribeiro, A.J., Hough, S., Veiga, F., and Neufeld, R.J., *Nanoparticulate delivery system for insulin: Design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity*. Eur J Pharm Sci, 2007. **30**(5): p. 392-397.
- Reis, C.P., Veiga, F.J., Ribeiro, A.J., Neufeld, R.J., and Damge, C., *Nanoparticulate biopolymers deliver insulin orally eliciting pharmacological response*. J Pharm Sci, 2008.

Robert, C. and Buri, P., *[Mucus and its role in the absorption of drugs]*. Pharm Acta Helv, 1986. **61**(8): p. 210-4.

Sai, P., Damage, C., Rivereau, A.S., Hoeltzel, A., and Gouin, E., *Prophylactic oral administration of metabolically active insulin entrapped in isobutylcyanoacrylate nanocapsules reduces the incidence of diabetes in nonobese diabetic mice*. J Autoimmun, 1996. **9**(6): p. 713-22.

Sajeesh, S. and Sharma, C.P., *Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery*. Int J Pharm, 2006a. **325**(1-2): p. 147-54.

Sajeesh, S. and Sharma, C.P., *Novel pH responsive polymethacrylic acid-chitosan-polyethylene glycol nanoparticles for oral peptide delivery*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2006b. **76**(2): p. 298-305.

Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Sampaio, P., Neufeld, R., and Ferreira, D., *Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery*. Pharm Res, 2007. **24**(12): p. 2198-206.

Shiah, J.G., Dvorak, M., Kopeckova, P., Sun, Y., Peterson, C.M., and Kopecek, J., *Biodistribution and antitumour efficacy of long-circulating N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-doxorubicin conjugates in nude mice*. Eur J Cancer, 2001. **37**(1): p. 131-9.

Smith, J.M., Dornish, M., and Wood, E.J., *Involvement of protein kinase C in chitosan glutamate-mediated tight junction disruption*. Biomaterials, 2005. **26**(16): p. 3269-76.

Sullivan, C.O. and Birkinshaw, C., *In vitro degradation of insulin-loaded poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles*. Biomaterials, 2004. **25**(18): p. 4375-82.

Swaan, P.W., *Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor-mediated transport pathways*. Pharm Res, 1998. **15**(6): p. 826-34.

Tsunoda, S., Kamada, H., Yamamoto, Y., Ishikawa, T., Matsui, J., Koizumi, K., Kaneda, Y., Tsutsumi, Y., Ohsugi, Y., Hirano, T., and Mayumi, T., *Molecular design of polyvinylpyrrolidone-conjugated interleukin-6 for enhancement of in vivo thrombopoietic activity in mice*. J Control Release, 2000. **68**(3): p. 335-41.

van der Merwe, S.M., Verhoef, J.C., Verheijden, J.H., Kotze, A.F., and Junginger, H.E., *Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs*. Eur J Pharm Biopharm, 2004. **58**(2): p. 225-35.

Wajcberg, E., Miyazaki, Y., Triplitt, C., Cersosimo, E., and DeFronzo, R.A., *Dose-response effect of a single administration of oral hexyl-insulin monoconjugate 2 in healthy nondiabetic subjects*. Diabetes Care, 2004. **27**(12): p. 2868-73.

Xiong, X.Y., Li, Y.P., Li, Z.L., Zhou, C.L., Tam, K.C., Liu, Z.Y., and Xie, G.X., *Vesicles from Pluronic/poly(lactic acid) block copolymers as new carriers for oral insulin delivery*. J Control Release, 2007. **120**(1-2): p. 11-7.

Yoo, H.S. and Park, T.G., *Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer*. J Control Release, 2001. **70**(1-2): p. 63-70.

Zhang, N., Ping, Q., Huang, G., Xu, W., Cheng, Y., and Han, X., *Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin*. Int J Pharm, 2006. **327**(1-2): p. 153-9.

Ziv, E. and Bendayan, M., *Intestinal absorption of peptides through the enterocytes*. Microsc Res Tech, 2000. **49**(4): p. 346-52.

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

CHAPITRE I :

Influence de la concentration en polymères sur les caractéristiques in vitro de nanoparticules d'insuline destinées à l'administration orale

Soumis à Drug Development and Industrial Pharmacy

Comme nous venons de l'exposer, l'encapsulation de l'insuline dans des nanoparticules en vue d'une administration orale a été étudiée par de nombreuses équipes de recherche ces 20 dernières années. Notre travail a consisté à optimiser une formulation de nanoparticules encapsulant 2 types différents d'insuline : une insuline humaine recombinante (Actrapid®) et une insuline asparte (Novorapid®) qui autorise une action plus rapide mais possède une durée d'action inférieure à l'insuline humaine après administration sous-cutanée. En effet, la substitution d'une proline par un acide aspartique en position 28 de la chaîne B permet de limiter la formation d'hexamères et donc d'accélérer l'absorption.

Nous avons procédé à l'encapsulation de l'insuline par une technique de double émulsion eau dans huile dans eau. Cette méthode d'encapsulation est une méthode de choix pour les principes actifs hydrophiles. Les polymères utilisés étaient la poly- ϵ -caprolactone, polymère biocompatible et biodégradable, et l'Eudragit® RS, polyméthacrylate biocompatible mais non biodégradable. L'Eudragit® RS a été choisi pour ses caractéristiques physiques : ses groupements ammonium quaternaires lui confèrent une charge globale positive qui va pouvoir interagir avec le mucus intestinal chargé négativement et ainsi permettre une muco-adhésion des nanoparticules sur la paroi de l'intestin. L'absorption de l'insuline libérée sera alors facilitée. La PCL étant biodégradable, la libération de l'insuline suite à la dégradation des particules *in vivo*, sera progressive.

Le but de cette étude était d'observer l'influence du rapport de polymères sur la charge globale des particules, leur taille moyenne, le taux d'encapsulation des insulines et l'efficacité de libération du principe actif *in vitro*. Les différentes proportions choisies de polymères étaient de 0, 25, 50, 75 et 100 % (m/m), soit RS 100 %, RS/PCL 75/25, RS/PCL 50/50, RS/PCL 25/75 et PCL 100 %. Un essai préliminaire *in vivo* a également été réalisé avec la formulation de nanoparticules de Novorapid® à partir d'un mélange 50/50. Les particules ont été administrées à des rats rendus diabétiques par administration intraveineuse de streptozotocine.

Une étape importante de ce travail a été d'adapter des techniques de dosage CLHP de l'insuline à partir de données bibliographiques, à notre formulation. En effet, la plupart des travaux effectués avec l'insuline utilisent des méthodes enzymatiques

(enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA) ou immunologiques (radio-immunoassay-RIA) afin de doser l'insuline. Ces techniques restent coûteuses, nécessitent un matériel particulier (RIA) et un personnel spécialisé. Etant donné le nombre important de dosages qu'a nécessité notre travail, une technique CLHP semblait plus adaptée et moins difficile à mettre en œuvre.

Les résultats obtenus montrent que la proportion de polymères dans la formulation ne semble pas avoir beaucoup d'influence sur les caractéristiques *in vitro* des particules, mis à part sur les particules composées de PCL seule. En effet, le taux d'encapsulation des insulines ne varie pas (environ 96 %) à part pour l'encapsulation de Novorapid® dans les particules composées exclusivement de PCL (35 %). La taille moyenne des particules vierges et chargées en Actrapid® est supérieure pour les particules de PCL 100 % et les potentiels de surface sont globalement positifs (+40 mV) sauf pour les particules de PCL qui restent légèrement négatifs (-14 mV). Concernant la libération *in vitro* d'insuline, même si les profils sont similaires quelle que soit la formulation (libération initiale rapide suivie d'un plateau), les particules de PCL se distinguent par le fait qu'elles relarguent de 2 à 3 fois moins de principe actif que les formulations contenant les deux polymères associés. L'étude préliminaire *in vivo* réalisée chez le rat diabétique a montré une diminution significative du glucose sanguin après administration orale de particules de Novorapid® comparativement à l'administration de NP vierges, démontrant que l'insuline encapsulée dans les nanoparticules est absorbée dans le tractus digestif à partir duquel elle peut rejoindre la circulation sanguine et exercer son activité hypoglycémiante.

Influence of polymers ratio on the in vitro characterization of insulin loaded nanoparticles based on poly- ϵ -caprolactone and Eudragit[®] RS for oral administration

M. Socha¹, A. Sapin¹, C. Damgé², N. Ubrich¹ and P. Maincent^{*, 1}

¹Laboratory of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, 5, Rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

²Institute of Physiology, Faculty of Medicine, 11, Rue Humman, 67000 Strasbourg, France

* Corresponding author. Tel: + 33 3 83 68 22 96; Fax: + 33 3 83 68 23 01; E-mail adress: philippe.maincent@pharma.uhp-nancy.fr

Keywords: nanoparticles, insulin, oral delivery, Eudragit, poly- ϵ -caprolactone

ABSTRACT

Nanoparticles loaded with commercial insulin (Actrapid[®] or Novorapid[®]) and based on different blends of a biodegradable polyester (poly- ϵ -caprolactone) and a polycationic non-biodegradable acrylic polymer (Eudragit[®] RS) were characterized *in vitro*. The mean diameter ranged from 320 to 590 nm. The zeta potential was positive whenever Eudragit[®] RS was part of the nanoparticles matrix. The encapsulation efficiency was around 96 % except for Novorapid[®]-loaded particles of poly- ϵ -caprolactone (only 35 %). *In vitro* release studies revealed a burst release of insulin from nanoparticles, which may be of interest for oral delivery. Novorapid loaded nanoparticles were orally administered to diabetic rats and allowed the glycemia to be decreased when compared with free nanoparticles.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a general health problem around the world. For the treatment of insulin-dependent diabetes mellitus, insulin therapy by injectable formulation is necessary. This mode of administration requires frequent daily subcutaneous injections in order to maintain adequate control of serum glucose levels: this is far from being the ideal method of treatment since insulin does not immediately reach the liver following injection. In addition, this route induces some disadvantages as pain, risk of hypoglycemia (due to a narrow therapeutic window), peripheral hyperinsulinemia (Kennedy, 1991), lipoatrophy, lipohypertrophy (Monaco, 1996), obesity with intensive therapy (Carlson, 1993), insulin neuropathy and insulin presbyopia. Therefore, there is a continuous search for improved insulin formulations in order to reproduce the physiological pattern of insulin secretion as close as possible and thereby minimize the complications of diabetes mellitus. Numerous attempts to deliver insulin by routes avoiding injections have been reported in the literature: buccal, nasal, oral, rectal, pulmonary, ocular, transdermal, vaginal and intrauterine (Brange, 1997; Owens, 2003; Peppas, 2006). Of all these routes, oral administration would be the most desirable on the long-term basis. However, enzymatic degradation by proteolytic enzymes and low absorption rates limit the oral bioavailability of insulin in human to less than 1% (Pauletti, 1996). Particles in the nanosized range, based on biodegradable and muco-adhesive polymers, are of particular interest as they could provide protection of sensitive proteins against enzymatic degradation and prolong intestinal residence time (Chen, 1998). Such a formulation would contribute not only to an improvement in the patient's condition, but also to a reduction of the risk of catching additional diseases associated with diabetes mellitus. Furthermore, the delivery of insulin to the liver via the portal circulation would be especially

desirable as the normal physiology of insulin will produce a similar effect to pancreas-secreted insulin (Lewis, 1996).

We have prepared insulin loaded nanoparticles by the double emulsion method. Two types of insulin were investigated: regular human insulin (Actrapid®) and aspart insulin (Novorapid®) which acts more rapidly and presents duration of action shorter than regular human insulin after subcutaneous injection. We have investigated the influence of polymers ratio on the *in vitro* characterization (mean diameter, zeta potential, encapsulation efficiency, release kinetic) of nanoparticles composed of a biodegradable polyester (poly-ε-caprolactone) and a polycationic non-biodegradable acrylic polymer (Eudragit® RS). Due to its polycationic groups, Eudragit® RS could favor mucoadhesion and has already demonstrated its properties to enhance oral delivery of insulin from nanoparticles (Damgé, 2007). As a preliminary test, one formulation was tested *in vivo* to evaluate the capacity of such preparation to release insulin in the gastro-intestinal tract and to decrease glycemia on diabetic rats.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Recombinant human insulins (Actrapid® and Novorapid®), provided by Novo Nordisk (Denmark) were used as model drugs. Poly-ε-caprolactone (PCL; MW 42,000 Da) was supplied by Aldrich Chemical Company (Milwaukee, USA) and a copolymer of acrylic and methacrylic acids which contents 0.5 to 0.8% of a quaternary ammonium groups (Eudragit® RS, MW 150,000 Da) was kindly supplied by Evonik (Darmstadt, Germany). Polyvinylalcohol (PVA, MW 30,000 Da, 88% hydrolyzed) was purchased from Sigma (Saint-Louis, USA) and chosen as a surface active agent for the second emulsion. All other chemical reagents were of analytical grade.

Methods

Preparation of nanoparticles

The preparation of nanoparticles was based on water in oil in water (w/o/w) emulsification solvent evaporation method. The technique was optimised as follows: 1 mL of insulin aqueous solution (100 IU/mL) was first emulsified by sonication by using an ultrasound probe (Vibra cell 72 434, BioBlock Scientific, Strasbourg, France) at amplitude 60 and 50 W output (15 s) into methylene chloride (10 mL) containing 250 mg of dissolved polymers (Eudragit® RS and PCL in different proportions - RS 100%, RS/PCL 75/25, RS/PCL 50/50, RS/PCL 25/75, PCL 100 %; w/w). This first emulsion (w/o) was emulsified by sonication (60 s) in the same conditions into

40 mL of an aqueous PVA solution (0.1% w/v) to obtain the second emulsion (w/o/w). After solvent and water evaporation under reduced pressure during 20 min, nanoparticles were further isolated by centrifugation (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Germany) at 42,000 g for 20 min. The sedimented nanoparticles were resuspended in 3 mL of purified water and immediately frozen before freeze-drying.

Free nanoparticles were prepared according to the same preparation method.

For all formulations, the supernatant obtained after centrifugation was kept for the assay of insulin. Each formulation was made in triplicate.

Particle size and potential

Nanoparticles were analysed for their size distribution using laser diffusion in a Zetasizer (Malvern Instruments, UK) and for their surface charge using photon correlation spectroscopy with the same instrument. Each sample was measured in triplicate.

Encapsulation efficiency

The amount of entrapped insulin into nanoparticles was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) followed by UV detection by measuring the amount of free drug recovered in the supernatant after centrifugation of the nanoparticles suspension at 42,000 g for 20 min.

The HPLC system consisted of a SCL 10A system controller, a FCV 10AL pump, SIL 10AD autoinjector, a CTO 10A column oven and a SPD 10A UV detector (Shimadzu). Separation was performed at 40°C on a C-18 reversed phase column (250 x 4.6 mm, 5 µm, 300 Å - Vydac). An elution gradient was carried out with 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid in water (eluent A) and 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid in acetonitrile (eluent B). The gradient started at 25 % of B and was increased to 70 % in 10 min and then decreased to 25 % in 5 min. The flow rate was 1.2 mL/min, the injection volume was 50 µL and the detection wavelength was 214 nm. The data analysis was performed by using the Class-VP software from Shimadzu. The standard curve solution (0-1 IU/mL, $r^2=0.999$) was prepared by diluting the stock standard solutions in PVA 0.1 %.

In vitro release experiments

Fifty milligrams of freeze-dried nanoparticles were suspended in 20 mL of phosphate buffer (PBS pH 7.4) containing 0.1 % (v/v) of Tween[®] 80 and incubated into a bath at 37°C under gentle magnetic stirring (150 rpm). At determined intervals, 1 mL samples were removed, filtered through a 0.22 µm Millipore[®] filter and assayed for released drug. One mL of fresh

phosphate buffer was added to the suspension of nanoparticles after each sampling. The amount of insulin released was determined as described previously by HPLC at 214 nm. The standard curve solution (0-1 UI/mL, $r^2=0.998$) was prepared by diluting the stock standard solutions in PBS.

All release experiments were performed in triplicate.

In vivo study

The *in vivo* studies were carried out on male Wistar rats (250 mg, Charles River laboratories, L'Arbresle, France) which were housed in air-conditioned quarters under a photoperiod schedule of 12 h light/12 h dark. They received standard laboratory chow diet and tap water ad libitum. All experiments were carried out in accordance with the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC).

Diabetes was induced in animals by intravenous injection of streptozotocin (65 mg/kg diluted in phosphate buffer pH 4.5) as previously described (Damgé, 1988). Animals were considered diabetic when glycemia was over 300 mg/dL.

Before experiments, rats were overnight fasted (12 h). Novorapid loaded nanoparticles (RS/PCL 50/50, 50 IU/kg) aqueous suspension were orally administered to diabetic rats. In order to evaluate the effect of administration on glycemia, unloaded nanoparticles in aqueous suspension were orally administered as control. Blood samples were withdrawn from the tail vein at determined intervals: 0, 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 8 h and glycemia was measured with a glucometer.

Statistical analysis

Statistical comparisons were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett or a Bonferroni multicomparison test using the Instat 2.00 Macintosh software (Graph Pad Software, San Diego, CA). The difference was considered as significant when $p<0.05$.

RESULTS

Characterization of nanoparticles

As shown in table 1, the mean diameter of loaded and unloaded nanoparticles prepared with Eudragit® RS alone or with different amounts of PCL ranged from 315 to 695 nm. Actrapid® loaded nanoparticles were not significantly different from unloaded ones (340 nm) whereas the mean diameter of the Novorapid® loaded nanoparticles was larger (from 480 to 695 nm).

Nanoparticles prepared with PCL alone only displayed no major difference in their mean diameter (510 nm) whatever the type of encapsulated insulin.

Loaded or unloaded insulin nanoparticles prepared with Eudragit[®] RS alone or in combination with PCL were positively charged (from + 36 to + 44 mV) due to the quaternary ammonium groups of Eudragit[®] RS which were directed toward the continuous aqueous phase. However, nanoparticles prepared with PCL alone were quite negatively charged (-14 mV).

TABLE 1 Main physicochemical properties of the free insulin nanoparticles or insulin loaded nanoparticles (NP) prepared with different blends of Eudragit[®] RS and PCL. Data are shown as mean $\pm$ S.D. (n=3).

<i>Formulation</i>	<i>Mean diameter (nm)</i>			<i>Zeta potential (mV)</i>		
	Free NP	Actrapid [®]	Novorapid [®]	Free NP	Actrapid [®]	Novorapid [®]
RS 100%	345.7 $\pm$ 9.3	344.0 $\pm$ 8.3	479.2 $\pm$ 11.8	38.0 $\pm$ 0.5	41.0 $\pm$ 4.0	43.7 $\pm$ 1.8
RS/PCL 75/25	342.5 $\pm$ 8.1	363.4 $\pm$ 14.3	555.9 $\pm$ 4.2	37.5 $\pm$ 5.9	40.7 $\pm$ 1.8	40.7 $\pm$ 1.0
RS/PCL 50/50	339.7 $\pm$ 24.9	360.7 $\pm$ 10.6	695.2 $\pm$ 55.8	36.7 $\pm$ 1.4	41.8 $\pm$ 3.4	40.5 $\pm$ 0.7
RS/PCL 25/75	314.6 $\pm$ 5.9	322.9 $\pm$ 16.1	588.2 $\pm$ 18.9	38.5 $\pm$ 4.0	40.0 $\pm$ 2.1	38.0 $\pm$ 2.5
PCL 100%	506.0 $\pm$ 21.9	519.9 $\pm$ 34.5	505.6 $\pm$ 58.2	- 17.5 $\pm$ 2.5	- 9.5 $\pm$ 4.9	- 15.3 $\pm$ 6.2

As reported in table 2, at the exception of nanoparticles of Novorapid[®] prepared with PCL alone (36 %) the encapsulation efficiency of insulin in each formulation was very high (96 %) for Actrapid[®] or Novorapid[®] loaded nanoparticles,

TABLE 2 Encapsulation efficiency of insulin loaded nanoparticles prepared with different blends of Eudragit[®] RS and PCL. Data are shown as mean $\pm$ S.D. (n=3).

<i>Formulation</i>	<i>Encapsulation efficiency (%)</i>	
	Actrapid [®]	Novorapid [®]
RS 100%	96.4 $\pm$ 0.3	97.5 $\pm$ 0.1
RS/PCL 75/25	96.2 $\pm$ 0.2	96.9 $\pm$ 0.5
RS/PCL 50/50	96.3 $\pm$ 0.4	97.5 $\pm$ 0.4
RS/PCL 25/75	97.3 $\pm$ 0.4	95.4 $\pm$ 0.4
PCL 100%	95.4 $\pm$ 1.5	35.9 $\pm$ 12.2

***In vitro* drug release**

Figures 1 and 2 illustrate the *in vitro* release profiles of insulin in PBS at 37°C and pH 7.4 from Actrapid® and Novorapid® loaded nanoparticles, respectively.

FIGURE 1 Release kinetics of Actrapid® loaded nanoparticles prepared with different blends of Eudragit® RS and PCL. Data are shown as mean $\pm$ S.D. (n=3).

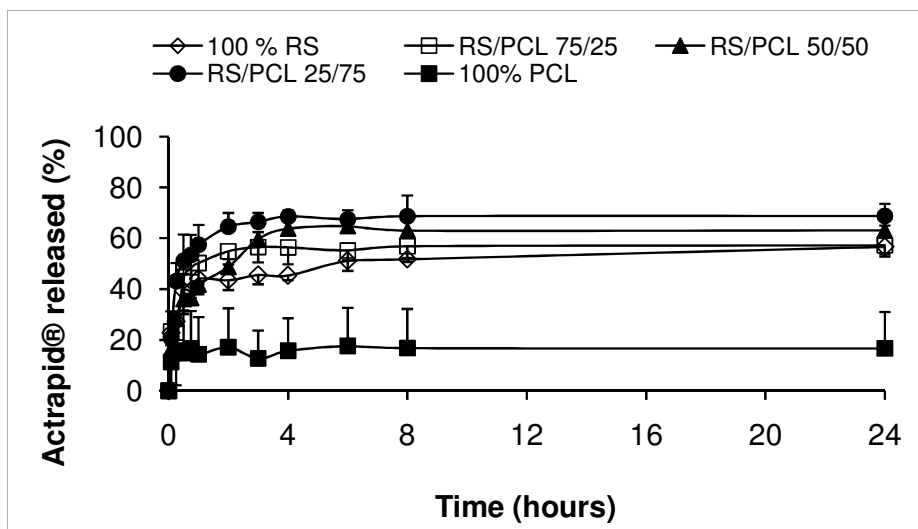
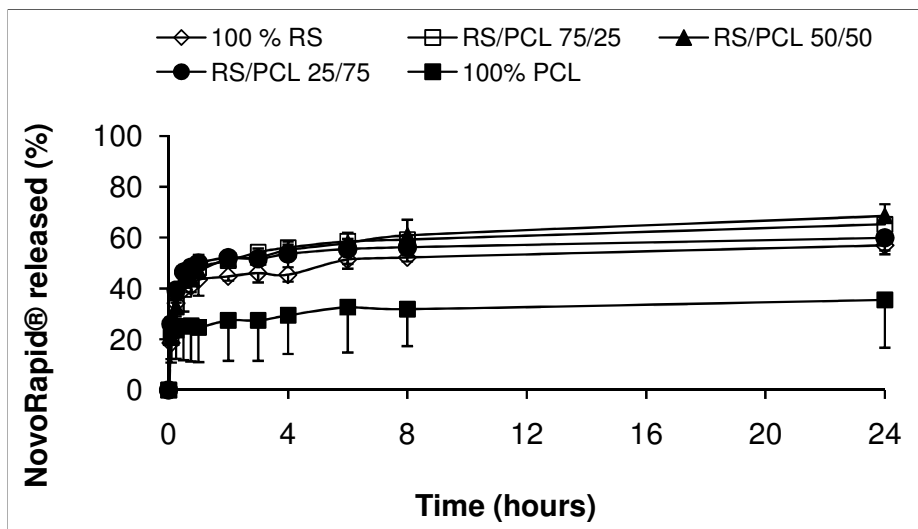


FIGURE 2 Release kinetics of Novorapid® loaded nanoparticles prepared with different blends of Eudragit® RS and PCL. Data are shown as mean $\pm$ S.D. (n=3).



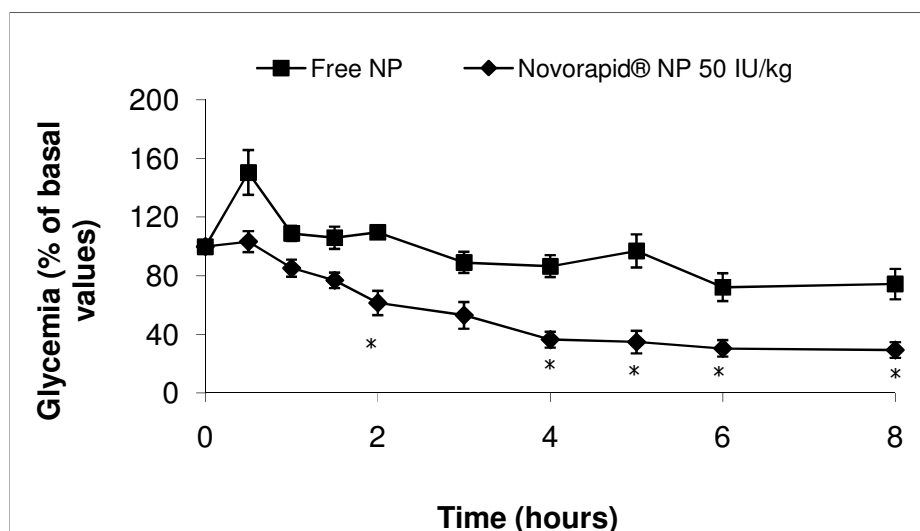
A biphasic release was observed for each formulation and for each type of insulin. Indeed, after an initial burst during which insulin was rapidly released over one hour, the drug release profiles

displayed a plateau characterized by a slow and incomplete release for an extended period of time. Nanoparticles prepared with Eudragit[®] RS alone or in combination with PCL exhibited higher drug release (from 55 to 70 %) than those prepared with PCL alone (from 17 to 35 %).

***In vivo* experiment**

As reported in figure 3, Novorapid[®] loaded nanoparticles orally administered in diabetic rats allowed a significant decrease of glycemia compared to rats treated with free nanoparticles from 2 to 8h after force-feeding. Glycemia was reduced by 39 % at 2h and until 70 % at 8h.

FIGURE 3 Glycemia after a single oral administration of free nanoparticles (NP) and Novorapid[®] loaded nanoparticles (50 IU/kg) based on Eudragit[®] RS and PCL (50/50). Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. (n=6). Statistically different from free nanoparticles. * $p < 0.05$



DISCUSSION

For the preparation of nanoparticles, the choice of the method is generally determined by the solubility characteristics of the drug. Since insulin is a water-soluble drug, the double emulsion solvent evaporation technique was selected. This process involves two steps: the first step consists in the formation of the water-in-oil emulsion and leads to the formation of droplets of insulin dispersed into the organic phase of polymers (Eudragit[®] RS and PCL alone or their blends) followed by the water-in-oil-in-water emulsion obtained by mixing the first emulsion into an aqueous solution of PVA (0.1 % w/v). The second step is the solvent evaporation from the droplets of the second emulsion leading to the precipitation of polymers which are insoluble

in water and consequently the solidification of the core of the particles and the entrapment of the drug.

The mean diameters of free and Actrapid[®] loaded nanoparticles prepared with Eudragit[®] RS alone or in combination with PCL were approximately the same (340 nm) whereas the Novorapid[®] loaded ones were larger (from 480 to 690 nm) (table 1). Due to their quaternary ammonium groups, Eudragit[®] RS has surface active properties able to stabilize the first emulsion and consequently hampers the coalescence of the droplets leading to minimize the diameter of the particles (Chernysheva, 2003). Since the particle size is related to a great extent to the stability of the first emulsion, it can be assumed that some excipients included in the commercial presentation of Novorapid[®] could interfere with Eudragit[®] RS. Indeed, Actrapid[®] contains zinc chloride, glycerol, metacresol, and either sodium hydroxide or hydrochloric acid. Novorapid[®] contains the same excipients than Actrapid[®] but also phenol, sodium chloride and disodium phosphate dehydrate which could act on the ionic strength of the medium, destabilize the first emulsion and consequently induce the coalescence of the droplets and finally increase the diameter of the nanoparticles comparatively with Actrapid[®] loaded nanoparticles. On the other hand, nanoparticles prepared with PCL alone were larger than nanoparticles containing Eudragit[®] RS (510 nm). It is emphasized that the lack of the surface active properties associated when Eudragit[®] RS is present induced the coalescence of the droplets of the first emulsion and increased the size of the nanoparticles. Insulin itself seems to have no effect on the mean diameter of nanoparticles prepared with PCL alone. Moreover, all nanoparticles formulations prepared with PCL alone showed a quite negative zeta potential (-14 mV). The magnitude of the measured zeta potential is an indication of the repulsive forces that are present and can be used to predict the long term stability of the nanoparticles suspension (Benita, 1993). When particles have a high negative or positive zeta potential, they tend to repel each other and have no tendency to aggregate. On the contrary, when particles have low absolute zeta potential values, there is no counteracting force to prevent their aggregation and flocculation. Since PCL nanoparticles displayed a lower zeta potential, their stability was lower. Indeed, they have tendency to aggregate and their mean diameter was higher.

On the other hand, table 1 shows that nanoparticles prepared with Eudragit[®] RS alone or in combination with PCL were positively charged (from + 36 to + 44 mV), due to the quaternary ammonium groups of Eudragit[®] RS. Although insulin (pI 5.4) is mainly negatively charged in the aqueous solution of PVA 0.1 % (w/v) (pH 6.5), we can observe that the addition of insulin in the formulation did not affect the zeta potential of the nanoparticles, thus proving that insulin

was encapsulated into the nanoparticles. Indeed, some authors have demonstrated that encapsulation of heparin (which is negatively charged) decreased the zeta potential of microparticles (Hoffart, 2003; Y. Jiao, 2002; Y. Y. Jiao, 2002); heparin was mainly adsorbed on the surface of the particles, involving a decrease of the zeta potential of free particles (from + 40 mV to - 30 mV). In the case of nanoparticles prepared with Eudragit® RS alone or in combination of PCL, the lack of zeta potential difference between free and loaded nanoparticles is in favor of the insulin encapsulation in the nanoparticles matrix.

As shown in table 2, the encapsulation efficiency of insulin was very high (96 %) except for nanoparticles of Novorapid® prepared with PCL alone (36 %). Since Eudragit® RS is a positively charged polymer and insulin is mainly negatively charged in our experimental conditions, electrostatic interactions occurred during the preparation which led to a low release of the drug and high entrapment efficiency. Indeed, all formulations containing Eudragit® RS (from 25 to 100 %) showed high encapsulation efficiency of insulin. The PCL polymer seemed to have no effect on the encapsulation efficiency of insulin in nanoparticles prepared with the blends of polymers. The formulation prepared with PCL alone and Novorapid® encapsulated only 36 % of drug. As shown previously, excipients contained in Novorapid® and not present in Actrapid® could interfere during the preparation and could explain the lower encapsulation efficiency of Novorapid® in nanoparticles prepared with PCL. The lower efficiency could be explained by i) the absence of electropositive charges of PCL that could retain the drug into nanoparticles by electrostatic forces, ii) the negative zeta potential of the nanoparticles and the specific excipients included in Novorapid® which could destabilize the medium, leading to the leak of insulin.

Figures 1 and 2 illustrate the *in vitro* release profile of each formulation, in pH 7.4 phosphate buffer containing 0.1 % (v/v) of Tween® 80, by representing the percentage of Actrapid® and Novorapid® release with respect to the amount of drug encapsulated, respectively. They were characterized by an initial burst during which insulin was rapidly released over one hour followed by a plateau characterized by an incomplete release of drug up to 24 hours. Although the entire encapsulated drug was not released within 24 h, the dissolution test was limited to this time since the goal of this research work was to prepare an oral system delivery which has to take into account the intestinal residence time. When nanoparticles are prepared by w/o/w method, water-soluble drugs and proteins show a significant tendency to migrate to the aqueous dissolution medium, thereby concentrating at the surface of the particles and generally involving a burst effect (Jameela, 1997). All formulations prepared with Eudragit® RS or with blends of Eudragit® RS and PCL released from 55 to 70 % of encapsulated drug, whereas nanoparticles

prepared with PCL alone exhibited less drug release (from 17 to 35 %). No significant difference could be observed between formulations containing Eudragit[®] RS, whatever its concentration. The higher drug release observed with Eudragit[®] RS alone or in combination with PCL, compared with PCL alone may be explained by the high hydrophobicity of PCL that reduced the wettability of the nanoparticles as well as the diffusion of the drug to the dissolution medium. In addition, Ha *et al.* (1997) have shown that the degradation of PCL was very slow in an aqueous medium because of its semi-crystallinity and hydrophobicity. This indicates that *in vitro* drug release was a result of diffusion and not a degradation of the polymer. This is also compatible with the short duration time of the release test which was limited to 24 hours. Nevertheless, *in vivo*, the release of insulin from such nanoparticles could be increased since the biological environment (i.e. enzymes) may partially degrade PCL. Although no significant difference was observed between formulations of Novorapid[®] and Actrapid[®] prepared with Eudragit[®] RS alone or in combination with PCL, the higher release was from nanoparticles prepared with the 25/75 blend proving that electrostatic interactions between Eudragit[®] RS and insulin did not interfere with the release of the drug.

As a first step, even if all formulations were able to release insulin, only one formulation was tested *in vivo* as a preliminary test to evaluate the ability of insulin loaded nanoparticles to decrease glycemia in rats. Previous works based on heparin loaded nanoparticles (Hoffart, 2006) have demonstrated that the blend 50/50 permitted the increase of anti-Xa activity after oral delivery. Moreover, a previous work has already studied Actrapid[®] loaded nanoparticles in diabetic rats (Damgé *et al.*, 2007). So, Novorapid[®] loaded nanoparticles based on the same blend of Eudragit[®] RS and PCL (50/50) were chosen to be orally administered to rats. The dose of 50 IU/kg was higher than the classical dose used for subcutaneous injection of insulin in the treatment of diabetes. Due to lower absorption figures associated with oral route, it was seemed necessary to administer a higher dose for oral route than for parenteral one. As shown in figure 3, the decrease of glycemia started 2h after oral administration. This lag time could be due to the time required for nanoparticles to reach the site of the gastro-intestinal tract where nanoparticles or free insulin released from nanoparticles could be absorbed. The release of insulin from nanoparticles is first based on the diffusion of the drug through the polymers matrix which also takes time. The encapsulation of insulin into polymeric nanoparticles permitted to protect insulin against degradation by proteolytic enzymes (i.e. trypsin, chymotrypsin) as previously shown by Damgé *et al.* (1997) with poly(alkylcyanoacrylate) nanospheres. Indeed, non-encapsulated insulin does not affect glycemia after oral delivery. The quaternary ammonium groups of Eudragit[®] RS confer a global positive zeta potential to nanoparticles which can interact with the

negative charges of intestinal mucus (due to the presence of sialic acid in its composition). These interactions could be responsible for mucoadhesion of nanoparticles on the surface of the intestinal barrier, allowing a closer intimacy of contact between drug and mucus membrane at the absorption sites, thus enhancing the permeability as well as reducing the local degradation of the drug. Insulin loaded nanoparticles and/or insulin released from nanoparticles could be uptaken by three potential mechanisms: i) uptake via a paracellular pathway, ii) transcytosis or receptor-mediated transcytosis and transport via the epithelial cells of the intestinal mucosa, iii) lymphatic uptake via the M-cells of the Peyer's patches mostly abundant in the ileum (Damgé, 2008). Mucoadhesion of cationic nanoparticles made of Eudragit® RS to mucin layer on Caco-2 cells has already been demonstrated by Lamprecht *et al.* (2006). The mechanism was governed by non-specific particle adhesion to the epithelial barrier followed by a replacement of the drug on the particle surface by mucin. The free drug was then actively either taken up into or transported through the cells. This mechanism is in line with a transport phenomenon described for enhanced particle deposition close to biological barriers, leading to a highly increased concentration of the entrapped drug at the apical side being responsible for enhanced absorption by a drug gradient concentration towards the basolateral compartment.

We have demonstrated the ability of nanoparticles based on different blends of PCL and Eudragit® RS to encapsulate and to release *in vitro* two types of insulin. It seems that the ratio of polymers did not influence the encapsulation efficiency of the drug, except for Novorapid® loaded nanoparticles based only on PCL. Regarding the *in vitro* kinetic profiles, nanoparticles composed of PCL alone displayed a lower release when compared with all formulations based on the blend of polymers or Eudragit® RS alone. The effect of oral administration of Novorapid® loaded nanoparticles (50/50) on glycemia of diabetic rats has proven that insulin was still active after encapsulation and was absorbed by the gastro-intestinal tract. Compared with subcutaneous administration of insulin, such nanoparticles allowed a hypoglycemic effect from 2 to 8 h after oral delivery to be observed. Insulin nanoparticles could represent an interesting dosage form to increase the compliance and the comfort of diabetic patients.

REFERENCES

Benita, S., & Levy, M. Y. (1993). Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J Pharm Sci*, 82(11), 1069-1079.

- Brange, J., & Langkjaer, L. (1997). Insulin formulation and delivery. *Pharm Biotechnol*, 10, 343-409.
- Carlson, M. G., & Campbell, P. J. (1993). Intensive insulin therapy and weight gain in IDDM. *Diabetes*, 42(12), 1700-1707.
- Chen, H., & Langer, R. (1998). Oral particulate delivery: status and future trends. *Adv Drug Deliv Rev*, 34(2-3), 339-350.
- Chernysheva, Y., Babak, V., Kildeeva, N., Boury, F., Benoit, J. P., Ubrich, N., & Maincent, P. (2003). Effect of the type of hydrophobic polymers on the size of nanoparticles obtained by emulsification-solvent evaporation. *Mendeleev Commun.*, 13, 65-68.
- Damgé, C., Maincent, P., & Ubrich, N. (2007). Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *J Control Release*, 117(2), 163-170.
- Damgé, C., Michel, C., Aprahamian, M., & Couvreur, P. (1988). New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier. *Diabetes*, 37(2), 246-251.
- Damgé, C., Reis, C. P., & Maincent, P. (2008). Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. *Expert Opin Drug Deliv*, 5(1), 45-68.
- Damgé, C., Vranckx, H., Balschmidt, P., & Couvreur, P. (1997). Poly(alkyl cyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. *J Pharm Sci*, 86(12), 1403-1409.
- Ha, J.-H., Kim, S.-H., Han, S.-Y., Sung, Y.-K., Lee, Y.-M., Kang, I.-K., & Cho, C.-S. (1997). Albumin release from bioerodible hydrogels based on semi-interpenetrating polymer networks composed of poly([epsilon]-caprolactone) and poly(ethylene glycol) macromer. *J Control Release*, 49(2-3), 253-262.
- Hoffart, V., Lamprecht, A., Maincent, P., Lecompte, T., Vigneron, C., & Ubrich, N. (2006). Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. *J Control Release*, 113(1), 38-42.
- Hoffart, V., Ubrich, N., Lamprecht, A., Bachelier, K., Vigneron, C., Lecompte, T., Hoffman, M., & Maincent, P. (2003). Microencapsulation of low molecular weight heparin into polymeric particles designed with biodegradable and nonbiodegradable polycationic polymers. *Drug Deliv*, 10(1), 1-7.
- Jameela, S. R., Suma, N., & Jayakrishnan, A. (1997). Protein release from poly(epsilon-caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques: a comparative study. *J Biomater Sci Polym Ed*, 8(6), 457-466.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., Lecompte, T., & Maincent, P. (2002). In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. *Circulation*, 105(2), 230-235.
- Jiao, Y. Y., Ubrich, N., Hoffart, V., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., & Maincent, P. (2002). Preparation and characterization of heparin-loaded polymeric microparticles. *Drug Dev Ind Pharm*, 28(8), 1033-1041.

- Kennedy, F. P. (1991). Recent developments in insulin delivery techniques. Current status and future potential. *Drugs*, 42(2), 213-227.
- Lamprecht, A., Koenig, P., Ubrich, N., Maincent, P., & Neumann, D. (2006). Low molecular weight heparin nanoparticles: mucoadhesion and behaviour in Caco-2 cells. *Nanotechnology*, 17(15), 3673-3680.
- Lewis, G. F., Zinman, B., Groenewoud, Y., Vranic, M., & Giacca, A. (1996). Hepatic glucose production is regulated both by direct hepatic and extrahepatic effects of insulin in humans. *Diabetes*, 45(4), 454-462.
- Monaco, L., Geffken, G., & Silverstein, J. H. (1996). Accuracy of injection site identification among children with insulin dependent diabetes mellitus: a comparison of traditional and new visual aids. *Clin Pediatr (Phila)*, 35(4), 191-197.
- Owens, D. R., Zinman, B., & Bolli, G. (2003). Alternative routes of insulin delivery. *Diabet Med*, 20(11), 886-898.
- Pauletti, G. M., Gangwar, S., Knipp, G. T., Nerurkar, M. M., Okumu, F. W., Tamura, K., Siahaan, T. J., & Borchardt, R. T. (1996). Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs. *J Control Release*, 41(1-2), 3-17.
- Peppas, N. A., & Kavimandan, N. J. (2006). Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. *Eur J Pharm Sci*, 29(3-4), 183-197.

CHAPITRE II :

Nanoparticules d'Eudragit et Poly- ϵ -
caprolactone pour l'administration orale
d'insuline asparte dans le traitement du
diabète

Soumis à Journal of Controlled Release

Suite aux résultats de l'étude précédente, il a semblé important d'approfondir les recherches concernant l'administration orale de nanoparticules d'insuline. Des travaux antérieurs ayant déjà été effectués à partir d'insuline humaine recombinante (Actrapid®), nous avons voulu les comparer à des nanoparticules d'insuline asparte (Novorapid®) quant à leur capacité à libérer l'insuline *in vivo* dans le tractus digestif et à jouer leur rôle hypoglycémiant. Comme nous l'avons exposé, l'insuline Novorapid® possède sur la chaîne B, une substitution en position 28 d'une proline par un résidu acide aspartique, augmentant ainsi la charge de la molécule et donc les forces de répulsion, permettant ainsi de limiter la formation d'hexamères. Notre hypothèse repose sur le fait que, restant préférentiellement sous forme de monomères, l'insuline asparte serait mieux absorbée par la muqueuse intestinale, exerçant son action plus rapidement, augmentant donc l'efficacité des nanoparticules.

Les nanoparticules ont été préparées selon le même protocole que lors de l'étude précédente à partir d'un mélange 50/50 de poly-ε-caprolactone et Eudragit® RS. Après avoir procédé aux caractérisations *in vitro* (diamètre moyen, potentiel zêta, cinétique de dissolution), des tests ont été effectués *in vivo* par administration des particules à des rats rendus diabétiques par administration de streptozotocine.

Afin de vérifier le maintien de l'activité hypoglycémiante de l'insuline après encapsulation dans les nanoparticules, l'administration a été réalisée par voie sous-cutanée dans un premier temps, comparativement à une solution d'insuline administrée de la même manière. Les rats *a jeun* ont reçu une dose de 10 UI/kg, quelle que soit la formulation d'insuline. La glycémie des animaux a été mesurée avant et jusqu'à 24 heures après l'administration.

Dans un deuxième temps, les nanoparticules ont été administrées par voie intragastrique aux animaux diabétiques. Deux types d'expériences ont alors été effectués en administrant des nanoparticules chargées en insuline comparativement à des nanoparticules vierges. L'influence de la concentration en insuline a tout d'abord été observée sur la glycémie des rats *a jeun* en administrant des formulations aux doses de 25, 50 ou 100 UI/kg. Puis, la réponse à une surcharge en glucose a été étudiée suite à l'administration orale des nanoparticules d'insuline à la dose de 50 UI/kg et de nanoparticules vierges servant de contrôle. Après l'administration des

nanoparticules, le test de tolérance au glucose a consisté à administrer du glucose par voie orale à la dose de 2g/kg aux rats diabétiques à des temps déterminés (de 2 à 72 h). La glycémie des animaux a été relevée avant la surcharge en glucose puis de 10 à 120 minutes après le début du test. Ce test permet d'étudier l'activité des particules d'insuline au cours du temps face à une surcharge en glucose.

Une expérience complémentaire a permis de mesurer l'insulinémie suite à l'administration de nanoparticules d'insuline par voie orale à la dose de 50 UI/kg, de 30 minutes à 24 h.

Les résultats expérimentaux montrent que l'insuline asparte reste active après son encapsulation au sein des nanoparticules. En effet, une diminution de la glycémie est observée suite à leur administration sous-cutanée.

D'autre part, il semble que la concentration en insuline sur l'efficacité hypoglycémiante des nanoparticules administrées par voie orale soit différente de celle observée avec les nanoparticules d'Actrapid®. En effet, seule la formulation administrée à la dose de 50 UI/kg permet une diminution significative de la glycémie. Ces même nanoparticules augmentent la tolérance au glucose depuis 6 h et jusqu'à 24 h après leur administration. De plus, deux pics d'insuline ont été observés à 6 et 12 h.

Cette étude démontre que, comparativement à des nanoparticules d'Actrapid®, les nanoparticules de Novorapid® exercent, à la posologie de 50 UI/kg, une activité hypoglycémiante plus prolongée après administration orale à des rats diabétiques.

**ϵ -Polycaprolactone/Eudragit nanoparticles
for oral delivery of Aspart-insulin in the treatment of diabetes**

*Christiane Damgé^{*1, 2}, Marie Socha², Nathalie Ubrich², Philippe Maincent²*

^{*1}University Louis Pasteur, Faculty of Medicine, Institute of Physiology, 11, rue Humann, 67000-Strasbourg, France.

²Laboratory of Pharmaceutical Technology, EA 3452, Faculty of Pharmacy, 5, rue Lebrun, BP 80403, 54001-Nancy Cedex, France.

Short title: Oral insulin

***Corresponding author :**

Dr. Christiane Damgé

Faculty of Medicine. Institute of Physiology. 11, rue Humann. 67000-Strasbourg (France).

Fax : +33 (0)3 90 24 31 21

Phone : +33 (0)3 90 24 34 44

E-mail : Christiane.Damge@medecine.u-strasbg.fr

Abstract

Nanoparticles prepared with a blend of a biodegradable polyester (poly(ϵ -caprolactone)) and a polycationic non-biodegradable acrylic polymer (Eudragit[®] RS) have been used as a drug carrier for oral administration of a short-acting insulin analogue, aspart-insulin. Insulin nanoparticles, about 700 nm in diameter, encapsulated 97.5 % of insulin and were able to release about 70% of their content in vitro in a neutral medium over 24 hours. When administered orally to diabetic rats, insulin-loaded nanoparticles (50 IU/kg) decreased fasted glycemia for a prolonged period of time and improved the glycemic response to glucose in a time - dependent manner, with a maximal effect between 12 and 24h after their administration. In parallel, plasma insulin levels increased. However, higher (100 IU/kg) and lower (25 IU/kg) doses of insulin did not exert any biological effect. It is concluded that polymeric nanoparticles composed of poly(ϵ -caprolactone) / Eudragit[®] RS are able to preserve the biological activity of the insulin analogue aspart-insulin; however, the post-prandial effect was prolonged more than 24 hours by comparison with regular insulin working only 6-8 hours. This effect may be explained by the monomeric configuration of aspart-insulin which is probably better taken up by the intestinal mucosa than regular insulin.

Key-words: Nanoparticles, oral insulin, insulin analogues, diabetes

Introduction

Insulin is a 51 amino acid peptide discovered in 1921-1922 by Banting and Best, together with Macleod and Collip [1]. This hormone, produced by the pancreatic β cells, controls the level of sugar in the blood by facilitating the uptake of glucose in the cells of the organism, especially liver, muscle and adipose tissue. Thus, physiologically, insulin counteracts the increase in blood glucose levels after a meal. In type 1 diabetes due to the autoimmune destruction of β cells and in type 2 diabetes characterized by a dysfunction of insulin, insulin resistance and a reduction of the number of β -cells, the parenteral administration of insulin normalizes blood glucose levels and prevents the complications of diabetes such as neuropathy, nephropathy, blindness, cardiac failure, stroke and amputation [2].

Insulin is generally parenterally administered but alternative routes of administration (oral, nasal, rectal, pulmonary and ocular) have been extensively investigated [3]. Among them, the oral route is the most physiological and comfortable. Indeed, insulin absorbed by the intestinal epithelium reaches the liver through the portal vein and can directly inhibit hepatic glucose output [4]. However, insulin is less absorbed by the gastrointestinal tract ($< 0.5\%$ under physiological conditions) and in addition, it is strongly degraded by proteolytic enzymes i.e. the same enzymes that degrade dietary peptides and proteins. In order to protect insulin against degradation and to improve its absorption, insulin has been associated to antiproteases [5], hydrogels [6], or absorption enhancers such as cyclodextrins [7], bile salts and surfactants [8, 9]. Insulin was also modified chemically [10-13] or associated with oligoarginine, a cell-penetrating peptide [14]. Another strategy was to associate insulin to drug delivery systems such as liposomes, hydrogels, lipid particles or polymeric nano- or microparticles [4, 15]. These particles must be biocompatible, stable in suspension, and should be degraded under physiological conditions.

As early as 1988 [16] insulin was associated to poly(alkylcyanoacrylate) nanocapsules and a prolonged reduction of glycemia was observed after a single oral administration to diabetic rats. This reduction was dose dependent and lasted up to 20 days with a dose of 50 IU/kg of encapsulated insulin. These results were confirmed in dogs [17] and demonstrated the feasibility of oral delivery of insulin using polymeric biodegradable nanocapsules as a drug carrier. Later on, other types of nanoparticles were developed for oral delivery of insulin. The polymers were based on polymethacrylic acid [18], poly(lactic acid) [19] and poly(lactide-co-glycolide) [20-22], chitosan [23-25] and alginate [26-28]. Nanoparticles composed of solid lipids [29, 30], CAPIC (calcium phosphate-PEG-insulin-casein) [31] or gold [32] were also developed. Generally, these formulations, orally administered mostly to diabetic animals, induced a sustained reduction in

blood glucose [4]. In a recent work [33], we used nanoparticles composed of a biodegradable polymer (poly(ϵ -caprolactone)), and a non - degradable but biocompatible mucoadhesive polymer (Eudragit[®] RS) with polymers ratio 50/50. These insulin-loaded nanoparticles (100 IU/kg) reduced glycemia for a prolonged period of time (from 4h up to 24 h) with a maximal effect after 6-8 h (-40%). This effect was dose-dependent. After labeling of insulin with fluorescein isothiocyanate, it was demonstrated that insulin was absorbed by the intestinal mucosa probably due to the mucoadhesive properties of the polycationic polymer, i.e. Eudragit[®] RS [33].

All insulin nanoparticle formulations developed for oral delivery of the peptide used regular insulin [4]. Regular insulin is a peptide of 5.8 kDa, composed of two peptide chains referred to as the A chain and B chain linked together by two disulfide bonds, and an intramolecular disulfide bond formed within the A chain. Insulin molecules have a tendency to form dimers in solution due to hydrogen bonding between the C-terminals of B chains. At high concentrations and even at low concentrations in presence of zinc ions, insulin dimers form hexamers. These interactions have important clinical implications. Monomers and dimers readily diffuse into blood while hexamers diffuse poorly. Thus, absorption of insulin preparations with a high proportion of hexamers is delayed. This property has been taken into account for the pharmaceutical development of long-acting insulin analogues [34]. In contrast, fast-acting insulin analogues based on the monomeric form of insulin have also been developed. In particular, aspart-insulin (marketed by Novo Nordisk, Denmark, as NovoRapid[®]) was created through recombinant DNA technology so that the amino acid, B28, which is normally proline, is substituted with an aspartic acid residue. This analogue has increased charge repulsion which prevents the formation of hexamers; thus, monomeric insulin is absorbed three times faster than human insulin after subcutaneous injection, leading to a more rapid rise in plasma insulin concentration and an earlier hypoglycemic response [35, 36]. We hypothesized that the aspart-insulin analogue, remaining monomeric, should be able to be better absorbed by the intestinal mucosa, and in consequence should improve the biological efficacy of oral insulin nanoparticles. Thus, the present study was designed to develop a formulation of aspart-insulin nanoparticles composed of poly(ϵ -caprolactone) / Eudragit[®] RS, to characterize them physico-chemically (diameter, zeta-potential, insulin loading, in vitro release of insulin) and to study the biological efficacy after oral administration in streptozotocin-induced diabetic rats.

Materials and Methods

Material

Aspart- insulin (Novorapid[®]) was kindly provided by Novo-Nordisk (Paris, France). Poly(ϵ -caprolactone) (MW = 42,000) was purchased from Sigma-Aldrich Chimie (L'Isle d'Abeau Chesnes, France) and Eudragit[®] RS (methacrylic acid esters with a small proportion of trimethylammonioethyl methacrylate chloride) (MW = 150,000) was a gift from Röhm Pharma (Darmstadt, Germany). Polyvinylalcohol (PVA, MW = 30,000, 88% hydrolyzed) and streptozotocin were obtained from Sigma-Aldrich Chimie. All other chemicals or solvents were of analytical grade.

Preparation of nanoparticles

Nanoparticles were prepared by the multiple emulsion technique previously described by Hoffart et al [37]. Briefly, 1 mL of an aqueous solution of insulin (100 IU) was first emulsified, by sonication for 30 seconds, in methylene chloride (10 mL) containing 250 mg of polymers (PCL/Eudragit[®] RS 50/50). The resulting water-in-oil emulsion was thereafter poured into 40 mL of a polyvinyl alcohol aqueous solution (0.1%, m/v) and sonicated for 1 minute, involving the formation of the second water-in-oil-in-water emulsion. After evaporation of methylene chloride under reduced pressure, the nanoparticles were isolated by centrifugation (45,000 g, 20 min). The nanoparticles were washed three times with deionized water then centrifuged again and kept in suspension in water until use. For control experiments, empty nanoparticles were formulated in the same way.

Characterization of nanoparticles

The mean diameter and zeta-potential of nanoparticles were determined by photon correlation spectroscopy (ZetaSizer II, Malvern Instruments, Orsay, France). The amount of insulin entrapped within polymeric nanoparticles was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) [38].

In vitro experiments

Fifty milligrams of freeze-dried insulin-loaded nanoparticles were suspended in 20 mL of saline phosphate buffer (PBS, pH 7.4) containing 0.1% Tween[®] 80 and incubated at 37°C under gentle magnetic stirring (300 rpm). At determined intervals (5, 15, 30, 45 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 24 h), 1 mL samples were removed and replaced by 1 mL of fresh phosphate buffer added to the

suspension of nanoparticles. Insulin was determined in each sample by HPLC as previously described [38].

In vivo experiments in diabetic rats

Animals - Adult male Wistar rats (Dépré, St Doulchard, France) were housed in air-conditioned quarters under a photoperiod schedule of 12 h light/12 h dark. They received standard laboratory chow diet (UAR, Villemoisson-sur-Orge, France) and tap water, available ad libitum. All experiments were carried out in accordance with the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC).

Induction of diabetes – Diabetes was induced in male Wistar rats (250 ± 30 g) by an injection of streptozotocin (65 mg/kg) in sodium chloride (0.9%) as previously described [33]. Rats were considered diabetic when glycemia was higher than 300 mg/dL about two weeks after streptozotocin treatment.

Subcutaneous (s.c.) administration of insulin-loaded nanoparticles and free insulin - Prior to oral administration and in order to verify that insulin encapsulated into nanoparticles was still active, loaded nanoparticles were injected to fasted diabetic rats (10 IU/kg body weight). Non-encapsulated insulin (10 IU/kg) and saline were administered in control animals. Glycemia, in blood samples withdrawn from the tail vein, was measured before injection and 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 and 24 h using a glucometer (Accu-check Go, Roche Diagnostics, Meylan, France). Rats were maintained fasted during the experiment up to 8 hours and fed thereafter.

Intragastric administration of empty and insulin-loaded nanoparticles – In order to investigate the biological efficacy of insulin-loaded nanoparticles administered orally, two sets of experiments were performed. In the first experiment, the effect of oral insulin on glycemia was analyzed as a function of insulin concentration. To this intent, unloaded (control) and insulin-loaded nanoparticles were given intragastrically as a single administration to overnight fasted (water at libitum) diabetic rats at the dose of 25, 50 and 100 IU/kg body weight. In the second experiment, the response of oral insulin to a glucose overload was investigated. Thus, unloaded (control) and insulin-loaded nanoparticles (50 IU/kg) were given intragastrically as a single administration to overnight fasted diabetic rats. Then 2, 5, 12, 24, 48 and 72 hours later, these animals received orally glucose (2 g/kg). Glycemia was measured in blood sampled from the tail vein before oral glucose and at regular time intervals thereafter, from 10 min up to 120 min.

Plasma insulin after oral administration of insulin-loaded nanoparticles. Insulin-loaded nanoparticles (50 IU/kg) were administered orally to overnight fasted diabetic rats. Blood samples from the tail vein were collected under a slight anesthesia prior and sequentially from 30

min to 24 hours after the administrations. Plasma insulin concentrations were measured by radioimmunoassay (Insulin-CT kit from CIS Bio International, Gif-sur-Yvette, France).

Statistical analysis

The means and standard errors for all values were calculated. For group comparisons a one way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett or a Bonferroni multicomparison test were applied, using the InStat 2.00 Macintosh software (Graph Pad Software, San Diego, CA). The difference was considered as significant when $P < 0.05$.

Results

Structure and characterization of nanoparticles

When analyzed by laser light scattering, insulin-loaded and empty nanoparticles showed a homogeneous size distribution with a mean diameter of 695 ± 56 nm and 340 ± 25 nm respectively. They were positively charged (40.5 ± 0.7 mV versus 36.7 ± 1.4 mV for unloaded nanoparticles) and encapsulated a high amount of insulin (97.5 ± 0.4 %) (table 1).

Table 1. Characteristics of insulin - loaded nanoparticles

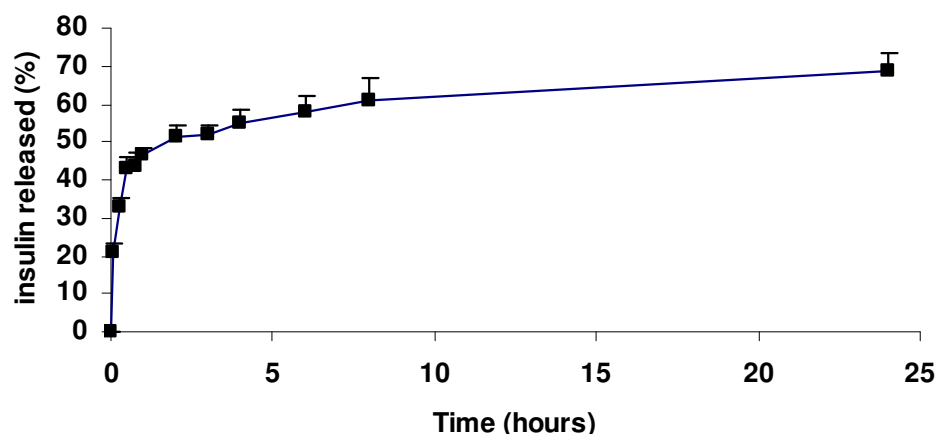
	Unloaded NP	Insulin-loaded NP
Mean diameter (nm)	340 ± 25	695.2 ± 55.8
Zeta potential (mV)	36.7 ± 1.4	40.5 ± 0.7
Encapsulation efficiency (%)	-	97.5 ± 0.4

Data are means $\pm$ SD (n=3).

In vitro release of insulin

Figure 1 illustrates the in vitro release profile of insulin from insulin nanoparticles in PBS at 37°C and pH 7.4. The release profile showed two phases: an initial burst release during which a significant amount of insulin was released within 30 minutes (43.1 ± 2.6 %). This level increased up to 46.84 ± 1.78 % after 1 hour and slightly increased up to 68.6 ± 4.6 % after 24 hours.

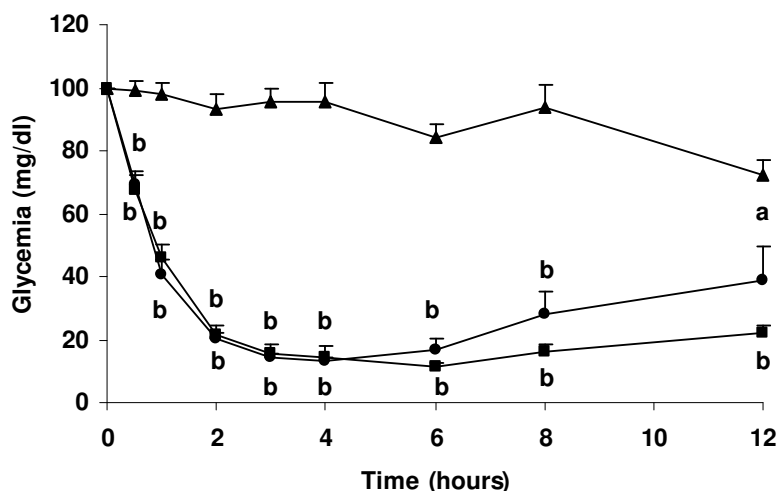
Figure 1. In vitro release profile of insulin from insulin-loaded nanoparticles in pH 7.4 saline phosphate buffer containing 0.1% Tween[®] 80. Results are means $\pm$ S.D. of three experiments.



Effect of subcutaneous administration of insulin nanoparticles on glycemia

Blood glucose profiles following subcutaneous injection of insulin-loaded nanoparticles and non-encapsulated insulin to diabetic rats at the dose of 10 IU/kg are illustrated in figure 2.

Figure 2. Profiles of glycemia after a subcutaneous administration of free aspart-insulin (squares), insulin-loaded nanoparticles (circles) or saline (triangles) in fasted diabetic rats. The administrated dose of insulin was 10 IU/kg. Before the injections, glycemia was 324 ± 26 mg/dL. Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. (n = 6-8 animals per group). Statistically different from saline (a) $p < 0.05$; (b) $p < 0.001$.



When compared to the glycemic profile of control animals receiving saline, encapsulated insulin as well as non encapsulated insulin rapidly reduced insulin by 32 % ($p < 0.001$) after half an hour and 55-59 % ($p < 0.001$) after 1 hour. The maximal reduction (-85 to -90 %) was observed between 3 and 6 hours. Then, glycemia increased slowly but faster after encapsulated insulin

injection (-61 %, $p<0.05$ after 12 hours) than after free insulin injection (-78 %, $p<0.001$ after 12 hours). Finally, the rats were fed again after 12 hours; the glycemia of the three groups increased and after 24 hours, the values of both groups treated with encapsulated and non-encapsulated insulin reached the control group treated with saline. None significant difference was observed between the three groups.

Effect of oral administration of insulin nanoparticles on glycemia

As illustrated in fig. 3A, insulin nanoparticles intragastrically administered at the dose of 50 IU/kg in diabetic fasted rats, reduced significantly glycemia from half an hour (-29 %, $p<0.05$) . The glycemia continued to decrease and attained the maximum decrease after 6 to 8 hours (-53 %, $p<0.01$). In contrast, a lower (25 IU/kg) and a higher dose (100 IU/kg) of encapsulated insulin slightly reduced glycemia by comparison with the profile observed after oral administration of empty nanoparticles but this decrease was not significant. This was confirmed by the calculation of the areas under the curve (trapezoidal method) over 8 hours (fig. 3B). Indeed, 50 IU/kg insulin nanoparticles reduced this area by 40 % ($p<0.01$) while the two other doses (25 and 100 IU/kg) reduced it only by 16 and 14% (NS) respectively compared to the area obtained with unloaded nanoparticles.

Thus, aspart-insulin associated to nanoparticles remains biologically active after oral administration to fasted diabetic rats at a dose of 50 IU/kg but lower and higher doses were less efficient.

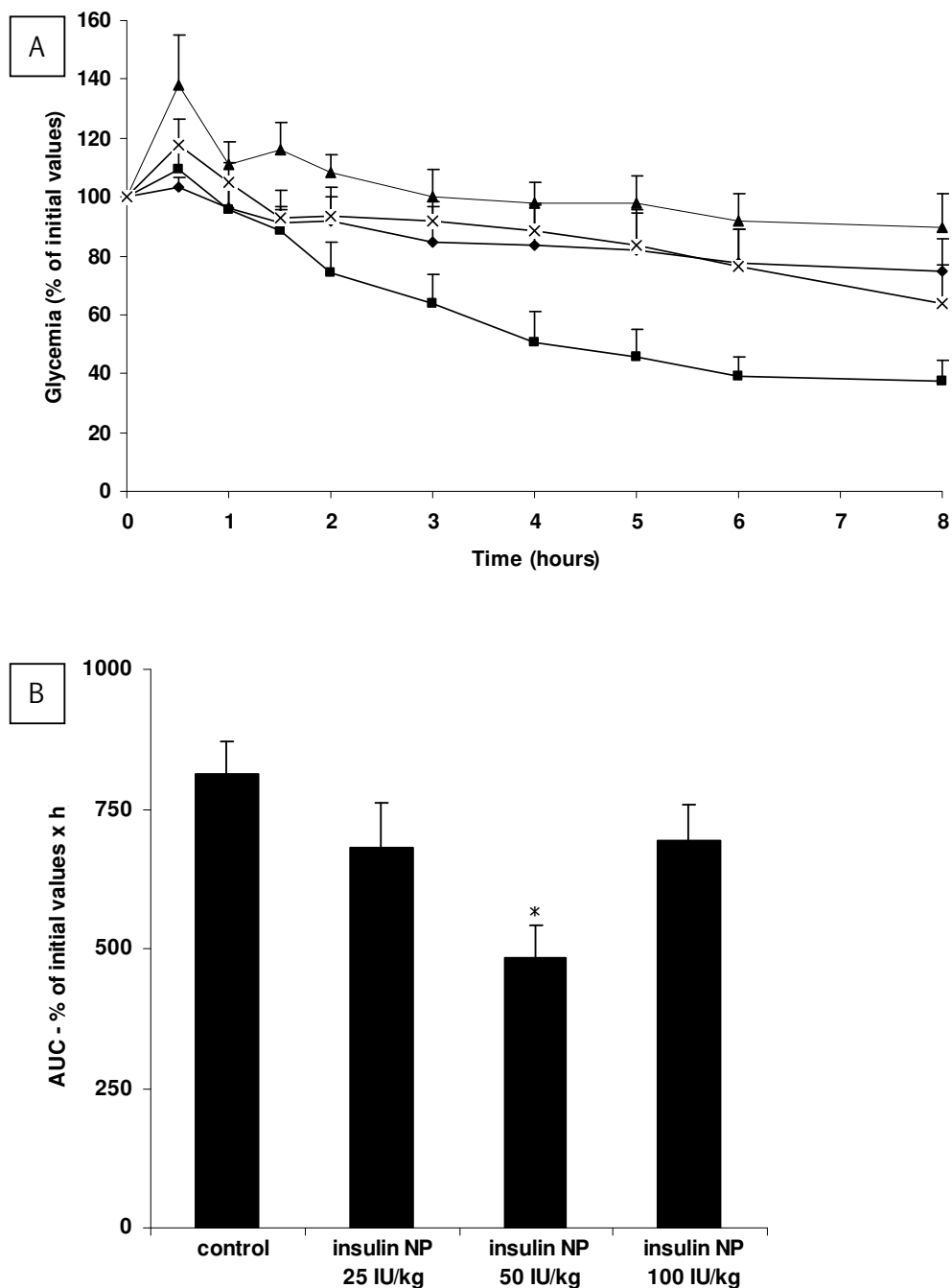
Effect of oral administration of insulin nanoparticles on an oral glucose tolerance test (OGTT)

Because insulin-loaded nanoparticles exert a long term effect on fasted glycemia after oral administration, we investigated the glycemic response to an oral glucose overload (2g/kg body weight) several hours (from 2 to 72 hours) after the single administration of insulin nanoparticles. As shown in fig. 4 (A and B), in control animals receiving empty nanoparticles, oral glucose increased glycemia immediately, reaching a maximal increase (385 %, $p<0.001$) after 30-60 min. Then glycemia decreased slightly but never came back to control values after 120 min.

When the glucose tolerance test was performed after the administration of insulin-loaded nanoparticles, the glycemic profiles were different. When it was performed 2, 6, 12, 24 and 48 h later, glycemia also increased but less than after unloaded nanoparticles intake. Finally, when

insulin-loaded nanoparticles were administered 72 h before the glucose tolerance test, the profile of glycemia was identical to that of controls (fig. 3B).

Figure 3. (A) Profiles of glycemia after an oral administration of aspart-insulin nanoparticles at the dose of 25 IU/kg (diamonds), 50 IU/kg (squares), and 100 IU/kg (crosses) or empty nanoparticles as controls (triangles) in fasted diabetic rats. Before the oral administrations, glycemia was 206 ± 16 mg/dL. Results are expressed as means $\pm$ SEM of 8 animals per group. (B) Areas under the curves (0-8h) of each glycemia profile. Statistically different from control * $p < 0.01$.



The calculation of the areas under the curves during the 120 min glucose challenge, confirmed these observations and showed that insulin-loaded nanoparticles improved the glycemic response performed 2, 6, 12, 24, and 48 h later by 30% (NS), 41% ($p<0.05$), 55% ($p<0.01$), 52% ($p<0.01$) and 24% (NS) respectively.

When the doses of insulin - loaded nanoparticles were lower (25 IU/kg) or higher (100 IU/kg), the profile of glycemia during an oral glucose challenge did not differ from that observed after empty nanoparticles as control, regardless the time after nanoparticles administration.

Consequently, oral insulin nanoparticles improved the oral glucose challenge for a prolonged time, with a maximal effect 12-24 h after intake of insulin - loaded nanoparticles at the dose of 50 IU/kg.

Plasma insulin in rats treated orally with aspart-insulin-loaded nanoparticles

Plasma insulin responses are illustrated in figure 5. When insulin nanoparticles were administered orally at the dose of 50 IU/kg, plasma insulin level increased, with a first peak value (+ 75%, $p<0.05$) six hours after the administration. Then, insulinemia decreased again slightly and a second peak appeared after 12 hours. Finally, insulinemia decreased again but remained slightly over basal values after 24 hours.

Discussion

In a previous work [33], we have shown that nanoparticles prepared with a blend of a biodegradable polyester (poly(ϵ -caprolactone)) and a polycationic non biodegradable acrylic polymer (Eudragit[®] RS) both reduced glycemia in a dose dependent manner after a single oral administration in diabetic rats and improved the glycemic response to oral glucose ingestion. In this previous study, regular insulin (Actrapid[®], Novo Nordisk, Denmark) was used. In the present study regular insulin was replaced by the insulin analogue, aspart-insulin, in which proline, normally in position B28, was substituted by an aspartic acid residue. This molecular change of human insulin leads to a more rapid absorption and achieves higher plasma insulin concentrations than human soluble insulin following subcutaneous injection [35, 36] Thus, it has a faster and more effective glucose-lowering effect, with superior control of postprandial hyperglycemia, compared with human soluble insulin [35, 36].

Aspart-insulin loaded poly(ϵ -caprolactone) / Eudragit[®] RS nanoparticles were larger than regular insulin loaded nanoparticles (695 ± 56 nm versus 331 ± 11 nm) as reported previously [33]. The substitution of proline in position B28 by an aspartic acid could explain this difference. Indeed, the pKa of aspartic acid is 4 and at physiological pH, the carboxylic acid function is

almost fully ionized and aspartate residue has therefore a negative charge and form a very polar and hydrophilic radical. It could consequently create electrostatic interactions with Eudragit[®] RS and modify the arrangement of insulin with polymers. This could explain the larger size of aspart-insulin nanoparticles as well as the higher encapsulation efficiency ($97.5 \pm 0.4 \%$) compared to regular insulin nanoparticles ($96.3 \pm 0.4\%$) [33]. However, the charge surface represented by the zeta potential was quite similar (40.5 ± 0.7 mV versus 41.8 ± 3.4 for regular insulin nanoparticles) [33]. This clearly reflects that insulin is probably well dispersed in the nanoparticles matrix, a hypothesis confirmed by the comparison with heparin nanoparticles also composed of poly(ϵ -caprolactone)/Eudragit[®] RS [37]. Heparin, a negatively charged glycosaminoglycane, was found by confocal microscopy at the outer surface of negatively charged nanoparticles while empty nanoparticles were positive [37]. Thus, insulin (pI 5.4), which is mainly negatively charged in the external aqueous 0.1% PVA solution (pH 6.5) probably exerts electrostatic interactions with the positively charged polycationic polymer, leading to an overall positive zeta potential of nanoparticles. Therefore, it can be concluded that insulin is homogeneously distributed into the nanoparticles.

The in vitro release study of insulin displays a behaviour which is also similar to that previously observed with heparin nano- and microparticles [37]. The initial burst seems to be of value regarding the mechanism of absorption of insulin. Indeed, once it reaches the site of absorption, i.e. the intestine, the encapsulated drug can be released very rapidly allowing a high drug gradient concentration followed by a good absorption. Since nanoparticles are an aqueous suspension, they will leave the stomach of fasted animals very rapidly and arrive in the duodenum where they will be able to release their cargo. However, it has to be noted that the problem of burst release is just the opposite for parenteral administration when one usually tries to reduce it as much as possible.

In the first set of experiments, both aspart insulin nanoparticles and the commercial aspart-insulin solution were subcutaneously administered at the dose of 10 IU/kg. The major objective of this initial study was to make sure that the incorporated aspart-insulin was still biologically efficient after the encapsulation process. Based on the results observed in figure 2, it can be concluded that, despite many shearing and/or organic solvent stress during manufacturing, the encapsulated insulin is bioactive since there is no in vivo difference for the 6 first hours. The initial sharp fall in glycemia may be related with the observed in vitro burst. Later on at 8 and 12 hours, there is a trend in observing different biological activities. Although the difference is non-statistical, this could reflect the slower and incomplete release of insulin from nanoparticles as it was again observed in vitro during the release test. Nevertheless, the

profile of glycemia observed after subcutaneous administration of encapsulated aspart-insulin was quite similar to that of encapsulated regular insulin [33]. So it can be concluded that there should be no advantage in encapsulating aspart-insulin instead of regular insulin with regards to subcutaneous administration.

Once it was known that the manufacturing process did not alter the encapsulated insulin, aspart-insulin loaded nanoparticles were administered orally to fasted diabetic rats. They also reduced glycemia for a sustained period, from half an hour post-administration up to more than 8 hours (fig. 3). However, the maximal effect observed after 8 hours was more pronounced with aspart - insulin nanoparticles than with regular-insulin nanoparticles (-52% versus -24%) at the dose of 50 IU/kg [33]. Thus, encapsulated aspart-insulin was more efficient than regular insulin. This could be attributed to a better absorption of the monomeric insulin analogue compared to the hexameric human insulin.

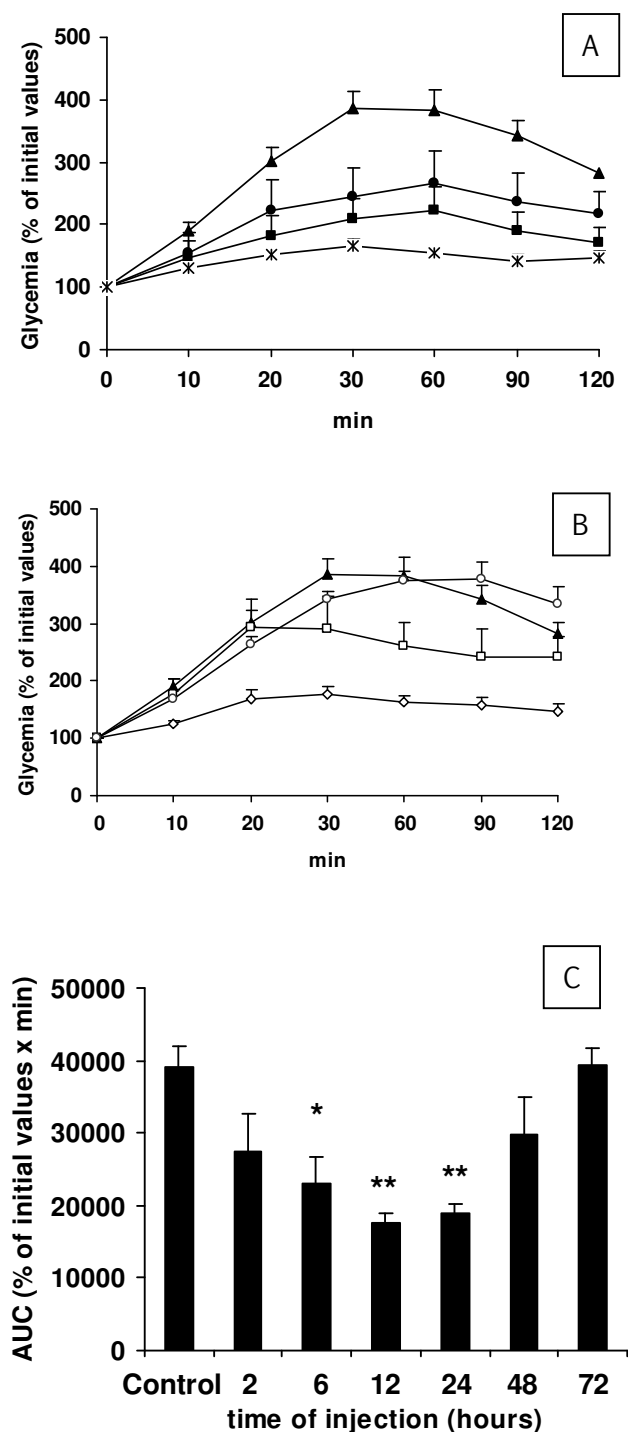
Nevertheless, the most important difference between regular insulin and its analogue was that encapsulated aspart-insulin did not elicit a dose-dependent hypoglycemic effect. Indeed, the maximal effect was observed with 50 IU/kg insulin while lower (25 IU/kg) and higher doses (100 IU/kg) did not show any significant reduction in glycemia. These discrepancies should be explained regarding the mechanisms by which insulin nanoparticles administered orally elicit their biological response. At first insulin should be protected by the polymeric nanoparticles against proteolytic enzymes in the stomach and gastrointestinal tract [4, 33]. Secondly, arriving in the intestine, several possibilities exist. Insulin nanoparticles should increase the residence time of insulin in the GIT, especially next to the apical surface of the absorptive cells, reducing the aggression by proteolytic enzymes. This can be explained by the attraction of the electropositive nanoparticles due to Eudragit® RS and the electronegative mucus layer which cover the intestinal epithelium. Indeed, as previously reported [4, 33], when insulin loaded nanoparticles were labeled with fluorescein isothiocyanate, a thin fluorescent film was observed in close contact with the apical pole of enterocytes. Similar observations were made with another mucoadhesive polymer composed of alginate nanoparticles recovered by chitosan alone [26] or with chitosan, PEG 4000 and albumin [28]. However, insulin either free or associated to nanoparticles could also be absorbed by a paracellular pathway [4]. Indeed, at the top of intestinal villi, there is a constant physiological desquamation of cells, promoting the uptake of large molecules or particles. Already, in 1987, a paracellular uptake of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules was described in the rat intestine by Aprahamian et al [39] and confirmed later by Damgé et al [40-41] and Pinto-Alphandary et al [42]. Finally, insulin-loaded nanoparticles could be also absorbed by transcytosis via Peyer's patches,

lymphoid follicles which are the most numerous in the ileum, arriving then in the lymph vessels or underlying capillaries [4, 33].

Insulin should be also released from the nanoparticles in the intestinal lumen in close contact with enterocytes. There, it should be absorbed as a free peptide either by a paracellular pathway or a receptor mediated pathway [4]. Indeed, the absorption of small fractions of insulin prior to its degradation cannot be discarded. As demonstrated by Bendayan et al [43], insulin, associated to antiproteases and surfactants, reduced glycemia for several hours after introduction in the intestinal lumen of normal and diabetic rats. This effect was explained by a receptor-mediated transport of insulin through the epithelial cells via the Golgi apparatus and intercellular spaces, reaching the blood circulation [44]. Indeed, insulin receptors described on epithelial cells along the intestinal tract [45] should play a role in insulin uptake via a receptor-mediated pathway [4]. Nevertheless, according to the in vitro results, the most probable way of uptake of insulin through CaCo 2 cells, an intestinal cell line, seems to be a paracellular way [46].

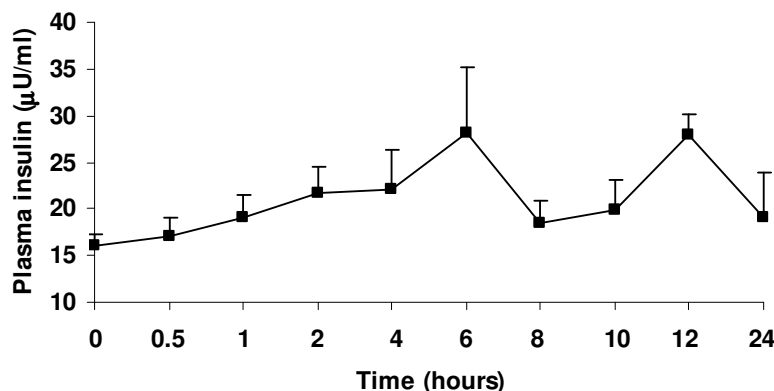
Regarding these possible ways of insulin absorption, the higher biological efficacy and duration of action of aspart-insulin nanoparticles compared to regular insulin nanoparticles should be explained by several hypothesis. At first, aspart-insulin is rather monomeric than hexameric and should be better absorbed by the intestinal mucosa. Secondly, to induce the biological response, insulin binds to receptors also located on its target organs (liver, muscle, adipose tissue). Thus, one hypothesis may be that the insulin analogue should have a different affinity with insulin receptors and / or an abnormal signal transduction mechanism. As reported by Kurtzhals et al [47], the affinity of aspart-insulin and human insulin to insulin receptor was quite similar, in accordance with the B26-B30 region being of little importance for insulin receptor recognition. In contrast, the time course for dissociation of aspart-insulin from the insulin receptor, determined using CHO-hIR cells, a cell line which overexpresses human insulin receptors, was slightly slower when compared to human insulin [47]. This could lead to a saturation of the receptors when the dose of aspart-insulin increases to 100 IU/kg and in consequence a blockage of the binding of insulin molecules. The slower insulin receptor off-rate, could also contribute to a prolonged effect of oral administered insulin nanoparticles (50 IU/kg) on oral glucose tolerance tests, due to a longer occupation of the receptors. As illustrated on figure 4, aspart-insulin nanoparticles improved considerably glucose tolerance from 6 hours up to 24 hours at least after oral administration. In contrast, regular insulin nanoparticles exerted a similar effect though of lesser intensity only after 4 hours and 8 hours. This is in agreement with a better postprandial control of glycemia by insulin analogues compared with soluble human insulin [35, 36].

Figure 4. Glycemia after an oral glucose challenge (2g/kg) performed 2 hours (A, full circles), 6 hours (A, full squares), 12 hours (A, crosses), 24 hours (B, empty diamonds), 48 hours (B, empty squares) and 72 hours (B, empty circles) after a single oral administration of aspart-insulin nanoparticles (50 IU/kg) or empty nanoparticles (A, B, full triangles) in fasted diabetic rats. (C). Corresponding areas under the glycemia curves (0-120 min). Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. of 6-8 animals per group. Comparisons between control and aspart-insulin treated animals * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.



In the present study we have also noted two peaks in plasma insulin concentrations, one after 6 hours and another after 12 hours which could be attributed to the release of insulin from nanoparticles during the process of degradation. These peaks of plasma insulin concentrations could also contribute to the prolonged effect of aspart - insulin on OGTTs.

Figure 5. Plasma insulin levels over time after a single administration of aspart-insulin nanoparticles (50 IU/kg) in fasted diabetic rats. Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. of 5 animals.



In conclusion, this study shows for the first time, that by modifying the configuration of the insulin molecule, it is possible to considerably improve the biological actions of insulin orally administered by its association to polymeric nanoparticles composed of a blend of poly(ϵ -caprolactone) and Eudragit[®] RS. These results also confirm that our formulation may be applied, in preference, to the treatment of type 2 diabetic patients who respond not enough to oral antidiabetic agents and who need a long acting insulin for a correct control of glycemia.

References

1. F.G. Banting, C.H. Best, J.B. Collip, W.R. Campbell, A.A. Fletcher, Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Preliminary report, Can. Med. Assoc. J. 12 (1922) 141-146.
2. D. Daneman, Type 1 diabetes, Lancet 367 (2006) 847-858.
3. D.R. Owens, B. Zinman, G. Bolli, Alternative routes of insulin delivery, Diabet. Med. 20 (2003) 886-898.
4. C. Damgé, C. Pinto Reis, P. Maincent, Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin, Expert Opin. Drug Deliv. 5 (2008) 45-68.
5. H. Liu, R. Tang, W.S. Pan, Y. Zhang, H. Liu, Potential utility of various protease

- inhibitors for improving the intestinal absorption of insulin in rats, *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (2003) 1523-1529.
6. M. Morishita, T. Goto, N.A. Peppas, J.I. Joseph, M.C. Torjman, C. Munsick, K. Nakamura, T. Yamagata, K. Takayama, A.M. Lowman, Mucosal insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels : effect of particle size on insulin enteral absorption, *J. Control. Rel.* 97 (2004) 115-124.
 7. Z. Shao, Y. Li, T. Chermak, A.K. Mitra, Cyclodextrins as mucosal absorption promoters of insulin. II. Effects of beta-cyclodextrin derivatives on alpha-chymotryptic degradation and enteral absorption of insulin in rats, *Pharm. Res.* 11 (1994) 1174-1179.
 8. M.S. Mesiha, S. Ponnappa, F. Plakogiannis, Oral absorption of insulin encapsulated in artificial chyles of bile salts, palmitic acid and alpha tocopherol dispersions, *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 1-5.
 9. S. Eaimtrakarn, Y.V. Rama Prasad, T. Ohno, T. Konishi, Y. Yoshikawa, N. Shibata, K. Takada, Absorption enhancing effect of labrasol on the intestinal absorption of insulin in rats, *J. Drug Target.* 10 (2002) 255-260.
 10. S. Clement, P. Dandona, J.G. Still, G. Kosutic, Oral modified insulin (HIM2) in patients with type 1 diabetes mellitus: results from a phase I/II clinical trial, *Metabolism* 53 (2004) 54-58.
 11. M. Kipnes, P. Dandona, D. Tripathy, J.G. Still, G. Kosutic, Control of postprandial plasma glucose by an oral insulin product (HIM2) in patients with type 2 diabetes, *Diabetes Care* 26 (2003) 421-426.
 12. C.Q. Xia, J. Wang, W.C. Shen, Hypoglycemic effect of insulin-transferrin conjugate in streptozotocin-induced diabetic rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295 (2000) 594-600.
 13. F. Cui, K. Shi, L. Zhang, A. Tao, Y. Kawashima, Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery : preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation, *J. Control. Rel.* 114 (2006) 242-250.
 14. M. Morishita, N. Kamei, J. Ehara, K. Isowa, K. Takayama, A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin, *J. Control. Release* 118 (2007) 177-184.
 15. V.R. Babu, P. Patel, R.C. Mundargi, V. Rangaswamy, T.M. Aminabhavi, Developments in polymeric devices for oral insulin delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 5 (2008) 403-415.
 16. C. Damgé, C. Michel, M. Aprahamian, P. Couvreur, New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier, *Diabetes* 37 (1988) 246-251.

17. C. Damgé, D. Hillaire-Buys, R. Puech, A. Hoeltzel, C. Michel, G. Ribes, Effects of orally administered insulin nanocapsules in normal and diabetic dogs, *Diab. Nutr. Metab.* 8 (1995) 3-9.
18. A.C. Foss, T. Goto, M. Morishita, N.A. Peppas, Development of acrylic-based copolymers for oral insulin delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 163-169.
19. X.Y. Xiong, Y.P. Li, Z.L. Li, C.L. Zhou, K.C. Tam, Z.Y. Liu, G.X. Xie, Vesicles from Pluronic/poly(lactic acid) block copolymers as new carriers for oral insulin delivery, *J. Control. Rel.* 120 (2007) 11-17.
20. J.M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama, T. Nagai, Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 471-476.
21. P.S. Kumar, S. Ramakrishna, T.R. Saini, P.V. Diwan, Influence of microencapsulation method and peptide loading on formulation of poly(lactide-co-glycolide) insulin nanoparticles, *Pharmazie* 61 (2006) 613-617.
22. F.D. Cui, A.J. Tao, D.M. Cun, L.Q. Zhang, K. Shi, Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 421-427.
23. Z. Ma, T.M. Lim, L.Y. Lim, Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats, *Int. J. Pharm.* 293(2005) 271-280.
24. B. Sarmento, A. Ribeiro, F. Veiga, D. Ferreira, R. Neufeld, Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles, *Biomacromolecules* 8 (2007) 3054-3060.
25. Y.H. Lin, F.L. Mi, C.T. Chen, W.C. Chang, S.F. Peng, H.F. Liang, H.W. Sung, Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery, *Biomacromolecules* 8 (2007) 146-152.
26. B. Sarmento, A. Ribeiro, F. Veiga, P. Sampaio, R. Neufeld, D. Ferreira, Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery, *Pharm. Res.* 24 (2007) 2198-2206.
27. CP Reis, A.J. Ribeiro, F. Veiga, R.J. Neufeld, C. Damgé, Polyelectrolyte biomaterial interactions provide nanoparticulate carrier for oral insulin delivery, *Drug Deliv.* 15 (2008) 127-139.
28. CP Reis, F.J. Veiga, A.J. Ribeiro, R.J. Neufeld, C. Damgé, Nanoparticulate biopolymers deliver insulin orally eliciting pharmacological response, *J. Pharm. Sci.* (2008) Apr 2.
29. J. Liu, T. Gong, C. Wang, Z. Zhong, Z. Zhang, Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles : preparation and characterization, *Int. J. Pharm.* 340 (2007) 153-162.

30. B. Sarmento, S. Martins, D. Ferreira, E.B. Souto, Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine* 2 (2007) 743-749.
31. T. Morcol, P. Nagappan, L. Nerenbaum, A. Mitchell, S.J. Bell, Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin, *Int. J. Pharm.* 277 (2004) 91-97.
32. D.R. Bhumkar, H.M. Joshi, M. Sastry, V.B. Pokharkar, Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1415-1426.
33. C. Damgé, P. Maincent, N. Ubrich, Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats, *J. Control. Rel.* 117 (2007) 163-170.
34. J. Morales, Defining the role of insulin detemir in basal insulin therapy, *Drugs* 67 (2007) 2557-2584.
35. J. Brange, D.R. Owens, S. Kang, A. Volund, Monomeric insulins and their experimental and clinical implications, *Diabetes Care* 13 (1990) 923-954.
36. S.M. Setter, C.F. Corbett, R.K. Campbell, J.R. White, Insulin aspart : a new rapid-acting insulin analog, *Ann. Pharmacother.* 34 (2000) 1423-1431.
37. V. Hoffart, N. Ubrich, A. Lamprecht, K. Bachelier, C. Vigneron, T. Lecompte, M. Hoffman, P. Maincent, Microencapsulation of low molecular weight heparin into polymeric particles designed with biodegradable and nonbiodegradable polycationic polymers, *Drug Deliv.* 10 (2003)1-7.
38. P. Moslemi, A.R. Najafabadi, H. Tajerzadeh, A rapid and sensitive method for simultaneous determination of insulin and A-21 desamido insulin by high performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 45-51.
39. M. Aprahamian, C. Michel, W. Humbert, J.P. Devissaguet, C. Damgé, Transmucosal passage of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as a new drug carrier in the small intestine, *Biol Cell* 61 (1987) 69-76.
40. C. Damgé, C. Michel, M. Aprahamian, P. Couvreur, J.P. Devissaguet, Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery, *J. Control. Rel.* 13 (1990) 233-239.
41. C. Damgé, M. Aprahamian, W. Humbert, M. Pinget, Ileal uptake of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules in the rat, *J. Pharm. Pharmacol.* 52 (2000) 1049-1056.
42. H. Pinto-Alphandary, M. Aboubakar, D. Jaillard, P. Couvreur, C. Vauthier, Visualization of insulin-loaded nanocapsules: in vitro and in vivo studies after oral administration to rats, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1071-1084.

43. M. Bendayan, E. Ziv, D. Gingras, R. Ben-Sasson, H. Bar-On, M. Kidron, Biochemical and morpho-cytochemical evidence for the intestinal absorption of insulin in control and diabetic rats. Comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa. *Diabetologia* 37 (1994) 119-126.
44. E. Ziv, M. Bendayan, Intestinal absorption of peptides through the enterocytes, *Microsc. Res. Tech.* 49 (2000) 346-352.
45. M.D. Fernandez-Moreno, M. Serrano-Rios, J.C. Prieto, Identification of insulin receptors in epithelial cells from duodenum, jejunum, ileum, caecum, colon and rectum in the rat, *Diabete Metab.* 13 (1987) 135-139.
46. N.J. Kavimandan, N.A. Peppas, Confocal microscopic analysis of transport mechanisms of insulin across the cell monolayer, *Int. J. Pharm.* 354 (2008) 143-148.
47. P. Kurtzhals, L. Schäffer, A. Sørensen, C. Kristensen, I. Jonassen, C. Schmid, T. Trüb, Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use, *Diabetes* 49 (2000) 999-1005.

CHAPITRE III :

Effets de la microencapsulation de nanoparticules sur la diminution du "burst"

Comme nous avons pu l'observer dans les travaux précédents, la libération *in vitro* d'un principe actif à partir de particules polymériques présente généralement un profil caractérisé par une libération initiale importante appelée "burst", suivie d'une libération plus ou moins progressive mais incomplète atteignant un plateau en fin d'expérimentation. Cette libération initiale rapide est due au mode de relargage de la drogue. Celui-ci peut en effet se faire de plusieurs façons : i) les molécules potentiellement adsorbées en surface se détachent rapidement de la particule ii) l'eau pénètre dans la particule et la fait gonfler, permettant une diffusion du principe actif hydrophile à travers la matrice de polymères iii) la dégradation du polymère et l'érosion de la particule entraîne une libération plus tardive. Ce burst constitue un obstacle majeur au développement de formes particulières injectables. En effet, cela peut être un avantage dans certains cas comme par exemple pour augmenter la pénétration d'un principe actif lors une application transdermique ou dans le cas d'une administration orale si on suppose que la libération puis l'absorption sont dues au contact intime avec la muqueuse, on obtient ainsi un gradient de concentration élevé qui facilite le passage du principe actif à travers la paroi intestinale. Cependant, ce burst reste un inconvénient important pour une administration injectable de produits potentiellement toxiques à forte dose ou à marge thérapeutique étroite. De tels médicaments nécessiteraient une libération contrôlée dans l'organisme.

Le but de ce travail était de mettre au point une forme multiparticulaire innovante capable de réduire cet effet de burst et donc de contrôler la libération du principe actif qu'elle encapsule. Cette nouvelle formulation constituée de microparticules contenant des nanoparticules a été appelée "microparticules composites". Les microparticules ont été préparées par la technique de double émulsion eau dans huile dans eau à partir d'une suspension aqueuse de nanoparticules jouant le rôle de phase aqueuse interne et encapsulant le principe actif. Deux modèles de drogue ont été choisis : une hydrophobe (ibuprofène) et une hydrophile (acétate de triptoréline) afin d'évaluer l'efficacité du système sur deux principes actifs de solubilité dans l'eau différente. Les microparticules composites ont fait l'objet d'une caractérisation *in vitro* : mesure de taille, de taux d'encapsulation des principes actifs et surtout étude des

profils de libération. Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec des microparticules non composites (microparticules simples) et avec des nanoparticules.

Notre travail a consisté essentiellement en l'adaptation de la technique de dosage de l'acétate de triptoréline. Celui-ci s'est effectué par CLHP à partir d'une méthode de la littérature. Les phases mobiles étaient constituées d'un tampon triéthylamine phosphate (TEAP) ajusté à pH 2,3 et d'un mélange TEAP/acétonitrile (40/60). Un gradient de phases mobiles a été mis en place. Nous avons dû déterminer les limites de quantification et de détection dans les différents milieux utilisés : PVA 0,1 % (m/V) pour déterminer le taux d'encapsulation et NaCl 0,1 M pour évaluer la libération *in vitro*, ainsi que les coefficients de corrélation des gammes d'étalonnage pour ces milieux.

Les résultats expérimentaux présentés mettent en évidence une diminution du burst *in vitro* pour les deux molécules modèles à partir des microparticules composites par rapport aux microparticules simples et aux nanoparticules. En effet, avant d'être libéré dans le milieu de dissolution, le principe actif doit d'abord diffuser à travers la matrice des nanoparticules pour ensuite pouvoir diffuser à travers la matrice des microparticules. Il semble alors nécessaire d'appliquer ce modèle *in vivo* afin de déterminer si ces microparticules composites sont capables de contrôler la libération d'un principe actif après administration sous-cutanée ou intramusculaire à des animaux.

Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release

A. Sheikh Hasan^a, M. Socha^a, A. Lamprecht^b, F. El Ghazouani^a,
A. Sapin^a, M. Hoffman^a, P. Maincent^{a,*}, N. Ubrich^a

^a EA 3452-Inserm U 734, School of Pharmacy-5, rue A. Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

^b Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmacy, Place Saint Jacques, 25030 Besançon Cedex, France

Received 5 February 2007; received in revised form 27 May 2007; accepted 29 May 2007

Available online 13 June 2007

Abstract

The initial burst release is one of the major problems in the development of controlled release formulations including drug-loaded micro- and nanoparticles, especially with low molecular weight drugs. The objective of the present work was to encapsulate, by the W/O/W emulsion, polymeric nanoparticles into polymeric microparticles by using non-water soluble polymers and appropriate organic solvents for the preparation of these composite microparticles. They were characterized *in vitro* (encapsulation efficiency, mean diameter and release kinetics) and compared with nanoparticles and classical microparticles prepared by the same method. Poly- ϵ -caprolactone (PCL) dissolved in methylene chloride was used to make nanoparticles, whereas ethylcellulose and Eudragit RS dissolved in ethyl acetate, a non-solvent of poly- ϵ -caprolactone, were used for the preparation of microparticles. Ibuprofen and triptorelin acetate were chosen as lipophilic and hydrophilic model drugs, respectively. High entrapment efficiencies were obtained with ibuprofen whereas lower amounts of triptorelin acetate were encapsulated, mainly with formulations prepared with poly- ϵ -caprolactone and Eudragit RS used alone or blended with ethylcellulose. The burst was significantly lower with composite microparticles and may be explained by the slower diffusion of the drugs through the double polymeric wall formed by the nanoparticle matrix followed by another diffusion step through the microparticle polymeric wall.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Burst release; Nanoparticles; Microparticles; Controlled release

1. Introduction

One major persistent problem in the development of injectable polymeric delivery systems is the drug initial burst release of drug which occurs during the first minutes of contact with the external medium (Yeo and Park, 2004). This burst release can be useful for the penetration of a drug, especially in the case of dermal applications, but sustained release is important for active drugs that are toxic at high concentrations or those that need to be present over a prolonged period. Burst release is often observed with microparticulate systems; it is unpredictable and generally difficult to control, but may be prevented by changing the drug distribution within the polymer matrix (Fu et al., 2003) or by developing more

sophisticated drug delivery systems. Examples of the latter are liposomes encapsulated inside dextran (Stenekes et al., 2000) and alginate microcapsules allowing the release of the drug in a controlled way and eliminating the burst effect (Dhoot and Wheatley, 2003). A pentamidine-loaded hydrogel has also been microencapsulated within PLGA microparticles using the solvent evaporation technique, leading to a significant reduction of the burst effect (Mandal et al., 2002). Double-walled microspheres (Lee et al., 2002), double-layered minipellets (Maeda et al., 2003) and coated microspheres (Huang et al., 1999; Hurteaux et al., 2005) have all been developed to reduce the initial burst and provide sustained release profiles of the drug. A substantial reduction of the initial burst was also obtained by crosslinking the microparticle surface, thus creating an additional barrier to diffusion which prevented easy dissolution of the drug in the external medium (Thote et al., 2005). Microparticles prepared with blends of polymers characterized by different viscosity, molecular weight and swelling properties may also modify the

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 22 96; fax: +33 3 83 68 23 01.
E-mail address: philippe.maincent@pharma.uhp-nancy.fr (P. Maincent).

release of the drug compared with microparticles prepared from a single polymer. Indeed, the release of ibuprofen from microspheres prepared with a blend of ethylcellulose and polystyrene was prolonged over 24 h with a reduced burst compared with microspheres prepared with ethylcellulose alone (Saravanan et al., 2003). The use of surfactants (Bouissou et al., 2006) or hydrophilic additives such as glycerol (Yamaguchi et al., 2002) added to the organic dispersion of methylene chloride containing PLGA and crystalline insulin results in a drastically reduced initial burst of insulin, which is preferentially located inside microcapsules rather than at the surface. Moreover, the addition of glycerol decreased both the glass transition temperature of PLGA and the porosity of microspheres: thus the diffusion of insulin was effectively prevented. The microencapsulation of lipid (Lee et al., 2003) or polymeric nanoparticles prepared from hydrophilic polymers (Grenha et al., 2005; Bhavsar et al., 2006) can lead to the controlled release of the encapsulated drug. Nanostructured protein particles produced by spray-freezing and encapsulated within lactide/glycolide copolymer and poly(lactic acid) microspheres decreased the burst release and maintained high structural integrity (38%) of the encapsulated protein (Leach et al., 2005).

The goal of our study was to encapsulate, by the double emulsion method, polymeric nanoparticles within polymeric microparticles by using non-water soluble polymers and an appropriate organic solvent for the preparation of these composite microparticles, thus preventing the dissolution of the nanoparticulate suspension used as internal phase. Poly(ϵ -caprolactone (PCL) dissolved in methylene chloride was used for the manufacture of nanoparticles, whereas ethylcellulose and Eudragit® RS dissolved in ethyl acetate, a non-solvent of PCL, were used for the preparation of microparticles. Ibuprofen and triptorelin acetate were chosen as lipophilic and hydrophilic model drugs, respectively. Microparticles containing nanoparticles, called composite microparticles, were characterized *in vitro* (encapsulation efficiency, mean diameter, release kinetics) and compared with nanoparticles and simple microparticles prepared by the same double emulsion method.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Ibuprofen [(R, S)-2(4-isobutylphenyl) propionic acid] (batch number 450025) generously supplied by Knoll Pharma Chemicals (Nottingham, UK) and triptorelin acetate, a gift of Debiopharm (Lausanne, Switzerland), were used as model drugs. Poly(ϵ -caprolactone) (MW 40,000 Da) was supplied by Aldrich, USA. An acrylic polycationic nonbiodegradable polymer (copolymers of acrylic and methacrylic acid esters with a low content of quaternary ammonium groups (0.5–0.8%) (4.48–6.77% ammonium methacrylate units by dry weight)) Eudragit® RS PO (MW 150,000 Da) (RS) and ethylcellulose powder (Ethocel viscosity 4) were donated by Röhm Pharma polymers, Degussa (Darmstadt, Germany) and The Dow Chemical Company (Michigan, USA), respectively.

Poly(vinyl alcohol) (PVA) (MW 30 kDa, 88% hydrolyzed) was supplied by Sigma–Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Ethyl acetate (water solubility = 8.3 g/100 ml at 20 °C) was purchased from Fluka Chemie GmbH (Switzerland). Methylene chloride (water solubility = 1.3 g/100 ml at 20 °C) was supplied by Prolabo (Paris, France). Acetonitrile and orthophosphoric acid were obtained from Carlo-Erba (Val de Reuil, France) and Prolabo (Paris, France), respectively. All other chemicals were of analytical grade and used without further purification.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of particles

2.2.1.1. Nanoparticles (NP). Ibuprofen or triptorelin acetate-loaded PCL NP were prepared by the W/O/W solvent evaporation method (Hoffart et al., 2002). Briefly, 1 ml of aqueous internal phase was emulsified for 15 s in 5 ml of methylene chloride (containing 125 mg of PCL) using an ultrasound probe (Vibra cell 72,434, BioBlock Scientific, Strasbourg, France) at 50 W output. This primary emulsion was poured into 40 ml of a 0.1% PVA aqueous solution and sonicated again with the same ultrasound probe for 1 min under the same conditions in order to create the water in oil-in-water emulsion. Three to four milliliters of NP suspension were obtained after solvent evaporation under reduced pressure (Rotavapor, Heidolph, Germany). Nanoparticles were separated from the bulk suspension by centrifugation (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Germany) at 42,000 $\times$ g for 20 min. The supernatant was kept for drug assay as described later and the sedimented nanoparticles were redispersed in 3 ml of purified water before freeze-drying. After lyophilization, the dried nanoparticles were resuspended in 2 ml of purified water shortly before preparing the composite microparticles.

Due to the lipophilic nature of ibuprofen, 50 mg of the drug were dissolved in the organic phase but, in order to keep the same preparation method for both drugs (W/O/W emulsion), 1 ml of purified water was used as the aqueous internal phase in the case of ibuprofen-loaded NP. On the other hand, since triptorelin acetate is water soluble, 1 ml of a triptorelin acetate aqueous solution (2.5 mg/ml) was used as the internal phase in the case of triptorelin acetate-loaded NP.

Blank nanoparticles were prepared under the same conditions without drug.

2.2.1.2. Microparticles (MP). Microparticles containing either ibuprofen or triptorelin acetate PCL NP (so-called composite microparticles) were prepared by the W/O/W solvent extraction method (Freytag et al., 2000). In the first step (W/O emulsion), the PCL NP suspension (2 ml) used as the internal aqueous phase was emulsified (ultrasound probe at 50 W output for 15 s) in an organic solution of polymer in ethyl acetate (5 ml). The polymers (250 mg) dissolved in ethyl acetate were (i) Eudragit® RS, (ii) ethylcellulose and (iii) a 1/1 blend of Eudragit® RS and ethylcellulose.

The primary emulsion was poured into 20 ml of 0.1% PVA aqueous solution in order to obtain a W/O/W pre-emulsion. After magnetically stirring for 1 min (1000 rpm) at room temperature, this pre-emulsion was added to 400 ml of a 0.1% PVA aqueous

ous solution and stirred mechanically (three-bladed propeller, 1600 rpm) for 10 min to form the final W/O/W emulsion.

Upon solvent extraction, the polymers precipitated and the microparticle cores solidified.

Microparticles were collected by filtration (Millipore® Type: 0.45 µm nitrate cellulose for ibuprofen MP and cellulose acetate for triptorelin acetate MP) and dried at room temperature for 24 h.

Blank composite microparticles (with blank PCL NP) and simple microparticles (without PCL NP but containing one or the other drug) were prepared under the same conditions.

2.2.2. Mean diameter and zeta potential

2.2.2.1. Microparticles. Mean diameter and size distribution of MP were analyzed by laser diffraction in a particle size analyzer (Mastersizer S, Malvern Instruments, France). Each sample was measured in triplicate.

2.2.2.2. Nanoparticles. The mean diameter of NP and their surface potential were evaluated with a Malvern Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments, France) using, respectively, photon correlation spectroscopy and electrophoretic mobility. Nanoparticles were diluted in 0.001 M NaCl prior to zeta potential measurements. The results were all normalized with respect to a polystyrene standard suspension (Malvern Instruments). Each sample was measured in triplicate.

2.2.3. Determination of drug content

2.2.3.1. Ibuprofen. The amount of ibuprofen entrapped within polymeric particles was determined spectrophotometrically at 222 nm (UV-160 IPC, UV-visible spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan) by measuring the amount of non-entrapped ibuprofen in the external aqueous solution (indirect method) which was recovered after filtration and washing of microparticles. In the case of nanoparticles, the external aqueous solution was obtained after centrifugation of the colloidal suspension for 20 min at $42,000 \times g$. A standard calibration curve was performed with the ibuprofen solution (aqueous solution of 0.1% PVA with 1% acetone). The established linearity range was 2–10 µg/ml ($r > 0.99$).

In order to validate the indirect assay for routine purposes, the results were compared with those obtained after measuring the amount of ibuprofen within Eudragit® RS microparticles (without PCL NP) directly by an established but slightly modified HPLC method (Fernandez-Carballido et al., 2004).

Briefly, 20 mg of particles were accurately weighed and dissolved in 20 ml of mobile phase (water/acetonitrile: 40/60 acidified with orthophosphoric acid pH 2.7). Fifty microliters of this solution were injected into the HPLC system (Model Shimadzu HPLC 10A vp, Shimadzu, Japan) with UV detection (SPD-10 A VP, Shimadzu, Japan). The separation was achieved by using a reversed phase column (Uptisphere ODB, 3 mm i.d., 150 mm long, 12 nm porosity, 5 µm particle size, Interchim, France). The detection wavelength was set at 264 nm. The flow rate of the mobile phase was 0.8 ml/min. Under these conditions, the polymer did not interfere with the drug at this specific

wavelength. The ibuprofen calibration curve was linear from 1 to 100 µg/ml ($r = 0.999$).

2.2.3.2. Triptorelin acetate. Triptorelin acetate content was determined by an established reversed phase HPLC method previously described (Schuetz et al., 2005). The separation was achieved by using a C₁₈ Whatman Partisphere WVS column (4.6 mm i.d., 125 mm long, 5 µm particles size, Interchim, France). The detection wavelength was set at 278 nm. The triptorelin acetate curve was linear from 1 to 500 µg/ml ($r = 0.999$) in an aqueous solution of PVA 0.1% and NaCl 0.1 M. The amount of triptorelin acetate entrapped within polymeric particles was also determined by two methods. In the indirect method, the amount of non-entrapped triptorelin acetate in the external aqueous solution was measured by injecting 20 µl directly into the HPLC system (Model Shimadzu HPLC 10A VP, Shimadzu, Japan) with UV detection (SD-10 A VP, Shimadzu, Japan). In the direct method, the triptorelin acetate amount was directly determined after extraction from the particles followed by injecting 20 µl of the extract directly into the HPLC system. To extract the drug, about 10 mg of particles were accurately weighed and dissolved in 0.5 ml of methylene chloride. Triptorelin acetate was extracted 6 times (vortex 10 min) from the organic phase with 2 ml of an aqueous solution of Tween 80 (0.1%), followed by a 20 min centrifugation at $800 \times g$.

2.2.4. In vitro drug release from both nanoparticles and microparticles

Fifty milligrams of freeze-dried or dried ibuprofen or triptorelin acetate loaded particles were suspended in 20 ml of saline phosphate buffer (KH₂PO₄ 0.0044 M, Na₂HPO₄ 0.0451 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4 adjusted by orthophosphoric acid) or NaCl 0.1 M, respectively. The particles suspension was gently stirred (200 rpm) at 37 °C into a water bath. One milliliter of suspension was withdrawn at appropriate intervals (5, 15, 30, 45 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24 h) and filtered with a 0.22 µm nitrate cellulose filter (Millipore®) in the case of ibuprofen. For triptorelin acetate, due to established filter adsorption during the preliminary trials, each sample was centrifuged at $42,000 \times g$ for 10 min. The filtrate (ibuprofen) or the supernatant (triptorelin acetate) was replaced by 1 ml of fresh buffer. The amount of ibuprofen in the release medium was determined by UV at 222 nm as previously described. For triptorelin acetate, the HPLC method described previously was used. Each particle batch was analyzed in triplicate.

3. Results and discussion

Burst release is a critical problem with currently marketed injectable microparticles, especially when slow release for a few weeks or months is required. The encapsulation of nanoparticles within microparticles as an alternative way to decrease the burst has been proposed by only a few groups (Lee et al., 2003; Sheikh Hasan et al., 2004; Grenha et al., 2005; Leach et al., 2005; Bhavsar et al., 2006). For example, Bhavsar et al. encapsulated gelatin nanoparticles in poly(ϵ -caprolactone) microparticles; whereas Grenha et al. encapsulated chitosan

nanoparticles within mannitol or lactose microparticles: however, these hydrophilic polymers used for nanoparticles might favor water uptake by the microparticles and consequently induce a faster release and/or a faster hydrolysis of the non-soluble polyester polymer, as was shown in the case of the PCL microparticles prepared by Bhavsar et al. Furthermore, Grenha et al. observed a very high release of their model drug (insulin) after 20 min in a dissolution test, although their insulin nanoparticles were incorporated within mannitol microparticles. In order to prevent such rapid release, we have prepared composite microparticles based on non-water soluble polymers such as PCL, ethylcellulose and Eudragit® RS. Since the double emulsion technique was used for the preparation of composite microparticles, our original approach consisted in using a polymer for the nanoparticles (PCL) which is insoluble in the organic solvent used to manufacture the microparticles in the second step of the double emulsion method. Indeed, PCL was dissolved in methylene chloride because of the low boiling point and poor water solubility of this solvent. Microparticles were prepared by dissolving the two other polymers (ethylcellulose, Eudragit® RS and 1/1 blend of each polymer) in ethyl acetate which is a poor solvent for PCL: in our conditions of microparticle preparation the maximum solubility of PCL added directly to ethyl acetate is 5%. Therefore, it was possible to use the PCL nanoparticle suspension as the internal aqueous phase in the preparation of the composite microparticles.

In order to test the effect on burst release, two model drugs differing in their water solubility were selected. One was a peptide drug. Indeed, most of the currently marketed injectable microparticles are peptide dosage forms for which a reduction of the burst would be highly desirable. Triptorelin acetate is a decapeptide (MW = 1311.5) which is highly water soluble. Consequently, the only way to obtain sufficiently high incorporation in nanoparticles to use the W/O/W emulsion technique (Nicoli et al., 2001). Ibuprofen was the second model drug; with contrasting properties since it is very poorly water soluble (35.89 µg/ml) substance with a low molecular weight (MW = 206.3). Due to the very low aqueous solubility of ibuprofen, it would have been possible to prepare ibuprofen nanoparticles according to the simpler O/W emulsion technique. However, with a view to comparing the drug release with that of triptorelin acetate, ibuprofen nanoparticles and control simple microparticles were also prepared by the double emulsion technique. In this case, ibuprofen was dissolved in the organic phase and plain water (1 ml) was used as the internal aqueous phase.

Tables 1–3 summarize the main physicochemical parameters (mean diameter, zeta potential and encapsulation efficiency) of

Table 1

Mean diameter, drug encapsulation efficiency and zeta potential of blank or ibuprofen and triptorelin acetate loaded PCL nanoparticles ($n = 3 \pm \text{S.D.}$)

	Blank NP	Ibuprofen NP	Triptorelin acetate NP
Mean diameter (nm)	355 $\pm$ 6.0	341 $\pm$ 9.0	380 $\pm$ 5.0
Zeta potential (mV)	-3.1 $\pm$ 2.9	+15.1 $\pm$ 5.5	+19.8 $\pm$ 12.4
Encapsulation efficiency (%)	–	95 $\pm$ 2.0	38 $\pm$ 7.0

the three types of particles prepared with the various polymers.

Both drug-loaded NP preparations had diameters ranging from 340 to 380 nm (Table 1). Blank nanoparticles were similar. Unloaded NP showed a slightly negative zeta potential which became positive after the incorporation of either drug. Due to its low water solubility, ibuprofen was very efficiently incorporated into PCL nanoparticles (mean encapsulation efficiency 95%) (Table 1). On the other hand, the encapsulation efficiency was only 38% for triptorelin acetate nanoparticles. This is probably the result of its higher water solubility; it would diffuse more readily through the aqueous continuous phase of the second emulsion before polymer precipitation. For both triptorelin acetate and ibuprofen, the average diameter of PCL nanoparticles obtained by the double emulsion technique was in the usual range for this polymer and this method of preparation. Indeed, Hoffart et al. (2002) obtained nanoparticle diameter ranging from 380 to 500 nm with the same polymer and preparation method. With the same double emulsion technique and also using methylene chloride, Nicoli et al. (2001) obtained triptorelin acetate nanoparticles in a slightly larger range (574–743 nm) when the polymer was various types of PLGA.

Simple microparticles are very small whatever the drug or the polymers used, except ibuprofen-loaded MP prepared with ethylcellulose (Table 2). Indeed, the diameter of all MP was close to 15 µm whereas ibuprofen-loaded MP prepared with ethylcellulose were larger (136 µm). In addition, simple blank ethylcellulose MP are slightly larger (32 µm) than blank MP prepared with Eudragit® RS alone or blended with ethylcellulose. The difference in encapsulation efficiency of the two drugs in simple ethylcellulose MP is not significant. Indeed, similar encapsulation efficiency (Table 2) was observed for ibuprofen and triptorelin encapsulated inside ethylcellulose MP (89 and 87%, respectively). A more significant difference between the two drugs was obtained after encapsulation in MP prepared with Eudragit® RS and the blend of EC and Eudragit® RS (around 80% for ibuprofen and 60% for triptorelin). The encapsulation

Table 2

Mean diameter and drug encapsulation efficiency of blank, ibuprofen (IBU) and triptorelin acetate (TRP) simple microparticles (SMP) prepared with ethylcellulose (EC), Eudragit® RS (RS) and a blend 50/50 of ethylcellulose and Eudragit® RS (EC/RS) ($n = 3 \pm \text{S.D.}$)

Polymers	Mean diameter (µm)			Encapsulation efficiency (%)		
	Blank SMP	IBU SMP	TRP SMP	Blank SMP	IBU SMP	TRP SMP
EC	32 $\pm$ 5	136 $\pm$ 28	20 $\pm$ 5	–	89 $\pm$ 5	87 $\pm$ 8
RS/EC	13 $\pm$ 4	18 $\pm$ 5	16 $\pm$ 3	–	80 $\pm$ 8	61 $\pm$ 4
RS	15 $\pm$ 2	14 $\pm$ 7	10 $\pm$ 5	–	79 $\pm$ 5	65 $\pm$ 7

Table 3

Mean diameter and drug encapsulation efficiency of blank, ibuprofen (IBU) and triptorelin acetate (TRP) composite microparticles (CMP) prepared with ethylcellulose (EC), Eudragit® RS (RS) and a blend 50/50 of ethylcellulose and Eudragit® RS (EC/RS) ($n = 3 \pm \text{S.D.}$)

Polymers	Mean diameter (μm)			Encapsulation efficiency (%)		
	Blank CMP	IBU CMP	TRP CMP	Blank CMP	IBU CMP	TRP CMP
EC	83 ± 10	161 ± 35	27 ± 6	–	87 ± 3	89 ± 8
RS/EC	23 ± 7	68 ± 18	24 ± 3	–	85 ± 4	66 ± 8
RS	16 ± 2	45 ± 9	21 ± 8	–	74 ± 5	59 ± 7

efficiency of triptorelin acetate was much higher in MP prepared with the two polymers used alone or blended than in NP prepared with PCL.

The PCL nanoparticle suspension of each drug was directly used as the internal aqueous phase in the preparation of the composite microparticles. Three types of composite microparticles were manufactured with either ethylcellulose, Eudragit® RS or the blend (50/50) of these 2 polymers. Composite microparticles had a larger diameter than simple microparticles (Table 3). This effect was more marked for ibuprofen composite microparticles. Encapsulation efficiencies remained fairly high and did not show major differences compared with simple microparticles. The high encapsulation efficiency of ibuprofen could again be explained by the lipophilic nature of the drug which has no affinity for the external aqueous phase, compared with the hydrophilic triptorelin acetate. The similar encapsulation efficiency observed with ethylcellulose simple and composite microparticles may be explained by the overall viscosity of the system. Indeed, it was observed (although not measured) that the solution of ethylcellulose in ethyl acetate was more viscous than with Eudragit® RS or with the blend ethylcellulose/Eudragit® RS. It would consequently be more difficult for the hydrophilic drug present in the internal dispersed phase to diffuse into the outer water phase (Bodmeier and McGinity, 1988). The triptorelin acetate encapsulation efficiency was higher in simple and composite microparticles than in nanoparticles: this is probably the effect of a faster precipitation of polymers after solvent (ethyl acetate) extraction during microparticle manufacturing compared with solvent evaporation (methylene chloride) during NP preparation. In order to demonstrate conclusively that nanoparticles were effectively entrapped in the microparticles, we performed the following experiment with unloaded micro- and nanoparticles. Blank composite EC/RS microparticles (containing PCL nanoparticles), blank simple EC microparticles, blank simple Eudragit® RS microparticles and PCL nanoparticles were dispersed in ethyl acetate. It should be noted that ethylcellulose and Eudragit® RS are soluble in ethyl acetate while the PCL polymer is not (or very slightly as stated above). Therefore, if PCL nanoparticles had really been encapsulated, the resulting suspension in ethyl acetate should have been very turbid, as should the blank PCL nanoparticle suspension dispersed in ethyl acetate. Fig. 1 clearly displays a similar turbidity in ethyl acetate of both PCL nanoparticles and composite microparticles showing the dissolution of ethylcellulose and Eudragit RS but the presence of PCL nanoparticles. In contrast, blank simple EC microparticles and blank simple RS microparticles are totally dissolved in ethyl acetate and produce

a clear solution. Consequently, Fig. 1 shows that the manufacturing process allows the encapsulation of PCL nanoparticles within microparticles and demonstrates the composite character of these microparticles.

Most nano- and microparticulate systems are characterized by an initial burst which is generally difficult to control. Such a burst may be due to a number of phenomena, including (i) heterogenous drug distribution including surface-associated drug (Huang and Brazel, 2001); (ii) temperature, which affects drug distribution and morphology of particles (Guiziou et al., 1996); (iii) the physico-chemical nature of the polymeric matrix (Fernandez-Carballido et al., 2004; Thompson et al., 2007) and (iv) porosity of particles which is generally higher for the solvent evaporation method (methylene chloride) than for the extraction method (ethyl acetate) (Yeo and Park, 2004). There are two ways to determine whether the burst is controlled: by an *in vitro* dissolution test or by an *in vivo* approach after subcutaneous or intramuscular administration. As a first approach, we have used the *in vitro* dissolution test. These tests were carried out under sink conditions, in phosphate buffer (pH 7.4) and NaCl 0.1 M for ibuprofen and triptorelin acetate, respectively. The resulting release profiles are presented for each drug (ibuprofen or triptorelin acetate) and type of polymer (ethylcellulose, ethylcellulose/Eudragit RS and Eudragit RS). Fig. 2A–C displays the release profiles of ibuprofen from ethylcellulose, ethylcellu-



Fig. 1. Picture showing the macroscopic solubility in ethyl acetate of different nano- and microparticles prepared with different polymers: (A) ethyl acetate, (B) blank PCL nanoparticles, (C) EC/Eudragit® RS microparticles, (D) composite EC/Eudragit® RS microparticles, (E) simple Eudragit® RS microparticles, (F) simple EC microparticles.

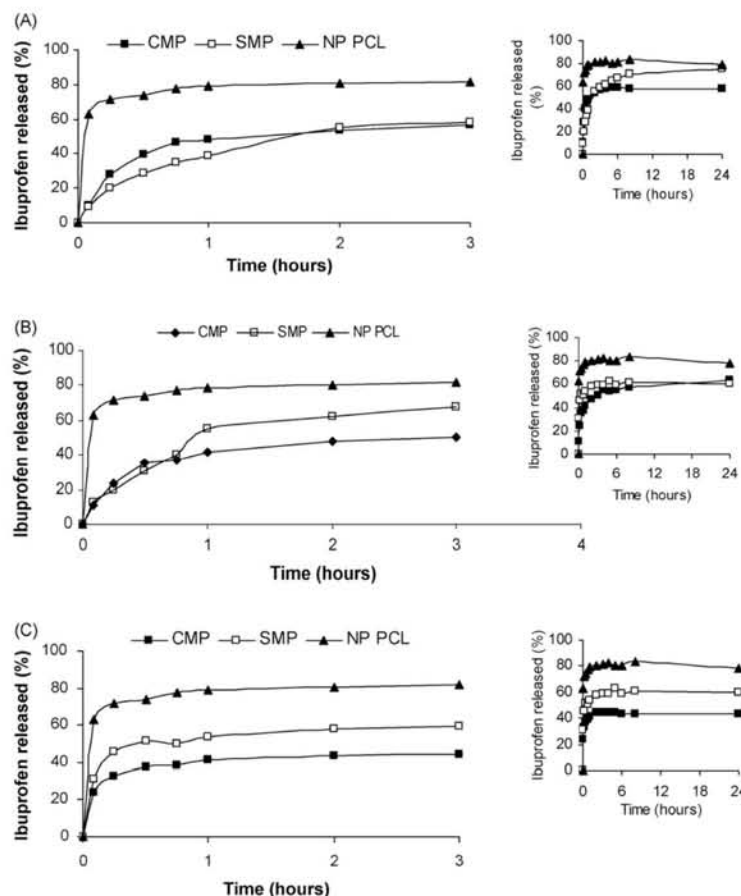


Fig. 2. Release kinetics of ibuprofen from PCL nanoparticles (solid triangles), simple (SMP, open squares) and composite microparticles (CMP, solid squares) prepared with (A) ethylcellulose, (B) Eudragit RS/ethylcellulose (50/50) and (C) Eudragit RS. Experiments were performed in phosphate buffer pH 7.4 at 37 °C. Data shown as mean $\pm$ S.D. ($n=3$).

lose/Eudragit RS and Eudragit RS microparticles, respectively. Fig. 3A–C displays the release profiles of triptorelin acetate from ethylcellulose, ethylcellulose/Eudragit RS and Eudragit RS microparticles, respectively.

PCL-loaded nanoparticles of each drug displayed an immediate and important initial drug release in the first 15 min, followed by a plateau of around 80 and 70% at 24 h for ibuprofen and triptorelin acetate nanoparticles, respectively (Table 4). This immediate high release may be due to the small diameter of nanoparticles leading to a large exchange surface and probably to a more porous structure owing to the solvent evaporation method, favoring the release of the encapsulated drugs. Indeed, it has been already demonstrated that the slow precipitation of microparticles after solvent evaporation leads to more porous particles compared to the fast polymer precipitation obtained after solvent extraction (Jiang et al., 2002; Wang et al., 1991). This principle can be applied to the PCL nanoparticles which were prepared by solvent evaporation. It has also to be noted that,

in the case of triptorelin acetate nanoparticles, the dissolution experiments were carried out in NaCl 0.1 M since the peptide was only slightly soluble in the PBS (solubility <0.25 mg/ml) used for ibuprofen. The higher ibuprofen release in PBS may be explained by its higher solubility in this buffer (3800 μ g/ml) than in water (35.89 μ g/ml). Indeed, ibuprofen is an acid (pK_a 4.5) and has better solubility in water with increasing pH (Levis et al., 2003). Not all the encapsulated ibuprofen and triptorelin acetate was released, since a plateau (around 80 and 70%, respectively) was obtained after 30 min and was stable up to 24 h (the end of the dissolution test). Similar behavior has already been observed with triptorelin acetate PLGA nanoparticles (Nicoli et al., 2001).

Although not all the encapsulated drug was released in 24 h, the dissolution test was limited to this time because the aim of this research was to demonstrate the influence of the encapsulation of nanoparticles within microparticles on the initial burst release. The initial burst and the dissolution profiles were

due to the physicochemical properties of Eudragit[®] which is a more hydrophilic polymer owing to its quaternary ammonium groups that favor water uptake and drug diffusion towards the dissolution medium (Huang et al., 2006). However, composite microparticles tend to reduce the initial burst effect especially for microparticles prepared with ethylcellulose used alone or blended with Eudragit[®] RS (27.7 and 23.8%, respectively, compared with 32.9% for Eudragit[®] RS alone composite microparticles). This can be explained by the rather lipophilic properties of ibuprofen does not favor its dissolution in aqueous media, but also to the high encapsulation ratio of PCL ibuprofen nanoparticles. Encapsulation of nanoparticles into microparticles also had a strong effect on the dissolution profile, especially for the ethylcellulose and Eudragit[®] RS/ethylcellulose microparticles. Indeed for the latter two types of microparticle, the total ibuprofen released was much lower after 24 h and a plateau of around 50% was obtained as early as 2 h. The presence of EC in the matrix of microparticles conferred a slower and more progressive release of ibuprofen during the time of the experiment. This could be explained by different interactions between the drug and either Eudragit[®] RS or ethylcellulose polymers.

For triptorelin acetate, the burst was the lowest for both the composite and the simple ethylcellulose microparticles compared with Eudragit[®] RS or blended microparticles (Fig. 3A) but the drug was more slowly released from the composite than from the simple microparticles in the 24 h period of the dissolution test ($54.9 \pm 3.6\%$ versus $31.5 \pm 5.8\%$). As for ibuprofen, except for composite Eudragit[®] RS microparticles which displayed a reduced burst, there was no major difference in terms of burst reduction between simple and composite microparticles for ethylcellulose and the blend of ethylcellulose and Eudragit[®] RS (from 54.9 to 31.5% and from 77.3 to 59.5%, respectively). Again, the burst was higher for Eudragit[®] RS microparticles compared with ethylcellulose or polymers blended microparticles. On the other hand, the effect of reducing the burst is much more marked with triptorelin acetate. Indeed, due its high hydrophilicity, this compound has a natural tendency to diffuse very rapidly towards the surrounding aqueous phase. Therefore, any mechanism which is able to restrict this diffusion of triptorelin acetate towards water would be easily observed. The influence of nanoparticle encapsulation in microparticles is obvious for each of the three types of microspheres. As a first observation, it can be noticed that simple microparticles prepared with Eudragit[®] RS (alone or blended with ethylcellulose) allowed a very fast release of triptorelin acetate. Basically the release profile was the same as for the triptorelin acetate PCL nanoparticles. It is only with simple ethylcellulose microparticles that the triptorelin acetate profile was intermediate between nanoparticles and composite microparticles when taking into account the whole 24 h of the experiment. This is probably due to the slow diffusion of water into the lipophilic EC matrix. However, in terms of burst reduction there is no difference between simple and composite ethylcellulose microparticles since the burst was under 10% in both cases (Table 4). When PCL triptorelin acetate nanoparticles were encapsulated in microparticles, there was a large decrease in the burst. Again, this

decrease is much more marked than that for ibuprofen due to the hydrophilic nature of the drug. Therefore, the advantage of encapsulating nanoparticles in microparticles (composite microparticles) has been definitely demonstrated for hydrophilic drugs. The decrease in the burst is greater for ethylcellulose than for Eudragit[®] RS due to the lipophilic nature of ethylcellulose which slows down the entrance of water in the polymeric matrix. On the other hand, Eudragit[®] RS is more permeable to water which facilitates drug release from the encapsulated PCL nanoparticles.

4. Conclusion

More generally, the differences observed with the composite microparticles may be explained by the heterogeneous composition of the polymeric matrix. Indeed, in order to be released into the external dissolution medium, both drugs have to diffuse first through the PCL nanoparticles followed by another diffusion step through the ethylcellulose or Eudragit[®] RS matrix. The diffusion pathway takes longer for ethylcellulose due to the hydrophobicity of this polymer. The overall dissolution profiles show the potential of composite microparticles to dramatically change the burst effect and the release profile of drugs in vitro. This concept remains to be verified after subcutaneous or intramuscular administration, in this case using biodegradable polymers.

References

- Bhavsar, M.D., Tiwari, S.B., Amiji, M.M., 2006. Formulation optimization for the nanoparticles-in-microsphere hybrid oral delivery system using factorial design. *J. Control Rel.* 110, 422–430.
- Bodmeier, R., McGinity, J.W., 1988. Solvent selection in the preparation of poly(DL-Lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *Int. J. Pharm.* 43, 179–186.
- Bouissou, C., Rouse, J.J., Price, R., van der Walle, C.F., 2006. The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm. Res.* 23, 1295–1305.
- Dhoot, N.O., Wheatley, M.A., 2003. Microencapsulated liposomes in controlled drug delivery: strategies to modulate drug release and eliminate the burst effect. *J. Pharm. Sci.* 92, 679–689.
- Fernandez-Carballido, A., Herrero-Vanrell, R., Molina-Martinez, I.T., Pastoriza, P., 2004. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intrarticular administration. Effect of Labrafil addition on release in vitro. *Int. J. Pharm.* 279, 33–41.
- Freytag, T., Dashevsky, A., Tillman, L., Hardee, G.E., Bodmeier, R., 2000. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. *J. Control Rel.* 69, 197–207.
- Fu, K., Harrell, R., Zinski, K., Um, C., Jaklenec, A., Frazier, J., Lotan, N., Burke, P., Klibanov, A.M., Langer, R., 2003. A potential approach for decreasing the burst effect of protein from PLGA microspheres. *J. Pharm. Sci.* 92, 1582–1591.
- Grenha, A., Seijo, B., Remunan-Lopez, C., 2005. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25, 427–437.
- Guizou, B., Armstrong, D.J., Elliott, P.N., Ford, J.L., Rostron, C., 1996. Investigation of in-vitro release characteristics of NSAID-loaded polylactic acid microspheres. *J. Microencapsul.* 13, 701–708.
- Hoffart, V., Ubrich, N., Simonin, C., Babak, V., Vigneron, C., Hoffman, M., Lecomte, T., Maincent, P., 2002. Low molecular weight heparin-loaded polymeric nanoparticles: formulation, characterization, and release characteristics. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28, 1091–2000.

- Huang, X., Brazel, C., 2001. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J. Control Rel.* 73, 121–136.
- Huang, Y.Y., Chung, T.W., Tzeng, T.W., 1999. A method using biodegradable polylactides/polyethylene glycol for drug release with reduced initial burst. *Int. J. Pharm.* 182, 93–100.
- Huang, J., Wigent, R.J., Schwartz, J.B., 2006. Nifedipine molecular dispersion in microparticles of ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blends for controlled drug delivery: effect of matrix composition. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32, 1185–1197.
- Hurteaux, R., Edwards-Levy, F., Laurent-Maquin, D., Levy, M.C., 2005. Coating alginate microspheres with a serum albumin-alginate membrane: application to the encapsulation of a peptide. *Eur. J. Pharm. Sci.* 24, 187–197.
- Jiang, G., Thanoo, B.C., DeLuca, P.P., 2002. Effect of osmotic pressure in the solvent extraction phase on BSA release profile from PLGA microspheres. *Pharm. Dev. Technol.* 7, 391–399.
- Leach, W.T., Simpson, D.T., Val, T.N., Anuta, E.C., Yu, Z., Williams III, R.O., Johnston, K.P., 2005. Uniform encapsulation of stable protein nanoparticles produced by spray freezing for the reduction of burst release. *J. Pharm. Sci.* 94, 56–69.
- Lee, T.H., Wang, J., Wang, C.H., 2002. Double-walled microspheres for the sustained release of a highly water soluble drug: characterization and irradiation studies. *J. Control Rel.* 83, 437–452.
- Lee, K.E., Cho, S.H., Lee, H.B., Jeong, S.Y., Yuk, S.H., 2003. Microencapsulation of lipid nanoparticles containing lipophilic drug. *J. Microencapsul.* 20, 489–496.
- Levis, K.A., Lane, M.E., Corrigan, O.I., 2003. Effect of buffer media composition on the solubility and effective permeability coefficient of ibuprofen. *Int. J. Pharm.* 253, 49–59.
- Maeda, H., Nakagawa, T., Adachi, N., Sakai, Y., Yamamoto, T., Matsuoka, A., Sano, A., Satoh, Y., Miyata, T., Fujioka, K., 2003. Design of long-acting formulation of protein drugs with a double-layer structure and its application to rhG-CSF. *J. Control Rel.* 91, 281–297.
- Mandal, T.K., Bostanian, L.A., Graves, R.A., Chapman, S.R., 2002. Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) encapsulated poly(Vinyl Alcohol) hydrogel as a drug delivery system. *Pharm. Res.* 19, 1713–1719.
- Nicoli, S., Santi, P., Couvreur, P., Couarraze, G., Colombo, P., Fattal, E., 2001. Design of triptorelin loaded nanospheres for transdermal iontophoretic administration. *Int. J. Pharm.* 214, 31–35.
- Saravanan, M., Bhaskar, K., Srinivasa Rao, G., Dhanaraju, M.D., 2003. Ibuprofen-loaded ethylcellulose/polystyrene microspheres: an approach to get prolonged drug release with reduced burst effect and low ethylcellulose content. *J. Microencapsul.* 20, 289–302.
- Schuetz, Y.B., Naik, A., Guy, R.H., Vuaridel, E., Kalia, Y.N., 2005. Transdermal iontophoretic delivery of triptorelin in vitro. *J. Pharm. Sci.* 94, 2175–2182.
- Sheikh Hasan, A., Maincent, P., Lamprecht, A., Rissmann, R., Ubrich, N., 2004. A drug delivery system based on the encapsulation of nanoparticles in microparticles. *AAPS J.* 6, T3290.
- Stenekes, R.J., Loebis, A.E., Fernandes, C.M., Crommelin, D.J., Hennink, W.E., 2000. Controlled release of liposomes from biodegradable dextran microspheres: a novel delivery concept. *Pharm. Res.* 17, 690–695.
- Thompson, C.J., Hansford, D., Higgins, S., Rostron, C., Hutcheon, G.A., Munday, D.L., 2007. Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. *Int. J. Pharm.* 329, 53–61.
- Thote, A.J., Chappell, J.T., Gupta, R.B., Kumar, R., 2005. Reduction in the initial-burst release by surface crosslinking of PLGA microparticles containing hydrophilic or hydrophobic drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 31, 43–57.
- Wang, H.T., Schmitt, E., Flanagan, D.R., Linhardt, R.J., 1991. Influence of formulation methods on the in vitro controlled release of protein from poly(ester) microspheres. *J. Control Rel.* 17, 23–31.
- Yamaguchi, Y., Takenaga, M., Kitagawa, A., Ogawa, Y., Mizushima, Y., Igarashi, R., 2002. Insulin-loaded biodegradable PLGA microcapsules: initial burst release controlled by hydrophilic additives. *J. Control Rel.* 81, 235–249.
- Yeo, Y., Park, K., 2004. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch. Pharmacol. Res.* 27, 1–12.

DEUXIÈME PARTIE :

NANOPARTICULES FURTIVES, APPLICATION À L'ENCAPSULATION DE PRINCIPES ACTIFS MODÈLES

INTRODUCTION

De nombreuses thérapeutiques utilisent la voie intraveineuse pour l'administration de principes actifs. Les formes galéniques classiques entraînent une distribution de la molécule dans le sang et l'organisme en fonction des propriétés physico-chimiques du principe actif et ne permettent pas un contrôle des taux plasmatiques. En effet, un principe actif injecté dans la circulation sanguine subit aussitôt une élimination par excrétion rénale ou biliaire et/ou par métabolisme avec une vitesse variable. Ainsi, un objectif important de la recherche galénique est d'augmenter la durée de vie du principe actif, notamment en l'associant à des vecteurs tels que les particules de polymères. L'incorporation de principes actifs dans des vecteurs polymères par encapsulation est largement étudiée aujourd'hui que ce soit en vue d'une administration intraveineuse ou pour tout autre mode d'administration (orale, sous-cutané) (Kabanov *et coll.*, 1992 ; Muller *et coll.*, 1997 ; Jiao *et coll.*, 2002 ; Ubrich *et coll.*, 2004 ; Mesihah *et coll.*, 2005). L'une des techniques d'encapsulation consiste en une double émulsion (eau dans huile dans eau). Elle permet en effet d'encapsuler des principes actifs hydrophiles dans des particules de polymères hydrophobes.

Les micro- et nanoparticules constituent des formes galéniques innovantes. Elles doivent posséder une demi-vie plasmatique suffisamment longue pour permettre une libération plus ou moins contrôlée du principe actif qu'elles contiennent, entraînant alors une diminution du nombre d'injections à réaliser pour maintenir une concentration plasmatique dans la zone d'efficacité thérapeutique. De plus, elles sont susceptibles d'augmenter la demi-vie du principe actif par le simple fait de le protéger d'une éventuelle inactivation.

Cependant, lors de l'injection intraveineuse de nanoparticules, celles-ci sont rapidement détectées par l'organisme et phagocytées via l'intervention des protéines plasmatiques. Cette phagocytose résulte d'interactions entre les vecteurs nanoparticulaires et certaines molécules présentes dans le sang, particulièrement les opsonines qui activent le système immunitaire. Ainsi, au contact du sang, la surface artificielle des particules induit une réponse inflammatoire via l'activation du complément par les leucocytes et les plaquettes. Le système phagocytaire mononucléé, particulièrement les cellules de Küpffer mais aussi les macrophages, reconnaissent

alors les particules et les phagocytent. L'activation du complément joue un rôle important dans le phénomène d'opsonisation et intervient également dans le processus de reconnaissance par les macrophages, entraînant la production de médiateurs de l'inflammation responsables de l'élimination des particules.

Face au problème d'opsonisation des nanoparticules par le système phagocytaire mononucléé, il a été envisagé de réduire les interactions entre les particules et les opsonines afin de limiter le phénomène de phagocytose. Deux stratégies ont alors été abordées. La première consiste en la formation d'une barrière stérique hydrophile à la surface des particules. Sachant que les forces d'attraction entre les protéines plasmatiques et un polymère très hydrophile et donc hydraté sont généralement faibles, l'adsorption des protéines sur le polymère est ainsi défavorisée. Différentes équipes ont alors greffé des macromolécules hydrophiles sur les polymères constitutifs des particules afin de créer une couronne périphérique permettant d'empêcher l'adsorption des protéines plasmatiques (Vittaz *et coll.*, 1996 ; Peracchia *et coll.*, 1999 ; Gref *et coll.*, 2000). La seconde approche consiste en l'inhibition de l'activation du complément par greffage en périphérie des particules de molécules capables de réduire l'action du complément (Labarre, 1990 ; Passirani *et coll.*, 1998a ; Lappegard *et coll.*, 2004).

La modification de surface des nanoparticules par le greffage de molécules hydrophiles leur permet donc d'échapper au processus de phagocytose des cellules du système phagocytaire mononucléé en leur conférant une certaine furtivité. C'est pour cette raison que ces nouveaux vecteurs de médicaments constitués d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile sont qualifiés de particules furtives.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les nanoparticules administrées par voie intraveineuse

L'efficacité des systèmes nanoparticulaires est limitée par leur clairance rapide de la circulation en raison de la capture des nanoparticules par les cellules du système phagocytaire mononucléé (SPM). Cette capture conduit alors à une courte demi-vie du principe actif entraînant des injections répétées et l'administration de doses importantes.

1. Rappels sur la phagocytose

La phagocytose est le mécanisme par lequel certaines cellules vivantes englobent et digèrent les corps étrangers (bactéries, déchets cellulaires, particules, ...). Ces cellules appartiennent à la famille des leucocytes comprenant les polynucléaires neutrophiles ainsi que les monocytes et macrophages. Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules à intervenir lors d'une agression. Dans les heures qui suivent, les monocytes les rejoignent et subissent alors une différenciation en macrophages. Ils vont ensuite persister dans les tissus pendant un laps de temps variable en fonction de l'étendue de l'agression.

Les cellules phagocytaires possèdent une variété de récepteurs pouvant être activés par une particule reconnue comme étrangère et notamment des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines et pour la fraction C3b du complément.

La phagocytose se déroule en plusieurs étapes (Figure 17):

- La première étape est la phase de contact et d'adhérence (A et B) qui permet la reconnaissance de la particule comme étrangère et sa fixation à la membrane des cellules du SPM ; elle est facilitée par le phénomène d'opsonisation faisant intervenir des protéines plasmatiques particulières, les opsonines, qui se fixent à la particule et la rendent plus facilement détectable et donc "phagocytable". Des récepteurs aux

opsonines sont présents à la surface des cellules phagocytaires et le contact récepteur-ligand déclenche la phagocytose. Le système du complément joue un rôle important dans la reconnaissance des agents étrangers. Il comprend un nombre important de protéines qui interagissent entre elles par des réactions en cascade. Le système est activé par la voie classique (réaction antigène-anticorps) ou par la voie alterne (activée par divers composés provenant de bactéries ou de particules étrangères). Ces deux voies ont la propriété d'activer le facteur C3 en C3b qui est une opsonine : adhèrent aux particules étrangères, elle permet leur reconnaissance et leur phagocytose par les cellules phagocytaires pourvues de récepteurs correspondants.

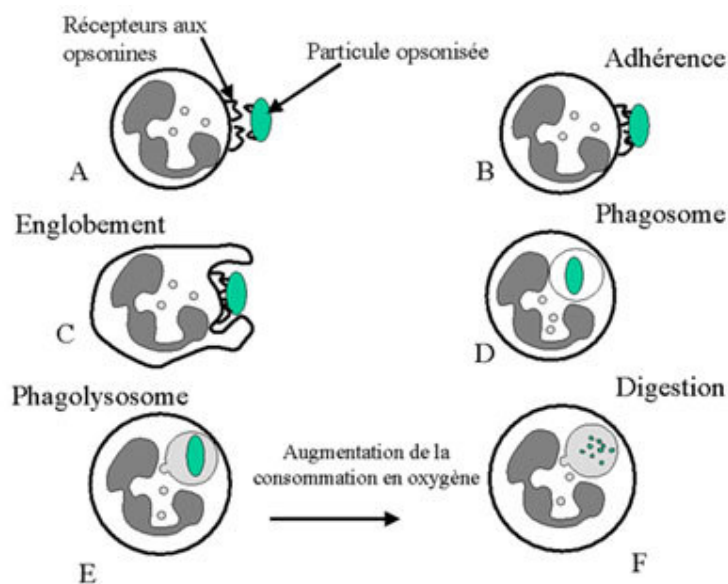


Figure 17 : Représentation schématique des différentes étapes de la phagocytose d'une particule opsonisée par une cellule du SPM (Selon CHU-PS, 2008).

- La seconde étape est la phase d'internalisation et d'ingestion (C et D). Les particules opsonisées présentent à leur surface des motifs reconnus par les récepteurs Fc des immunoglobulines situés à la surface des cellules phagocytaires. L'induction de signaux intracellulaires suite au contact récepteur-ligand entraîne des modifications du cytosquelette et la formation de pseudopodes (invaginations membranaires). La particule phagocytée est alors entourée par les pseudopodes émis par la cellule

phagocytaire. Après que les pseudopodes aient capturé et complètement entouré la particule, une fusion membranaire des pseudopodes forme une nouvelle vacuole intracellulaire, le phagosome, dans lequel se trouve la particule.

- La dernière étape est la phase de digestion (E et F) qui aboutit à la fin du processus de phagocytose. Elle est consécutive à l'accolement et à la fusion des lysosomes de la cellule avec la membrane du phagosome constituant ainsi un phagolysosome au sein duquel les divers enzymes lysosomales vont se déverser et s'attaquer aux divers constituants de la particule, provoquant sa destruction.

2. Concept des nanoparticules furtives et stratégies de recouvrement des vecteurs particulières

De nombreux systèmes particuliers présentent une surface hydrophobe, surtout lorsqu'ils sont constitués de polymères synthétiques. Après leur injection intraveineuse, une fois dans la circulation sanguine, une grande majorité de ces particules est dégradée par le système phagocytaire mononucléé, diminuant ainsi l'effet thérapeutique du principe actif qu'elles contiennent. Il est apparu très rapidement nécessaire de rendre les nanoparticules invisibles vis-à-vis du SPM. Étant donné que la phagocytose dépend entre autres de l'interaction entre les vecteurs nanoparticulaires et les opsonines, il a été envisagé de réduire ces interactions. Pour cela, de nombreux auteurs ont proposé d'élaborer des particules à propriétés de surface contrôlées, dites furtives, en particulier en réalisant des recouvrements hydrophiles et neutres (Dellacherie *et coll.*, 2001).

En effet, en raison du caractère amphiphile de leur surface, les protéines en milieu aqueux s'adsorbent plus ou moins facilement sur la plupart des surfaces solides hydrophobes, grâce à l'établissement d'interactions hydrophobes entre le solide et les segments apolaires de la protéine. Dans le cas de nanoparticules injectées dans la circulation sanguine, l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface des particules contribue au processus de phagocytose par les macrophages et donc à l'élimination

de celles-ci par le système de défense immunitaire. Une manière efficace pour minimiser ces interactions hydrophobes entre le polymère et les protéines plasmatiques consiste à déposer en surface du solide une couche dense d'un polymère hydrophile et neutre. Les chaînes superficielles jouent alors le rôle d'une barrière stérique qui masque les charges et l'hydrophobie de surface des particules et empêche les protéines de s'y fixer (Figure 18).

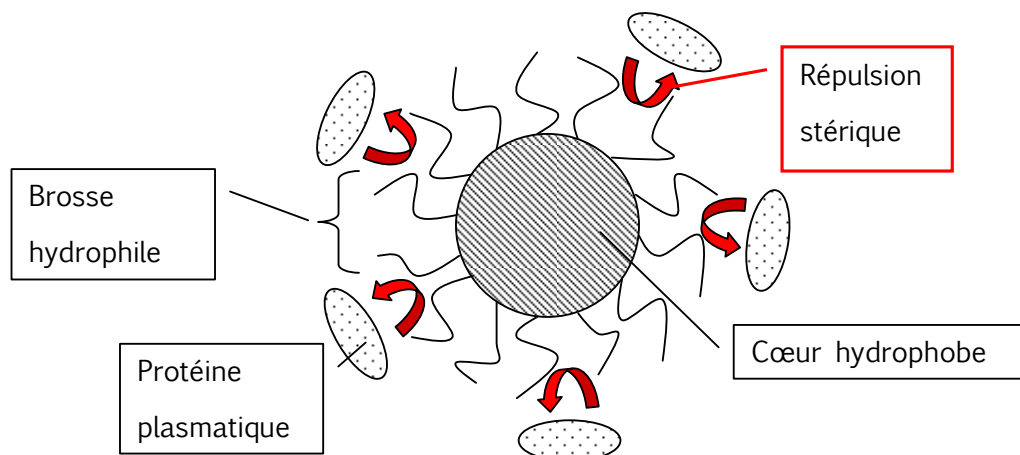


Figure 18 : Représentation schématique d'une nanoparticule constituée d'un polymère hydrophobe et recouverte par un polymère hydrophile.

Les conditions qui conduisent à la répulsion des protéines des surfaces hydrophobes ont été étudiées par Jeon *et coll.* (Jeon et Andrade, 1991 ; Jeon *et coll.*, 1991). Les hypothèses posées par les auteurs sont les suivantes : la protéine est assimilée à une particule sphérique de rayon R , le polymère présente une faible hydrophobicité et la protéine présente une surface hydrophobe. Ils ont alors élaboré un modèle mathématique prenant en compte les quatre types d'interactions entre une protéine et un substrat hydrophobe (Figure 19) : l'attraction hydrophobe entre le substrat et la protéine (a), la répulsion stérique résultant de la constriction des chaînes de polymère (b), l'attraction de Van der Waals entre la protéine et le substrat (c) et l'attraction de Van der Waals entre la protéine et les chaînes de polymère (d). L'approche de la protéine se fait par simple diffusion. Après collision entre la protéine et la surface de la particule, les chaînes de polymère se compriment comme des ressorts. Il a été prouvé que la protection apportée par un polymère hydrophile en surface des particules dépend de la densité de surface de celui-ci, et pour une

protéine de rayon donné, il existe une valeur optimale de densité de polymère permettant d'éviter l'adsorption des protéines.

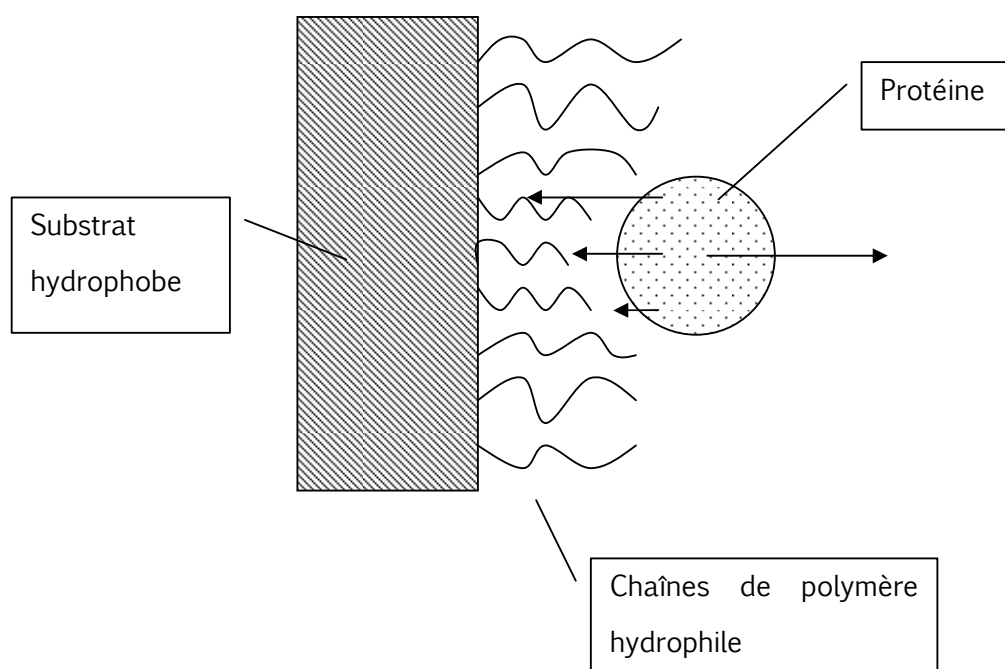


Figure 19 : Interactions entre une protéine et une surface hydrophobe recouverte de chaînes de polymère hydrophile.

Une méthode complémentaire utilisée pour détourner le SPM consiste à inhiber le système du complément en recouvrant la surface des particules avec une molécule capable de limiter son activation et donc de retarder la reconnaissance par le système immunitaire.

Différentes approches ont alors été envisagées afin d'augmenter l'hydrophilie de surface des particules et de masquer les sites nécessaires à l'activation du système du complément. Ces nanoparticules alors appelées furtives sont obtenues par adsorption ou greffage chimique de polymères hydrophiles en leur surface, ou directement durant leur préparation par couplage chimique de polymère hydrophile ou utilisation de copolymères amphiphiles. Certains polysaccharides ont également été testés pour le développement des particules furtives.

21. Le poly(éthylène glycol) (PEG) (Figure 20)

C'est le polymère hydrophile le plus utilisé. C'est un polymère d'oxyde d'éthylène qui se présente sous forme liquide ou semi-solide selon sa masse moléculaire. De nombreuses études ont montré l'effet protecteur du PEG contre la capture des nanoparticules par les macrophages du SPM, tant *in vivo* qu'*in vitro* (Bazile *et coll.*, 1995 ; Beletsi *et coll.*, 2005).

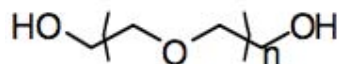


Figure 20 : Formule chimique du poly(éthylène glycol)

211. Greffage de PEG durant la fabrication des nanoparticules

Peracchia *et coll.* ont élaboré des nanoparticules biodégradables recouvertes de PEG par copolymérisation de poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) (PIBCA) et de PEG (Peracchia *et coll.*, 1997b). Des études d'activation du complément ont montré la potentialité de furtivité de nanoparticules de PEG-PIBCA et de MePEG-PIBCA (Peracchia *et coll.*, 1997a). La différence entre les deux types de PEG réside dans leur attachement à la particule : le groupement méthoxy terminal du MePEG serait lié au PIBCA par un seul groupement OH tandis que dans le cas du PEG, deux groupements OH entreraient en jeu (figure 21). La conformation en brosse du MePEG comparativement à la conformation en champignon du PEG serait plus favorable à empêcher la fixation des opsonines en formant une couche plus dense et moins compressible.

212. Utilisation de copolymères amphiphiles préformés

Les nanoparticules constituées d'un copolymère triséquencé PLA-PEG-PLA obtenu par polymérisation chimique de PEG de différentes masses moléculaires (6600 ou 20000 Da) et en diverses proportions (5 à 25 %) ont été préparées par Nakada *et coll.* (1998). La progestérone a été utilisée comme principe actif modèle afin d'étudier l'effet des caractéristiques du polymère sur la pharmacocinétique des particules et leur biodistribution. L'incorporation de PEG dans le polymère ainsi que sa concentration au

sein de celui-ci permettent de prolonger le temps de résidence sanguine comparativement à une solution de progestérone et donc d'éviter la capture par le SPM. De plus, l'ajout de PEG contribue à augmenter la proportion de particules dans le sang (de 21 à 30 %), et donc à diminuer leur séquestration par le foie (de 23 à 9 %).

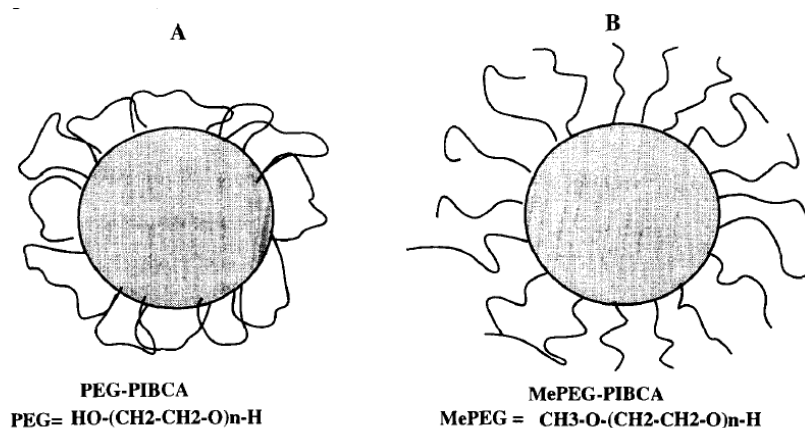


Figure 21 : Nanoparticules de PIBCA recouvertes de PEG, avec différentes configurations de PEG en fonction de la structure chimique (A : PEG ; B : MePEG). (selon Peracchia *et coll.*, 1997a)

Le copolymère biséquencé de PLA-PEG présente les mêmes propriétés (Verrecchia *et coll.*, 1995). Le principe actif encapsulé dans ces nanoparticules est un nouvel antagoniste de la substance P : IBP 5823 ayant été marqué au ¹⁴C. La présence de PEG dans le polymère permet d'augmenter la demi-vie du principe actif de quelques minutes à environ 2h30min. Celui-ci se concentre préférentiellement dans le sang et les tissus et son activité biologique est maintenue.

Le copolymère de PEG-PLGA présente lui aussi des caractéristiques semblables. Beletsi *et coll.* (2005) ont montré que la proportion de copolymère biséquencé entrant dans la composition des nanoparticules joue un rôle important dans le caractère furtif. En effet, quand cette proportion augmente, on observe une persistance vasculaire des nanoparticules et une diminution de leur concentration dans le foie. Cependant, au-delà de 80 % de PEG₅-PLGA₄₅ (PLGA de 45000 Da et PEG de 5000 Da), cette

observation ne se vérifie plus. Il semblerait que les nanoparticules composées de ce mélange soient de taille suffisamment faible (65 nm) pour pénétrer plus facilement dans les tissus, tandis que les particules composées de PEG₅-PLGA₅ (PLGA de 5000 Da et PEG de 5000 Da) de taille légèrement supérieure (96 nm) restent préférentiellement dans le sang. En fait, pour la même proportion de PEG-PLGA dans le mélange PEG-PLGA/PLGA, la quantité de PEG dans le mélange PEG₅-PLGA₄₅/PLGA est plus faible que dans le mélange PEG₅-PLGA₅/PLGA. Quand la quantité de PEG augmente, on observe une augmentation de la densité de la couche de PEG qui confère une barrière stérique plus efficace.

Shi *et coll.* (2005) ont élaboré des micelles chargées en hydrocamptothécine et constituées de copolymère de MePEG-PCL avec des chaînes de PEG de différentes longueurs (2000, 5000 et 10000 Da) et en plusieurs proportions (1 :2, 1 :4, 1 :6, 1 :8) par rapport à la PCL. Ils se sont intéressés à l'épaisseur de la couche hydrophile fixée en surface des micelles (Fixed Aqueous Layer Thickness-FALT). Quand la longueur des chaînes de PEG augmente, l'épaisseur de la couche hydrophile augmente et la densité de la couche de PEG diminue. En effet, les chaînes de PEG plus longues ont besoin de plus d'espace pour conserver leur flexibilité, entraînant une surface de PEG plus clairsemée. La flexibilité des chaînes longues de PEG est essentielle pour permettre aux micelles d'échapper au SPM.

22. Poloxamères et poloxamines

Les poloxamères sont des copolymères triséquencés amphiphiles constitués de deux séquences d'oxyde d'éthylène (OE) (partie hydrophile) et d'une séquence d'oxyde de propylène (OP) (partie hydrophobe) (figure 22). Les poloxamines sont constituées de quatre unités biséquencées OE et OP reliées entre elles par une fonction éthylène diamine (figure 23). L'adsorption des polymères amphiphiles s'effectue par interactions hydrophobes entre les blocs centraux de polyoxypropylène (poloxamère) ou polyoxypropylène éthylène diamine (poloxamine) et la surface hydrophobe de la particule. De cette façon, les chaînons hydrophiles (polyoxyéthylène) créent une couronne hydrophile en surface de la particule.

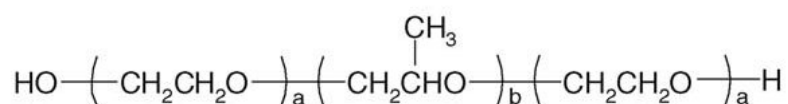


Figure 22 : Formule chimique des poloxamères

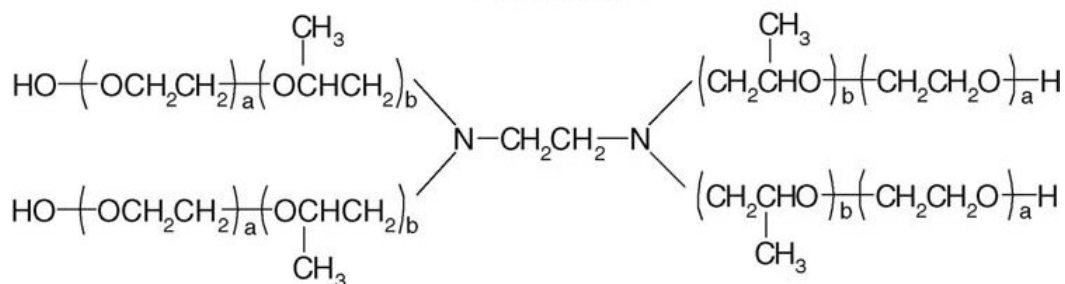


Figure 23 : Formule chimique des poloxamines

Müller *et coll.* (1997) ont montré que la présence de poloxamère 188 en surface de nanoparticules lipidiques solides (NLS) permet de limiter leur phagocytose *in vitro* par les granulocytes mais aussi de limiter leur accumulation dans le foie et la rate après administration intraveineuse à des souris. L'épaisseur maximale de la couche de poloxamère est obtenue avec une concentration de 1,2 %. De plus, le film de poloxamère ne semble pas être affecté par la composition du cœur des particules. Ces NLS pourraient alors encapsuler une drogue sans affecter la composition de leur surface.

Moghim *et coll.* (2003) ont greffé de la poloxamine 908 sur des nanosphères de polystyrène. Après injection IV à des rats, la quantité de nanosphères retrouvées dans le foie et la rate diminue de 60 % pour une concentration de poloxamine de 0,5 mg/mL de suspension comparativement aux nanosphères non recouvertes (tableau 3). Cependant, au-delà de 1 mg/mL, aucune différence significative n'est observée, soulignant le fait que les chaînes sont les plus serrées possibles et présentent une configuration en brosse qui s'étend sur toute la surface de la particule. Des résultats similaires ont été obtenus avec des particules nues incubées dans un sérum surchargé en poloxamine avant administration. Ces observations démontrent que même en présence des protéines sériques, la poloxamine peut modifier la surface des particules.

Tableau 3 : Distribution des nanoparticules de polystyrène recouvertes de poloxamine 3h après injection intraveineuse. (selon Moghimi *et coll.*, 2003)

Distribution at 3 h post-injection (% of injected dose)		Poloxamine (mg/ml)
Liver+spleen	Blood	
63.6 ± 2.0	1.0 ± 0.1	0
20.6 ± 3.7	48.2 ± 1.9	0.5
9.3 ± 1.6	63.4 ± 3.9	1.0
8.6 ± 1.4	61.2 ± 2.2	2.0
9.9 ± 1.2	58.6 ± 3.6	5.0

23. Le poly(oxyde d'éthylène) (POE)

Le POE est un polymère hydrophile de structure chimique identique au PEG. La différence principale réside dans leurs propriétés physiques différentes dues à la longueur des chaînes de polymère. Le POE a été utilisé par plusieurs équipes afin de tenter de préparer des vecteurs furtifs. Vandorpe *et coll.* (1997) ont élaboré des nanoparticules de poly(organophosphazène) (PF) dont la surface a été modifiée par adsorption d'un copolymère de poly(organophosphazène)-POE (PF-POE₅₀₀₀).

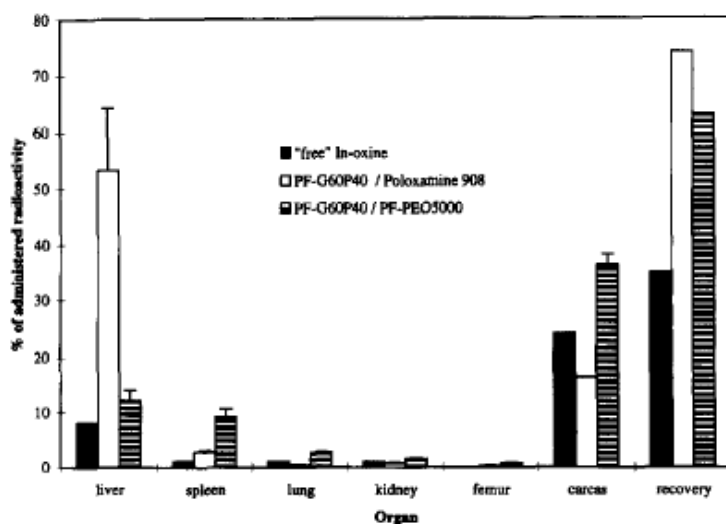


Figure 24 : Répartition de la ¹¹¹In-oxine libre (noir) et des nanoparticules de poly(organophosphazène) (PF) recouvertes de poloxamine 908 (blanc) ou d'un copolymère de poly(organophosphazène)-POE (PF-POE₅₀₀₀) (rayé) 3h après injection intraveineuse à des rats. (selon Vandorpe *et coll.*, 1997)

Ces nanoparticules administrées chez le rat comparativement à des nanoparticules recouvertes de poloxamine 908 présentent, 3h après injection intraveineuse, une vitesse d'élimination plus lente, avec 51,4 % de la dose restant dans la circulation et seulement 12,3 % s'accumulant dans le foie (figure 24). Les nanoparticules recouvertes de poloxamine quant à elles, se retrouvent majoritairement dans le foie (53,2 %) et une faible quantité reste dans la circulation sanguine (10,7 %).

Zambaux *et coll.* (2000) ont étudié des nanoparticules constituées d'un copolymère amphiphile biséquencé de monométhoxypoly(oxide d'éthylène)-acide polylactique (MPOE-PLA) et d'acide polylactique (PLA) (75/25). Ces nanoparticules ont été marquées par un agent fluorescent et injectées à des cobayes avec comme contrôle des nanoparticules simples d'acide polylactique (PLA). L'estimation de la furtivité se fait alors par la mesure des particules phagocytées par les granulocytes. Celle-ci se fait par l'analyse des granulocytes fluorescents, dénombrés par cytométrie de flux, présents dans les échantillons de sang prélevés sur l'animal. Neuf minutes après l'administration des nanoparticules de PLA, environ 30 % des granulocytes sont fluorescents et ce pourcentage diminue progressivement jusqu'à 10 % à 22h (figure 25). Pour les nanoparticules de copolymère MPOE-PLA/PLA, les granulocytes fluorescents (25 %) n'apparaissent que 11h après l'injection intravasculaire et cette proportion diminue rapidement vers 14h puis lentement jusqu'à des valeurs nulles à 24h. Il a été rapporté précédemment que la présence de MPOE à la surface des nanoparticules permet de réduire l'adsorption des protéines et l'activation du complément (Vittaz *et coll.*, 1996). L'effet de dysopsonine du MPOE pourrait impliquer différents processus d'opsonisation se traduisant par un délai plus long dans le processus de phagocytose.

Le POE présente donc des propriétés capables de limiter la reconnaissance de particules injectées dans le système sanguin en créant en périphérie des particules une couche hydrophile ne favorisant pas l'adsorption des opsonines nécessaire à l'initiation de la phagocytose.

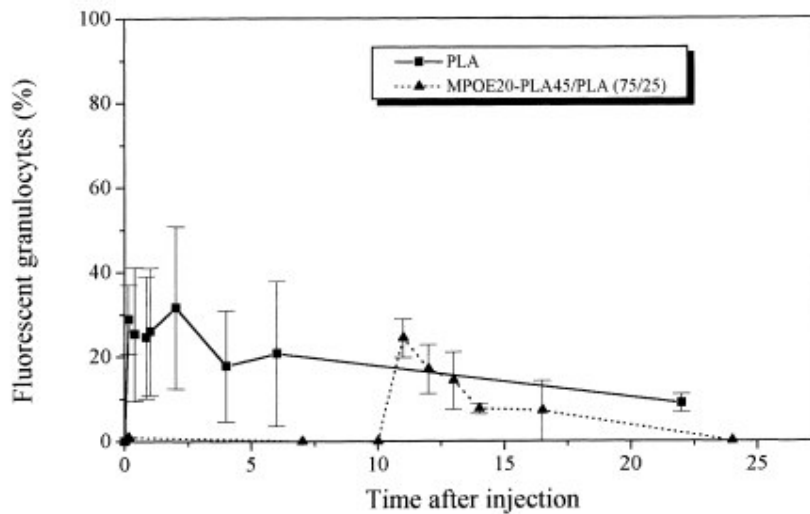


Figure 25 : Pourcentage de granulocytes fluorescents après administration intravasculaire de nanoparticules fluorescentes de PLA et de MPOE-PLA/PLA (75/25) à des cobayes en fonction du temps (8 mg/kg, n=3). (selon Zambaux *et coll.*, 2000)

24. Les polysaccharides

Les dérivés polysaccharidiques peuvent également être utilisés pour modifier les propriétés de surface de vecteurs particuliers à base de polyester. Dans ce cas, les polysaccharides utilisés sont soit des polysaccharides chargés, soit des polysaccharides électriquement neutres. Dans le second cas, des chaînons hydrophobes et/ou miscibles avec le polyester doivent être greffés sur le polysaccharide afin qu'ils puissent s'ancrer dans la matrice polyester, la partie polysaccharidique assurant la surface hydrophile.

Ainsi, Passirani *et coll.* (1998b) ont élaboré des nanoparticules fluorescentes de poly(méthyl méthacrylate) (PMMA) greffées ou non d'héparine (Nanohep) ou de dextran (Nanodex) de façon covalente. Après injection intraveineuse des 3 formulations à des souris, des prélèvements sanguins sont effectués afin de suivre le devenir des particules dans la circulation sanguine. Les nanoparticules de PMMA nues ne sont plus détectables 30 minutes après administration alors que celles recouvertes d'héparine ou de dextran sont encore visibles après 48 h (figure 26). Les mêmes auteurs avaient

précédemment démontré que ces mêmes particules étaient capables de limiter la consommation du complément *in vitro* (Passirani *et coll.*, 1998a), suggérant que les propriétés d'activation du complément du cœur de PMMA sont masquées par l'effet protecteur de chaque polysaccharide. Dans le cas des Nanohep, cet effet serait probablement augmenté par les propriétés d'inhibition de l'activation du complément de l'héparine (Maillet *et coll.*, 1983 ; Ekre *et coll.*, 1992). La structure externe des particules formée par la couche de polysaccharide est capable d'augmenter de façon très importante leur demi-vie plasmatique (de 3 min pour les particules nues de PMMA à plus de 5 h pour les particules greffées d'héparine ou de dextran).

Ces résultats mettent en avant le potentiel des particules recouvertes d'héparine sur leur surface à devenir des véhicules de médicament capables d'inhiber le processus d'opsonisation, de ralentir leur élimination et donc d'augmenter leur temps de circulation dans l'organisme.

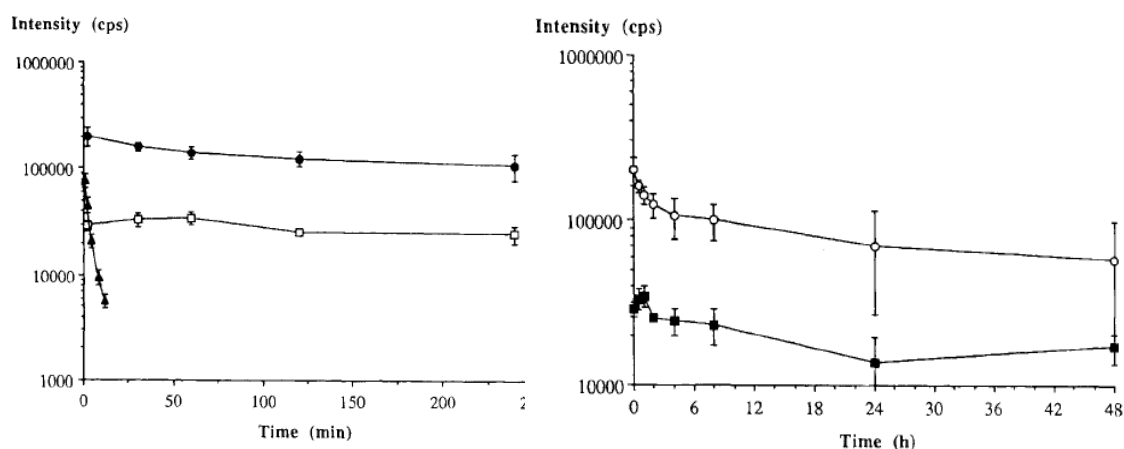


Figure 26 : Concentrations plasmatiques en fonction du temps après injection des suspensions des 3 types de nanoparticules (● : Nanohep, □ : Nanodex, ▲ : PMMA) à des souris. (selon Passirani *et coll.*, 1998b)

Les expérimentations *in vitro* effectuées par Videm (2004) ont montré que la présence d'héparine permettrait de limiter la fixation et le développement des polynucléaires neutrophiles sur des plaques nues de polyéthylèneimine. La répulsion électrostatique entre l'héparine polyanionique (figure 27) et les neutrophiles chargés

eux aussi négativement permettrait de diminuer l'adhésion de ces derniers sur les plaques. La présence d'héparine confère une barrière stérique contre l'adhésion. Les auteurs ont pu démontrer que ces propriétés de l'héparine sont indépendantes de ses propriétés anticoagulantes.

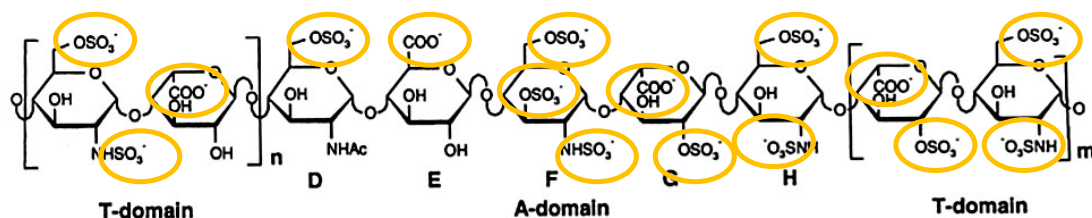


Figure 27 : Formule chimique d'une héparine de bas poids moléculaire

3. Evaluation de la furtivité

31. *In vitro*

Le potentiel de furtivité des nanoparticules injectées par voie intraveineuse peut se mesurer *in vitro* par leur capacité à activer le système du complément. En effet, l'interaction des nanoparticules avec les protéines du complément joue un rôle essentiel dans leur opsonisation et leur phagocytose, conduisant à leur élimination. Plusieurs techniques sont actuellement utilisées pour évaluer la furtivité *in vitro* : le test du pouvoir hémolytique du sérum ou test du CH50, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines.

311. Le test du CH50

Il s'agit d'un test hémolytique basé sur le principe d'activation de la voie classique et de la voie finale commune d'activation du complément (Vonarbourg *et coll.*, 2006b). Le CH50 est la plus petite quantité de sérum capable d'entraîner la lyse de 50 % d'une suspension d'hématies de mouton sensibilisées par des anticorps anti-hématies. Pour estimer la variation du CH50 en présence de particules pendant un temps d'incubation déterminé, différentes quantités de particules sont mises en contact avec du sérum humain normal (SHN) et incubées à 37°C sous agitation douce. Plus les

particules sont activatrices, plus la quantité de protéines adsorbées est importante (figure 28). Une quantité connue d'érythrocytes de mouton sensibilisés est ensuite ajoutée dans le milieu d'incubation. Les érythrocytes sensibilisés sont alors lysés par les protéines du complément contenues dans le SHN non adsorbés sur les particules et restant libres dans le milieu d'incubation. Cette hémolyse est mesurée par densité optique à 415 nm comparativement à un sérum contrôle. Plus les nanoparticules sont activatrices, moins il reste de protéines du complément libres dans le milieu et moins l'hémolyse est importante. On observe alors une diminution du CH50. Les résultats obtenus sont exprimés en consommation d'unités de CH50. Pour comparer des particules de différents diamètres, les quantités de consommation d'unités de CH50 sont exprimées en fonction de la surface totale des particules.

Passirani *et coll.* (1998a) ont démontré que la consommation de CH50 variait en fonction de la taille des particules de poly(méthyl méthacrylate) mises en contact. Plus la surface totale des particules est importante, plus la consommation de CH50 est élevée.

De plus, Lemarchand *et coll.* (2006) ont observé que la nature de la surface des particules influait considérablement sur la consommation de CH50. Des nanoparticules de copolymère constitué de poly- ϵ -caprolactone associée à du dextran sont plus activatrices du complément que les mêmes particules de PCL non modifiée alors qu'elles sont moins activatrices lorsque la PCL est associée à du poly(éthylène glycol) (PEG).

La configuration et la densité de la couche de PEG en surface des particules jouent aussi un rôle important dans l'activation du complément (Peracchia *et coll.*, 1997a). Les chaînes de PEG fixées par une seule extrémité sur des nanoparticules de polyisobutylcyanoacrylate (PIBCA) forment une couche plus épaisse et plus flexible que les chaînes fixées par leurs deux extrémités, prévenant ainsi mieux l'opsonisation en minimisant les liaisons avec les protéines (figure 29). Gbadamosi *et coll.* (2002) confirment cette hypothèse en montrant que des nanoparticules greffées avec des molécules de méthoxy-poly(éthylène glycol) (mPEG) sont susceptibles de bloquer les sites d'adsorption des protéines plasmatiques et ainsi diminuer le CH50. De plus, pour

obtenir la suppression de l'activation du complément, une configuration en brosse des chaînes de PEG est préférable.

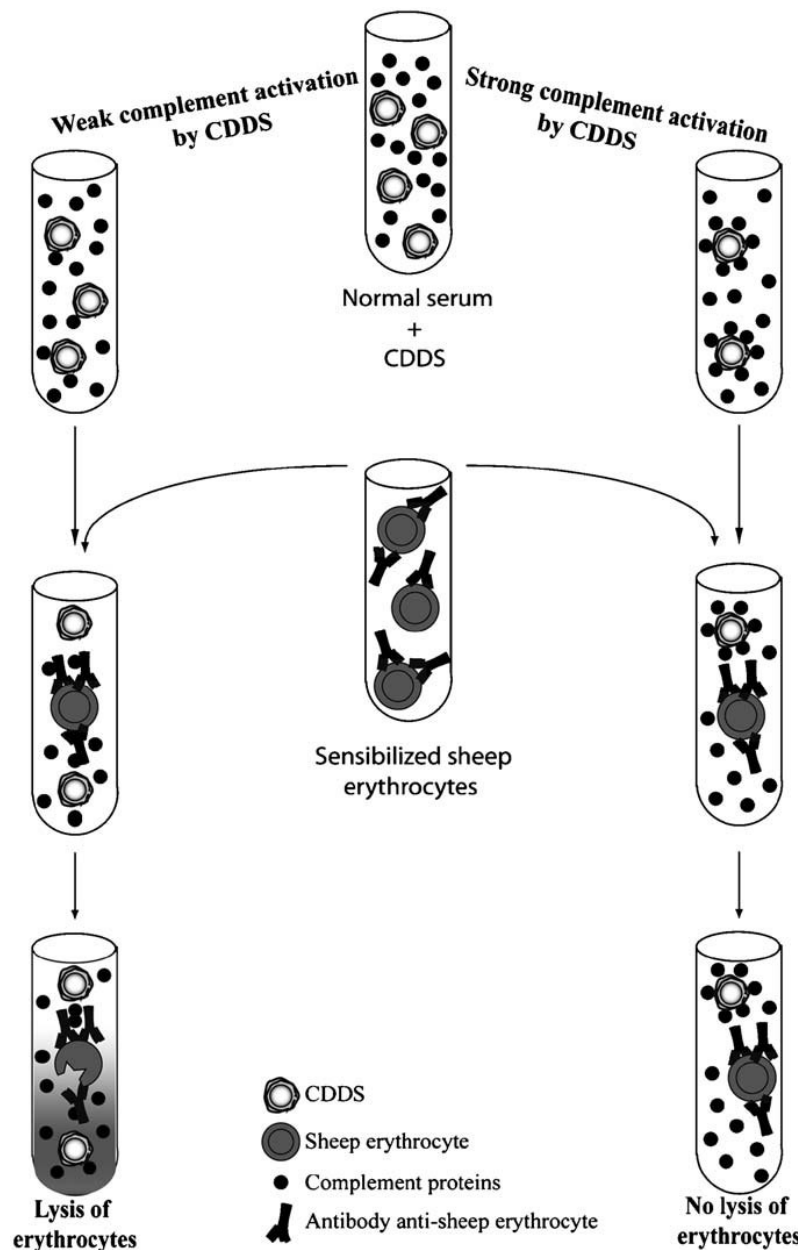


Figure 28 : Représentation schématique de la technique du CH50 mesurant l'activation du complément. (Selon Vonarbourg *et coll.*, 2006a)

De même, des nanoparticules d'acide polylactique (PLA) greffées avec du polyoxyde d'éthylène (POE) présentent une consommation de CH50 identique au contrôle tandis que les mêmes particules nues montrent une consommation accrue du complément (Vittaz *et coll.*, 1996). Cette consommation varie en fonction de la densité de POE greffé, plus la couche de POE est dense, plus la consommation de CH50 est faible.

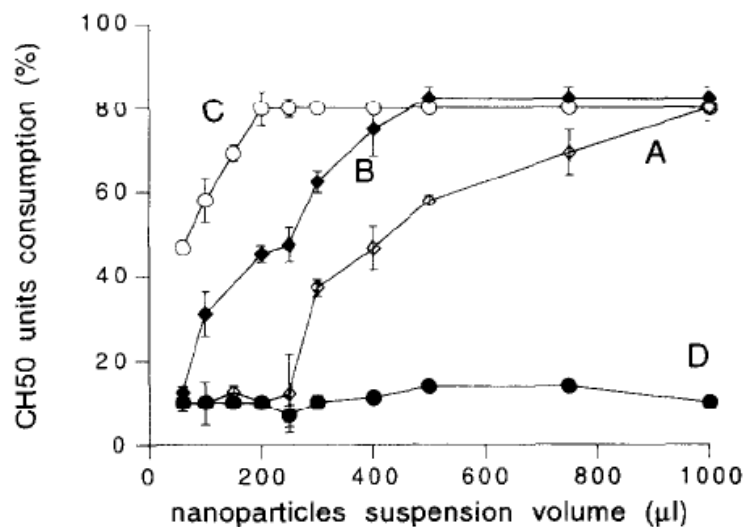


Figure 29 : Consommation de CH50 de nanoparticules de PEG-PIBCA (A), MePEG-PIBCA (B) et de PIBCA (C) en fonction du volume de suspension nanoparticulaire. (D) Activation spontanée du complément. (selon Peracchia *et coll.*, 1997a)

La technique du test de CH50 est intéressante pour tenter de prévoir la réaction des particules *in vitro* mais elle n'est cependant pas applicable à des vecteurs recouverts de substances inhibant ou favorisant eux-mêmes l'hémolyse.

312. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

La technique de SDS-PAGE est utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Les protéines sont dénaturées par du sodium dodécylsulfate (SDS), détergent anionique très fortement chargé. Le SDS déstructure la structure spatiale des protéines sur lesquelles il se fixe, linéarisant les protéines et leur

conférant ainsi une charge négative identique. La séparation est alors uniquement fonction de la masse moléculaire dans le gel de polyacrylamide qui se comporte comme un tamis moléculaire. La charge de l'ensemble molécule dénaturée/SDS (et donc sa vitesse de migration) dépend alors uniquement de la longueur de la chaîne protéique. En l'absence de gel, toutes les protéines ainsi traitées migreraient à la même vitesse. En présence du gel, les protéines se répartissent le long du trajet de migration en fonction de leur masse moléculaire, la migration des protéines de grande taille étant ralentie par rapport aux protéines de petite taille.

Cette technique permet de mesurer l'adsorption des protéines aux vecteurs particuliers. Dans un premier temps, les nanoparticules sont incubées dans un plasma thermostaté à 37°C pendant un temps déterminé. Elles sont ensuite récupérées par centrifugation et lavées plusieurs fois afin d'éliminer les protéines non adsorbées. Les protéines adsorbées sur les nanoparticules sont récupérées par lavage dans une solution de solubilisation contenant du SDS et du dithioérythritol, agent réducteur qui coupe les ponts disulfures. Une quantité déterminée de protéines est alors déposée sur le gel de polyacrylamide et séparée par électrophorèse. Des échantillons de protéines de masse moléculaire connue sont également déposés à côté des échantillons à analyser pour permettre d'identifier les bandes obtenues après migration (figure 30).

Pour étudier l'influence des propriétés de surface des nanoparticules sur leur phagocytose, Gaur et coll. ont choisi de suivre la fixation des marqueurs de 185, 66, 52 et 20 kDa correspondant respectivement au fragment C3b du complément, à l'albumine et aux chaînes longues et courtes des immunoglobulines G (Gaur *et coll.*, 2000). Ces opsonines fixées à la surface de particules forment une liaison entre les particules et les macrophages et favorisent leur capture par ces derniers. Les nanoparticules constituées de polyvinylpyrrolidone (PVP), polymère hydrophile, sont capables de limiter la fixation des opsonines, comparativement à celles constituées d'un copolymère de PVP et de *N*-isopropylacrylamide (NIPAAM) ; l'augmentation de la quantité de NIPAAM dans le copolymère se traduisant par l'augmentation de

l'hydrophobicité de surface des particules. Cette expérience confirme qu'il existe une relation directe entre le caractère hydrophobe de la surface des particules et le processus d'opsonisation.

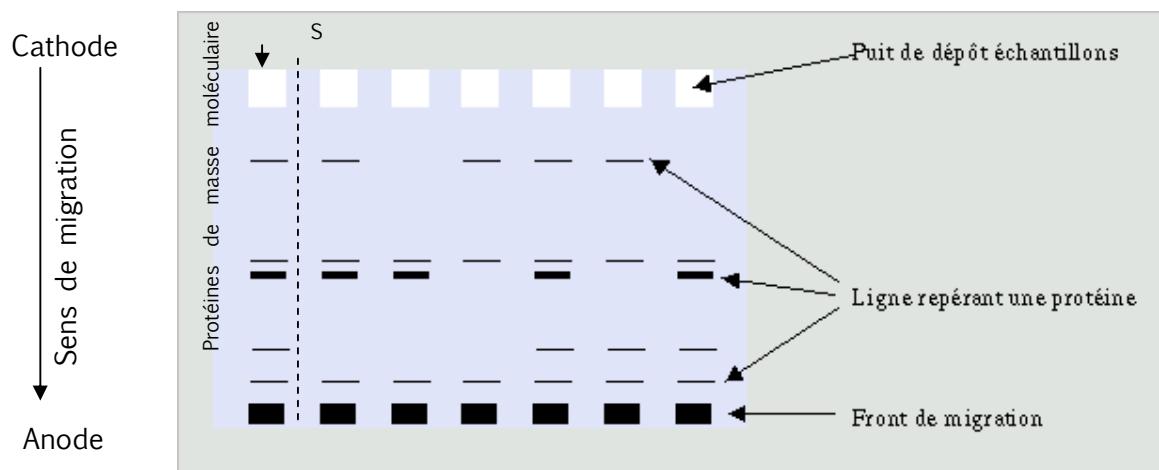


Figure 30 : Représentation schématique d'un gel d'électrophorèse après migration des échantillons.

Les nanosphères préparées par Ogawara *et coll.* (2004) recouvertes ou non de sérum albumine humaine (SAH) et testées par SDS-PAGE présentent des profils d'adsorption de protéines sériques identiques en qualité (figure 31) mais les nanosphères recouvertes de SAH fixent neuf fois moins de protéines sériques au total (excepté pour l'albumine). Comme les nanosphères classiques fixent davantage de protéines du sérum à leur surface que celles recouvertes de SAH, les auteurs émettent l'hypothèse qu'elles sont sans doute captées plus facilement par le foie via des mécanismes médiés par des récepteurs. De plus, le greffage de SAH (protéine constitutive du sérum présentant une activité de dysopsonine) sur les nanosphères permettrait de réduire leur hydrophobicité et d'altérer l'association des composants du sang, incluant les opsonines, à la surface des particules. Il en résulterait alors une diminution de l'affinité des nanosphères pour le foie et une prolongation de leur temps de circulation.

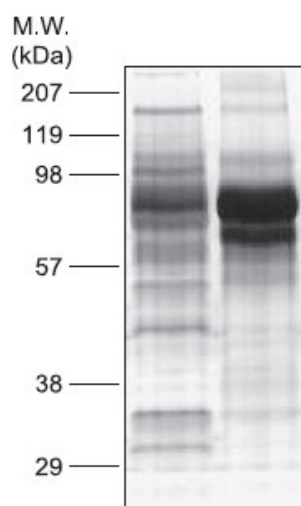


Figure 31 : Gel de SDS-PAGE de protéines de sérum associées à des nanosphères classiques (à gauche) et des nanosphères recouvertes de SAH (à droite) incubées dans un sérum. (selon Ogawara *et coll.*, 2004)

Fang *et coll.* (2006) ont préparé des nanoparticules de poly (hexadécyl cyanoacrylate) (PHDCA) et de poly (méthoxypolyéthylèneglycol cyanoacrylate-co-hexadécyl cyanoacrylate) (PEG-PHDCA) chargées de TNF- α humain recombinant (rHuTNF- α). Le but du travail était de révéler l'influence de la masse moléculaire du MePEG et de la taille des particules sur l'adsorption des protéines aux nanoparticules *in vitro* (tableau 4). La technique de SDS-PAGE montre que, comparativement aux nanoparticules de PHDCA, la quantité de protéines adsorbées sur les nanoparticules de PEG-PHDCA est nettement réduite. De plus, cette quantité dépend fortement de la masse moléculaire du MePEG et de la taille des particules ; les particules comportant un MePEG de 5000 Da et ayant un diamètre moyen de 80 nm ainsi que celle comportant un MePEG de 10000 kDa et de diamètre égal à 169 nm présentent moins de protéines adsorbées à leur surface que les particules plus grosses (172, 243 nm) ou comportant un MePEG de masse moléculaire plus faible (2000 Da). Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les nanoparticules de PHDCA de tailles différentes (85, 173, 242 nm), démontrant que la taille seule des particules ne permet pas d'expliquer les différences de comportement des particules vis-à-vis des protéines sériques. Ici, le rôle de la densité de la couche de MePEG est essentiel. En effet, la masse moléculaire de MePEG greffé sur le polymère constitutif des particules joue un rôle important sur l'épaisseur de la couche aqueuse et la distance entre les chaînes de MePEG, deux facteurs essentiels pour la recherche de particules pouvant échapper au SPM.

Tableau 4 : Adsorption des protéines sériques sur des nanoparticules de PEG-PHDCA et de PHDCA incubées dans un sérum murin et quantifiées par BCA. (selon Fang *et coll.*, 2006)

Table 2 – The adsorption of serum proteins to PEG-PHDCA and PHDCA nanoparticles incubated in murine serum and quantified by BCA assay	
Nanoparticles	Protein adsorbed (%)
PEG ₅₀₀₀ -PHDCA (243 nm)	34
PEG ₅₀₀₀ -PHDCA (171 nm)	23
PEG ₅₀₀₀ -PHDCA (80 nm)	6
PEG ₂₀₀₀ -PHDCA (172 nm)	29
PEG ₁₀₀₀₀ -PHDCA (169 nm)	9
PHDCA (242 nm)	58
PHDCA (173 nm)	56
PHDCA (85 nm)	57

La technique de SDS-PAGE permet donc d'évaluer qualitativement les interactions entre des particules présentant des surfaces modifiées et les protéines du sérum *in vitro* et ainsi tenter de prévoir leur devenir *in vivo* face aux macrophages du SPM. Cette technique ne peut fournir que des renseignements semi-quantitatifs.

313. L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel d'acrylamide (2D-PAGE) (Figure 32)

La méthode d'analyse la plus fine d'un mélange complexe de protéines est l'électrophorèse bidimensionnelle (E2D), développée initialement par O'Farrel (1975). Il s'agit de la combinaison d'une électrofocalisation isoélectrique (FIE) qui sépare selon le point isoélectrique (pI) dans un gradient de pH, suivie d'une électrophorèse dénaturante au SDS (sodium dodécyl sulfate), séparant selon la masse moléculaire. Dans un premier temps, le mélange est séparé selon le pI dans un gel de polyacrylamide cylindrique ou plat comportant un gradient de pH. La bande verticale du gel plat (ou le cylindre de gel) est récupéré et incubé dans un tampon contenant les éléments du gel d'un système dénaturant au SDS. Cette bande est déposée sur un gel d'électrophorèse, permettant une séparation selon la masse moléculaire. La révélation est effectuée au nitrate d'argent. Les spots de protéines sont ensuite identifiés par

comparaison avec une banque de données correspondant au plasma utilisé. Cette approche permet donc de séparer un mélange selon deux paramètres complètement indépendants. Ainsi, une FIE ou une SDS-PAGE peuvent séparer environ 60 à 100 composantes. Combinant ces deux méthodes lors d'une électrophorèse bidimensionnelle, plus de 1000 polypeptides peuvent être discriminés.

Blunck *et coll* (1993) ont adapté cette technique aux vecteurs colloïdaux dans le but de déterminer qualitativement et semi quantitativement l'adsorption des protéines plasmatiques sur des nanoparticules. La préparation des échantillons à analyser se fait de la même manière que pour la SDS-PAGE. Comme chaque protéine révélée par la 2D-PAGE possède ses propres caractéristiques (point isoélectrique et masse moléculaire), les protéines fixées sur les particules peuvent être identifiées en routine par comparaison avec des gels obtenus à partir d'une 2D-PAGE des protéines de plasma humain. Les protéines majoritairement analysées en électrophorèse bidimensionnelle sont l'albumine, les immunoglobulines (IgG - chaînes lourdes et chaînes légères, IgM), les apolipoprotéines (Apo A-I, A-IV, C-II, C-III, J, E) et le fibrinogène. Les IgG sont connues comme des protéines opsonisantes et pourraient donc affecter la demi-vie des particules après injection intraveineuse.

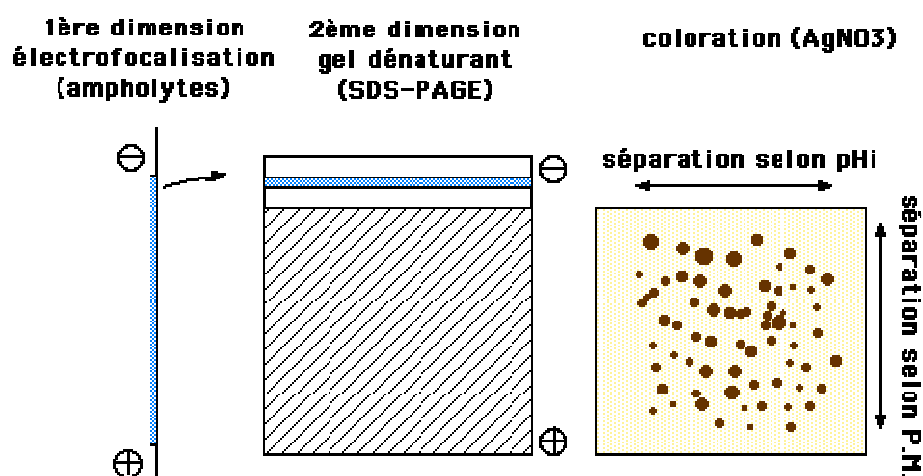


Figure 32 : Représentation schématique des différentes étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel d'acrylamide.

Peracchia *et coll.* (1999) ont effectué une analyse avec des nanoparticules de polyhexadécylcyanoacrylate (PHDCA) et leurs équivalents PEGylés avec différents ratio de PEG (1 : 2 ou 1 : 5). Les profils d'adsorption protéiques sont semblables pour les 3 formulations mais la quantité totale de protéines adsorbées ainsi que le nombre de protéines différentes changent distinctement entre les particules PEGylées et les non-PEGylées. Comme on peut s'y attendre, le nombre de spots et la quantité totale de protéines diminuent quand la quantité de PEG en surface augmente. La surface présentant des chaînes alkyl hydrophobes (PHDCA) fixe beaucoup plus les chaînes lourdes que les chaînes légères d'IgG, respectivement 43,5 % et 21,5 % des protéines totales. Cette quantité diminue quand on augmente la proportion de PEG entrant dans la composition du polymère : 26 % de chaînes lourdes et 9,6 % de chaînes légères pour le ratio 1 : 2. Cependant, la quantité d'apolipoprotéines augmente lors de l'introduction de PEG à la surface des particules, pour le ratio 1 : 5, surtout l'Apo A-I et l'Apo C-III pour le ratio 1 : 2. Cette analyse a donc montré des propriétés d'évitement des protéines par les particules de PHDCA PEGylées.

Gref *et coll.* (2000) ont étudié quant à eux l'influence de la longueur des chaînes de PEG, donc de leur masse moléculaire et de leur densité à la surface des particules sur l'adsorption des protéines.

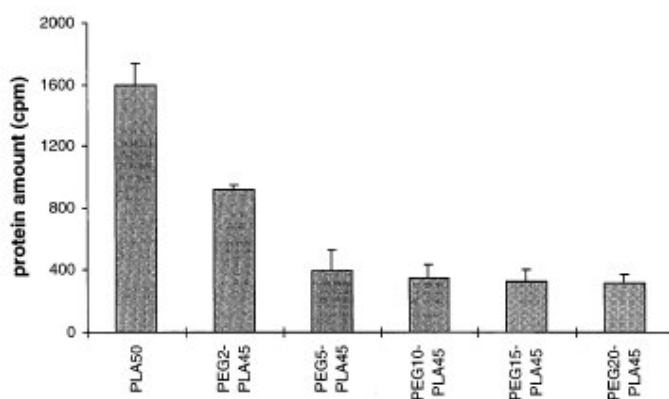


Figure 33 : Quantités totales de protéines adsorbées sur des nanoparticules de PEG-PLA avec différentes masses moléculaires de PEG. La quantité de protéines est exprimée en unités arbitraires (n=2). (selon Gref *et coll.*, 2000)

Les nanoparticules étudiées étaient constituées de PLA sur lequel étaient greffés ou non des PEG de longueurs de chaînes différentes. L'addition de PEG de 2000 Da sur le PLA diminue la quantité de protéines plasmatiques fixées de 57 % (figure 33). Si on considère un PEG de 5000 Da, cette quantité est encore diminuée de moitié. Cependant, augmenter la masse moléculaire du PEG au-delà de 5000 a peu d'effet sur la quantité de protéines fixées.

En effet, l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface des particules ne peut pas être totalement inhibée parce que toute la surface de la particule n'est jamais recouverte entièrement par les chaînes de PEG. Certaines parties hydrophobes de la surface ne sont alors pas protégées par le PEG et peuvent alors interagir avec les protéines plasmatiques. Qualitativement, les profils des électrophorèses bidimensionnelles effectuées pour les différentes formulations sont similaires (figure 34). On note une réduction de la fixation d'Apo E par des chaînes longues de PEG, de même pour les IgG, le fibrinogène et l'Apo J. Cependant, pour d'autres protéines comme l'Apo A-IV et l'Apo C-III, la réduction maximale d'adsorption s'observe avec le PEG de 5000 Da et l'augmentation de la masse moléculaire du PEG n'a pas d'influence. Ainsi, l'existence de seuils exigés pour la réduction maximale d'adsorption dépendant des espèces protéiques pour les longues chaînes de PEG a pu être démontrée.

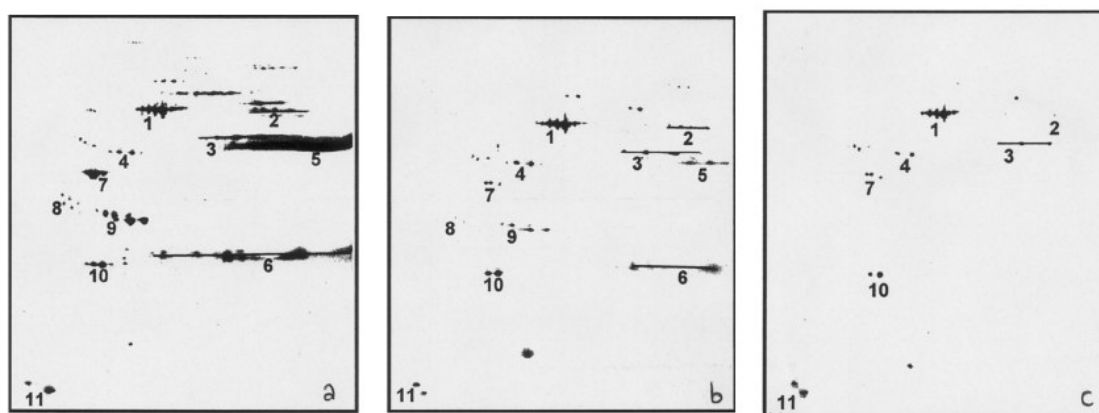


Figure 34 : Gels de 2D-PAGE de protéines plasmatiques adsorbées sur des nanoparticules de PLA greffées avec (a) PEG de 2000 Da, (b) PEG de 5000 Da et (c) PEG de 10000 Da. (1) albumin ; (2) fibrinogène α ; (3) fibrinogène β ; (4) fibrinogène γ ; (5) IgG γ ; (6) Ig à chaînes courtes ; (7) apoA-IV ; (8) apoJ ; (9) apoE ; (10) apoA-I ; (11) apoC-III (selon Gref *et coll.*, 2000)

Le PEG de masse moléculaire 5000 Da semblant être le seuil pour la réduction maximale de l'adsorption protéique, il a été choisi par Gref *et coll.* (2000) afin d'évaluer l'influence de la densité de PEG en surface des particules, sa proportion dans la composition du polymère utilisé variant de 0,5 à 20 %. Avec 0,5 % de PEG, la quantité totale de protéines adsorbées diminue de moitié par rapport aux particules de PLA de référence (figure 35). Les particules contenant 5 % de PEG fixent encore trois fois moins de protéines que celles comportant un PEG de plus faible densité. Cependant, lorsqu'on augmente encore la proportion de PEG dans le polymère, la quantité de protéines fixées ne varie plus. Comme expliqué précédemment, l'adsorption des protéines ne peut pas être bloquée totalement. La réduction la plus importante s'observe pour l'Apo E, les IgG et l'Apo C-III. En résumé, l'étude de Gref *et coll.* montre que l'efficacité optimale pour réduire l'adsorption protéique sur les nanoparticules de PLA est obtenue avec le greffage de PEG de 5000 kDa dans une proportion située entre 2 et 5 % de polymère PEGylé par rapport à la masse totale de polymère.

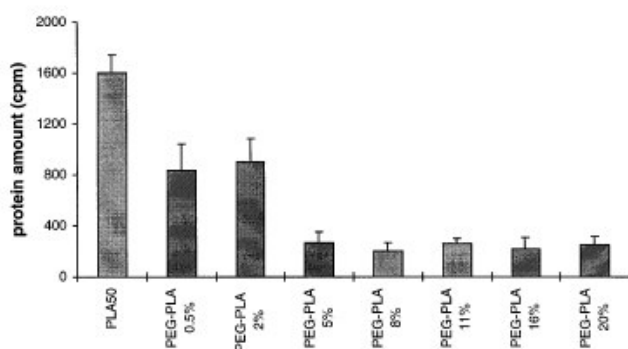


Figure 35 : Quantités totales de protéines adsorbées sur des nanoparticules de PEG-PLA avec différentes proportions de PEG. La quantité de protéines est exprimée en unités arbitraires (n=2). (selon Gref *et coll.*, 2000)

Le greffage de dextran à la surface de particules de PCL permettrait également de limiter la fixation des protéines plasmatiques (Lemarchand *et coll.*, 2006). Une réduction de 56 % de fixation des chaînes longues et légères d'IgG est observée entre des particules de PCL et les mêmes particules greffées avec du dextran. La masse moléculaire du dextran joue également un rôle puisque un dextran de 40000 Da permet de fixer 2,6 fois moins de protéines plasmatiques sur les particules par rapport à un dextran de 5000 Da. Cette différence pourrait être attribuée à la conformation et à la mobilité du dextran à la surface des particules, le dextran de 40000 Da formant

des boucles plus grandes et plus flexibles que le dextran 5000 qui est dense et rigide (figure 36).

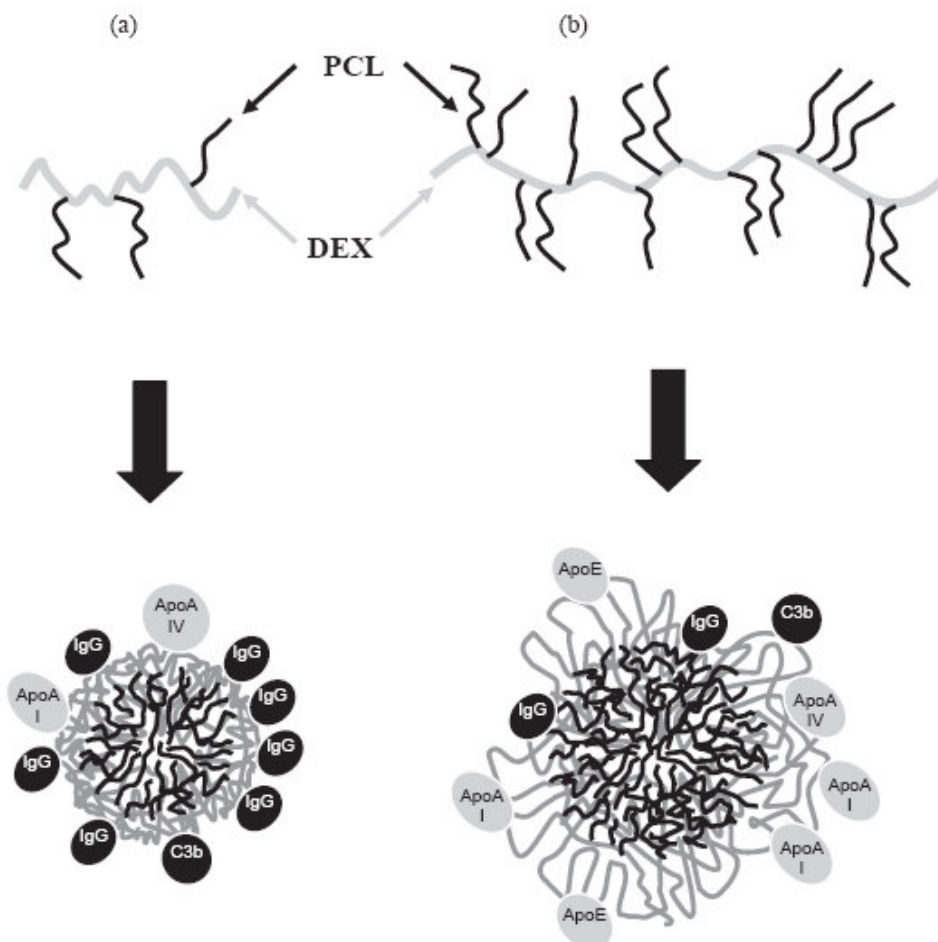


Figure 36 : Représentation schématique de nanoparticules de PCL recouvertes de dextran de 5000 Da (a) et de 40000 Da (b). (selon Lemarchand *et coll.*, 2006)

Labarre *et coll.* (2005) confirment cette hypothèse avec la fabrication de particules de poly(isobutylcyanoacrylate) (PIBCA) recouvertes de dextran de différentes natures. La conclusion de ces travaux démontre que l'effet protecteur contre l'adsorption des protéines plasmatiques par répulsion stérique dépend de la conformation et de la masse moléculaire des chaînes de dextran. La conformation la plus efficace est obtenue pour les plus longues chaînes qui s'organisent en brosse,

tandis que les chaînes courtes organisées en boucles ou en trains sont plutôt inefficaces.

L'électrophorèse bidimensionnelle permet donc d'évaluer qualitativement et semi quantitativement les protéines plasmatiques adsorbées en surface des particules et de démontrer le caractère furtif de certaines d'entre elles par diminution du nombre et de l'intensité de spots observés sur le gel d'électrophorèse.

314. Observation en microscopie électronique après cryofracture de l'interaction des particules avec le fibrinogène.

Peracchia *et coll.* (1999) ont imaginé une technique originale permettant d'observer *in vitro* les propriétés d'évitement des protéines plasmatiques de particules furtives PEGylées. Les nanoparticules de PHDCA PEGylées ou non ont été incubées 30 min à 37°C dans une solution de fibrinogène. Une solution de glycérol a servi de cryoprotecteur. Une goutte de chaque échantillon a été placée sur un support et congelée immédiatement dans du propane liquide puis conservée dans de l'azote liquide. Une solution de fibrinogène dans du glycérol a été utilisée comme contrôle. Après la fracture, l'observation a été réalisée par microscopie électronique à transmission (Figure 37).

Le fibrinogène a été choisi comme protéine modèle du sang car il est facilement visualisable par microscopie électronique après cryofracture en raison de sa masse moléculaire (340 kDa) qui confère à ses molécules un diamètre moyen de 15 nm. La figure A montre un certain nombre de molécules de fibrinogène à la surface des particules nues de PHDCA, témoignant d'une interaction entre les particules et la protéine indépendante de la taille des particules étant donné que les particules les plus grosses montrent le même phénomène. Au contraire, les molécules de fibrinogène sont distribuées à distance des particules PEGylées (figure B), indépendamment de la taille de celles-ci, démontrant l'efficacité du PEG de repousser les protéines plasmatiques. Cette technique originale pourrait être adaptée pour analyser l'adsorption d'autres protéines plasmatiques sur les particules.

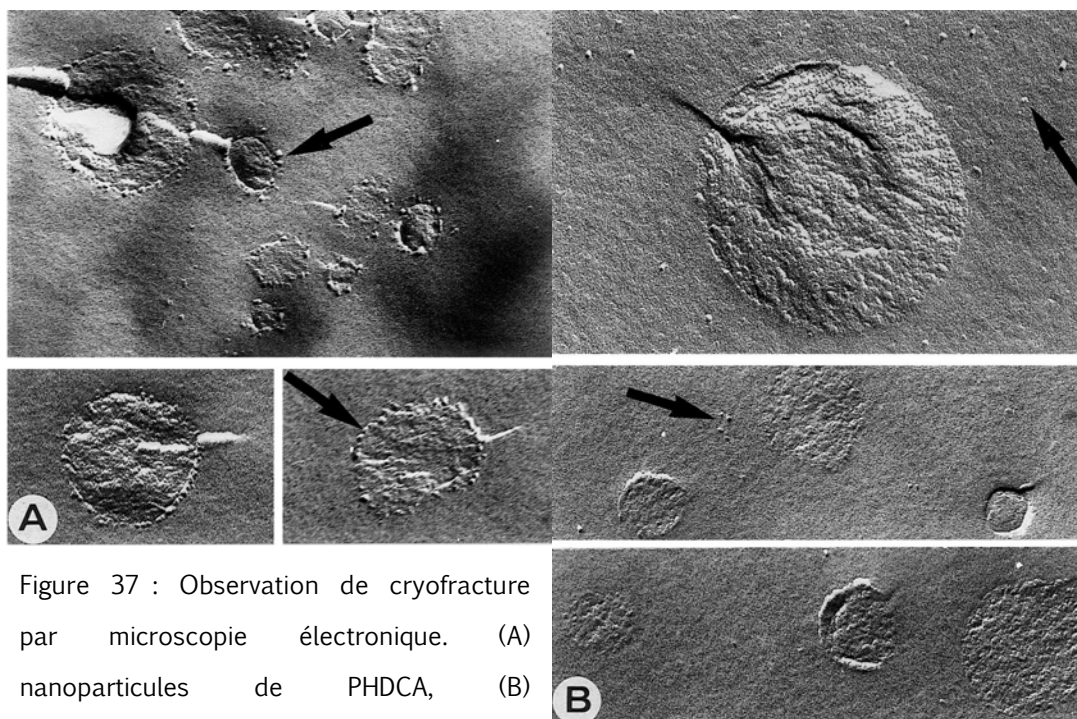


Figure 37 : Observation de cryofracture par microscopie électronique. (A) nanoparticules de PHDCA, (B) nanoparticules PEGylées de PHDCA après incubation avec une solution de fibrinogène. Les flèches indiquent les molécules de fibrinogène libre ou associé aux particules. (selon Peracchia *et coll.*, 1999)

315. Interaction avec les cellules phagocytaires

Une autre technique *in vitro* permet de mettre en évidence le changement de comportement des particules modifiées vis-à-vis du système phagocytaire mononucléé. Cette méthode consiste à mettre les particules directement en présence des cellules phagocytaires et, après un temps d'incubation déterminé, d'évaluer la quantité de particules internalisées par les cellules. Les lignées cellulaires les plus couramment utilisées sont les macrophages murins J774 A12, les macrophages humains THP 1 et les cellules U 937. Les cellules sont mises en culture et incubées à 37°C dans des puits, à une concentration connue. Puis elles sont lavées afin de supprimer les quelques cellules non adhérentes et incubées dans un milieu de culture approprié pour le test sélectionné. Après 24h d'incubation, une quantité connue de particules à étudier est ajoutée dans chaque puits. Après des temps d'incubation déterminés, les cellules sont lavées et rincées plusieurs fois avec le milieu de culture afin d'éliminer les particules non phagocytées. L'intensité de la phagocytose est mesurée par la

concentration de particules internalisées dans les cellules phagocytaires. Afin de détecter les particules phagocytées, celles-ci sont marquées le plus souvent par un marqueur fluorescent ou un isotope radioactif et détectées respectivement par microscopie à fluorescence et spectrofluorimétrie ou par un compteur gamma. Dans le cas de particules chargées avec un principe actif, leur phagocytose se mesure par la détection du principe actif dans les cellules phagocytaires après avoir vérifié la quantité de principe actif non encapsulé ayant pu être phagocyté.

Le greffage de PEG à la surface des vecteurs particulaires permet de limiter la phagocytose. En effet, Bocca *et coll.* (1998) ont mesuré la phagocytose de SLN (nanoparticules lipidiques solides) rendues fluorescentes par marquage à la rhodamine B. La phagocytose des SLN classiques par les macrophages augmente entre 2 et 60 min tandis que, lorsqu'elles sont recouvertes de PEG, leur capture est beaucoup plus faible et plus lente. L'inhibition de la phagocytose semble aussi dépendre des sels biliaires utilisés dans la fabrication des SLN. Celle-ci est la plus marquée en présence de stéarate de PEG : durant les premières minutes de l'expérience, la capture par les macrophages est très lente et indétectable par fluorescence. Cependant, dans les conditions expérimentales utilisées, l'augmentation de la phagocytose n'est pas linéaire et semble démontrer qu'il existe une saturation. La diminution de phagocytose des SLN furtives dépend donc de la présence de PEG en surface des particules, formant un nuage hydrophile capable de limiter la reconnaissance des particules par les macrophages.

La mesure de l'indice phagocytaire permet d'évaluer les interactions des cellules phagocytaires avec les vecteurs particulaires ; il représente le nombre moyen de particules ingérées par cellule. Roser *et coll.* (1998) ont ainsi démontré une corrélation entre la stimulation des macrophages (évaluée par leur capacité à internaliser les particules) et le potentiel zêta des particules : plus la valeur absolue de la charge de surface est faible, plus l'activité de phagocytose est faible. Une augmentation de la réponse phagocytaire est observée en utilisant des particules avec un potentiel de surface élevé et positif. En effet, l'indice phagocytaire diminue à mesure que le

potentiel zêta se rapproche de la neutralité, et ceci autant avec les cellules U 937 qu'avec les macrophages murins (figure 38).

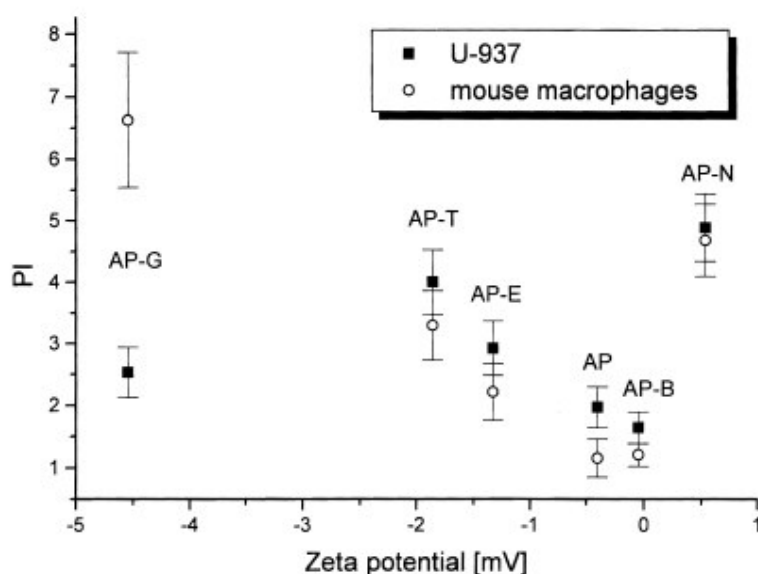


Figure 38 : Corrélation entre l'indice phagocytaire et le potentiel zêta (dans un tampon phosphate, 5mM, pH 7,2) de nanoparticules dont la surface a été modifiée par de l'albumine en utilisant des cellules U-937 (incubation 60 min en présence de sérum humain) et des macrophages de souris (incubation 60 min sans sérum). (selon Roser *et coll.*, 1998)

L'évaluation de la phagocytose de nanoparticules par les macrophages peut également se faire par la recherche de la molécule encapsulée dans les particules qui se retrouve alors contenue dans les macrophages après phagocytose. Fontana *et coll.* (2001) ont fabriqué des nanoparticules de polyéthylcyanoacrylate (PECA) chargées d'amoxicilline et greffées ou non de PEG de différentes masses moléculaires. La quantité de particules phagocytées par les macrophages murins J774 a été déterminée en dosant l'amoxicilline contenue dans les macrophages par HPLC après incubation avec les particules. On note que le processus de phagocytose diminue au fur et à mesure que la masse moléculaire du PEG adsorbé sur la surface des nanoparticules de PECA augmente (figure 39). Parallèlement, l'ajout de PEG de 600 à 4000 Da montre une augmentation croissante du potentiel de surface des particules, de -18 mV pour les

particules non PEGylées, à -5 mV pour les particules comportant le PEG de plus grande masse moléculaire, confortant l'idée qu'un potentiel de surface proche de la neutralité est favorable à une diminution de la phagocytose des particules.

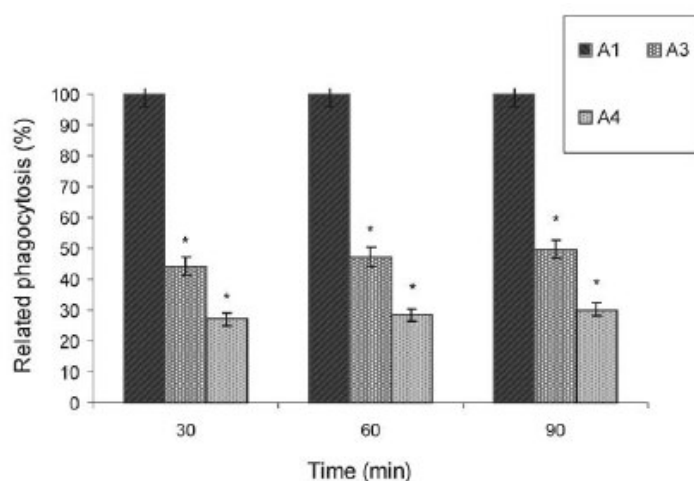


Figure 39 : Capture de nanoparticules chargées en amoxicilline (A1) nues, (A3) greffées avec du PEG 2000 Da et (A4) avec du PEG 4000 Da, par des macrophages murins. Les résultats sont exprimés en pourcentage de nanoparticules phagocytées comparativement au lot A1 fixé à 100 % $\pm$ écart-type. *Statistiquement différent de A1 à $p < 0,01$. (selon Fontana *et coll.*, 2001)

Gbadamosi *et coll.* (2002) confirment eux aussi cette hypothèse en démontrant une relation linéaire entre le potentiel zêta des particules de polystyrène greffées avec du méthoxy-poly(éthylène glycol) (mPEG) et leur capture par des macrophages murins J774 (figure 40). En effet, plus le potentiel de surface des particules se rapproche de la neutralité, moins celles-ci sont reconnues par les macrophages et internalisées. La présence de PEG en surface des particules semble former un nuage moléculaire de PEG capable de limiter la reconnaissance des particules par les macrophages. Les auteurs émettent alors l'hypothèse que la phagocytose de vecteurs particuliers pourrait être prédite par la mesure de leur potentiel de surface.

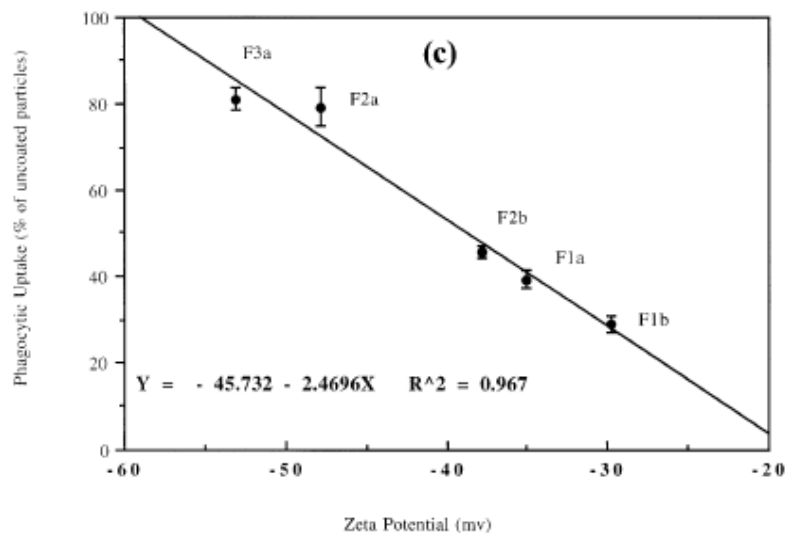


Figure 40 : Relation entre le potentiel zêta et la phagocytose de particules de polystyrène greffées avec du mPEG (la capture des particules non recouvertes étant considérée comme 100 %). (selon Gbadamosi *et coll.*, 2002)

Pour Gref *et coll.* (2002) les chaînes protectrices de PEG peuvent masquer les extrémités carboxyliques des chaînes de PLA utilisé pour la fabrication de nanosphères, ayant ainsi pour résultat la réduction du potentiel zêta (de -65 à -5 mV). La diminution du potentiel zêta peut être attribuée à l'augmentation de l'épaisseur de la barrière de PEG assurant une protection stérique plus efficace des nanoparticules au fur et à mesure que la densité de PEG augmente, limitant ainsi la reconnaissance et l'internalisation des nanoparticules par les cellules phagocytaires.

Lemarchand *et coll.* (2006) ont étudié l'influence de la présence de dextran de différentes masses moléculaires (5000 et 40000 Da), ajouté à plusieurs ratio (de 5 à 33 %) dans la composition de nanoparticules de PCL (poly-ε-caprolactone), sur la capture des particules par des macrophages murins J774. Les particules comportant 33 % de dextran dans leur composition sont 3 fois moins internalisées que les mêmes particules de PCL simples. Cependant, aucune influence de la masse moléculaire du dextran n'a été observée sur la phagocytose par les macrophages. En effet, la couche de dextran pourrait être responsable de la réduction de l'opsonisation par les

protéines dans le milieu de culture et des interactions hydrophobes non spécifiques entre les particules et la membrane cellulaire.

Yang et coll. ont étudié l'interaction de nanoparticules de PEG-PLGA avec des macrophages péritonéaux murins. Les nanoparticules chargées avec une protéine fluorescente ont été mises en contact avec du sérum de souris pendant 30 min afin d'être opsonisées par les protéines plasmatiques. Elles ont ensuite été incubées avec les macrophages 20 min à 37°C. Après lavage, l'intensité de la fluorescence due aux nanoparticules phagocytées a été mesurée par une autre technique que celles citées précédemment : la cytométrie en flux. Ces auteurs ont confirmé que les particules greffées de PEG sont phagocytées 4 à 5 fois moins que les mêmes particules nues (figure 41).

L'observation de l'interaction *in vitro* des vecteurs particuliers avec les cellules du système phagocytaire mononucléé permet donc d'évaluer le potentiel furtif de particules polymériques dont la surface est modifiée par greffage de molécules diverses (PEG, dextran) qui tendent à augmenter l'hydrophilie de surface des particules en masquant le caractère hydrophobe du polymère. Les particules étant moins reconnues *in vitro* par les macrophages, elles seront alors susceptibles d'éviter le SPM *in vivo* et de présenter des propriétés de furtivité permettant d'augmenter leur temps de résidence dans la circulation sanguine. Cependant, ces propriétés *in vitro* ne sont pas toujours corrélées *in vivo*. Roser *et coll.* (1998) ont observé un comportement différent de leurs nanosphères *in vitro* et *in vivo*. En effet, ces nanosphères présentent un échappement à la capture phagocytaire par les macrophages murins J774 *in vitro* mais restent rapidement éliminées après injection intraveineuse à des rats.

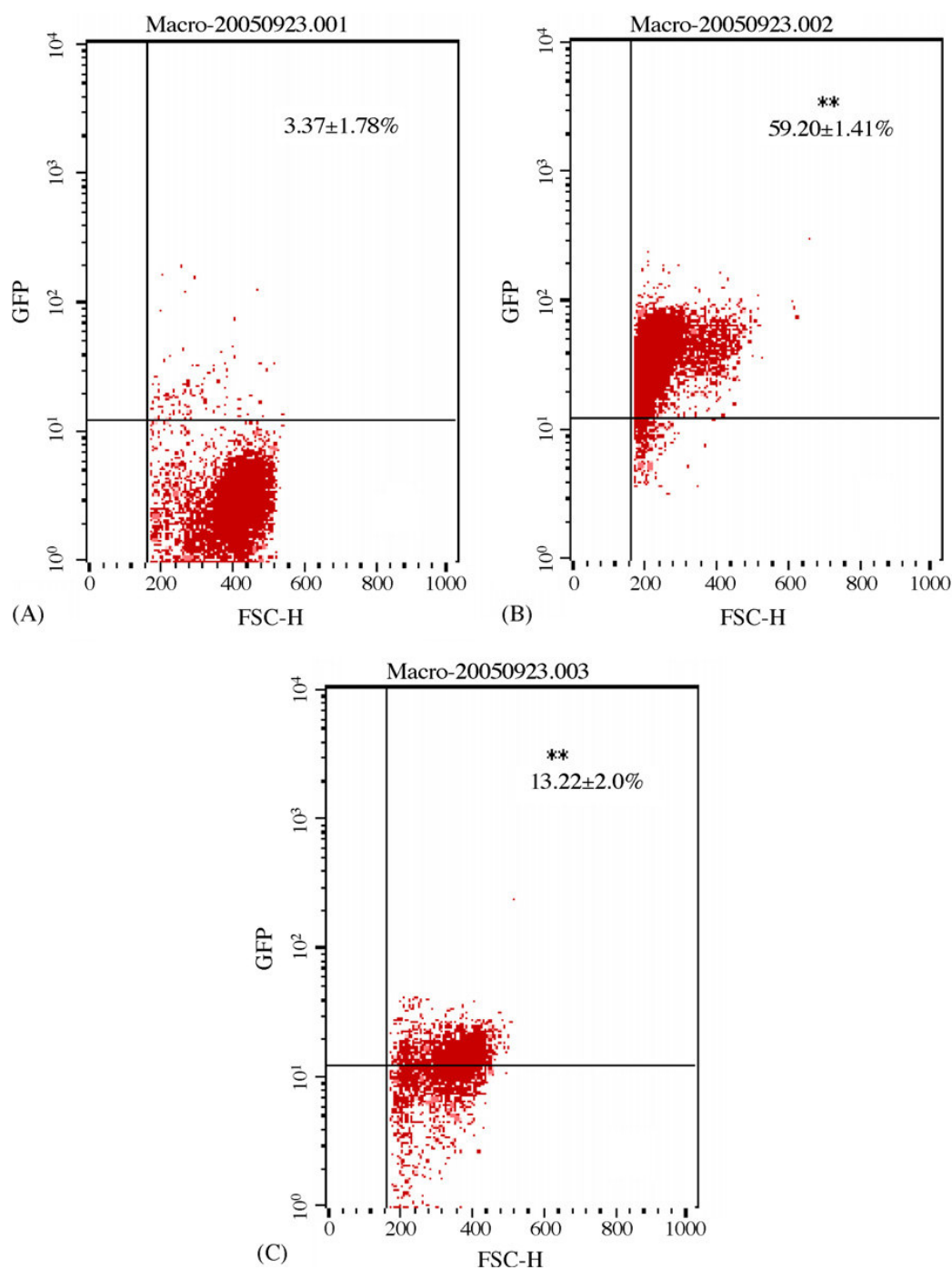


Figure 41 : Capture des nanoparticules par des macrophages péritonéaux murins déterminée par cytométrie en flux. (A) macrophages seuls (contrôle), (B) macrophages en présence de nanoparticules de PLGA, (C) macrophages en présence de nanoparticules de PEG-PLGA. Résultats exprimés en pourcentage de nanoparticules marquées, moyenne $\pm$ écart-type, n=3.

** P<0,01 comparativement au contrôle. (Selon Yang *et coll.*, 2007)

32. *In vivo*

Après avoir démontré *in vitro* les propriétés d'échappement des vecteurs particulaires par le SPM, il semble nécessaire de confirmer ces propriétés *in vivo*, afin d'attribuer un caractère furtif aux particules après injection intraveineuse. En effet, le comportement *in vitro* de particules à propriétés de surface contrôlées n'est pas obligatoirement vérifié *in vivo* (Roser *et coll.*, 1998). La circulation sanguine dans laquelle se retrouvent les particules après administration IV met en jeu un système plus complexe que celui recréé lors des manipulations *in vitro* et fait intervenir un plus grand nombre de paramètres influençant le devenir de ces particules.

Les expériences *in vivo* sont réalisées le plus souvent chez le rongeur (rat, souris, lapin, cobaye). Après anesthésie de l'animal, une quantité connue de particules en suspension dans un milieu approprié (NaCl 0,9 %, PBS) est injectée dans le système veineux via la veine de la queue ou la veine jugulaire. Des prélèvements de sang sont ensuite effectués à des temps déterminés afin de suivre l'évolution de la présence des particules dans le sang. Les particules injectées sont marquées avec un isotope radioactif (le plus souvent ^{125}I) ou une molécule fluorescente (par exemple la fluorescéine isothyocyanate-FITC) afin d'être facilement détectées dans le sang prélevé après injection intraveineuse. Dans le cas de particules contenant un principe actif, la détection de ce dernier dans les échantillons prélevés permet de suivre son élimination au cours du temps et d'évaluer sa demi-vie expérimentale *in vivo* ainsi que d'autres paramètres pharmacocinétiques (aire sous la courbe : AUC, constante de distribution, constante d'élimination, volume de distribution) à partir de sa concentration sanguine au cours du temps (exemple figure 42).

Une expérience effectuée chez le lapin démontre que 24 h après l'injection intraveineuse de nanoparticules de copolymère de PF-POE ou de PLGA recouvertes de poloxamine, 15,5 % de la dose de nanoparticules de PF-POE sont encore dans le système sanguin tandis que seulement 1,7 % des particules de PLGA y sont présentes (figure 43) (Vandorpe *et coll.*, 1997).

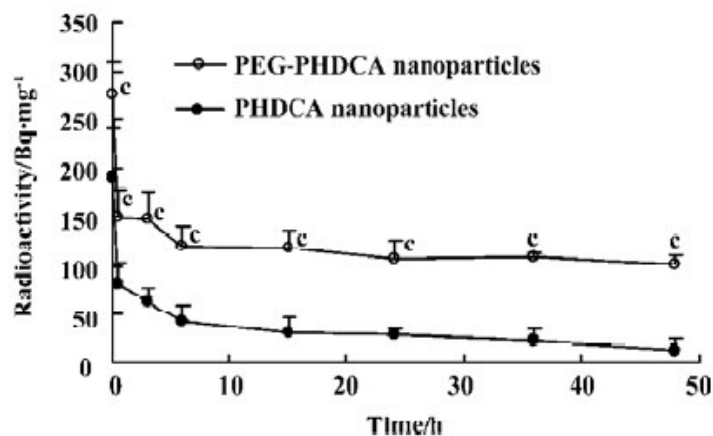


Figure 42 : Radioactivité détectée dans le sang en fonction du temps après injection intraveineuse de nanoparticules furtives de poly méthoxyéthylèneglycol cyanoacrylate-co-n-hexadécyl cyanoacrylate (PEG-PHDCA) ou non furtives de polyhexadécyl cyanoacrylate (PHDCA). n=6. Moyenne $\pm$ écart-type. (c) $P < 0,01$ par rapport aux particules de PHDCA. (selon Huang *et coll.*, 2005)

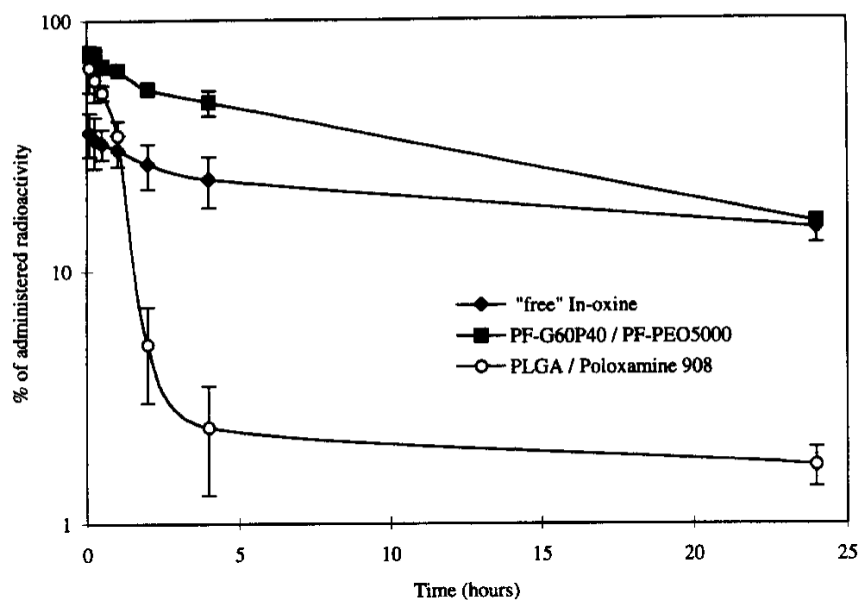


Figure 43 : Profils de clairance sanguine de ^{111}In -oxine libre, de nanoparticules de poly(organophosphazène) (PF) recouvertes de POE et de nanoparticules de PLGA recouvertes de poloxamine 908 après injection intraveineuse à des lapins. (selon Vandorpe *et coll.*, 1997)

Une autre technique est utilisée chez l'animal pour suivre la distribution des particules dans l'organisme. Cette technique est basée sur l'accumulation ou non des particules dans les tissus. Les vecteurs non furtifs, rapidement reconnus par le SPM, présentent un temps de demi-vie plasmatique court et s'accumulent très rapidement dans les organes du système phagocytaire mononucléé (foie, rate, poumons) comme n'importe quel organisme étranger. Les particules furtives devraient être moins facilement reconnues comme étrangères par les cellules du système immunitaire et resteraient plus longtemps dans le compartiment sanguin sans être concentrées dans les organes.

Après injection intraveineuse de particules à l'animal et un temps d'attente déterminé, l'animal est sacrifié et ses organes sont alors prélevés (principalement le foie et la rate mais aussi les poumons, les muscles, la moelle osseuse, les intestins, les reins, le pancréas, le cœur) ainsi que son sang total. Ces organes sont ensuite analysés afin d'évaluer la présence ou non de marqueurs fluorescents ou radioactifs dans les particules injectées. Dans le cas où les particules contiennent un principe actif, il suffit simplement de le rechercher dans les organes. Cette analyse permet donc de cartographier la répartition des particules dans tout l'organisme après injection intraveineuse et donc par déduction, d'apprécier le caractère furtif des particules.

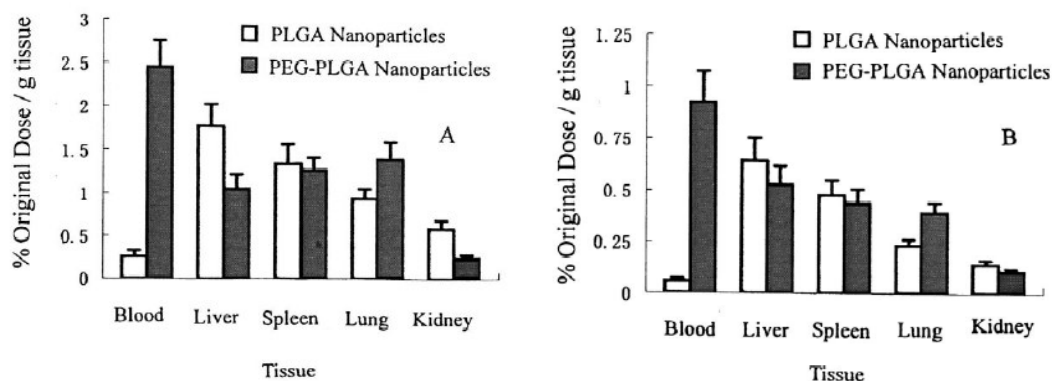


Figure 44 : Distribution de BSA marquée à ^{125}I 3h (A) et 12h (B) après injection intraveineuse de nanoparticules de PLGA et de PEG-PLGA à des rats. (selon Li *et coll.*, 2001)

L'encapsulation de SAB (sérum albumine bovine) dans des particules constituées d'un copolymère de PLGA-PEG permet, après injection intraveineuse à des rats, d'augmenter la demi-vie de celle-ci de 13,6 min pour des nanoparticules de PLGA à 4,5 h pour les nanoparticules de PLGA-PEG (Li *et coll.*, 2001). De plus, une plus grande proportion de BSA encapsulée dans les particules de PEG-PLGA (environ 10 fois plus) se retrouve dans le sang après 3 h et se distribue lentement dans les tissus après 12 h tout en restant majoritairement dans la circulation sanguine (figure 44).

II. Les nanoparticules furtives appliquées à l'encapsulation de peptides et/ou protéines

Après avoir démontré la faisabilité de la préparation de systèmes particuliers capables d'éviter le SPM et donc de prolonger le temps de circulation de ces systèmes dans la circulation sanguine, il a semblé important d'appliquer ces formulations à l'encapsulation de principes actifs présentant une courte demi-vie lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse. Ces dix dernières années, les particules furtives ont donc été testées dans un premier temps sur leur capacité à encapsuler, véhiculer et libérer des protéines modèles. Dans un second temps, leurs propriétés furtives ont été mises en évidence *in vitro* et parfois même *in vivo*.

1. Encapsulation de sérum albumine humaine (SAH)

Les sérum albumine humaine ou bovine sont souvent choisies comme protéine modèle pour l'encapsulation dans des particules car leurs propriétés physico-chimiques sont bien connues et leur coût relativement faible.

Quellec *et coll.* (1998 et 1999) ont utilisé la SAH comme protéine modèle encapsulée dans des nanosphères constituées de copolymères de PLA recouvertes de PEG, molécule potentiellement responsable de la furtivité des particules. En effet, de telles particules ont précédemment démontré leur capacité à prolonger leur demi-vie

plasmatique d'un facteur 180 par rapport aux mêmes particules sans PEG, après injection IV à des rats (Bazile *et coll.*, 1995). Les nanosphères chargées en SAH ont été préparées par double émulsion et leurs caractéristiques de surface ont été étudiées afin de déterminer le mode d'encapsulation de la protéine. Les images obtenues en microscopie à force atomique montrent que les particules chargées ou non en SAH sont de forme sphérique et présentent une surface lisse, révélant que la SAH se trouve bien encapsulée à l'intérieur de la particule et non pas adsorbée simplement en surface (Quellec *et coll.*, 1998). Les auteurs ont fait varier les proportions de PEG-PLA et de PLA, leur concentration dans la phase organique ainsi que la charge théorique en protéine et ont suivi leur influence sur la taille des particules, le taux d'encapsulation en SAH et sa charge réelle (tableau 5). La plus petite taille (200 nm) est obtenue avec la plus faible concentration en polymère, tandis qu'une augmentation de cette concentration se traduit par une élévation de la charge et du taux d'encapsulation en SAH au détriment d'une augmentation de taille (environ 450 nm) des nanosphères.

Tableau 5 : Influence de la concentration en polymère dans le solvant organique (C_p) et de la charge théorique en SAH (L_t) sur divers paramètres (d : diamètre des nanosphères, P_i : index de polydispersité, Y_a : taux d'encapsulation, L_r : charge réelle). (Résultats exprimés en moyenne de 3 à 5 expériences distinctes) (selon Quellec *et coll.*, 1998)

PEG-PLA:PLA Blend Composition (w:w)	C_p (mg/mL)	L_t (%) (w/w)	d (nm) ± 5	P_i ± 0.01	Y_a (%) (w/w) ± 3	L_r (%) (w/w) ± 0.1
1:0	25	5	186	0.13	56	3.1
		10	209	0.12	57	6.6
		20	186	0.12	36	7.8
	100	5	452	0.69	82	4.6
		10	456	0.63	88	8.9
		10	195	0.17	50	8.2
3:1	100	5	321	0.46	90	5.1
		10	443	0.54	92	9.8
		10	443	0.54	92	9.8
1:1	25	5	198	0.18	57	3.7
		10	216	0.15	66	7.7
		20	188	0.13	42	9.8
	100	5	456	0.34	88	5.1
		10	457	0.49	95	10.6
		10	220	0.27	70	6.8
1:3	25	10	203	0.32	57	6.7
		10	203	0.32	57	6.7
		10	203	0.32	57	6.7
0:1	25	5	367	0.39	96	7.2
		5	367	0.39	96	7.2
		10	410	0.38	96	12.4

Après avoir procédé aux caractérisations *in vitro* des nanosphères de PEG-PLA chargées en SAH, les auteurs ont effectué des essais de libération *in vitro* à partir des différentes formulations en observant l'influence de la taille des particules, de leur composition et de la charge en SAH (Quellec *et coll.*, 1999). Les nanosphères les plus petites (200 nm) libèrent progressivement la protéine (20-30 %) pendant une période allant jusqu'à 15 jours, tandis que les plus grosses (450 nm) ne libèrent qu'une très petite quantité (2,5 %) dans la première heure. Ces dernières contiennent une plus grande quantité de polymères. Les auteurs auraient pu s'attendre à ce que les chaînes de PEG orientées vers la phase aqueuse interne empêchent une forte interaction entre le polymère et la protéine mais il semble que le PEG ne soit pas en quantité suffisante pour limiter ces interactions et c'est pourquoi un relargage relativement faible est observé. D'autre part, l'augmentation de la charge en SAH des particules de 200 nm se traduit par une augmentation de la libération de celle-ci après 10 jours d'incubation. La proportion de PEG dans la formulation a également une influence sur la libération de SAH : plus la préparation contient de PEG, plus la libération de protéine est importante. Les auteurs ont donc pu démontrer qu'il était possible de contrôler la libération de la protéine en jouant sur la taille, la charge et la composition des particules. De telles formulations renfermant une protéine devront encore démontrer leur capacité à éviter la phagocytose afin d'être qualifiées de vecteurs furtifs.

Une autre technique d'encapsulation a été utilisée pour préparer des nanoparticules de SAH en vue d'obtenir des particules furtives : la co-précipitation de copolymères bioéliminables de poly (methacryloylglycylglycine-OH,co-hydroxypropylmethacrylamide,) (Chiellini *et coll.*, 2007). Ces particules permettent d'encapsuler jusqu'à 60 % de SAH et d'obtenir une charge de 10 %. Les profils de libération *in vitro* montrent une libération constante de principe actif atteignant 20 % de la quantité de protéine encapsulée à 100 h. La libération semble contrôlée dans le temps et ne montre pas d'effet burst, ce qui est de bon pronostic en vue d'une administration *in vivo*. Afin d'évaluer la biocompatibilité du copolymère, la cytotoxicité des nanoparticules a été étudiée sur des fibroblastes embryonnaires de souris. Les auteurs ont testés la viabilité et la prolifération des cellules après contact avec les

particules polymères. Les résultats montrent une grande cytocompatibilité des particules avec des valeurs de viabilité cellulaires proches de 100 % par rapport au contrôle. De tels nanosystèmes pourraient donc être utilisés en tant que vecteurs à libération contrôlée de protéines.

2. Encapsulation de sérum albumine bovine (SAB)

Li *et coll.* (2001) ont préparé des nanoparticules par une technique de double émulsion à partir de copolymères de PEG-PLGA encapsulant de la SAB comme protéine modèle. Les caractéristiques *in vitro* ont montré un diamètre moyen de 200 nm et un potentiel de surface de l'ordre de -16 mV. La libération *in vitro* de SAB a été suivie pendant 7 jours et a mis en évidence un burst initial important, correspondant sans doute à la fraction de protéine adsorbée en surface de la particule lors de la fabrication et qui se retrouve libérée très rapidement. La libération de principe actif se prolonge ensuite jusqu'à 7 jours, traduisant la diffusion de la protéine à travers la matrice polymère et sa libération dans le milieu suite à l'érosion de celui-ci. Les expérimentations *in vivo* effectuées chez le rat ont démontré une nette augmentation (x12) de la demi-vie plasmatique de la protéine après administration IV de nanoparticules de PEG-PLGA par rapport aux mêmes particules de PLGA nues (figure 45). Ces résultats démontrent que de tels systèmes peuvent être utilisés comme transporteurs furtifs de protéines ou peptides.

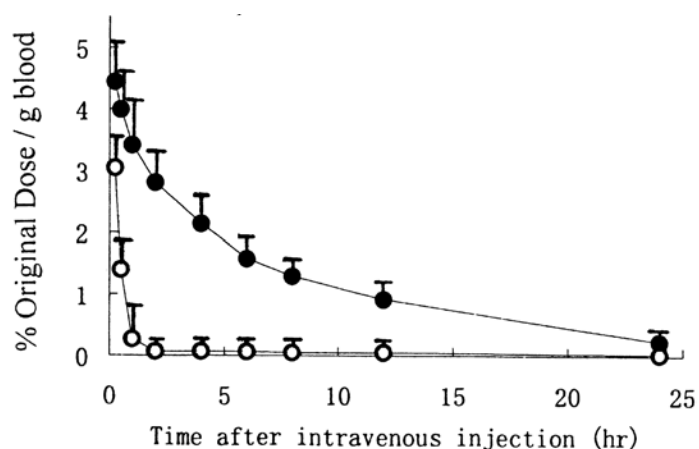


Figure 45 : Courbe de clairance sanguine de nanoparticules de PEG-PLGA (●) et PLGA (○) chargées en SAB marquée à ^{125}I . (Selon Li *et coll.*, 2001)

Des nanoparticules de SAB ont également été préparées à partir de chitosane, polysaccharide biodégradable (Gan et Wang, 2007). Le chitosane peut en effet être dégradé en N-acétyl glucosamine par les lysozymes de l'organisme. Les auteurs ont étudiés l'influence de la masse moléculaire du chitosane, de sa concentration dans la formulation ainsi que celle de la protéine sur le taux d'encapsulation de la SAB et sur les profils de libération *in vitro*. Les meilleurs taux d'encapsulation sont obtenus avec des masses moléculaires de chitosane plus importantes, une concentration en chitosane plus faible et une concentration en SAB plus importante. Cependant, la variation de ces paramètres ne semble pas affecter le burst initial de libération de la protéine qui est observé dans tous les cas. Une différence significative est cependant mise en évidence au niveau de la libération totale de SAB. La libération de la protéine à partir de particules de chitosane se fait selon les 3 phases citées précédemment lors de la libération à partir des particules de PEG-PLGA : désorption de la protéine depuis la surface des particules, diffusion à travers la matrice de polymère puis libération suite à l'érosion du polymère. Même si le procédé de fabrication est relativement simple (coacervation poly-ionique), la libération de protéine à partir de ces particules de chitosane n'est pas contrôlée et montre une grande quantité de protéine libérée rapidement. La protéine semble interagir avec le chitosane par la formation de plusieurs liaisons hydrogène le long de la chaîne polymère de chitosane qui doivent être brisées avant que la molécule de protéine puisse être libérée de la masse des particules.

3. Encapsulation de TNF α (tumor necrosis factor)

Le TNF α , protéine principalement sécrétée par les macrophages, est une cytokine avec de larges effets biologiques : antiviral, anti tumoral, régulation immunitaire, médiateur de prolifération, de différenciation, de nécrose et d'apoptose de différentes cellules cibles.

Fang *et coll.* (2005) ont élaboré des nanoparticules à base de poly(methoxypolyethyleneglycol cyanoacrylate-co-n-hexadecyl cyanoacrylate) (MePEG-PHCA) capables d'encapsuler du TNF α . Ils ont étudié l'influence de la masse

moléculaire du PEG et de la taille des particules sur le profil de libération *in vitro* du TNF α dans du tampon PBS et dans du plasma de rat. Quelle que soit la formulation, un effet de burst est observé en début d'expérimentation dans le PBS. Pour des particules de taille similaire (environ 170 nm), la libération à partir des particules constituées de PEG de plus grande masse moléculaire (10000 Da) montre une libération plus rapide et plus importante que pour celles à partir de PEG de plus faible masse moléculaire (2000 Da). Les auteurs émettent l'hypothèse que les PEG de plus grande masse moléculaire possèdent des chaînes plus grandes qui pourraient entraver l'interaction de la protéine à libérer avec le polymère (PHDCA) et donc faciliter sa libération. Concernant l'influence de la taille des nanoparticules, pour un PEG de même masse moléculaire (5000 Da), la libération de TNF α à partir des particules les plus petites (80 nm) présente un burst plus important que pour les plus grandes (243 nm), en raison de la plus grande surface de contact offerte au milieu de dissolution. Une diminution de la quantité totale de protéine dans le milieu a pu être observée en fin d'expérimentation. Il semble qu'une réadsorption de protéine se fasse sur la surface des nanoparticules. Ce phénomène a déjà été observé par d'autres auteurs (Quellegre *et coll.*, 1999 ; Zambaux *et coll.*, 1999). Les chaînes de PEG s'organisent en une brosse autour de la particule permettant de créer une barrière stérique capable de limiter la réadsorption de la protéine sur les particules. Un détachement partiel des chaînes de PEG des nanoparticules préparées par Fang *et coll.* (2005) modifie la densité de PEG en surface et ne semble plus suffisant pour repousser la protéine, d'où la diminution de TNF α total dans le milieu en fin d'expérience. La libération de TNF α dans le plasma de rat présente les mêmes profils de libération que dans le PBS. Cependant, la réadsorption de la protéine sur les particules est absente. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les protéines plasmatiques entrent en compétition avec le TNF α pour la réadsorption sur les particules.

Les auteurs ont ensuite procédé à des essais de phagocytose de ces nanoparticules de MePEG-PHDCA chargées en TNF α (Fang *et coll.*, 2006). Les nanoparticules les plus petites (80 nm) et constituées de PEG de plus grande masse moléculaire présentent une capacité plus importante à limiter la phagocytose. Ces particules possèdent une couche hydrophile de surface (Fixed Aqueous Layer

Thickness-FALT) d'une épaisseur optimale de 5,16 nm avec un espacement entre deux chaînes de PEG de 0,87 nm. Cette conformation permet une densité de la couche hydrophile optimale afin de repousser les protéines plasmatiques et donc de limiter la phagocytose. Lors d'expérimentations *in vivo* effectuées sur des modèles de tumeurs chez la souris, la demi-vie d'élimination du TNF α a été évaluée comparativement à celle du TNF α en solution (28 min) à partir des profils d'élimination dans le sang (figure 46). Selon la formulation, une augmentation de cette demi-vie d'un facteur 10 à 24 a pu être observée. Les particules les plus petites et préparées à partir de PEG de 5000 Da ont présenté la plus longue demi-vie (11,3 h). De telles particules constituent un avenir pour le ciblage de protéines thérapeutiques pour le traitement de tumeur.

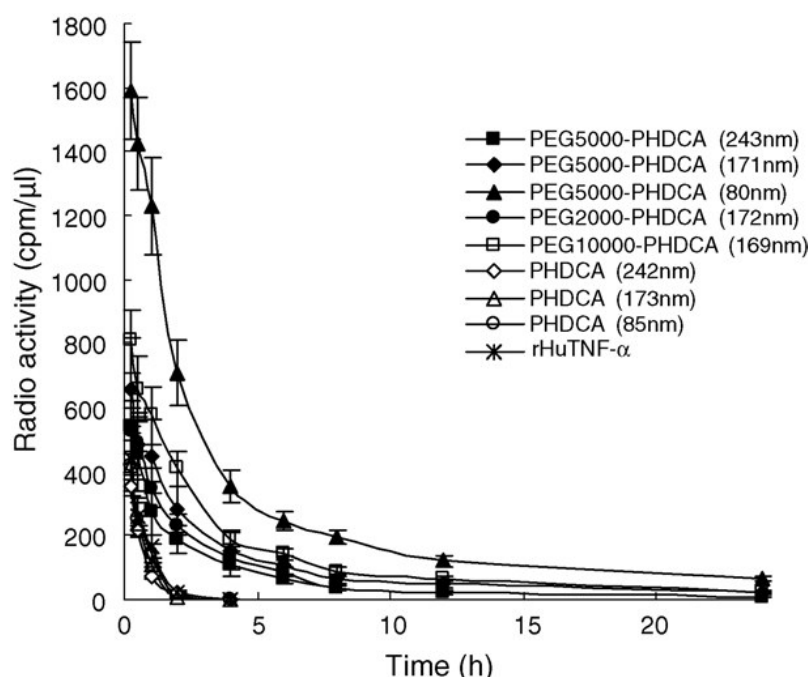


Figure 46 : Courbes de clairance sanguine du TNF α libre et du TNF α chargé dans des nanoparticules de PEG-PHDCA et de PHDCA (n=5). (Selon Fang *et coll.*, 2006)

RÉFÉRENCES

Bazile, D., Prud'homme, C., Bassoullet, M.T., Marlard, M., Spenlehauer, G., and Veillard, M., *Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system*. J Pharm Sci, 1995. **84**(4): p. 493-8.

Beletsi, A., Panagi, Z., and Avgoustakis, K., *Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers*. Int J Pharm, 2005. **298**(1): p. 233-41.

Blunk, T., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.C., Muller, B.W., and Muller, R.H., *Colloidal carriers for intravenous drug targeting: plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. Electrophoresis, 1993. **14**(12): p. 1382-7.

Bocca, C., Caputo, O., Cavalli, R., Gabriel, L., Miglietta, A., and Gasco, M.R., *Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 1998. **175**: p. 185-193.

Chiellini, F., Bartoli, C., Dinucci, D., Piras, A.M., Anderson, R., and Croucher, T., *Bioeliminable polymeric nanoparticles for proteic drug delivery*. Int J Pharm, 2007. **343**(1-2): p. 90-7.

CHU-PS. *CHUPS - Anatomie pathologique - PCEM2*, [en ligne]. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/anapath/Cours/POLY.Chp.3.html> [page consultée le 12 07 2008]

Dellacherie, E., Gref, R., and Quellec, P., *Les naosphères "furtives" comme nouvelles formes galéniques injectables : espoirs et réalités*. Médecine/Sciences, 2001. **17**(5): p. 619-626.

Ekre, H.P., Naparstek, Y., Lider, O., Hyden, P., Hagermark, O., Nilsson, T., Vlodavsky, I., and Cohen, I., *Anti-inflammatory effects of heparin and its derivatives: inhibition of complement and of lymphocyte migration*. Adv Exp Med Biol, 1992. **313**: p. 329-40.

Fang, C., Shi, B., and Pei, Y.Y., *Effect of MePEG molecular weight and particle size on in vitro release of tumor necrosis factor-alpha-loaded nanoparticles*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(2): p. 242-9.

Fang, C., Shi, B., Pei, Y.Y., Hong, M.H., Wu, J., and Chen, H.Z., *In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor-alpha-loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight and particle size*. Eur J Pharm Sci, 2006. **27**(1): p. 27-36.

Fontana, G., Licciardi, M., Mansueto, S., Schillaci, D., and Giammona, G., *Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake*. Biomaterials, 2001. **22**(21): p. 2857-65.

Gan, Q. and Wang, T., *Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier--systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007. **59**(1): p. 24-34.

Gaur, U., Sahoo, S.K., De, T.K., Ghosh, P.C., Maitra, A., and Ghosh, P.K., *Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system*. Int J Pharm, 2000. **202**(1-2): p. 1-10.

Gbadamosi, J.K., Hunter, A.C., and Moghimi, S.M., *PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance*. FEBS Lett, 2002. **532**(3): p. 338-44.

Gref, R., Luck, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T., and Muller, R.H., *'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2000. **18**(3-4): p. 301-313.

Huang, M., Wu, W., Qian, J., Wan, D.J., Wei, X.L., and Zhu, J.H., *Body distribution and in situ evading of phagocytic uptake by macrophages of long-circulating poly (ethylene glycol) cyanoacrylate-co-n-hexadecyl cyanoacrylate nanoparticles*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(12): p. 1512-8.

Jeon, S.I. and Andrade, J.D., *Protein--surface interactions in the presence of polyethylene oxide : II. Effect of protein size*. J Colloid Interface Sci, 1991. **142**(1): p. 159-166.

Jeon, S.I., Lee, J.H., Andrade, J.D., and De Gennes, P.G., *Protein--surface interactions in the presence of polyethylene oxide : I. Simplified theory*. J Colloid Interface Sci, 1991. **142**(1): p. 149-158.

Jiao, Y., Ubrich, N., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., Lecompte, T., and Maincent, P., *In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits*. Circulation, 2002. **105**(2): p. 230-5.

Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Melik-Nubarov, N.S., Fedoseev, N.A., Dorodnich, T.Y., Alakhov, V.Y., Chekhonin, V.P., Nazarova, I.R., and Kabanov, V.A., *A new class of drug carriers: micelles of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain*. J Control Release, 1992. **22**(2): p. 141-157.

Labarre, D., Vauthier, C., Chauvierre, C., Petri, B., Muller, R., and Chehimi, M.M., *Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush*. Biomaterials, 2005. **26**(24): p. 5075-84.

Labarre, D.J., *Heparin-like polymer surfaces: control of coagulation and complement activation by insoluble functionalized polymers*. Int J Artif Organs, 1990. **13**(10): p. 651-7.

- Lappegard, K.T., Fung, M., Bergseth, G., Riesenfeld, J., and Mollnes, T.E., *Artificial surface-induced cytokine synthesis: effect of heparin coating and complement inhibition*. Ann Thorac Surg, 2004. **78**(1): p. 38-44; discussion 44-5.
- Lemarchand, C., Gref, R., Passirani, C., Garcion, E., Petri, B., Muller, R., Costantini, D., and Couvreur, P., *Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems*. Biomaterials, 2006. **27**(1): p. 108-18.
- Li, Y., Pei, Y., Zhang, X., Gu, Z., Zhou, Z., Yuan, W., Zhou, J., Zhu, J., and Gao, X., *PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats*. J Control Release, 2001. **71**(2): p. 203-11.
- Maillet, F., Kazatchkine, M.D., Glotz, D., Fischer, E., and Rowe, M., *Heparin prevents formation of the human C3 amplification convertase by inhibiting the binding site for B on C3b*. Mol Immunol, 1983. **20**(12): p. 1401-4.
- Mesiha, M.S., Sidhom, M.B., and Fasipe, B., *Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles*. Int J Pharm, 2005. **288**(2): p. 289-93.
- Moghimi, S.M., Pavey, K.D., and Hunter, A.C., *Real-time evidence of surface modification at polystyrene lattices by poloxamine 908 in the presence of serum: in vivo conversion of macrophage-prone nanoparticles to stealth entities by poloxamine 908*. FEBS Lett, 2003. **547**(1-3): p. 177-82.
- Müller, R.H., Maassen, S., Schwarz, C., and Mehnert, W., *Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes*. Journal of Controlled Release, 1997. **47**: p. 261-269.
- Muller, R.H., Maassen, S., Schwarz, C., and Mehnert, W., *Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes*. J Control Release, 1997. **47**(3): p. 261-269.
- Nakada, Y., Tudomi, R., Sakurai, K., and Takahashi, Y., *Evaluation of long-circulating nanoparticles using biodegradable ABA triblock copolymers containing of poly(L-lactic acid) A-blocks attached to central poly(oxyethylene) B-blocks in vivo*. Int J Pharm, 1998. **175**: p. 109-117.
- O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
- Ogawara, K., Furumoto, K., Nagayama, S., Minato, K., Higaki, K., Kai, T., and Kimura, T., *Pre-coating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: implications for rational design of nanoparticles*. J Control Release, 2004. **100**(3): p. 451-5.
- Passirani, C., Barratt, G., Devissaguet, J.P., and Labarre, D., *Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system*. Life Sci, 1998a. **62**(8): p. 775-85.

- Passirani, C., Barratt, G., Devissaguet, J.P., and Labarre, D., *Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate)*. Pharm Res, 1998b. **15**(7): p. 1046-50.
- Peracchia, M.T., Harnisch, S., Pinto-Alphandary, H., Gulik, A., Dedieu, J.C., Desmaele, D., d'Angelo, J., Muller, R.H., and Couvreur, P., *Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles*. Biomaterials, 1999. **20**(14): p. 1269-75.
- Peracchia, M.T., Vauthier, C., Passirani, C., Couvreur, P., and Labarre, D., *Complement consumption by poly(ethylene glycol) in different conformations chemically coupled to poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles*. Life Sci, 1997a. **61**(7): p. 749-61.
- Peracchia, M.T., Vauthier, C., Puisieux, F., and Couvreur, P., *Development of sterically stabilized poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles by chemical coupling of poly(ethylene glycol)*. J Biomed Mater Res, 1997b. **34**(3): p. 317-26.
- Quellec, P., Gref, R., Dellacherie, E., Sommer, F., Tran, M.D., and Alonso, M.J., *Protein encapsulation within poly(ethylene glycol)-coated nanospheres. II. Controlled release properties*. J Biomed Mater Res, 1999. **47**(3): p. 388-95.
- Quellec, P., Gref, R., Perrin, L., Dellacherie, E., Sommer, F., Verbavatz, J.M., and Alonso, M.J., *Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization*. J Biomed Mater Res, 1998. **42**(1): p. 45-54.
- Roser, M., Fischer, D., and Kissel, T., *Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats*. Eur J Pharm Biopharm, 1998. **46**(3): p. 255-63.
- Shi, B., Fang, C., You, M.X., Zhang, Y., Fu, S., and Pei, Y., *Stealth MePEG-PCL micelles: effects of polymer composition on micelle physicochemical characteristics, in vitro drug release, in vivo pharmacokinetics in rats and biodistribution in S180 tumor bearing mice*. Colloid Polym Sci, 2005. **283**: p. 854-967.
- Ubrich, N., Bouillot, P., Pellerin, C., Hoffman, M., and Maincent, P., *Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles: a comparative study*. J Control Release, 2004. **97**(2): p. 291-300.
- Vandorpe, J., Schacht, E., Dunn, S., Hawley, A., Stolnik, S., Davis, S.S., Garnett, M.C., Davies, M.C., and Illum, L., *Long circulating biodegradable poly(phosphazene) nanoparticles surface modified with poly(phosphazene)-poly(ethylene oxide) copolymer*. Biomaterials, 1997. **18**(17): p. 1147-52.
- Verrecchia, T., Spenlehauer, G., Bazile, D.V., Murry-Brelier, A., Archimbaud, Y., and Veillard, M., *Non-stealth (poly(lactic acid/albumin)) and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers*. J Control Release, 1995. **36**(1-2): p. 49-61.

- Videm, V., *Endpoint-attached heparin blocks neutrophil sticking and spreading*. Biomaterials, 2004. **25**(1): p. 43-51.
- Vittaz, M., Bazile, D., Spenlehauer, G., Verrecchia, T., Veillard, M., Puisieux, F., and Labarre, D., *Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators*. Biomaterials, 1996. **17**(16): p. 1575-81.
- Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., and Benoit, J.P., *Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems*. Biomaterials, 2006a. **27**(24): p. 4356-73.
- Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Simard, P., Leroux, J.C., and Benoit, J.P., *Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake*. J Biomed Mater Res A, 2006b. **78**(3): p. 620-8.
- Yang, A., Yang, L., Liu, W., Li, Z., Xu, H., and Yang, X., *Tumor necrosis factor alpha blocking peptide loaded PEG-PLGA nanoparticles: preparation and in vitro evaluation*. Int J Pharm, 2007. **331**(1): p. 123-32.
- Zambaux, M.F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., and Vigneron, C., *Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles*. J Control Release, 1999. **60**(2-3): p. 179-88.
- Zambaux, M.F., Faivre-Fiorina, B., Bonneau, F., Marchal, S., Merlin, J.L., Dellacherie, E., Labrude, P., and Vigneron, C., *Involvement of neutrophilic granulocytes in the uptake of biodegradable non-stealth and stealth nanoparticles in guinea pig*. Biomaterials, 2000. **21**(10): p. 975-80.

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

CHAPITRE I :

Augmentation du temps de résidence
vasculaire de nanoparticules de propranolol
greffées avec de l'héparine

L'élaboration de vecteurs furtifs repose principalement sur la constitution d'une bordure en brosse hydrophile autour des liposomes ou des nanoparticules polymériques. Les molécules utilisées afin de créer une couronne capable de limiter l'adsorption des protéines plasmatiques telles que les opsonines sont généralement des polymères flexibles et hydrophiles comme le poly(éthylène glycol), des poloxamères, des poloxamines ou même certains polysaccharides comme le dextran. Ces molécules sont le plus souvent fixées soit de façon chimique sur les particules préformées, soit par synthèse chimique sur les polymères constitutifs des particules, et permettent ainsi de diminuer l'hydrophobicité des particules qui représente l'un des facteurs défavorables à une longue durée de vie dans la circulation.

Un autre axe de recherche utilisé pour développer la furtivité des nanoparticules consiste à inhiber le système du complément. En effet, l'activation du complément joue un rôle important dans la reconnaissance des particules par les cellules phagocytaires et donc dans l'élimination de celles-ci et du principe actif éventuel qu'elles contiennent.

Des travaux antérieurs effectués au laboratoire ont démontré qu'après encapsulation de l'héparine, une partie était encapsulée au cœur des particules, alors qu'une autre était fixée en couronne sur les groupements hydrophiles polycationiques d'un polymère méthacrylique, l'Eudragit® RS (Zambaux *et coll.*, 1999 ; Hoffart *et coll.*, 2003). Ce sont des copolymères amorphes, non biodégradables, synthétisés à partir d'esters d'acides acryliques et méthacryliques avec une faible concentration en groupements ammonium quaternaires qui leur confèrent une charge globale positive. Les héparines étant des glycosaminoglycanes polyanioniques, nous avons alors imaginé que l'on pourrait utiliser leurs propriétés de charge pour permettre des interactions électrostatiques avec les groupements polycationiques hydrophiles de l'Eudragit® RS.

L'héparine présente un double avantage : c'est un glycosaminoglycane qui permet d'augmenter l'hydrophilie de surface des particules mais elle a également déjà démontré ces capacités à inhiber l'activation du complément. Le recouvrement de nanoparticules par une telle molécule pourrait permettre de leur conférer des propriétés de furtivité.

Le but de cette étude a alors consisté à développer des nanoparticules rendues furtives par une quantité déterminée d'héparine permettant de neutraliser la surface des particules de charge globale positive préparées avec le mélange 50/50 d'Eudragit® RS et de poly- ϵ -caprolactone. En effet, un potentiel de surface proche de la neutralité semble favorable à une réduction de la phagocytose des vecteurs polymériques.

Afin d'évaluer la capacité d'une telle formulation à véhiculer une drogue, nous avons procédé à l'encapsulation d'un principe actif hydrophile modèle, le chlorhydrate de propranolol, par une technique de double émulsion eau dans huile dans eau. Ces vecteurs furtifs ont été comparés *in vitro* à des nanoparticules non furtives (taille, potentiel de surface, taux d'encapsulation et cinétique de dissolution), puis *in vivo* après injection intraveineuse de ces vecteurs à des lapins. Les propriétés de furtivité ont ainsi été évaluées par détermination de la demi-vie d'élimination du principe actif par rapport à une solution de chlorhydrate de propranolol et à des nanoparticules non furtives, administrées de la même façon.

Les résultats *in vivo* ont mis en évidence une augmentation importante ($\times 18$) de la demi-vie d'élimination du principe actif encapsulé dans les nanoparticules furtives par rapport à la solution aqueuse, démontrant que l'héparine liée par des liaisons électrostatiques au polymère polycationique utilisé permet de conférer des propriétés de furtivité aux particules.

Il faudra toutefois garder à l'esprit que l'Eudragit® RS n'est pas biodégradable. Il ne s'agit ici que d'un modèle de polymère polycationique nous ayant permis de mettre en évidence le principe de fabrication innovant des particules furtives.



Increase in the Vascular Residence Time of Propranolol-Loaded Nanoparticles Coated with Heparin

Marie Socha¹, Alf Lamprecht², Fatima El Ghazouani¹, Emeric Emond¹, Philippe Maincent^{1,*},
Jérôme Barré³, Maurice Hoffman¹, and Nathalie Ubrich^{1,†}

¹EA 3452-Inserm U734, School of Pharmacy, 5, Rue A. Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

²Laboratory of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Place Saint Jacques, 25041 Besançon cedex, France

³Unité Fonctionnelle de Pharmacologie-Toxicologie, Centre Hospitalier Intercommunal, 40, Avenue de Verdun, 94010 Créteil cedex, France

Propranolol-HCl incorporated nanoparticles prepared with a blend of a polyester and a polycationic polymer and coated or not with a low molecular weight heparin by electrostatic interactions were prepared by emulsification followed by solvent evaporation. The mean diameter was 388 and 357 nm for coated and uncoated nanoparticles, respectively, and the entrapment efficiency ranged from 20 to 32%. Coated nanoparticles were negatively-charged, whereas uncoated nanoparticles displayed a positive zeta potential (+30 mV). After intravenous administration to rabbits of propranolol-HCl solution and propranolol-loaded nanoparticles coated or not with heparin, pharmacokinetic data revealed that coated nanoparticles exhibited a prolonged blood residence time. It can be concluded that the hydrophilic layer of heparin at the surface of nanoparticles conferred stealth properties which probably reduce the phagocytosis process and avoid immediate uptake by the mononuclear phagocytic system.

Keywords:

1. INTRODUCTION

Colloidal drug delivery systems such as liposomes and polymeric nanoparticles were developed in order to control the tissue drug distribution and the targeting of drugs as well as to reduce their potential toxicity towards some organs. In addition, they have also contributed to improve the therapeutic index and the vascular residence time of many drugs. However, after intravenous administration, these drug carriers are eliminated within seconds or minutes after injection by the mononuclear phagocytic system (MPS). Indeed, owing mainly to their large specific surface area, these carriers interact by strong hydrophobic bindings with plasma proteins called opsonins that are recognized by specific receptors located on macrophages of the MPS. Colloidal carriers, thus decorated with opsonins, were mainly taken up by Kupffer cells and macrophages of the marginal area of the spleen, then internalized by endocytosis and degraded.

In order to prevent the phagocytosis of colloidal carriers by the MPS, the concept of opsonin repulsion has been proposed. It consists in increasing the hydrophilicity of the drug carriers by covalently binding hydrophilic and

flexible polymers such as polyethyleneglycols,¹⁻³ polysaccharides (dextran),^{4,5} or poloxamers and poloxamines^{6,7} that form a hydrophilic brush-like structure hampering the adsorption of opsonins onto the particles.

The complement activation is also important during the opsonization process and is involved in the recognition of colloidal carriers by the macrophages, leading to the production of inflammation mediators during the colloidal carrier elimination. Since heparin, mainly used as anticoagulant, has also the property to inhibit the complement activation, it has been demonstrated that nanoparticles bearing heparin covalently bound to the polymer led to the reduction of the uptake by a macrophagic cell line⁸ and allowed to reduce the activation of the C3 complement factor. In addition, Lappergard et al.^{9,10} showed that the binding of heparin at the surface of nanoparticles allowed to both increase the inhibition of the complement activation and to decrease the expression of CD11b onto macrophages and granulocytes and consequently reduce the phagocytosis of polymeric particles and increase their vascular residence time.

These new generation of colloidal drug carriers, called stealth particles, have thus demonstrated their potential to reduce their uptake by macrophages as well as their ability to increase their vascular residence time and

*Author to whom correspondence should be addressed.

†In memoriam of Nathalie Ubrich who died on April 24, 2007.

consequently the half-life of the drug.^{3,11} However, in all cases, hydrophilic polymers or macromolecules conferring stealth properties to polymeric particles were covalently bound to either polymers used to prepare nanoparticles or at the surface of manufactured nanoparticles. The development of an oral multiparticulate form of heparin with a blend of a polyester and a polycationic polymethacrylate showed that heparin was bound by electrostatic interactions onto the hydrophilic quaternary ammonium groups of the polycationic polymer located at the surface of the particles.¹²

In this work, we report the design of polycaprolactone/polymethacrylate (50/50) nanoparticles bearing a hydrophilic shell of heparin bound by electrostatic interactions, by using chlorhydrate propranolol as a drug model. After *in vitro* characterization of the particles (mean diameter, zeta potential, propranolol-HCl encapsulation efficiency, heparin binding efficiency, release kinetics), these new stealth carriers were intravenously administered to rabbits and compared to non-stealth propranolol nanoparticles and propranolol-HCl solution, then submitted to a pharmacokinetic analysis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Propranolol hydrochloride provided by Cooper (Melun, France) was used as a hydrophilic drug model. A marketed low molecular weight heparin (LMWH), Fraxiparine® (Nadroparin), was provided by Sanofi (Paris, France). Poly-ε-caprolactone (PCL; MW 42,000 Da) was supplied by Aldrich Chemical Company (Milwaukee, USA) and a copolymer of acrylic and methacrylic acids which contents 0.5 to 0.8% of quaternary ammonium groups (Eudragit® RS, MW 150,000 Da) was kindly supplied by Degussa (Darmstadt, Germany). Polyvinylalcohol (PVA, 88% hydrolyzed, MW 30,000 Da) was purchased from Sigma (Saint Louis, USA) and chosen as a stabilizer for the second emulsion. All other chemical reagents were of analytical grade.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of Nanoparticles

The preparation of nanoparticles (NP) was based on a w/o/w emulsification solvent evaporation method. The technique was optimised as follows: 1 mL of propranolol-HCl aqueous solution (80 mg/mL) was first emulsified by sonication by using an ultrasound probe (Vibra cell 72434, BioBlock Scientific, Strasbourg, France) at amplitude 60 and 50 W output (30 s) into 250 mg of polymers (Eudragit® RS/PCL; 50/50) in methylene chloride (10 mL). This first emulsion (w/o) was emulsified by sonication (60 s) in the same conditions into 40 mL of an

aqueous PVA solution (1% w/v pH 10.5). After solvent and water evaporation under reduced pressure (gradually down to 30 mbar) during 10 min to a final volume of 10 mL, propranolol-loaded NP (PNP) were further isolated by centrifugation (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Germany) at 42,000 g for 20 min. The sedimented nanoparticles were resuspended in 3 mL of purified water and immediately frozen before freeze-drying.

Heparin-coated propranolol-HCl nanoparticles (named “stealth” propranolol NP, S-PNP) were prepared in the same way by adding different volumes of LMWH (1000 anti-Xa U/mL) in the aqueous PVA solution (pH 10.5).

Blank uncoated and coated nanoparticles were prepared in the same way by substituting propranolol-HCl by water.

For both uncoated and coated nanoparticles, the supernatant obtained after centrifugation was kept for the assay of propranolol-HCl and LMWH.

Each formulation was prepared in triplicate.

2.2.2. Encapsulation Efficiency

Due to the impossibility of dissolving both polymers in the same organic solvent, the amounts of entrapped propranolol-HCl and bound heparin were determined by measuring the amount of free drugs in the supernatant recovered after centrifugation of the nanoparticles suspension at 42,000 g for 20 min.

For propranolol-HCl, the assay was carried out spectrophotometrically at 289 nm. The linearity range of the method was 0 to 40 µg/mL. It cannot be excluded that hydroxide ions could move inside the NP matrix. In this case, part of encapsulated propranolol could be as the free base.

For LMWH, the assay was carried out by nephelometry.¹³ This method is based on the complexation between sulfates and carboxylates groups of LMWH with ammonium groups of cetylpyridinium. Briefly, 500 µL of sample were reacted with 500 µL of acetate buffer (pH 5.2) and 2 mL of cetylpyridinium chloride (0.1%, w/v). After 1 hour of incubation at 37 °C, the extent of precipitate was assayed at 500 nm by UV spectroscopy. The linearity range of the method was 0 to 10 anti-Xa units/mL.

2.2.3. Particle Size and Potential

NP were analysed in purified water for their mean diameter, size distribution and zeta potential by photon correlation spectroscopy with a Zetasizer (Malvern Instruments, UK). Each sample was measured in triplicate.

2.2.4. In Vitro Drug Release

Fifty milligrams of freeze-dried NP were suspended in 20 mL of phosphate buffer (pH 7.4) and incubated into a bath at 37 °C under gentle magnetic stirring (150 rpm). At determined intervals, 1 mL samples were removed

and assayed for released drug. One mL of fresh phosphate buffer was added to the suspension of nanoparticles after each sampling. The amounts of propranolol-HCl and LMWH released were determined as described previously (Section 2.2.2) by spectrophotometry at 289 and 500 nm, respectively. All release experiments were performed in triplicate.

2.2.5. In Vivo Study

New Zealand rabbits (3.1–3.9 kg) were used for *in vivo* experiments. The animals were provided with standard diet and water ad libitum.

Coated and uncoated NP, obtained after centrifugation, were resuspended in 5 mL of sodium chloride 0.9% and administered immediately to overnight fasted rabbits ($n = 4$) by intravenous injection into the marginal ear vein at the dose of 1 mg propranolol-HCl per kg. A solution of propranolol hydrochloride in sodium chloride 0.9% was administered as the reference in order to compare the pharmacokinetic parameters with the different formulations. Serial blood samples were collected at 2, 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48, 72 and 96 h after the IV administration.

Blood samples (1.5 mL) were withdrawn from the opposite ear vein into a vial containing sodium citrate (0, 129 M, 170 μ L) and gently shaken before centrifugation for 10 min at 3,000 g. Plasma was frozen at -20°C until analysis.

2.2.6. Propranolol Assay in Plasma

Propranolol-HCl plasma levels were determined by an adapted HPLC method with spectrofluorimetric detection.^{14,15} Briefly, 200 μ L of acetonitrile with HCL 1 N (1%) was added into 200 μ L of plasma in order to precipitate the proteins. After vortexing for 15 s, the samples were centrifuged for 10 min at 10,000 g and the organic phase was injected on the column.

HPLC system consisted of a SCL 10A system controller, a FCV 10AL pump, a SIL 10AD auto injector, a CTO 10A column oven and a RF 10A detector (Shimadzu, Kyoto, Japan). Separation was performed at 35°C on a CN C-18 reversed phase column (250×4.6 mm, 5 μ m, 120 $\text{\AA}$ – CPS hypersil, Thermo electron corporation, UK). The mobile phase was 1% aqueous acetic acid containing 0.2% triethylamine pH 3.75 and acetonitrile (65:35 v/v) and was filtered before use through a 0.45 μ m membrane filter (Millipore) using a vacuum pump. The flow rate was 1.2 mL/min, the injection volume was 20 μ L and the excitation and emission wavelengths were 230 nm and 340 nm, respectively. The data analysis was performed by using Class-VP software from Shimadzu. The propranolol-HCl concentrations in plasma were linear between 1 and 200 ng/mL. The limit of quantification was determined at 1 ng/mL.

J. Nanosci. Nanotechnol. 8, 2369–2376, 2008

2.2.7. Biological Activity of LMWH

Anti-factor Xa activity was determined with a chromogenic assay by use of a standard kit (Stachrom, Stago Diagnostica) on a STA compact automate (Stago Diagnostica).

2.2.8. Pharmacokinetics Analysis

The terminal half-life ($T_{1/2}$) was calculated as following: $T_{1/2} = \ln 2 / \lambda_z$. λ_z was determined from the linear regression of the terminal phase of the concentration time plot. The area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the time of the last measurable concentration point (AUC_{0-t}) was calculated using the linear trapezoidal rule. Clearance (CL) and the volume of distribution (VD) were calculated from the following equations: $\text{CL} = \text{Dose} / \text{AUC}_{0-t}$; $\text{VD} = \text{Dose} / \lambda_z \cdot \text{AUC}_{0-t}$. Data are reported as mean $\pm$ S.D.

2.2.9. Statistical Analysis

Statistical comparisons of the experimental pharmacokinetic results were performed by a one-way analysis of variance (ANOVA) on ranks followed by a Student Newman Keuls test at the significance level of $p < 0.05$, with the statistical software package Sigmapstat 2.0.

3. RESULTS

The water-in-oil-in-water (w/o/w) method was used to prepare “stealth” NP loaded with a hydrophilic model drug (propranolol-HCl) and coated with LMWH bound by electrostatic interactions between negatively charged sulfate and carboxylate groups of heparin and polycationic quaternary ammonium groups of Eudragit® RS located at the surface of the particles.

3.1. Characterization of Nanoparticles

The amount of LMWH added in the preparation of LMWH-coated NP was optimized by measuring the surface potential of nanoparticles which has to be close to neutrality. Figure 1 shows the changes in the zeta potential

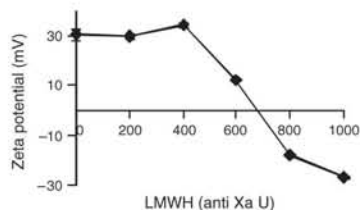


Fig. 1. Zeta potential of nanoparticles coated with various amounts of LMWH. Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n = 2$).

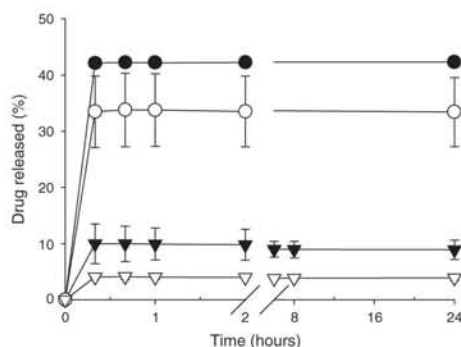
Table I. Main physicochemical properties of the free propranolol-HCl NP or propranolol-HCl loaded NP coated or not with LMWH and prepared with a blend (50/50) of PCL and Eudragit® RS. Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n = 3$).

Formulation	Mean diameter (nm)	Zeta potential (mV)	Propranolol-HCl encapsulation efficiency (%)	LMWH binding efficiency (%)
Non stealth-blank NP	522.6 $\pm$ 6.7	37.4 $\pm$ 2.8	N.D.	N.D.
Stealth-blank NP	363.4 $\pm$ 4.9	-25.3 $\pm$ 1.8	N.D.	80.7 $\pm$ 3.2
Non stealth-propranolol loaded NP	357.2 $\pm$ 10.6	30.4 $\pm$ 2.4	19.8 $\pm$ 3.2	N.D.
Stealth-propranolol loaded NP	388.4 $\pm$ 20.2	-17.8 $\pm$ 0.9	32.4 $\pm$ 4.8	74.4 $\pm$ 0.5

N.D.: Not determined.

according to the amounts of LMWH added into the external aqueous phase during the preparation. The surface potential of NP decreased when the amount of LMWH increased. From zero to 600 anti-Xa U, NP were positively charged (from +35 to +12 mV) whereas from 800 to 1000 anti-Xa U, they were negatively charged (-17 and -26 mV respectively). The amount of 800 anti-Xa U was chosen because the zeta potential of NP was the closest (among negatively charged NP) to neutrality.

As reported in Table I, the mean diameter of each loaded and unloaded NP prepared with both Eudragit® RS and PCL ranged from 350 to 520 nm. The polydispersity index was 0.20. Non-stealth blank nanoparticles were the largest ones. Stealth nanoparticles loaded or not with propranolol-HCl as well as non-stealth propranolol loaded nanoparticles displayed no significant difference in their mean diameter. Non-stealth NP with or without propranolol-HCl and stealth-blank NP were positively charged (+37, +30, -25 mV, respectively). On the contrary, stealth NP loaded with propranolol-HCl were negatively charged (-17 mV). The encapsulation efficiency of propranolol-HCl ranged between 20% for non-stealth NP and 33% for stealth NP. Around 80% of LMWH were bound on stealth NP loaded or not with propranolol-HCl.

**Fig. 2.** Release kinetics of (1) propranolol-HCl from non-stealth propranolol loaded NP (NS-PNP, ●), stealth propranolol loaded NP (S-PNP, ○) and (2) LMWH from stealth propranolol loaded NP (S-PNP, ▼) and stealth-blank NP (S-blank NP, ▽). Experiments were performed in phosphate buffer at 37 °C and pH 7.4. Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n = 3$).

3.2. In Vitro Drug Release

Figure 2 illustrates the *in vitro* release profiles of propranolol-HCl in PBS at 37 °C and pH 7.4 from propranolol-HCl loaded-stealth and non-stealth NP. They were characterized by an initial burst during which propranolol-HCl was rapidly released over 20 min followed by a plateau characterized by an incomplete release of the drug up to 24 hours. However, since 20 min was the first sampling point, the burst release might be more

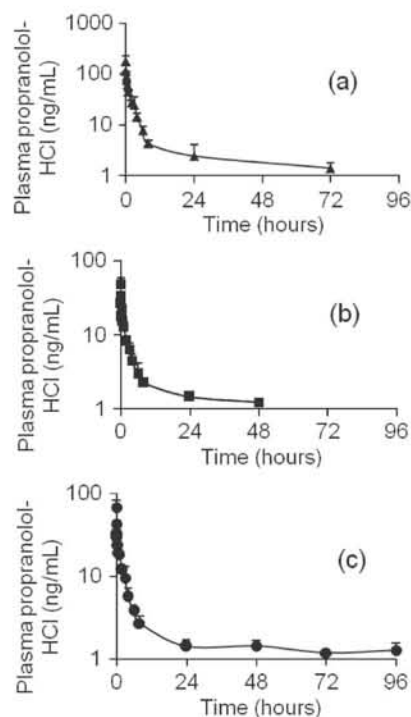
**Fig. 3.** Plasma propranolol-HCl concentrations after intravenous administration in rabbits of (a) a sodium chloride solution (0.9%) containing propranolol hydrochloride (▲), (b) non-stealth propranolol loaded NP (■), and (c) stealth propranolol loaded NP (●) (1 mg/kg). Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n = 4$ for each formulation).

Table II. Main pharmacokinetic parameters after intravenous administration of various formulations of propranolol-HCl in rabbits (1 mg/kg). Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n = 4$).

Formulation	AUC ₀₋₄ (ng·h/mL)	Clearance (mL/h)	$T_{1/2}$ (h)	VD (mL)
Solution	253.0 $\pm$ 25.3	13.6 $\pm$ 2.4	2.3 $\pm$ 0.2	45.0 $\pm$ 10.1
Non stealth-propranolol-loaded NP	89.4 $\pm$ 24.9 ^a	40.4 $\pm$ 11.5 ^a	3.0 $\pm$ 0.9	166.9 $\pm$ 25.1 ^a
Stealth propranolol-loaded NP	267.3 $\pm$ 26.3	13.6 $\pm$ 0.8	42.1 $\pm$ 7.7 ^b	827.8 $\pm$ 166.2 ^{b,c}

^aPropranolol-HCl solution statistically different at $p < 0.05$ from non-stealth propranolol loaded NP.^bPropranolol-HCl solution statistically different at $p < 0.05$ from stealth propranolol-loaded NP.^cNon-stealth propranolol-loaded NP statistically different at $p < 0.05$ from stealth propranolol-loaded NP.

important. After 24 hours, 33 and 42% of propranolol-HCl were released from stealth and non-stealth NP, respectively.

The *in vitro* release of LMWH from stealth NP loaded or not with propranolol-HCl and performed in the same conditions is reported in Figure 2. Only a small amount of nadroparin (4% for stealth blank NP and 10% for stealth propranolol-HCl loaded NP) was released.

3.3. In Vivo Study

Propranolol-HCl plasma concentrations were measured by HPLC after intravenous administration in rabbits of a sodium chloride solution (0.9%) containing propranolol-HCl, non-stealth propranolol-HCl NP and stealth propranolol-HCl NP (Fig. 3). As expected, for all formulations, plasma concentrations of propranolol-HCl decreased with regards to time. The plasma profiles were typical of intravenous administrations and characterized first by a fast decrease in propranolol-HCl concentration corresponding to the distribution phase of the drug and second by a slower propranolol-HCl concentration decrease corresponding to the elimination phase. Accordingly, the half-lives of propranolol-HCl in the different formulations were evaluated from the regression of the terminal phase of logarithms of the concentrations versus time.

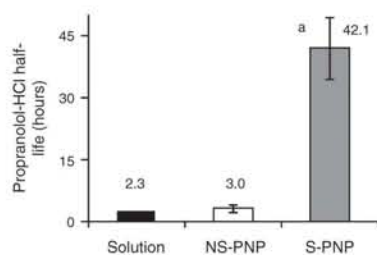


Fig. 4. Propranolol-HCl half-lives after intravenous administration in rabbits of a propranolol-HCl solution (black), non-stealth propranolol loaded NP (NS-PNP, white) and stealth propranolol NP (S-PNP, grey) (1 mg/kg). Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n = 4$).

^aPropranolol-HCl solution and non-stealth propranolol loaded NP statistically different at $p < 0.05$ from stealth propranolol loaded NP.

The main pharmacokinetic parameters are summarized in Table II. The experimental half-life of propranolol-HCl solution in sodium chloride (0.9%) was around 2 hours (Fig. 4). Propranolol-HCl encapsulation increased slightly the half-life of the drug up to 3 hours with non-stealth propranolol-loaded NP and extensively to 42 hours with stealth NP loaded with propranolol-HCl.

The anti-Xa factor was measured in plasma after the intravenous administration of S-PNP. A low anti-Xa activity was detected from 5 min to 8 hours demonstrating a limited release of LMWH from stealth NP encapsulating propranolol-HCl without any therapeutic or preventive effect (Fig. 5).

4. DISCUSSION

Since heparin has been shown to inhibit the complement activation,^{16,17} binding heparin to surfaces has been suggested to be a way of improving blood compatibility of surfaces by increasing the local activity of inhibitors proteins controlling coagulation and complement activation.¹⁸ Some studies have demonstrated the ability of nanoparticles covalently bound with heparin to avoid the mononuclear phagocyte system (MPS) recognition *in vitro*¹⁹ and *in vivo*.⁴ Moreover, Videm et al. have observed that coating of polymer surfaces with heparin significantly reduced neutrophil sticking and spreading.²⁰ In our approach, the aim was to prepare stealth nanoparticles based on the binding of LMWH on the surface of the particles by electrostatic interactions between the negatively charged groups of heparin and the polycationic groups of the Eudragit® RS polymer.

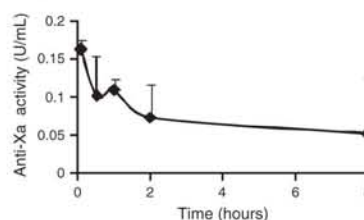


Fig. 5. Plasma anti-Xa activity after intravenous administration in rabbits of stealth propranolol loaded NP (1 mg/kg). Data are mean $\pm$ S.D. ($n = 4$).

For the preparation of nanoparticles, the choice of the encapsulation method is determined by the solubility characteristics of the drug. Since propranolol-HCl is a hydrophilic drug, the double emulsion solvent evaporation was adopted. The first step consists of the formation of a water-in-oil emulsion with droplets of propranolol-HCl aqueous solution dispersed into the organic solution of polymers (Eudragit® RS/PCL) followed by the water-in-oil-in-water emulsion obtained by mixing the first emulsion into an aqueous solution of PVA containing the LMWH. The second step depends on the solvent evaporation from the droplets of the second emulsion allowing the precipitation of polymers which are insoluble in water and consequently the solidification of the core of the nanoparticles.

Figure 1 shows that the uncoated NP were positively charged due to the quaternary ammonium groups of Eudragit® RS mainly directed towards the continuous aqueous phase. When nadroparin was added, the zeta potential decreased because of interactions with negatively charged sulfate and carboxylate groups of heparin which are able to mask the charges of the polymer when nadroparin amounts increase.

The magnitude of the measured zeta potential is an indication of the repulsive forces that are present and can be used to predict the long-term stability of the nanoparticle suspension.²¹ When the particles in suspension have a high negative or positive zeta potential, they tend to repel each other and have no tendency to aggregate. On the contrary, when particles have low zeta potential absolute values, there is no counteracting force to prevent their aggregation and flocculation. It can consequently be stated that heparin-free NP as well as NP coated with 1000 anti-Xa units of nadroparin that display a zeta potential of +35 and -26 mV, respectively, will lead to a better stability than intermediate amounts of LMWH. In addition, it has been demonstrated that the zeta potential of nanoparticles plays an important role in their recognition by the MPS and their phagocytosis.^{11,22} Indeed, it has also been demonstrated that the higher the surface charge, the shorter is the residence time of nanoparticles in the circulatory system.^{23,24} On the other hand, Benita and Levy have shown that an absolute value of 20 mV in zeta potential was the most favorable charge in term of stability.²¹ Based on that, 600 and 800 anti-Xa U seem to be the most favorable amounts of adsorbed nadroparin compared to 1000 anti-Xa U. In addition, since the endocytosis index is minimal with a zeta potential close to zero,^{22,24} that definitively led to take into account in our case 600 and 800 anti-Xa units which involve the closest value to neutrality. However, 600 anti-Xa U confer a rather low zeta potential value (+12.5 mV) which would definitely lead to potential stability problems (aggregation) on long term storage. Therefore, NP with a zeta potential of -17.5 mV corresponding to 800 anti-Xa U adsorbed on NP, display more favorable

characteristics in term of physical stability. There is some controversy in literature with regards to the optimal charge of stealth designed carriers. Indeed, some authors claim a longer residence time of positively-charged carriers²⁵⁻²⁸ whereas some others just demonstrated a slower uptake of negatively-charged particles owing to the repulsion effect towards the negatively-charged cell membranes.²⁴ Based on these reported behaviour and the stability issues NP coated with 800 anti-Xa U were selected for the *in vivo* study. Moreover, generally, nanoparticles with zeta potential close to neutrality display an enhanced residence time, probably due to few interactions with opsonins that increase the blood circulation time of nanoparticles.²⁵

As reported in Table I, the mean diameter of each formulation of nanoparticles was ca. 350 nm, whereas the mean diameter of the blank ones is larger. The chemical structure of propranolol-HCl, an hydrophilic molecule with an hydrophobic aliphatic chain, may confer a relative amphiphilicity to the drug which could behave as a surfactant. A previous study in our laboratory²⁹ has observed that the nanoparticles size decreased with increasing propranolol-HCl concentration in the internal aqueous phase. Since the particle size is related to a great extent to the stability of the first emulsion, it was claimed that the drug can act as a surfactant by stabilizing the first emulsion and consequently hampering the fast coalescence of the droplets.

The high solubility of propranolol-HCl in the external aqueous phase and its high volume compared to that of the internal aqueous phase (w/o/w technique) caused the leakage of the drug into the continuous phase. Increasing the pH of the external aqueous phase above the pKa of propranolol-HCl results in a decrease of its solubility and, consequently, in an increase of its entrapment in the nanoparticles. The pH of the solution of PVA was increased up to 9.45 (pKa of propranolol-HCl) to keep the propranolol-HCl in non-ionized form, but it cannot be higher than 10.5 due to the instability of nadroparin and the aggregation of nanoparticles. As shown in Table I, despite the optimization of the PVA solution pH, the encapsulation efficiency of propranolol-HCl in the nanoparticles ranged between 20% for non-stealth propranolol-HCl NP to 33% for stealth propranolol-HCl-loaded NP. The encapsulation was higher for stealth propranolol-HCl NP and could be explained by ionic interactions between heparin and Eudragit® RS which could create a microviscous area which was able to retain propranolol-HCl inside NP. The binding efficiency of LMWH was around 80% for the two formulations coated with nadroparin; this, together with *in vitro* release properties, was found satisfying for parenteral administration.

Figure 2 illustrates the *in vitro* release profile from each formulation, in pH 7.4 phosphate buffer, of both propranolol-HCl and nadroparin. They were characterized by an initial burst (42% and 33% of encapsulated drug for non stealth and stealth NP, respectively) during which

propranolol-HCl and nadroparin were rapidly released over 20 min followed by a plateau characterized by an incomplete release of drug up to 24 hours. When particles are prepared by w/o/w method, water-soluble drugs exhibit a tendency to migrate to the aqueous medium, thereby concentrating at the surface of the particles and involving the burst effect.³⁰ After 24 hours, only 33 and 42% of propranolol-HCl were released from stealth and non-stealth NP, respectively. The saturation concentration of propranolol-HCl in pH 7.4 phosphate buffer is 73 mg/ml, which definitely demonstrates that the sink conditions (defined as 30% of the concentration saturation) were maintained during the whole dissolution experiment. Therefore, the non-complete release cannot be explained by non-sink conditions but may be due to the high hydrophobicity of PCL which reduced the wettability of the nanoparticles as well as the diffusion of the drug to the dissolution medium. In addition the microviscous area created by interactions between heparin and Eudragit® RS can retain propranolol-HCl inside the particles and explain that less drug was released from stealth NP containing propranolol-HCl. Nevertheless, *in vivo*, the release of propranolol-HCl from these nanoparticles could be increased since the biological environment (i.e., enzymes) may increase the degradation of PCL.

The desorption of nadroparin from stealth NP appears to be a major drawback. However, since small amount of nadroparin under therapeutic doses are released, it cannot act as an anticoagulant. Indeed after 8 hours, the anti-Xa activity is only 0.05 U anti-Xa/mL which is very much below the preventive concentration i.e., 0.4 U anti-Xa/mL. Obviously the release is very slow and always maintained under the threshold value of 0.4 U anti-Xa/mL and therefore there will never be an anticoagulant activity. This low release probably corresponds to nadroparin chains which are either in excess, or not strongly bound onto quaternary ammonium groups of the polycationic polymer Eudragit® RS.

For the *in vivo* experiments, three different formulations of propranolol-HCl were intravenously administered to rabbits: a propranolol-HCl solution in 0.9% NaCl, non-stealth and stealth nanoparticles loaded with propranolol-HCl. The plasma kinetics of propranolol-HCl formulations showed a similar profile, characteristic of intravenous administration. The analytical method was validated and the LOQ (1 ng/mL) allowed propranolol-HCl plasma concentrations to be measured up to 72, 48 and 96 hours for the solution, the non-stealth and stealth nanoparticles, respectively. The clearance of propranolol-HCl is the same for the stealth NP and the aqueous solution dosage forms. Volumes of distribution (VD) are in the order stealth NP > non-stealth NP > aqueous solution. Stealth NP display a larger volume of distribution than the aqueous propranolol-HCl solution. It reflects a different distribution of the drug according to the dosage forms. Indeed, in the case of non-stealth NP, they are taken up

by the mononuclear phagocytic system mainly in the liver and spleen. As a consequence, the volume of distribution is increased, due to propranolol-HCl encapsulation. This is a well-known fact which was already previously demonstrated by Maincent et al.³¹ in the case of vincamine: the volume of distribution was 4.3 and 8.3 L/Kg for the aqueous solution or NP suspension, respectively. In the case of propranolol-HCl, the elimination half-lives are similar for both propranolol-HCl solution and propranolol-HCl loaded NP, as a consequence of the enhanced clearance. In addition, it could be stated that non-stealth NP were rapidly opsonized and taken up by the MPS, accounting for the high clearance and subsequently the low elimination half-life of non-stealth NP compared to stealth NP. Indeed, the main advantage of stealth NP is their ability to escape the opsonization process and therefore the MPS uptake. As observed in Table II, there is a significant increase in the distribution volume of stealth NP which is 5-fold higher than non-stealth NP. Since the clearances of propranolol-HCl are similar for both the aqueous solution and stealth NP, the significant increase in VD leads to a significant increase in the elimination half-life (18-fold higher) for stealth NP. Such an increase in elimination half-life has often been demonstrated with stealth particles such as liposomes or nanoparticles. There are more conflicting issues with regards to the clearance and the volume of distribution. Indeed, for these two latter parameters, their values may be either increased or decreased. For instance, in the case of liposomes or PLGA nanoparticles, there is a decrease in both the volume of distribution and the clearance after pegylation.^{32,33} On the other hand, Fundero et al.³⁴ have observed an increased volume of distribution after pegylation of solid lipid nanoparticles, together with a constant clearance value. Such an increase in the volume of distribution compares well with our values. The important differences found in the literature can be due to different parameters such as types of particles, polymers or lipids, animal model, drug model or its administered dose which can all affect the biodistribution of both stealth and non stealth particles.

Therefore, it has been demonstrated that propranolol-HCl NP coated with nadroparin confer stealth properties in the same way it has been observed with PEG or dextrans. As observed *in vitro*, small amounts of nadroparin corresponding to non-therapeutic and non-prophylactic doses were released. This is nevertheless not convenient for a pharmaceutical development and will require the optimisation of nadroparin immobilization. It should also be kept in mind that these particles are composed of 50% of a non biodegradable but biocompatible polymer, i.e., Eudragit® RS. Therefore, the pharmaceutical development of an injectable stealth system with Eudragit® RS would be extremely challenging unless the ratio efficacy/risk would be tremendously increased for a specific drug. We demonstrated the feasibility of stealth nanoparticles manufacturing based on a simple

and reproducible adsorption technique without complex steps of chemically binding of hydrophilic polymers onto biodegradable polymers or lipids or preformed colloidal carriers. In addition, compared to PEG, widely used in order to enhance the residence time of colloidal delivery systems by decreasing the hydrophobicity of particles and hampering protein adsorption, heparin acts not only on the increase of particle hydrophilicity but also on the inhibition of complement activation which is also involved in the phagocytosis process. To further extent this concept, it could be interesting to chemically synthesize new polycationic and biodegradable polymers. Peptides and proteins, characterized by a short half-life could be more appropriate candidates for the development of stealth nanoparticles according to our concept.

Acknowledgments: The authors would like to thank Professor Jean-Michel Cardot from the school of pharmacy of Clermont-Ferrand for help on pharmacokinetic parameters calculation.

References and Notes

1. G. Fontana, M. Licciardi, S. Mansueti, D. Schillaci, and G. Giammona, *Biomaterials* 22, 2857 (2001).
2. W. Chen and X. Yang, *J. Biomed. Eng.* 20, 143 (2003).
3. M. T. Peracchia, *STP Pharma. Sci.* 13, 155 (2003).
4. C. Passirani, G. Barratt, J. P. Devissaguet, and D. Labarre, *Pharm. Res.* 15, 1046 (1998).
5. U. Gaur, S. K. Sahoo, T. K. De, P. C. Ghosh, A. Maitra, and P. K. Ghosh, *Int. J. Pharm.* 202, 1 (2000).
6. R. H. Muller, S. Maassen, C. Schwarz, and W. Mehnert, *J. Control Release* 47, 261 (1997).
7. S. M. Moghimi, K. D. Pavey, and A. C. Hunter, *FEBS Lett.* 547, 177 (2003).
8. N. Jaulin, M. Appel, C. Passirani, G. Barratt, and D. Labarre, *J. Drug Target* 8, 165 (2000).
9. K. T. Lappegard, M. Fung, G. Bergseth, J. Riesenfeld, J. D. Lambris, V. Videm, and T. E. Mollnes, *Ann. Thorac. Surg.* 77, 932 (2004).
10. K. T. Lappegard, M. Fung, G. Bergseth, J. Riesenfeld, and T. E. Mollnes, *Ann. Thorac. Surg.* 78, 38 (2004).
11. R. Gref, M. Luck, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, and R. H. Muller, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 18, 301 (2000).
12. V. Hoffart, N. Ubrich, A. Lamprecht, K. Bachelier, C. Vigneron, T. Lecompte, M. Hoffman, and P. Maincent, *Drug Deliv.* 10, 1 (2003).
13. M. Ardy, *Bull. Ordre.* 137, 699 (1976).
14. H. K. Kim, J. H. Hong, M. S. Park, J. S. Kang, and M. H. Lee, *Biomed. Chromatogr.* 15, 539 (2001).
15. G. S. Rekhi, S. S. Jambhekar, P. F. Souney, and D. A. Williams, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, 1499 (1995).
16. H. P. Ekre, Y. Naparstek, O. Lider, P. Hyden, O. Hagermark, T. Nilsson, I. Vlodavsky, and I. Cohen, *Adv. Exp. Med. Biol.* 313, 329 (1992).
17. M. D. Kazatchkine, D. T. Fearon, J. E. Silbert, and K. F. Austen, *J. Exp. Med.* 150, 1202 (1979).
18. D. J. Labarre, *Int. J. Artif. Organs* 13, 651 (1990).
19. C. Passirani, G. Barratt, J. P. Devissaguet, and D. Labarre, *Life Sci.* 62, 775 (1998).
20. V. Videm, *Biomaterials* 25, 43 (2004).
21. S. Benita and M. Y. Levy, *J. Pharm. Sci.* 82, 1069 (1993).
22. M. Roser, D. Fischer, and T. Kissel, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46, 255 (1998).
23. C. Chouly, D. Poulquien, I. Lucet, J. J. Jeune, and P. Jallet, *J. Microencapsulation* 13, 245 (1996).
24. T. Neuberger, B. Schopf, H. Hofmann, M. Hofmann, and B. von Rechenberg, *J. Magn. Magn. Mater.* 293, 483 (2005).
25. T. S. Levchenko, R. Rammohan, A. N. Lukyanov, K. R. Whiteman, and V. P. Torchilin, *Int. J. Pharm.* 240, 95 (2002).
26. S. Sengupta, P. Tyagi, T. Velpandian, Y. K. Gupta, and S. K. Gupta, *Pharmacol. Res.* 42, 459 (2000).
27. H. Y. Yu and C. Y. Lin, *J. Formos Med. Assoc.* 96, 409 (1997).
28. L. H. Reddy, R. K. Sharma, K. Chuttani, A. K. Mishra, and R. R. Murthy, *Aaps J.* 6, e23 (2004).
29. N. Ubrich, P. Bouillot, C. Pellerin, M. Hoffman, and P. Maincent, *J. Control Release* 97, 291 (2004).
30. S. R. Jameela, N. Suma, and A. Jayakrishnan, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 8, 457 (1997).
31. P. Maincent, R. Le Verge, P. Sado, P. Couvreur, and J. P. Devissaguet, *J. Pharm. Sci.* 75, 955 (1986).
32. Z. Panagi, A. Beletsi, G. Evangelatos, E. Livaniou, D. S. Ithakissios, and K. Avgoustakis, *Int. J. Pharm.* 221, 143 (2001).
33. G. Phan, A. Herbet, S. Cholet, H. Benec, J. R. Deverre, and E. Fattal, *J. Control Release* 110, 177 (2005).
34. A. Fundaro, R. Cavalli, A. Bargoni, D. Vighetto, G. P. Zara, and M. R. Gasco, *Pharmacol. Res.* 42, 337 (2000).

Received: 2 May 2007. Accepted: 13 June 2007.

CHAPITRE II :

Nanoparticules furtives greffées avec de l'héparine, transporteurs de peptides ou protéines

Soumis à International Journal of Pharmaceutics

Notre précédente étude portait sur la mise au point d'un système innovant permettant de préparer des nanoparticules furtives. Nous avons mis en évidence une augmentation du temps de résidence vasculaire d'un principe actif hydrophile. Le chlorhydrate de propranolol n'a servi que de modèle afin de démontrer le potentiel de furtivité d'un tel système, mais sa demi-vie d'élimination expérimentale chez le lapin étant de 2,3 h, il nous a semblé important de confirmer les propriétés de furtivité à l'aide d'un principe actif ayant une demi-vie d'élimination plus courte.

Les peptides et les protéines présentent généralement une demi-vie d'élimination de l'ordre de quelques minutes lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse. Notre second choix a donc été d'encapsuler un autre principe actif hydrophile modèle présentant une demi-vie plus courte : l'insuline.

La formulation est basée sur le même modèle que la précédente : un mélange 50/50 d'Eudragit® RS et PCL constitue la matrice polymérique encapsulant l'insuline et est recouverte d'une quantité suffisante d'héparine pour masquer les sites positivement chargés de l'Eudragit® RS. Après la caractérisation *in vitro* des particules furtives (diamètre moyen, potentiel zêta, taux d'encapsulation, cinétique de libération) comparativement à des nanoparticules non furtives et à une solution aqueuse d'insuline, ces trois formulations ont été testées *in vivo* par administration intraveineuse à des rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine.

Des essais complémentaires ont été effectués afin d'observer le comportement de ces particules *in vitro*. Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests d'activation du complément (CH50) en mesurant l'activité résiduelle de la voie classique après contact avec les nanoparticules furtives et non furtives. Dans un second temps, nous avons tenté d'observer la phagocytose des particules par des polynucléaires.

La technique de dosage de l'insuline par CLHP a dû être adaptée en raison de la présence d'héparine dans le milieu.

Les résultats obtenus confirment les capacités de nos vecteurs à augmenter la demi-vie d'élimination d'un principe actif modèle. L'encapsulation de l'insuline dans ces nanoparticules furtives a pu être multipliée par un facteur 200 par rapport à la solution. Cependant, même si ces résultats ont montré que ce système innovant était capable d'échapper à la reconnaissance des particules par le système phagocytaire

mononucléé *in vivo*, les essais *in vitro* d'activation du complément n'ont pas mis en évidence une grande différence entre les particules furtives et les non furtives. De la même manière, ces dernières ne semblent pas être très réactives vis-à-vis des cellules phagocytaires.

Stealth nanoparticles coated with heparin as peptide or protein carriers

M. Socha¹, P. Bartecki¹, A. Sapin¹, C. Damgé², T. Lecompte¹, J. Barré³, F. El Ghazouani¹, N. Ubrich¹ and P. Maincent^{*,1}

¹Laboratory of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, 5, Rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

²Institute of Physiology, Faculty of Medicine, 11, Rue Humman, 67000 Strasbourg, France

³Unité Fonctionnelle de Pharmacologie-Toxicologie, Centre Hospitalier intercommunal, 40, Avenue de Verdun, 94010 Créteil cedex, France

* Corresponding author. Tel: + 33 3 83 68 22 96; Fax : + 33 3 83 68 23 01; E-mail adress: philippe.maincent@pharma.uhp-nancy.fr

Keywords: nanoparticles, stealth, protein, heparin, Eudragit, poly-ε-caprolactone

Abstract

Nanoparticles loaded with insulin were prepared by a double emulsion method followed by evaporation solvent and based on a blend of polyester and a polycationic polymer. Stealth properties were given by a low molecular weight heparin (LMWH) bound by electrostatic interactions onto the surface of the particles. The amount of LMWH was optimized to mask positive charges of nanoparticles surface in order to achieve a zeta potential as close as possible to zero. Such nanoparticles were characterized in vitro (mean diameter, zeta potential, encapsulation efficiency and release kinetics) and compared with non-stealth (non-coated with LMWH) and blank nanoparticles. In vivo studies were carried out by intravenous injection in diabetic rats of stealth, non-stealth insulin loaded nanoparticles and insulin solution. Stealth nanoparticles exhibited an increase in the elimination half-life of insulin, proving that the hydrophilic layer of LMWH was able to limit the mononuclear phagocytosis system recognition in vivo. However, the complement activation studies (CH50) did not reveal significant difference between stealth and non-stealth nanoparticles.

1. Introduction

For nearly three decades, colloidal carriers such as liposomes (Gregoriadis et al., 1971; Charrois and Allen, 2003) and nanoparticles (Oppenheim, 1981) have been extensively studied. However, following intravenous injection, classical liposomes and nanoparticles are quite rapidly cleared from the blood by elements of the mononuclear phagocytic system (MPS), particularly the hepatic Kupffer cells (Moghimi et al., 2001). The process involved in the uptake of nanoparticles by the MPS is the interaction of the hydrophobic surface of particles with plasma proteins (especially opsonins) which are recognized by specific receptors on macrophages, causing the internalization and the phagocytosis of these carriers. Then, the biodegradation of particles allows the release of the encapsulated drugs. Therefore, in the past few years, there has been an increasing interest to develop stealth nanoparticles as drug carrier systems, which could avoid nanoparticle recognition by the cell of MPS and prolong the blood circulation time. One of the main methods used for the preparation of stealth or long-circulating nanoparticles is to modify

their surface with a hydrophilic and flexible polymer, such as poly(ethylene glycol (PEG) (Verrecchia et al., 1995; Gref et al., 2000; Huang et al., 2005), polysaccharides (dextran (Gaur et al., 2000; Jaulin et al., 2000)) or poloxamers and poloxamines (Muller et al., 1997; Moghimi et al., 2003). Another method used to formulate stealth nanoparticles is to graft some complement inhibitor on the surface. Indeed, complement activation is an important factor in the opsonization process. Since heparin has shown property to inhibit complement activation (Ekre et al., 1992), it has been suggested to bind heparin onto particles to reduce the activation of the C3 complement factor. During phagocytosis experiment with macrophages, heparin already proved its ability to inhibit the adsorption and the internalization processes of nanoparticles (Jaulin et al., 2000). Indeed, heparin seemed to play a role in complement-dependent reaction (Lappegard et al., 2004) by preventing the generation of the C3 amplification convertase by binding to cell-bound C3b and masking the binding site for B on C3b (Maillet et al., 1983). Furthermore, heparin bound to polymethacrylate nanoparticles did not active C3 into C3b and retained its inhibiting properties towards complement after binding to nanoparticles (Passirani et al., 1998a). Actually, heparin displays the two properties suggested to make stealth nanoparticles, i.e. hydrophilicity and complement inhibition.

In a previous work, we developed a new model of stealth nanoparticles (Socha et al., 2008). Oppositely to many authors who covalently bound hydrophilic molecules to polymers during nanoparticles preparation (Gaur et al., 2000; Labarre et al., 2005), we prepared stealth nanoparticles based on electrostatic interactions between quaternary ammonium groups of a polycationic polymer and the sulfate and carboxylate groups of a low molecular weight heparin (LMWH). Such nanoparticles increased the half-life of an hydrophilic model drug (propranolol-HCl) 18 fold in rabbits when compared with the solution.

In the present study, we further extended this concept to peptide or protein delivery. Indeed, when peptides or proteins are intravenously injected, they are very quickly degraded and their half-lives are usually in the order of a few minutes. Consequently, proteins used for treatment of chronic diseases may require several daily injections. Stealth nanoparticles could enable to limit the number of injections and would increase patients comfort and compliance. Some research groups have already prepared stealth carriers encapsulating proteins: human serum albumin (HSA) (Quellec et al., 1999), tumor necrosis factor

alpha blocking peptide (TNF-BP) (Liu et al., 2007; Yang et al., 2007), tetanus toxoid (TT) (Tobio et al., 1998). Most of these studies have shown stealth properties *in vitro* but only few studies have demonstrated the increase of circulation time of the encapsulated protein *in vivo*; among them bovine serum albumin in nanoparticles (Li et al., 2001) or interferon gamma (Hockertz et al., 1989) and interleukin 2 (Kedar et al., 2000) both in liposomes.

In this work, we report on the design of poly- ϵ -caprolactone/polymethacrylate (50/50) nanoparticles bearing a hydrophilic shell of LMWH bound by electrostatic interactions. Insulin was chosen as peptide model drug. After *in vitro* characterization of the particles (mean diameter, zeta potential, insulin encapsulation efficiency, LMWH binding efficiency, release kinetics), these stealth carriers were intravenously administered to diabetic rats and compared to non-stealth insulin loaded nanoparticles and insulin solution.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Recombinant human insulin (Actrapid[®]) provided by Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) was used as model drug. A marketed low molecular weight heparin (LMWH), Fraxiparine[®] (Nadroparin), was obtained by Sanofi-Aventis (Paris, France). Poly- ϵ -caprolactone (PCL; MW 42,000 Da) was supplied by Aldrich Chemical Company (Milwaukee, USA) and a copolymer of acrylic and methacrylic acids which contents 0.5 to 0.8% of a quaternary ammonium group (Eudragit[®] RS, MW 150,000 Da) was kindly supplied by Evonik (Darmstadt, Germany). Streptozotocin and Polyvinylalcohol (PVA, MW 30,000 Da, 88% hydrolyzed) were purchased from Sigma (Saint-Louis, USA). All others chemical reagents were of analytical grade.

22. Methods

221. Nanoparticle preparation

Nanoparticle preparation was based on water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsification solvent evaporation method as previously described by Hoffart *et al.* (2003) The technique was optimised as follows: 1 mL of insulin aqueous solution (100 IU/mL) was first emulsified by sonication by using an ultrasound probe (Vibra cell 72 434, BioBlock Scientific, Strasbourg, France) at amplitude 60 and 50 W output during 30 s into 250 mg of polymers blend (Eudragit® RS/PCL; 50/50) dissolved in methylene chloride (10 mL). This first emulsion (w/o) was thereafter poured into 40 mL of an aqueous PVA solution (1% w/v) and emulsified by sonication (60 s) in the same conditions, involving the formation of the second emulsion. After solvent and water evaporation (Rotavapor, Heidolph, Germany) at 38°C under reduced pressure (gradually down to 30 mbar) during 10 min to a final volume of 10 mL, insulin-loaded nanoparticles (INP) were further isolated by centrifugation (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) at 42,000 g for 20 min. Supernatant was removed and the sedimented nanoparticles were resuspended in 3 ml of purified water and immediately frozen at -20°C before freeze-drying.

LMWH-coated insulin nanoparticles (named “stealth” insulin nanoparticles, S-INP) were prepared in the same way by adding 1 mL of LMWH (1000 anti-Xa/mL) in the external aqueous PVA solution (1%, m/v). For both uncoated and coated nanoparticles, the supernatant obtained after centrifugation (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) was kept for the encapsulation efficiency determination of both insulin and LMWH. Blank uncoated and coated nanoparticles were prepared in the same way by substituting insulin by water.

Each formulation was prepared in triplicate.

222. Particle size and zeta potential

Nanoparticles were analysed in purified water for their size distribution using laser diffusion in a Zetasizer® (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) and in 10⁻³ M NaCl for their surface charge using photon correlation spectroscopy with the same instrument. Each sample was measured in triplicate.

223. *Encapsulation efficiency*

Insulin and LMWH are dosed by two different techniques (HPLC and nephelometry, respectively). Due to the non solubility of both polymers in the same organic solvent, assay had to be carried out according to an indirect method. Therefore, the amounts of entrapped insulin and bound LMWH were determined by measuring the amount of free drugs in the supernatant recovered after centrifugation of the nanoparticles suspension at 42,000 g for 20 min (Stratos, Heraeus Instruments, Hanau, Germany).

Quantification of insulin encapsulation was carried out by an adapted high performance liquid chromatography (HPLC) (Moslemi et al., 2003; Xu et al., 2006) followed by UV detection (Shimadzu, Champs sur Marne, France). HPLC system consisted of a SCL 10A system controller, a FCV 10AL pump, SIL 10AD autoinjector, a CTO 10A column oven and a SPD 10A UV detector. Separation was performed at 40°C on a C-18 reversed phase column (250 x 4.6 mm, 5 µm, 300 Å – Uptisphere, Interchim, Montluçon, France). Gradient elution was carried out with 0.1% (v/v) triethylamine and 0.14% (v/v) trifluoroacetic acid in water (eluent A) and 0.1% (v/v) triethylamine and 0.14% (v/v) trifluoroacetic acid in acetonitrile (eluent B). The gradient started at 25% of B and was increased from 25 to 70% in 10 min and then decreased to 25% in 5 min. The flow rate was 1.2 mL/min, the injection volume was 50 µL and the detection wavelength was 214 nm. The data analysis was performed by using Class-VP software from Shimadzu (Champs sur Marne, France). The standard curve solution (0.05-2 IU/mL) was prepared by diluting the stock standard solutions in PVA 1% solution (m/v).

The level of coated LMWH was carried out by nephelometry (Ardy, 1976). This method is based on the complexation between sulfate and carboxylate groups of LMWH with ammonium groups of cetylpyridinium. Briefly, 500 µL of sample were reacted with 500 µL of acetate buffer (pH 5.2) and 2 mL of cetylpyridinium chloride (0.1%, w/v). After 1 hour at 37°C, the extent of precipitate was assayed at 500 nm by UV spectroscopy (UV-160 1PC, UV-visible spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). The linearity range of the method was 1 to 10 anti-Xa units/mL.

224. In vitro release experiments

Fifty milligrams of freeze-dried nanoparticles were suspended in 20 mL of saline phosphate buffer (PBS, pH 7.4) and incubated into a bath at 37°C under gentle magnetic stirring (200 rpm). At determined intervals (5 min, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 24 h), 1 mL samples were removed and replaced by 1 mL of fresh phosphate buffer. The amounts of insulin released were determined by HPLC as previously described. The standard curve solution was prepared in PBS with a linearity range of 0.1-1 IU/mL.

The amount of active LMWH released from coated nanoparticles in the medium was determined by measure of LMWH anti-factor Xa activity using a chromogenic assay (Stachrom[®], Stago Diagnostica, Asnières sur Seine, France) on a STA Compact[®] automate (Stago Diagnostica, Asnières sur Seine, France).

All experiments were performed in triplicate.

225. In vivo studies

Animals

Adult male Wistar rats (270-370 g; Charles River laboratories, L'Arbresle, France) were housed in air-conditioned quarters under a photoperiod schedule of 12 h light/12 h dark. They received standard laboratory chow diet and tap water ad libitum. All experiments were carried out in accordance with the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC).

Diabetes was induced in these rats by intravenous injection of streptozotocin (65 mg/kg) in 0.9% NaCl as described previously (Damgé et al., 1988). Rats were considered diabetic when glycaemia was higher than 300 mg/dL two weeks after streptozotocin treatment. Glycaemia was measured before each experiment and rats were excluded if glycaemia was under 120 mg/dL to prevent hypoglycaemia and death.

Experiments

Before experimentation, basal values of insulinemia were measured for all animals.

Coated and uncoated insulin loaded nanoparticles, obtained after centrifugation (20 min at 42.000 g; Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Hanau, Germany), were resuspended in 8 mL of 0.9% NaCl (m/v) and administered immediately to rats by intravenous injection into the penile vein at the dose of 10 IU of insulin per kg according to both encapsulation efficiency and animal weight. A solution of insulin in 0.9% NaCl was administered as the reference (1 IU/kg) in order to compare the pharmacokinetic parameters with the different formulations. Animal groups (3 or 4 groups of 4 rats each) were randomly done. Serial blood samples were collected at 2, 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48 and 72 h after the IV administration. Due to the 3 or 4 animal group's randomization, only 4 blood samples per animal were collected during the first 24 h for each formulation. For further times, blood was sampled from three groups leading to 4 samples at each time.

Blood samples (300 μ L) were withdrawn, into dry vial and coagulated during 30 min at 4°C before centrifugation for 15 min at 6,000 g at 4°C (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Hanau, Germany). Serum was separated, frozen and kept at -20°C until analysis.

Serum insulin concentrations were measured by radioimmunoassay (RIA) (Insulin-CT kit from CIS Bio International, Gif-sur-Yvette, France). The detection limit is defined as being the smallest concentration different from zero with a probability of 95%. It has been determined as being 4.6 μ IU/mL, according to the kit.

After administration of LMWH coated nanoparticles, anti-factor Xa activity was determined with a chromogenic assay (Stachrom[®], Stago Diagnostica, Asnières sur Seine, France), as mentioned before to evaluate the potential release of active LMWH *in vivo*.

Pharmacokinetic analysis

The terminal half-life ($T_{1/2}$) was calculated as following: $T_{1/2} = \ln 2 / \lambda_z$. λ_z was determined from the linear regression of the terminal phase of the logarithm concentration time plot.

Complement consumption was assessed in normal human serum (NHS) by measuring the residual haemolytic capacity of the complement system after contact with nanoparticles. The technique consisted in the determination of the amount of serum able to haemolyse 50% of a fixed number of sensitised sheep erythrocytes (CH50). Veronal buffered saline (VBS) and VBS^{2+} (VBS containing 0.15 mM Ca^{2+} and 0.5 mM Mg^{2+}) were prepared as described elsewhere (Mayer, 1961; Kazatchkine et al., 1986). NHS was obtained by allowing freshly drawn venous blood from normal donors to clot at room temperature for 2h, and then it was aliquoted and stored at -80°C until use. Sheep erythrocytes were sensitized by rabbit anti-sheep erythrocytes antibodies (Sérum hémolytique, Biomérieux) and suspended at a final concentration of 1.10^8 cells/mL in VBS^{2+} . To assess complement consumption in the presence of particles at constant incubation time, increasing amounts of nanoparticles suspensions were added to NHS diluted in VBS so that the final dilution of NHS in the reaction mixtures was $\frac{1}{4}$ (v/v) in a final volume of 1 mL. After 60-min incubation at 37°C with gentle agitation, the suspension was diluted with VBS^{2+} 1/25 (v/v) and mixed with a suspension of sensitized sheep erythrocytes. After 45-min incubation under gentle stirring at 37°C , the reaction was stopped by adding ice-cold NaCl (0.15 M). Unlysed erythrocytes were separated by centrifugation at 2000 rpm during 10 min. The optical density of 200 μL supernatant, related to the lytic capacity of the serum, was recorded at 405 nm using a microplate reader (Multiskan Ascent, Labsystems SA, Cergy-Pontoise, France) and compared with the results obtained with control serum. The lysis of cells was measured and allowed the level of residual active complement in NHS previously exposed to nanoparticles to be determined. After determining the CH50 units remaining in the serum, the results were expressed as consumption of CH50 units. In order to compare nanoparticles with different mean diameters, the results were expressed in term of surface area. Nanoparticles surface area was calculated by the following equation (Vittaz et al., 1996):

$S = 3 m / r \rho$, where S is the surface area [cm^2], m the weight [μg] in 1 mL nanosuspension, r the average radius [cm] determined by DLS, and ρ the voluminal mass [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$] of the nanoparticles estimated at $106 \mu\text{g}/\text{cm}^3$

3. Results

31. Characterization of nanoparticles

As reported in table 1, no important difference could be observed between the different formulations and each formulation of nanoparticles showed a homogeneous size distribution and a mean diameter of around 350 nm for all types of nanoparticles. Non-stealth nanoparticles containing or not insulin were positively charged (+ 45 and + 42mV, respectively) while stealth nanoparticles loaded or not with insulin were negatively charged (approx. - 4 mV). The encapsulation efficiency of insulin ranged between 79% for non-stealth nanoparticles to 84% for stealth nanoparticles. 86% and 89% of LMWH were bound on stealth nanoparticles loaded or not with insulin, respectively.

Table 1. Main physicochemical properties of the blank nanoparticles or insulin loaded nanoparticles (NP) coated or not with LMWH and prepared with a blend (50/50) of PCL and Eudragit® RS. Data are shown as mean $\pm$ S.D. (n=3).

Formulation	Mean diameter (nm)	Zeta potential (mV)	Insulin encapsulation efficiency (%)	LMWH binding efficiency (%)
Non stealth-blank NP	350.4 $\pm$ 4.9	+ 42.3 $\pm$ 5.6	N.D.	N.D.
Stealth-blank NP	347.4 $\pm$ 3.6	- 3.8 $\pm$ 1.2	N.D.	89.2 $\pm$ 2.3
Non stealth-insulin loaded NP	344.6 $\pm$ 5.6	+ 45.5 $\pm$ 0.3	79.2 $\pm$ 1.5	N.D.
Stealth-insulin loaded NP	356.7 $\pm$ 1.3	- 4.1 $\pm$ 0.4	83.9 $\pm$ 1.3	85.9 $\pm$ 1.7

N.D.: not determined.

32. *In vitro* release experiments

The *in vitro* release profiles of insulin and LMWH were obtained by representing the percentage of insulin and LMWH release with respect to the amount of encapsulated drug. Figure 1 illustrates the *in vitro* release profile of insulin in pH 7.4 PBS at 37°C from insulin loaded-stealth (S-INP) and non-stealth (NS-INP) nanoparticles. For S-INP, insulin release showed two phases: (i) an initial burst release during which a significant amount of insulin was released within 5 min (e.g. 62%) and (ii) a plateau characterized by an incomplete release of the drug up to 24 hours (70%). Although the profile was fairly similar for NS-INP, the burst was different; the drug was more slowly released in the first 2 hours of the dissolution test. Only 10 % of insulin were released from NS-INP at 5 min by comparison to 62% from S-INP at the same time. The release was then progressive: 38% at 30 min, 54% at 1 hour, until 80% at 8h. For NS-INP, a small decrease of the amount of total insulin released at 24h (63.3%) can be observed.

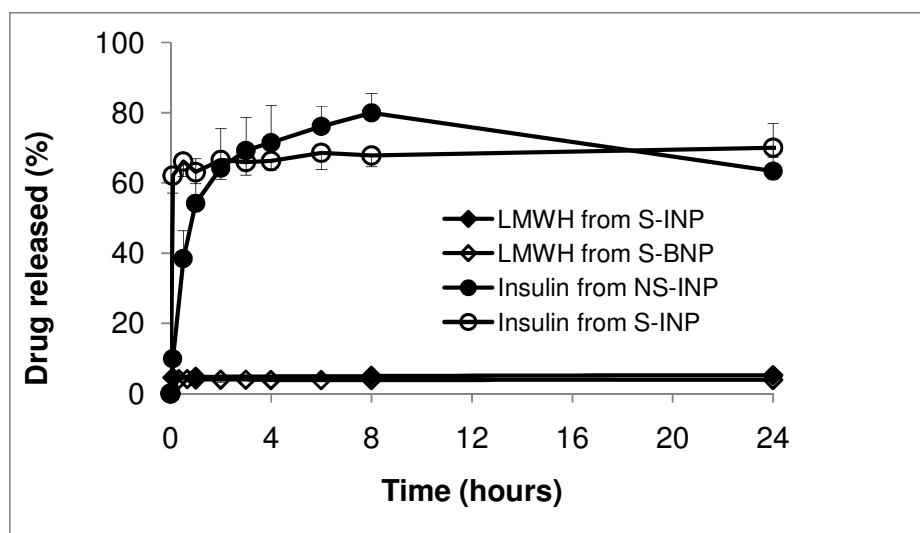


Figure 1: In vitro release kinetics of i) insulin from non-stealth insulin loaded nanoparticles (NS-INP, ●) and stealth insulin loaded nanoparticles (S-INP, ○) and ii) LMWH from stealth insulin loaded nanoparticles (NS-INP, ◆) and from stealth blank nanoparticles (S-BNP, ◇). Experiments were performed in pH 7.4 phosphate buffer at 37°C under gentle agitation. Data are shown as means $\pm$ S.D. (n=3).

Stealth-nanoparticles loaded or not with insulin were tested for the *in vitro* release of LMWH in the same conditions (figure 1). Little LMWH was released from both nanoparticles: less than 6% after 8 and 24 hours from stealth-insulin loaded nanoparticles and stealth-blank nanoparticles, respectively.

33. *In vivo* release experiments

After intravenous injection in diabetic rats of 0.9% NaCl solution containing insulin, non-stealth insulin-loaded nanoparticles and stealth insulin-loaded nanoparticles, insulin serum concentrations were measured by RIA. As shown for the three formulations in figure 2, serum concentrations of insulin increased at the first sampling time (2 min) and then decreased over time. The profiles were typical of intravenous administration. First a distribution phase represented by a fast decrease of insulin concentration in serum followed by the elimination phase characterized by a slower decrease of insulin concentration.

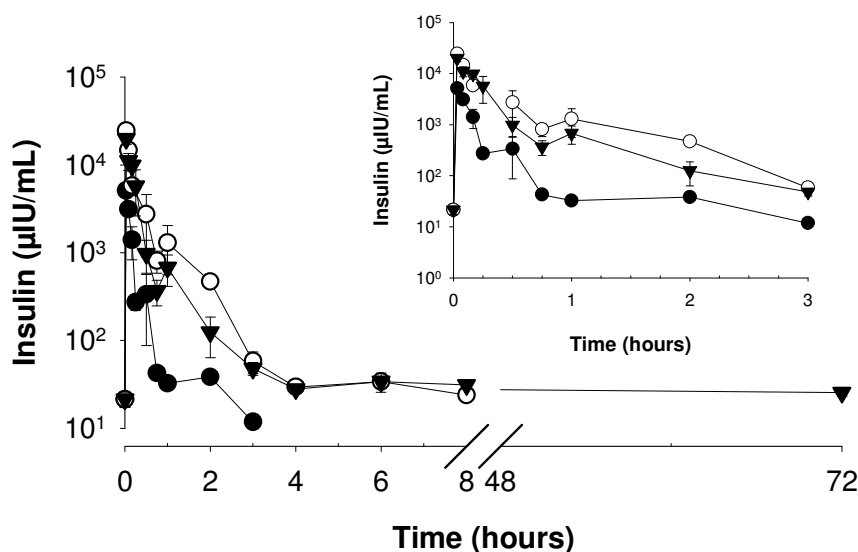


Figure 2: Serum insulin concentrations after intravenous injection of sodium chloride solution (0.9%) containing insulin (●) (1 IU/kg), non-stealth insulin loaded nanoparticles (○) (10 IU/kg) and stealth insulin-loaded nanoparticles (▼) (10 IU/kg). Data are shown as means $\pm$ S.E.M. (n=3 to 5 per group).

For insulin solution, insulinemia reached under basal values at 3h, showing that the solution was relatively rapidly eliminated from the blood. Insulin concentration in serum was still over basal values until 8h after the injection of NS-INP and then reached basal values whereas insulin was still detectable and over basal values 72h after the administration of S-INP. Accordingly, the half-lives of insulin from the three formulations were calculated from the regression of the terminal phase of logarithms of the concentrations versus time.

As reported in figure 3, the experimental half-life of insulin in sodium chloride (0.9%) was around 35 min (0.58h). The encapsulation of the drug increased the half-life of insulin up to 5 hours in non-stealth nanoparticles and up to 116 hours in stealth nanoparticles. After intravenous administration of stealth insulin loaded nanoparticles, the anti-Xa activity in plasma was measured. Figure 4 demonstrates a low anti-Xa activity from 5 min to 8 hours showing a low release of LMWH *in vivo*.

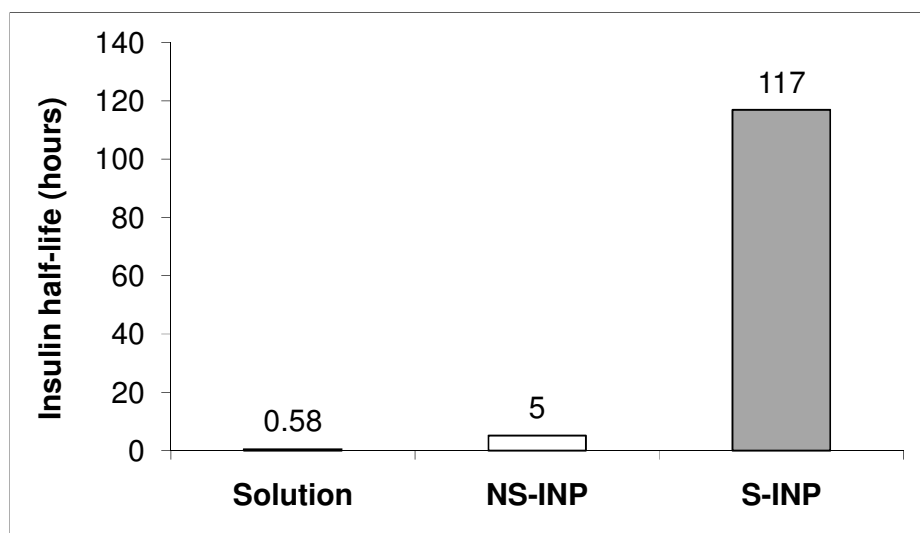


Figure 3: Insulin elimination half-lives after intravenous injection in rats of a solution of insulin (1 IU/kg) (black), non-stealth insulin loaded nanoparticles (10 IU/kg) (NS-INP, white) and stealth insulin loaded nanoparticles (10 IU/kg) (S-INP, grey).

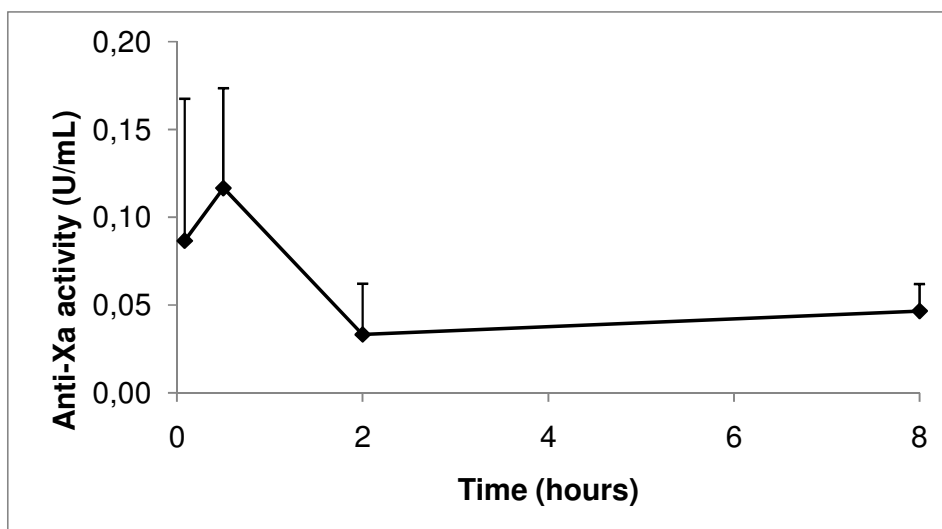


Figure 4: Plasma anti-Xa activity after intravenous injection in rats of stealth insulin loaded nanoparticles (10 IU/kg). Data are means $\pm$ S.D. (n=3).

34. Complement activation

Complement consumption was evaluated as the lytic capacity of the serum (amount of CH50 units) towards antibody-sensitized sheep erythrocytes after exposure to non-stealth blank, stealth-blank, non-stealth insulin loaded and stealth insulin loaded nanoparticles. As shown in figure 5, the consumption of CH50 units was linear and increased with the surface area of nanoparticles. No significant difference could be observed between the different formulations. The profiles were similar although we can note that the maximum of consumption of CH50 units was different: 75%, 59%, 69% and 44% for NS-BNP, S-BNP, NS-INP and S-INP, respectively, proving that LMWH has a tendency to decrease the complement activation. Moreover, looking at the linear regression of each curve, the slope for NS-BNP and NS-INP were 0.065 and 0.082, respectively, whereas it was 0.043 and 0.029 for S-BNP and S-INP respectively. So, the presence of LMWH on stealth nanoparticles was able to reduce it 1.5 fold for blank nanoparticles and 2.8 fold for insulin loaded nanoparticles.

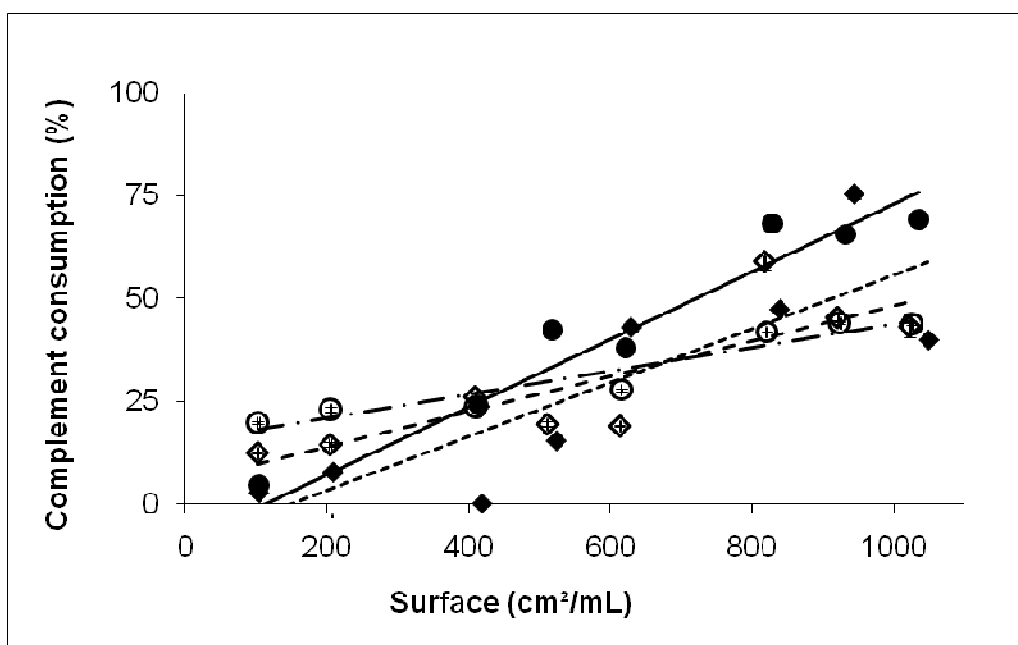


Figure 5: Consumption of CH50 units in the presence of non-stealth blank nanoparticles (♦,----), stealth-blank nanoparticles (◇,- - -), non-stealth insulin loaded nanoparticles (●,—) and stealth-insulin loaded nanoparticles (○,—·—) as a function of surface area. Suspensions of nanoparticles were incubated for 60 min at 37°C in normal human serum diluted 1/4 (v/v) in VBS2+. Data are means $\pm$ S.D. (n=3).

4. Discussion

Kazatchkine *et al.* (1979) early demonstrated that heparin is able to inhibit the activation of alternative pathway of human complement system. Since this property was confirmed by others authors, (Labarre, 1990; Ekre *et al.*, 1992) heparin was suggested to increase blood compatibility of intravenously injected particles, allowing the recognition of such nanoparticles by the mononuclear phagocyte system both *in vitro* (Passirani *et al.*, 1998a) and *in vivo* (Passirani *et al.*, 1998b) to be limited. In the present study, we bound LMWH onto polymer nanoparticles by electrostatic interactions between the negatively charged groups of LMWH and the positively charged quaternary ammonium groups of the Eudragit RS[®] polymer used in the formulation. Electrostatic interactions are an alternative method to others methods generally used to bound polysaccharides on polymers particles (covalent binding (Passirani *et al.*, 1998a; Jaulin *et*

al., 2000), coacervation (Gan and Wang, 2007), polymerisation (Labarre et al., 2005; Lemarchand et al., 2006)). This technique is faster, easier to implement and does not require any modification of polymer.

In a previous study, the half-life of a small molecular weight hydrophilic drug (propranolol-HCl) was increased 18 fold by encapsulation into the same type of “stealth” nanoparticles. To confirm the stealth properties of such particles, it was necessary to encapsulate a drug with a shorter half-life than propranolol-HCl one (experimental half-life of propranolol-HCl as a solution in rabbit: 2.3h). Since proteins generally show a very short blood residence time when they are intravenously administered, the encapsulation of a protein seemed to be a good choice in order to further demonstrate the potentiality of our system. Insulin was chosen as a model protein because of its hydrophilic properties and its relatively low molecular weight (5808 Da). Its elimination half-life after intravenous injection in human is in the order of a few minutes and was found to be 38 min in our experimental conditions in diabetic rats.

Insulin was not degraded during the formulation process as shown by the HPLC profile of insulin after encapsulation which did not show any degradation peak. This point was previously confirmed by another study which demonstrated that the same insulin loaded nanoparticles administered orally allowed the decrease of glycaemia in rats (Damgé et al., 2007).

As reported in table 1, the size distribution of all nanoparticle formulations was homogeneous and around 350 nm. The encapsulation of the drug and the coating with LMWH did not increase the mean diameter of the nanoparticles. Non-stealth blank nanoparticles and non-stealth insulin loaded nanoparticles were positively charged due to the quaternary ammonium group of Eudragit[®] RS mainly directed towards the external aqueous phase (table 1). The addition of LMWH decreased the zeta potential because of its negatively charged sulphate and carboxylate groups which build electrostatic interactions with the polycationic Eudragit[®] RS and consequently mask the positive charge of the particles. Therefore stealth blank and stealth insulin loaded nanoparticles showed a zeta potential close to neutrality. On the other hand, the isoelectric point of insulin (5.3) is under the pH of the external aqueous solution of PVA (pH 6.5) and so, at this pH, insulin is negatively charged. Since no difference was observed between blank and loaded insulin nanoparticles, it can be stated that insulin was encapsulated into particles and not adsorbed on their surface. Such a hypothesis is reinforced by the findings of Jiao *et al.* (2002) and Hoffart *et al.*

(2003) who showed a strong decrease of the zeta potential of nanoparticles prepared with a negatively charged drug. It was proven that this drug was mainly adsorbed on the surface of the particles.

The value of the zeta potential of particles is known to have an influence on the macrophage uptake *in vitro* (Bocca et al., 1998) and consequently *in vivo* (Levchenko et al., 2002). So, the long-circulating properties of the nanoparticles could be somehow predicted by the measurement of the surface potential. Gref *et al.* (2000) demonstrated the existence of a correlation between the zeta potential and the phagocytosis by polymorphonuclear (PMN) cells; nanoparticles coated with increasing amounts of PEG showed a reduction of the zeta potential correlated to a decrease of both particles uptake by PMN and protein adsorption on their surface. Many authors have proven that zeta potential of close to neutrality particles limits the phagocytosis by the MPS *in vitro* compared with high zeta potential value (Bocca et al., 1998; Fontana et al., 2001; Gbadamosi et al., 2002; Yang et al., 2007). Albumin particles with a zeta potential close to zero showed a reduced phagocytic uptake in comparison with charged particles but this phenomenon was more prominent for positively charged nanoparticles (Roser et al., 1998). Modifying the surface potential of liposomes by grafting PEG with different molecular weight plays a critical role on the clearance of the particles and on the circulation time *in vivo* (Levchenko et al., 2002). On one hand, Hsu and Juliano (1982) showed that the uptake of liposomes by macrophages was twofold higher for negatively charged ones than positively charged and 4 fold higher than neutral. Moreover, when dextran was grafted to PCL nanoparticles, the negative zeta potential decreased (getting closer to zero) leading to less cytotoxic nanoparticles towards macrophages and a decrease in the uptake of the particles (Lemarchand et al., 2006). On the other hand, negatively charged nanoparticles of etoposide exhibited some long-circulating properties compared to the same positively charged particles (Reddy et al., 2004). Based on that, our aim was to add a sufficient amount of LMWH to decrease the zeta potential of nanoparticles of Eudragit® RS and PCL as close as possible to zero. 1000 anti-Xa units of LMWH have been necessary to decrease the zeta potential from + 45 mV to - 4 mV. Although particles with low zeta potential absolute values tends to aggregate and flocculate, the achieved zeta potential for stealth insulin loaded nanoparticles seems to be not a disadvantage for their stability. Indeed, Liu *et al.* (2007)

demonstrated that PEG-PLGA nanoparticles with zeta potential of -8 mV remained stable for over one month when stored at room temperature.

In our experimental conditions, negatively charged insulin contributed to a good encapsulation efficiency of the drug by probably also creating electrostatic interactions with the quaternary ammonium groups of Eudragit[®] RS which are directed toward the internal phase (Chernysheva et al., 2003). Such an orientation prevents the leak of the drug outside the nanoparticles during the manufacturing process. Indeed, the insulin encapsulation efficiency reached about 80% and 85% for NS-INP and S-INP respectively (table 1). Such encapsulation rates permitted the volume of injected nanoparticle suspension to be small enough with regards to the required administered dose.

The amount of LMWH was chosen to mask positive charges of the Eudragit[®] RS polymer and to limit losses. The binding efficiency was around 87% for the two LMWH coated formulations.

The *in vitro* release profiles of insulin and LMWH from each formulation in phosphate buffer were characterized by an initial burst followed by a plateau during which the drug was incompletely released after 24 hours. Hydrophilic drug encapsulated into nanoparticles prepared by water-in-oil-in-water technique are particularly affected by a burst release because of the drug tendency to rapidly migrate to the external aqueous medium (Jameela et al., 1997). Although there was a burst for both types of insulin nanoparticles, it appeared that the presence of LMWH increases this effect. Indeed, insulin was more rapidly released from stealth insulin loaded nanoparticles than non-stealth nanoparticles: the initial release at 5 min was 62%, followed by a constant and slow release (up to 70%) at 24h. In the case of S-INP, the very hydrophilic LMWH chains at the surface of the particles facilitate the penetration of the dissolution aqueous medium inside the nanoparticles. Indeed, it was already demonstrated that the more hydrophilic the surface of particles, the faster the burst for a hydrophilic drug (Fang et al., 2005; Liu et al., 2007). At the pH of the dissolution medium (pH 7.4), insulin was negatively charged. The quaternary ammonium groups of Eudragit[®] RS are mainly directed toward the external aqueous phase (Chernysheva et al., 2003) but also toward the internal aqueous phase. Thus they could also interact with negative charges of insulin by electrostatic interactions, retaining the drug inside the nanoparticles and slowing its release from NS-INP. In S-INP, a particular arrangement during the preparation between these positive charges of the

polymer and LMWH could restrict interactions with insulin and consequently facilitating its release. For NS-INP, a reduction of the insulin release percentage was observed at 24 h with regards to the maximum release at 8h. A further test was carried out by dissolving insulin in the dissolution medium and the amount of insulin in this medium was followed for 24h. The total amount of insulin was recovered after 24h. This stability experiment proved that the release decrease at 24h was not due to a degradation of the drug. It could be attributed to the adsorption of released insulin onto nanoparticles. The same phenomenon was already observed by other groups (Quellec et al., 1998; Zambaux et al., 1999; Fang et al., 2005). In our case, it was only observed for non-stealth particles. This was attributed to the fact that LMWH chains can create a steric barrier around stealth nanoparticles and repel insulin, preventing its readsorption onto nanoparticles. The non-complete release of insulin could be due to the hydrophobicity of PCL which reduced the wettability of the nanoparticles (Jameela et al., 1997). A release of 100% might be observed by extending the experience but the test was limited to 24 hours.

The *in vitro* release of LMWH was around 5% for both formulations of LMWH-coated nanoparticles. Although the release amount was limited, it still could be a disadvantage for *in vivo* applications. However, LMWH does not exhibit anticoagulant activity when stealth nanoparticles are injected *in vivo*. The low release of LMWH was probably due to the slight electrostatic interactions forces which permit LMWH desorption from stealth nanoparticles.

The *in vivo* studies were carried out in rats by intravenous administration of i) a 0.9% NaCl solution of insulin (1 IU/kg), ii) non-stealth insulin loaded nanoparticles suspension (10 IU/kg) and iii) stealth insulin loaded nanoparticles (10 IU/kg). Different doses were administered for the solution and the nanoparticle suspensions because a preliminary study (data not shown) displayed that a dose of 1 IU/kg for the nanoparticles suspension was too low to affect insulinemia of animals. Nevertheless, it was not possible to increase the dose of insulin solution as much as for the nanoparticle suspension because mean insulinemia was already at 5000 IU/mL after 2 min. If the dose had been increased to 10 IU/kg, animals would have been in danger of death by hypoglycaemia.

The insulin serum profiles were similar for the three formulations and were typical of intravenous administration. For insulin solution in sodium chloride, basal values were quite rapidly reached (3 hours

after injection), allowing to calculate an elimination half-life of 0.58h (=38 min). The half-life of insulin encapsulated into non-stealth nanoparticles was 8 fold higher (5.12h). Furtado *et al.* (2006) already demonstrated that insulin encapsulation in poly(fumaric-co-sebacic anhydride) particles subcutaneously injected increased the duration of drug activity comparatively to unencapsulated insulin. Moreover, the half-life of etoposide encapsulated in non-stealth liposomes was increased from 58 min for free drug to 186 min for liposomal form (Sengupta *et al.*, 2000). Indeed, polymeric nanoparticles are known to protect drug from enzymatic degradation in blood (Maincent *et al.*, 1986) and allow the release of the drug to be controlled. For insulin loaded nanoparticles coated with LMWH, i.e. stealth nanoparticles, the elimination half-life was increased 200 fold compared to the solution (117h). An increase in the elimination half-life has often been demonstrated with stealth particles such as liposomes, microparticles or nanoparticles. The half-life of another protein (BSA) was increased from 13.6 min to 4.5 h, i.e. 20 fold, by encapsulation into stealth nanoparticles made of methoxypolyethyleneglycol poly(lactic-co-glycolic acid) (MePEG-PLGA) copolymer (Li *et al.*, 2001). In another report, the half-life in plasma of the methoxy poly(ethylene glycol)poly(d,l-lactic acid) block copolymers (MePEG-PLA) nanoparticles that were intravenously administered to rats was increased by a factor 180 compared with the non-stealth PLA nanoparticles (Bazile *et al.*, 1995). In a precedent study, the experimental half-life of propranolol-HCl was increased 18 fold by encapsulation in stealth nanoparticles coated with LMWH (Socha *et al.*, 2008). Many authors demonstrated and confirmed the stealth properties of particles coated by PEG (Awasthi *et al.*, 2003; Béduneau *et al.*, 2006). Indeed, the steric barrier composed by PEG chains could limit the recognition of the particles by plasma protein (i.e. opsonins) and reduce the uptake by the MPS. As previously shown in the case of poly(methyl methacrylate) or poly(isobutylcyanoacrylate) (Maillet *et al.*, 1983; Passirani *et al.*, 1998a; Labarre *et al.*, 2005), LMWH bound on Eudragit® RS polymer could play the same role in our stealth insulin loaded nanoparticles.

As suggested by the *in vitro* release of LMWH, only a weak anti-Xa activity was detected after injection of S-INP (figure 4). The maximum activity was 0.12 anti-Xa units at the peak. After 8 hours, an activity of 0.05 anti-Xa/mL was still measured in plasma. This level was well below therapeutic concentrations usually necessary for the anticoagulant action of LMWH. Indeed, preventive concentration is about 0.4

anti-Xa units/mL. However, this demonstrates that some LMWH chains seem to be in excess in the formulation of stealth nanoparticles and could be released because of weak electrostatic interactions which could be broken *in vivo*.

With a view to explaining the *in vivo* results, blank and insulin loaded nanoparticles were evaluated versus complement activation following their surface modification by LMWH (figure 5). The measure of the consumption of CH50 units by all formulations of nanoparticles revealed that they were not strong activators compared to zymosan particles (Vonarbourg et al., 2006). Although no significant differences could be observed between stealth and non-stealth nanoparticles loaded or not with insulin, stealth nanoparticles showed a tendency to be weak activators compared with non-stealth ones. Passirani *et al.* (1998a) demonstrated that heparin retained its inhibiting properties towards complement after binding to nanoparticles. In our case, although the effect was very important *in vivo*, we could not observe an important complement inhibition; this could be due to the low molecular weight (between 3,600 and 5,000 Da) of LMWH bound to stealth nanoparticles. Indeed, Passirani *et al.* (1998a) used a LMWH of average molecular weight 16,000-17,000 to demonstrate the inhibition of complement activation. The chains of nadroparin are smaller than porcine heparin used by Passirani *et al.* and could create a thinner steric barrier to repel opsonins *in vitro*. While Eudragit® RS and PCL are synthetic polymers which could be recognized as foreigner by the MPS when intravenously administered, non stealth nanoparticles did not activate very strongly the complement system. The organization between Eudragit® RS and PCL during the formulation could form a surface arrangement which was poorly activator of the complement system. This is in accordance with phagocytosis experiments that we carried out with non-stealth nanoparticles (data not shown). Nanoparticles were incubated with polynuclear cells and potential phagocytosis activity was detected by chemiluminescence. In the case of non-stealth blank nanoparticles, no phagocytosis activity was detected comparatively to zymosan (positive control). This confirms that our nanoparticles are not strong complement system activators and opsonisation process activators. Some authors have already observed a longer residence time of PCL nanocapsules in blood compared with that of the PLGA nanocapsules in mice (Marchal-Heussler et al., 1999). They explained this phenomenon by the lower liver uptake mediated by the adsorption of opsonins onto the carriers. Despite the weak

difference of complement activation *in vitro* between nanoparticles coated or not with LMWH, this coating permitted to dramatically increase the half-life of the drug *in vivo*.

We demonstrated the feasibility of stealth nanoparticles based on electrostatic interactions between the polymer and the polysaccharide used for its stealth properties. Insulin loaded nanoparticles coated with LMWH display *in vivo* stealth properties in the same way that what was already observed with PEG (Fundaro et al., 2000; Fang et al., 2006) or dextrans (Passirani et al., 1998b; Gaur et al., 2000). Such nanoparticles were able to increase the circulation time of drug with very short half-life such as protein and peptide. However, it must be kept in mind that Eudragit® RS is a biocompatible but not a biodegradable polymer and that it is impossible to use it intravenously for human application. Passirani *et al.* (1998b) already used a non-biodegradable polymer (PMMA) to prepare stealth nanoparticles administrated in mice. Even if this has been presented as an advantage for following the fate of the particles *in vivo*, stealth nanoparticles based on Eudragit® RS were just be considered as a model of particles made of positive polymer. Nevertheless, the potential of such positively charged polymer has been demonstrated. Based on this concept, further research should focus on the development of new polycationic polymer that should be both biocompatible and biodegradable. For example, polylysine which is positively charged at neutral pH could be tested for such stealth nanoparticles (Okuda et al., 2006). In addition, a weak anti-Xa activity was detected after stealth nanoparticles injection. This activity was lower than therapeutic level and should not be a barrier for the development of such stealth nanoparticles in the light of the major advantage that it brings. These two points compel us to still optimize the formulation of nanoparticles in such a way that no more LMWH should be released.

Acknowledgments

The authors would like to thank Professor Jean-Michel Cardot from the school of pharmacy of Clermont-Ferrand for help on pharmacokinetic parameters calculation.

References

- Arady, M., 1976. Dosage de l'héparine : étude cinétique. *Bull. Ordre.* 137, 699-707.
- Awasthi, V. D., Garcia, D., Goins, B. A. and Phillips, W. T., 2003. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. *Int J Pharm.* 253, 121-132.
- Bazile, D., Prud'homme, C., Bassoullet, M. T., Marlard, M., Spenlehauer, G. and Veillard, M., 1995. Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J Pharm Sci.* 84, 493-498.
- Béduneau, A., Saulnier, P., Anton, N., Hindré, F., Passirani, C., Rajerison, H., Noiret, N. and Benoit, J.-P., 2006. Pegylated Nanocapsules Produced by an Organic Solvent-Free Method: Evaluation of their Stealth Properties. *Pharm Res.* 23, 2190-2199.
- Bocca, C., Caputo, O., Cavalli, R., Gabriel, L., Miglietta, A. and Gasco, M. R., 1998. Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 175, 185-193.
- Charrois, G. J. and Allen, T. M., 2003. Multiple injections of pegylated liposomal Doxorubicin: pharmacokinetics and therapeutic activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 306, 1058-1067.
- Chernysheva, Y. V., Babak, V. G., Kildeeva, N. R., Boury, F., Benoit, J. P., Ubrich, N. and Maincent, P., 2003. Effect of the type of hydrophobic polymers on the size of nanoparticles obtained by emulsification-solvent evaporation. *Mendeleev Commun.* 13, 65-67.
- Damgé, C., Maincent, P. and Ubrich, N., 2007. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *J Control Release.* 117, 163-170.
- Damgé, C., Michel, C., Aprahamian, M. and Couvreur, P., 1988. New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier. *Diabetes.* 37, 246-251.
- Ekre, H. P., Naparstek, Y., Lider, O., Hyden, P., Hagermark, O., Nilsson, T., Vlodavsky, I. and Cohen, I., 1992. Anti-inflammatory effects of heparin and its derivatives: inhibition of complement and of lymphocyte migration. *Adv Exp Med Biol.* 313, 329-340.
- Fang, C., Shi, B. and Pei, Y. Y., 2005. Effect of MePEG molecular weight and particle size on in vitro release of tumor necrosis factor- α -loaded nanoparticles. *Acta Pharmacol Sin.* 26, 242-249.
- Fang, C., Shi, B., Pei, Y. Y., Hong, M. H., Wu, J. and Chen, H. Z., 2006. In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight and particle size. *Eur J Pharm Sci.* 27, 27-36.
- Fontana, G., Licciardi, M., Mansueto, S., Schillaci, D. and Giammona, G., 2001. Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake. *Biomaterials.* 22, 2857-2865.
- Fundaro, A., Cavalli, R., Bargoni, A., Vighetto, D., Zara, G. P. and Gasco, M. R., 2000. Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats. *Pharmacol Res.* 42, 337-343.
- Furtado, S., Abramson, D., Simhkay, L., Wobbekind, D. and Mathiowitz, E., 2006. Subcutaneous delivery of insulin loaded poly(fumaric-co-sebacic anhydride) microspheres to type 1 diabetic rats. *Eur J Pharm Biopharm.* 63, 229-236.
- Gan, Q. and Wang, T., 2007. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier--systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 59, 24-34.
- Gaur, U., Sahoo, S. K., De, T. K., Ghosh, P. C., Maitra, A. and Ghosh, P. K., 2000. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *Int J Pharm.* 202, 1-10.
- Gbadamosi, J. K., Hunter, A. C. and Moghimi, S. M., 2002. PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance. *FEBS Lett.* 532, 338-344.
- Gref, R., Luck, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T. and Muller, R. H., 2000. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 18, 301-313.

- Gregoriadis, G., Leathwood, P. D. and Ryman, B. E., 1971. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett.* 14, 95-99.
- Hockertz, S., Franke, G., Kniep, E. and Lohmann-Matthes, M. L., 1989. Mouse interferon-gamma in liposomes: pharmacokinetics, organ-distribution, and activation of spleen and liver macrophages in vivo. *J Interferon Res.* 9, 591-602.
- Hoffart, V., Ubrich, N., Lamprecht, A., Bachelier, K., Vigneron, C., Lecompte, T., Hoffman, M. and Maincent, P., 2003. Microencapsulation of low molecular weight heparin into polymeric particles designed with biodegradable and nonbiodegradable polycationic polymers. *Drug Deliv.* 10, 1-7.
- Hsu, M. J. and Juliano, R. L., 1982. Interactions of liposomes with the reticuloendothelial system. II: Nonspecific and receptor-mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 720, 411-419.
- Huang, M., Wu, W., Qian, J., Wan, D. J., Wei, X. L. and Zhu, J. H., 2005. Body distribution and in situ evading of phagocytic uptake by macrophages of long-circulating poly (ethylene glycol) cyanoacrylate-co-n-hexadecyl cyanoacrylate nanoparticles. *Acta Pharmacol Sin.* 26, 1512-1518.
- Jameela, S. R., Suma, N. and Jayakrishnan, A., 1997. Protein release from poly(epsilon-caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques: a comparative study. *J Biomater Sci Polym Ed.* 8, 457-466.
- Jaulin, N., Appel, M., Passirani, C., Barratt, G. and Labarre, D., 2000. Reduction of the uptake by a macrophagic cell line of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate). *J Drug Target.* 8, 165-172.
- Jiao, Y. Y., Ubrich, N., Hoffart, V., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M. and Maincent, P., 2002. Preparation and characterization of heparin-loaded polymeric microparticles. *Drug Dev Ind Pharm.* 28, 1033-1041.
- Kazatchkine, M. D., Fearon, D. T., Silbert, J. E. and Austen, K. F., 1979. Surface-associated heparin inhibits zymosan-induced activation of the human alternative complement pathway by augmenting the regulatory action of the control proteins on particle-bound C3b. *J Exp Med.* 150, 1202-1215.
- Kazatchkine, M. D., Hauptmann, G. and Nydegger, U. E., 1986. Techniques du complément.
- Kedar, E., Gur, H., Babai, I., Samira, S., Even-Chen, S. and Barenholz, Y., 2000. Delivery of cytokines by liposomes: hematopoietic and immunomodulatory activity of interleukin-2 encapsulated in conventional liposomes and in long-circulating liposomes. *J Immunother.* 23, 131-145.
- Labarre, D., Vauthier, C., Chauvierre, C., Petri, B., Muller, R. and Chehimi, M. M., 2005. Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush. *Biomaterials.* 26, 5075-5084.
- Labarre, D. J., 1990. Heparin-like polymer surfaces: control of coagulation and complement activation by insoluble functionalized polymers. *Int J Artif Organs.* 13, 651-657.
- Lappegard, K. T., Fung, M., Bergseth, G., Riesenfeld, J., Lambris, J. D., Videm, V. and Mollnes, T. E., 2004. Effect of complement inhibition and heparin coating on artificial surface-induced leukocyte and platelet activation. *Ann Thorac Surg.* 77, 932-941.
- Lemarchand, C., Gref, R., Passirani, C., Garcion, E., Petri, B., Muller, R., Costantini, D. and Couvreur, P., 2006. Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems. *Biomaterials.* 27, 108-118.
- Levchenko, T. S., Rammohan, R., Lukyanov, A. N., Whiteman, K. R. and Torchilin, V. P., 2002. Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. *Int J Pharm.* 240, 95-102.
- Li, Y., Pei, Y., Zhang, X., Gu, Z., Zhou, Z., Yuan, W., Zhou, J., Zhu, J. and Gao, X., 2001. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Control Release.* 71, 203-211.
- Liu, W., Yang, A., Li, Z., Xu, H. and Yang, X., 2007. PEGylated PLGA nanoparticles as tumor necrosis factor- α receptor blocking peptide carriers: Preparation, characterization and release in vitro. *Journal of Wuhan University of Technology--Materials Science Edition.* 22, 112-116.

- Maillet, F., Kazatchkine, M. D., Glotz, D., Fischer, E. and Rowe, M., 1983. Heparin prevents formation of the human C3 amplification convertase by inhibiting the binding site for B on C3b. *Mol Immunol.* 20, 1401-1404.
- Maincent, P., Le Verge, R., Sado, P., Couvreur, P. and Devissaguet, J. P., 1986. Disposition kinetics and oral bioavailability of vincamine-loaded polyalkyl cyanoacrylate nanoparticles. *J Pharm Sci.* 75, 955-958.
- Marchal-Heussler, L., Thouvenot, P., Hoffman, M. and Maincent, P., 1999. Comparison of the biodistribution in mice of 111 indium oxine encapsulated into poly(lactic-co-glycolic)-D,L-85/15 and poly(epsilon caprolactone) nanocapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 88, 450-453.
- Mayer, M. M., 1961. *Experimental Immunochemistry.* Springfield, IL: Thomas,
- Moghim, S. M., Hunter, A. C. and Murray, J. C., 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev.* 53, 283-318.
- Moghim, S. M., Pavey, K. D. and Hunter, A. C., 2003. Real-time evidence of surface modification at polystyrene lattices by poloxamine 908 in the presence of serum: in vivo conversion of macrophage-prone nanoparticles to stealth entities by poloxamine 908. *FEBS Lett.* 547, 177-182.
- Moslemi, P., Najafabadi, A. R. and Tajerzadeh, H., 2003. A rapid and sensitive method for simultaneous determination of insulin and A21-desamido insulin by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 33, 45-51.
- Muller, R. H., Maassen, S., Schwarz, C. and Mehnert, W., 1997. Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes. *J Control Release.* 47, 261-269.
- Okuda, T., Kawakami, S., Maeie, T., Niidome, T., Yamashita, F. and Hashida, M., 2006. Biodistribution characteristics of amino acid dendrimers and their PEGylated derivatives after intravenous administration. *J Control Release.* 114, 69-77.
- Oppenheim, R. C., 1981. Solid colloidal drug delivery systems: Nanoparticles. *Int J Pharm.* 8, 217-234.
- Passirani, C., Barratt, G., Devissaguet, J. P. and Labarre, D., 1998a. Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system. *Life Sci.* 62, 775-785.
- Passirani, C., Barratt, G., Devissaguet, J. P. and Labarre, D., 1998b. Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate). *Pharm Res.* 15, 1046-1050.
- Quelleg, P., Gref, R., Dellacherie, E., Sommer, F., Tran, M. D. and Alonso, M. J., 1999. Protein encapsulation within poly(ethylene glycol)-coated nanospheres. II. Controlled release properties. *J Biomed Mater Res.* 47, 388-395.
- Quelleg, P., Gref, R., Perrin, L., Dellacherie, E., Sommer, F., Verbavatz, J. M. and Alonso, M. J., 1998. Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res.* 42, 45-54.
- Reddy, L. H., Sharma, R. K., Chuttani, K., Mishra, A. K. and Murthy, R. R., 2004. Etoposide-incorporated tripalmitin nanoparticles with different surface charge: formulation, characterization, radiolabeling, and biodistribution studies. *Aaps J.* 6, e23.
- Roser, M., Fischer, D. and Kissel, T., 1998. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm.* 46, 255-263.
- Sengupta, S., Tyagi, P., Velpandian, T., Gupta, Y. K. and Gupta, S. K., 2000. Etoposide encapsulated in positively charged liposomes: pharmacokinetic studies in mice and formulation stability studies. *Pharmacol Res.* 42, 459-464.
- Socha, M., Lamprecht, A., El Ghazouani, F., Emond, E., Maincent, P., Barré, J., Hoffman, M. and Ubrich, N., 2008. Increase in the Vascular Residence Time of Propranolol-Loaded Nanoparticles Coated with Heparin. *J Nanosci Nanotechnol.* 8, 2369-2376.
- Tobio, M., Gref, R., Sanchez, A., Langer, R. and Alonso, M. J., 1998. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharm Res.* 15, 270-275.

- Verrecchia, T., Spenlehauer, G., Bazile, D. V., Murry-Brelier, A., Archimbaud, Y. and Veillard, M., 1995. Non-stealth (poly(lactic acid/albumin)) and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers. *J Control Release*. 36, 49-61.
- Vittaz, M., Bazile, D., Spenlehauer, G., Verrecchia, T., Veillard, M., Puisieux, F. and Labarre, D., 1996. Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators. *Biomaterials*. 17, 1575-1581.
- Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Simard, P., Leroux, J. C. and Benoit, J. P., 2006. Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J Biomed Mater Res A*. 78, 620-628.
- Xu, X., Fu, Y., Hu, H., Duan, Y. and Zhang, Z., 2006. Quantitative determination of insulin entrapment efficiency in triblock copolymeric nanoparticles by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 41, 266-273.
- Yang, A., Yang, L., Liu, W., Li, Z., Xu, H. and Yang, X., 2007. Tumor necrosis factor alpha blocking peptide loaded PEG-PLGA nanoparticles: preparation and in vitro evaluation. *Int J Pharm*. 331, 123-132.
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E. and Vigneron, C., 1999. Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *J Control Release*. 60, 179-188.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les vecteurs particuliers constituent une part importante de la recherche galénique actuelle. Parmi les différentes formes existantes (liposomes, microparticules, nanoparticules), nous avons porté notre choix sur les vecteurs de type nanoparticulaire afin d'encapsuler et de véhiculer un principe actif. Notre objectif était de préparer, de caractériser et de comparer *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules à partir d'un mélange d'un polymère non biodégradable (Eudragit® RS) et d'un polymère biodégradable (PCL). La technique d'encapsulation utilisée est la méthode de double émulsion suivie de l'évaporation du solvant organique. Celle-ci permet principalement l'incorporation de principes actifs hydrophiles. On réalise tout d'abord une première émulsion (eau dans huile) entre une phase organique de polymères et la solution aqueuse de principe actif puis on procède à la préparation de la deuxième émulsion (eau dans huile dans eau) en ajoutant la première émulsion dans la phase aqueuse dispersante (solution de PVA). Lors de l'évaporation du solvant organique, les polymères hydrophobes précipitent au contact de la phase aqueuse et le principe actif est alors piégé dans les particules solides.

Cette technique a été utilisée pour préparer toutes les formulations de nanoparticules étudiées dans ce travail. Nous présentons ici les différents résultats obtenus dans chaque étude.

I. Développement de nanoparticules d'Eudragit et de poly- ϵ -caprolactone encapsulant de l'insuline

Notre première étude a porté sur l'élaboration de nanoparticules destinées à l'administration orale d'insuline. L'insuline est un petit peptide qui est très rapidement dégradé par les enzymes du TGI et présente donc une biodisponibilité très faible voire nulle si elle est administrée par voie orale. L'insulinothérapie des patients diabétiques s'effectue donc par injection sous-cutanée. Pour contrecarrer la dégradation digestive et augmenter la biodisponibilité par voie orale de l'insuline, plusieurs stratégies ont été développées.

Certains auteurs ont ainsi développé des formulations contenant des inhibiteurs enzymatiques (Yamamoto *et coll.*, 1994 ; Marschutz et Bernkop-Schnurch, 2000).

Marschütz et Bernkop-Schnurch (2000) ont utilisé des inhibiteurs spécifiques de la trypsine, de la chymotrypsine et de l'élastase, les trois enzymes principalement impliquées dans la dégradation de l'insuline. Après conjugaison de l'inhibiteur de Bowman-Birk et de l'élastatinal à de la carboxyméthylcellulose, l'insuline a été incorporée à un mélange (40/60) de ces deux conjugués et sa dégradation a été suivie dans un fluide intestinal artificiel (contenant trypsine, chymotrypsine et élastase) et comparé au devenir de l'insuline libre. Après 1h, seulement 23 % d'insuline incorporée à la matrice était dégradée par rapport à 98 % d'insuline libre. Yamamoto *et coll.* (1994) ont quant à eux observé une activité hypoglycémiante de l'insuline administrée par voie orale à des rats, en association avec d'autres inhibiteurs tels que le glycholate de sodium, la bacitracine et l'aprotinine.

Une autre méthode utilisée pour augmenter la biodisponibilité de l'insuline par voie orale consiste en l'utilisation de promoteurs d'absorption (Mesiha *et coll.*, 1994 ; Mesiha *et coll.*, 2002). Les sels biliaires et les acides gras sont les substances les plus utilisées. Plusieurs hypothèses expliquent leur action : les promoteurs pourraient augmenter la perméabilité du mucus digestif par ouverture des jonctions serrées des cellules épithéliales et également transformer les oligomères en monomères plus diffusibles.

Une troisième technique réside en l'encapsulation de l'insuline dans des systèmes particuliers à base de polymères pouvant non seulement protéger la molécule mais aussi diffuser à travers la muqueuse digestive (Mathiowitz *et coll.*, 1997 ; Damgé *et coll.*, 2007). C'est cette méthode que nous avons choisie pour préparer une formulation d'insuline capable d'être administrée par voie orale. Des travaux antérieurs effectués au laboratoire avec des nanoparticules associant la PCL et l'Eudragit® RS ont permis l'absorption orale d'héparine de bas poids moléculaire et présentant des biodisponibilités variant de 20 à 50 % (Jiao *et coll.*, 2002 ; Hoffart *et coll.*, 2006). Sur la base de ces recherches, nous avons étudié l'influence de la proportion de polymères sur les caractéristiques *in vitro* de nanoparticules d'Eudragit® RS et PCL encapsulant de l'insuline. L'Eudragit® RS étant un polyméthacrylate polycationique, ses charges positives permettent une interaction avec le mucus chargé négativement au pH physiologique et facilitent ainsi l'absorption de l'insuline dans le TGI. La PCL étant

biodégradable, la molécule pourra également être libérée au cours de la dégradation du polymère. Nous avons ainsi testé plusieurs proportions de polymères (RS 100 %, RS/PCL 25/50, RS/PCL 50/50, RS/PCL 75/25 et PCL 100 %) sur les paramètres physico-chimiques de nanoparticules chargées en Actrapid® ou Novorapid®. Dans un premier temps, les particules vierges et celles d'Actrapid® constituées de PCL seule apparaissent différentes de celles contenant de l'Eudragit® RS. Elles présentent un diamètre moyen supérieur (510 nm) et un potentiel de surface plus faible et légèrement négatif (-14 mV). En effet, la présence d'Eudragit® RS dans les autres formulations permet, grâce à ses propriétés d'agent tensio-actif, de limiter la coalescence des gouttelettes de polymères lors de la première émulsion. De plus, les charges positives de l'Eudragit® RS sont responsables du potentiel de surface positif (+ 40 mV) des particules, ce qui permet de stabiliser l'émulsion et donc de limiter l'agrégation des particules. La variation de proportion de l'Eudragit® RS dans les formulations n'influence pas les caractéristiques *in vitro* des nanoparticules ; à partir de 25 % d'Eudragit® RS, les groupements positifs sont en quantité suffisante pour obtenir les avantages cités précédemment. Concernant les particules de Novorapid®, celles-ci présentent une taille moyenne supérieure à celles précédemment décrites (565 nm). La présence d'excipients dans la formulation commerciale de Novorapid® et non présents dans celle d'Actrapid® pourrait expliquer une force ionique différente du milieu capable de déstabiliser partiellement l'émulsion et donc d'augmenter la taille des particules.

Les charges positives de l'Eudragit® RS permettent également d'obtenir des taux d'encapsulation élevés d'insuline (95 %) grâce à la formation d'interactions électrostatiques avec l'insuline chargée négativement au pH de l'étude. Seule la formulation préparée uniquement avec la PCL et l'insuline Novorapid® présente un taux d'encapsulation plus faible (34 %) probablement dû aux adjuvants présents dans la forme commerciale d'insuline.

Les particules ont ensuite été testées quant à leur capacité à libérer le principe actif *in vitro* dans un milieu de dissolution. Toutes les formulations présentent un profil similaire caractérisé par une libération initiale rapide suivie d'un plateau. De la même façon, il apparaît que les particules constituées de PCL seule libèrent une quantité

moindre d'insuline (20 %) comparativement aux autres formulations qui, elles, relarguent une quantité similaire (60 %). La PCL possède un caractère très hydrophobe qui semble limiter l'entrée d'eau dans la particule et donc la diffusion de l'insuline à travers la matrice de polymères.

Une étude préliminaire a été réalisée *in vivo* par administration de la formulation basée sur un mélange 50/50 de polymères chargée en Novorapid®. En effet, même si toutes les formulations ont montré leur capacité à encapsuler puis libérer l'insuline, les travaux antérieurs du laboratoire cités précédemment utilisaient ces proportions. Après administration orale de nanoparticules à des rats diabétiques à la posologie de 50 UI/kg, une baisse significative de la glycémie a été observée à partir de 2h et jusqu'à 8h. Ici encore, les charges positives de l'Eudragit® RS ont pu favoriser l'adhésion des particules au mucus intestinal et ainsi favoriser l'absorption des particules et/ou de l'insuline. La présence de PCL biodégradable permettrait une libération secondaire d'insuline suite à la dégradation partielle *in vivo* des particules. Une telle formulation orale présente une libération d'insuline progressive *in vivo* se traduisant par une hypoglycémie prolongée par rapport à une administration sous-cutanée, ce qui permettrait d'augmenter la compliance du patient diabétique.

II. Nanoparticules d'insuline asparte pour l'administration orale

Suite aux résultats encourageants obtenus lors de la première étude concernant l'administration orale de nanoparticules d'insuline, nous avons souhaité approfondir cet axe de recherche. Les nanoparticules de Novorapid® constituées d'un mélange 50/50 de PCL et d'Eudragit® RS ont alors été étudiées plus largement *in vivo*. L'insuline asparte est une insuline humaine recombinante dont la proline en position 28 de la chaîne B a été remplacée par un acide aspartique. Elle présente alors un profil pharmacologique différent de l'insuline rapide classique avec une absorption plus rapide et une insulïnémie supérieure après administration sous-cutanée (Brange *et coll.*, 1990 ; Setter *et coll.*, 2000). Cette modification de structure entraîne donc un effet hypoglycémiant plus rapide et un meilleur contrôle postprandial de la glycémie.

Les profils de libération *in vitro* de l'insuline à partir des nanoparticules révèlent une libération initiale rapide, profil classiquement observé à partir de formulation de type micro- ou nanoparticulaire. Dans le cas d'une administration orale, cette libération initiale rapide peut être un avantage. En effet, lorsque les particules atteignent leur site d'absorption (généralement le début de l'intestin), la libération rapide du principe actif permet d'obtenir un gradient de concentration important au niveau de la paroi intestinale et donc de favoriser l'absorption de celui-ci.

La première expérience effectuée chez l'animal a consisté à administrer les nanoparticules d'insuline par voie sous-cutanée afin de déterminer si le processus de préparation a pu altérer la molécule d'insuline. De même que l'administration de la solution d'insuline asparte, l'administration des nanoparticules a provoqué une diminution comparable de la glycémie des animaux diabétiques jusqu'à 6 h, démontrant que l'insuline conserve son activité malgré les multiples étapes nécessaires à la fabrication. Même si la différence n'est pas significative, la réduction de la glycémie à 8 et 12 h après l'administration sous-cutanée des nanoparticules est moins importante que celle due à la solution. Ceci pourrait traduire une libération incomplète du principe actif, comme cela a pu être observé lors des tests de libération *in vitro*.

Plusieurs mécanismes ont été mis en évidence concernant l'absorption d'insuline par voie orale via l'administration de nanoparticules. La paroi de polymères permet tout d'abord de protéger l'insuline d'une dégradation par les enzymes protéolytiques de l'estomac dans un premier puis du reste du TGI. Une fois au niveau de l'intestin, les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules permettent d'augmenter le temps de résidence de celles-ci au contact de la paroi intestinale, favorisant ainsi l'absorption de l'insuline au niveau du pôle apical des entérocytes. En effet, les charges positives des particules, conférées par la présence d'Eudragit® RS, favorisent l'adhésion de celles-ci au mucus chargé négativement qui couvre la paroi de l'intestin. D'autre part, l'insuline peut aussi être absorbée par voie paracellulaire, qu'elle soit libre ou associée aux nanoparticules. Cette voie d'absorption a déjà été observée et décrite par plusieurs auteurs (Aprahamian *et coll.*, 1987 ; Damgé *et coll.*, 1990 ; Damgé *et coll.*, 2000 ; Pinto-Alphandary *et coll.*, 2003) lors de l'administration de nanocapsules de polyisobutylcyanoacrylate. Les nanoparticules d'insuline pourraient également être

absorbées par transcytose via les plaques de Peyer, follicules lymphoïdes présents dans la paroi de l'iléon et permettant à l'insuline de rejoindre la circulation lymphatique ou les capillaires sous-jacents (Damgé *et coll.*, 2008).

Dans cette deuxième étude, l'administration orale des nanoparticules de Novorapid® à la dose de 50 UI/kg a permis de réduire la glycémie des rats diabétiques à partir de 1h30 et jusqu'à 8 heures après l'administration. Cette diminution a été plus importante (-52 %) que lors de l'administration de nanoparticules d'Actrapid® (-24 %) à la même dose, effectuée lors d'une autre étude (Damgé *et coll.*, 2007). Cette différence peut s'expliquer par la nature des insulines. Comme évoqué précédemment, la substitution d'une proline par un acide aspartique modifie la charge de la molécule et limite la formation d'hexamères, facilitant ainsi l'absorption de l'insuline. De plus, pour induire une réponse biologique, l'insuline doit se lier à des récepteurs situés au niveau des organes cibles tels que le foie, les muscles ou le tissu adipeux. Les deux insulines pourraient avoir une affinité différente pour ces récepteurs ou induire un signal différent pouvant expliquer la modification de l'activité des particules.

Cependant, aucune relation entre la concentration en insuline et la réduction de la glycémie n'a été observée, contrairement aux particules chargées en Actrapid® (Damgé *et coll.*, 2007). L'administration de doses de 25 et 100 UI/kg d'insuline asparte n'ont engendré aucune modification significative de la glycémie des animaux diabétiques. Une expérience effectuée sur une lignée cellulaire particulière (CHO-hIR) surexprimant les récepteurs à l'insuline a démontré que le temps de dissociation de l'insuline asparte à ces récepteurs était supérieur à celui observé avec l'insuline humaine classique (Kurtzhals *et coll.*, 2000). Ceci pourrait expliquer le fait qu'à la dose de 100 UI/kg, les récepteurs sont saturés et par conséquent cela entraînerait un blocage de la liaison de l'insuline, provoquant une diminution de son effet pharmacologique. De plus, cette occupation plus longue des récepteurs peut contribuer à l'effet prolongé des nanoparticules à 50 UI/kg sur le test de tolérance au glucose. En effet, les nanoparticules d'insuline asparte améliorent la réponse au test de tolérance au glucose de 6 à 24 h après l'administration orale. Les particules chargées en insuline classique n'avaient montré une amélioration de ce test que de 4 à 8 h

après l'administration (Damgé *et coll.*, 2007). L'observation de deux pics d'insuline lors de l'administration des nanoparticules d'insuline asparte (à 6 et 12 h) permet également d'expliquer cette action prolongée sur les tests de tolérance au glucose.

Cette étude a permis de démontrer pour la première fois que la modification structurale de l'insuline augmente de manière significative l'activité hypoglycémiante de nanoparticules administrées par voie orale. Cette formulation serait préférentiellement destinée aux patients diabétiques de type II chez lesquels les antidiabétiques oraux ne sont plus assez efficaces et qui nécessitent une insuline présentant une longue durée d'action permettant ainsi un contrôle correct de leur glycémie.

III. Développement de microparticules composites

Les études menées ces dernières années sur l'encapsulation de principes actifs en vue d'une administration parentérale se sont heurtées à un problème récurrent concernant la libération de la molécule thérapeutique. Celle-ci découle de la nature du polymère utilisé, généralement synthétique, qui délivre le principe actif par diffusion depuis la matrice jusqu'au milieu extérieur puis par dégradation du polymère dans le cas d'un polymère biodégradable. Les profils de libération obtenus montrent une libération initiale rapide appelée "effet burst". Cet effet reste difficile à contrôler et peut poser problème dans le cas d'un principe actif à marge thérapeutique étroite.

Pour tenter de réduire ce burst, différents modèles de microparticules composites ont été développés et consistent à modifier le principe actif avant son encapsulation au cœur des microparticules : complexation du principe actif avec des cyclodextrines (De Rosa *et coll.*, 2005 ; Zheng *et coll.*, 2006), encapsulation dans des nanoparticules (Li *et coll.*, 1997), dans des liposomes (Dhoot et Wheatley, 2003), ou encore combinaison à l'intérieur d'un hydrogel (Mandal *et coll.*, 2002 ; Liu *et coll.*, 2007a). De tels systèmes ont démontré leur capacité à réduire l'effet burst *in vitro* et *in vivo* en contrôlant la diffusion du principe actif au travers de la double paroi des microparticules composites. Cependant, la présence de polymère hydrophile dans ces formulations favorise l'entrée d'eau dans la matrice et donc la diffusion de la molécule vers le milieu extérieur, limitant ainsi le contrôle du burst (Wang *et coll.*, 2004).

Le but de cette étude était de mettre au point une formulation de microparticules encapsulant des nanoparticules, appelées alors microparticules composites, composées uniquement de polymères hydrophobes, permettant de limiter l'entrée d'eau et donc la diffusion du principe actif. Les nanoparticules ont été préparées avec de la poly- ϵ -caprolactone et encapsulées dans des microparticules d'éthylcellulose, d'Eudragit® RS ou de PLGA. La suspension nanoparticulaire tenait lieu de phase interne lors de la préparation des microparticules par la technique de double émulsion. D'un point de vue technique, cela nécessitait l'utilisation d'un polymère très hydrophobe pour la formulation des nanoparticules. Les microparticules étaient alors formulées dans un solvant organique, non-solvant des nanoparticules. Cette différence d'hydrophobicité des deux barrières polymériques entourant le principe actif devait permettre d'une part de ralentir la diffusion d'eau vers l'intérieur de la matrice et d'autre part de maintenir le principe actif le plus longtemps possible à l'intérieur des particules.

La nature de la molécule utilisée joue un rôle sur l'effet burst de par sa masse moléculaire et son degré de solubilité dans l'eau. C'est pourquoi, il a semblé intéressant d'étudier deux molécules de faible masse moléculaire : l'ibuprofène, lipophile et l'acétate de triptoréline, peptide hydrophile. Les particules composites ont fait l'objet d'une étude comparative *in vitro* concernant leur taille, leur taux d'encapsulation et leur faculté à libérer le principe actif dans un milieu de dissolution. Le diamètre moyen variait selon le principe actif encapsulé et la nature du polymère, témoignant d'une interaction entre les charges positives de l'Eudragit® RS et la triptoréline chargée négativement. Toutes les formulations de microparticules composites présentaient une taille moyenne supérieure aux microparticules ne contenant pas de nanoparticules, démontrant que ces dernières sont bien encapsulées dans les microparticules. Bien que différant selon le principe actif et le polymère utilisé, les profils de libération *in vitro* ont permis de mettre en évidence une réduction plus ou moins importante de l'effet burst avec les microparticules composites par rapport aux micro ou aux nanoparticules simples.

IV. Nanoparticules furtives de chlorhydrate de propranolol

De nombreux médicaments nécessitant d'être administrés par voie intraveineuse présentent un inconvénient majeur quant au suivi du traitement et au confort du patient. En effet, selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ces molécules vont être dégradées plus ou moins rapidement dans l'organisme, ce qui va nécessiter plusieurs injections journalières. Afin d'augmenter la durée de vie dans la circulation sanguine de ces substances, certains auteurs ont imaginé protéger ces principes actifs en les encapsulant à l'intérieur d'une matrice de polymère qui sera alors capable de retarder leur dégradation. Cependant, les vecteurs polymériques sont rapidement reconnus comme étrangers lorsqu'ils se retrouvent dans le sang. Ils sont alors éliminés et la molécule qui se trouvait en leur sein est alors dégradée. Pour palier ce problème, de nombreuses équipes de recherche ont alors développé le concept de furtivité (Bazile *et coll.*, 1995 ; Verrecchia *et coll.*, 1995 ; Bocca *et coll.*, 1998 ; Peracchia *et coll.*, 1999a). Ce concept repose sur la modification de vecteurs polymériques en vue de limiter leur reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé (SPM), de réduire leur phagocytose et ainsi prolonger leur temps de résidence vasculaire. En effet, en présence de la surface polymérique le plus souvent hydrophobe des particules, les cellules phagocytaires réagissent et déclenchent le processus de phagocytose. La première idée a donc été d'augmenter l'hydrophilie de surface des particules en y greffant un polymère hydrophile qui va permettre de créer une barrière stérique hydrophile capable de repousser les protéines plasmatiques et notamment les opsonines et ainsi de réduire la phagocytose. La substance la plus largement étudiée est le PEG (Gref *et coll.*, 2000 ; Beletsi *et coll.*, 2005 ; Huang *et coll.*, 2005 ; Fang *et coll.*, 2006). La molécule hydrophile utilisée est le plus souvent liée de façon chimique sur le polymère constitutif des particules. Une autre technique utilisée afin de préparer des vecteurs furtifs repose sur l'inhibition de l'activation du système du complément. Avant de développer un modèle de particules furtives véhiculant une drogue, la plupart des recherches se font à partir de particules vides afin de mettre au point une formulation capable d'éviter le SPM *in vitro* et parfois *in vivo*.

Notre objectif était d'élaborer un nouveau système permettant de donner des propriétés de furtivité à des nanoparticules encapsulant un principe actif. Notre idée

repose sur les propriétés de l'héparine comme substance hydrophile capable également d'inhiber l'activation du complément. Nous avons alors procédé à l'encapsulation d'un principe actif modèle, le chlorhydrate de propranolol, dans des nanoparticules composées d'Eudragit® RS et de PCL (50/50) et recouvertes d'héparine. L'optimisation de la formulation a nécessité plusieurs étapes. Tout d'abord la quantité d'héparine à ajouter dans la phase aqueuse externe a été étudiée : le potentiel zêta des particules sans héparine étant positif (+ 30 mV) à cause des groupements ammonium quaternaires de l'Eudragit® RS, l'ajout croissant d'héparine polyanionique a permis de masquer ces charges positives jusqu'à diminuer la charge globale de surface et observer un potentiel zêta le plus proche de la neutralité possible (- 18 mV). Une fois la quantité d'héparine déterminée, il a fallu améliorer le taux d'encapsulation du principe actif. En effet, le chlorhydrate de propranolol étant très hydrophile, il tend à s'échapper de la matrice de polymère vers la phase aqueuse dispersante lors de la préparation. Comme le pKa du chlorhydrate de propranolol est de 9,45, l'augmentation du pH de la solution aqueuse dispersante de PVA au-delà de cette valeur a permis de maintenir une certaine proportion de chlorhydrate de propranolol sous sa forme non ionisée, moins hydrosoluble et donc d'améliorer son taux d'encapsulation. Cependant, l'héparine est instable à un pH trop basique et provoque alors une floculation de la formulation. Le pH optimal de la solution de PVA a alors été optimisé à 10,5, permettant un taux d'encapsulation et un aspect acceptables de la suspension nanoparticulaire. Les taux d'encapsulation du chlorhydrate de propranolol varient de 19 % pour les nanoparticules non furtives à 32 % pour les nanoparticules furtives. L'interaction à la périphérie des nanoparticules entre le polymère cationique et l'héparine anionique présente dans la phase continue de PVA pourrait créer une zone de microviscosité plus élevée qui semble ralentir la fuite du principe actif vers la phase aqueuse continue.

Le diamètre moyen des nanoparticules chargées en principe actif est de l'ordre de 360 nm, ce qui représente une taille acceptable pour les expérimentations *in vivo*. Une taille supérieure est observée pour les particules vierges (520 nm) ; il semblerait que le chlorhydrate de propranolol agisse comme un agent tensio-actif grâce à son caractère amphiphile (Ubrich *et coll.*, 2004).

Les profils de libération *in vitro* montrent que les nanoparticules relarguent le chlorhydrate de propranolol en quantité limitée (33 et 42 % pour les particules furtives et non furtives, respectivement). Le caractère hydrophobe de la PCL semble limiter l'entrée d'eau à l'intérieur de la matrice.

Une part importante de notre travail concernant les études *in vivo* a consisté à adapter une technique de dosage CLHP du chlorhydrate de propranolol au plasma de lapin et à abaisser au maximum la limite de quantification dans le plasma. En effet, afin de déterminer le temps maximal de persistance des particules dans la circulation sanguine, il fallait détecter de très petites quantités de substance. Nous avons réussi à atteindre la valeur de 1 ng/mL de plasma, valeur inférieure à celles de la littérature (Rekhi *et coll.*, 1995 ; Kim *et coll.*, 2001). Les études *in vivo* chez le lapin ont permis de mettre en évidence une persistance vasculaire des nanoparticules furtives. Le chlorhydrate de propranolol administré à la dose de 1 mg/kg a pu être retrouvé dans le plasma jusqu'à 96 h après leur administration IV, tandis qu'il n'était détecté respectivement que jusqu'à 48 et 72 h après l'administration des particules non furtives et de la solution. Il est important de noter que le chlorhydrate de propranolol non encapsulé a été éliminé par centrifugation avant l'administration des nanoparticules chez le lapin. Bien que reprises dans un minimum de chlorure de sodium (0,9 %), on peut considérer que 100 % du chlorhydrate de propranolol administré était effectivement encapsulé dans les nanoparticules. La demi-vie du chlorhydrate de propranolol a été calculée pour chaque formulation à partir des profils de concentrations sanguines. Le simple fait d'encapsuler le principe actif ne modifie pas significativement sa demi-vie d'élimination (2,3 à 3 h). En effet, les nanoparticules injectées dans la circulation sanguine semblent être rapidement reconnues par le système phagocytaire mononucléé. Par contre, la fixation d'héparine aux nanoparticules permet d'augmenter cette demi-vie jusqu'à 42 h.

Un point important a dû être contrôlé suite à l'administration des nanoparticules furtives aux animaux. Etant donné qu'une faible quantité d'héparine était libérée *in vitro*, il semblait possible qu'il en soit de même *in vivo*. En effet, il faut garder à l'esprit que l'héparine est avant tout un médicament anticoagulant prescrit lors de la maladie thromboembolique veineuse, de la thrombose veineuse profonde, de l'angor

instable ou encore de l'infarctus du myocarde (Thériaque, 2008). Nous avons donc suivi l'activité anti-Xa du plasma des lapins au cours de l'expérimentation *in vivo*. L'activité mesurée (entre 0,18 et 0,05 unités anti-Xa/mL), bien que restant inférieure à celle obtenue lors d'un traitement préventif par HBPM (de l'ordre de 0,4 unités anti-Xa/mL) reste un point négatif. En effet, il n'est pas envisageable qu'un tel modèle de particules furtives possède un effet anticoagulant lors d'un traitement thérapeutique.

Le tableau 6 résume les différents résultats obtenus *in vitro* et/ou *in vivo* à partir de vecteurs furtifs de diverses natures.

Tableau 6 : Récapitulatif des différentes études portant sur des vecteurs furtifs.

Type de vecteur	Molécule apportant la furtivité	Principe actif encapsulé	Mise en évidence de la furtivité in vitro	Mise en évidence de la furtivité in vivo	Réf.
Liposomes	PEG	–	SDS PAGE : - protéines	Marquage FITC, sacrifice rats : + dans sang, - foie	(Gaur <i>et coll.</i> , 2000)
		Doxorubicine		Souris : + sang, - foie, + tumeur	(Sadzuka <i>et coll.</i> , 2002)
		Gadolinium		Souris : + sang, - foie et rate	(Le et Cui, 2006)
Nanoparticules	PEG	IBP 5823		Demi-vie x 30 chez rat ; localisation des particules dans le sang pendant 6h	(Verrecchia <i>et coll.</i> , 1995)
		–	Phagocytose plus lente par monocytes	Demi-vie x 180 chez rat	(Bazile <i>et coll.</i> , 1995)
		–		Souris : temps de résidence dans sang augmentée, - foie	(Peracchia <i>et coll.</i> , 1999a)
		–	2D-PAGE : - de spots, volume total de protéines diminué	Souris : radioactivité dans sang présente après 6h	(Peracchia <i>et coll.</i> , 1999b)
		–	2D-PAGE : diminution quantité protéines selon MM et quantité PEG		(Gref <i>et coll.</i> , 2000)
		Amoxicilline	PEG diminue phagocytose, proportionnellement à MM		(Fontana <i>et coll.</i> , 2001)

Nanoparticules	PEG	SAB		Rats : après 1h, concentration dans sang x12, présence après 24h ; + dans sang et - dans foie	(Li <i>et coll.</i> , 2001)
		rHuTNF	SDS-PAGE : quantité moindre dépend de MM PEG et taille particule Phagocytose par macrophages murins diminuée	Souris : + longtemps dans tumeur	(Fang <i>et coll.</i> , 2006)
	POE	–		Rats : vitesse élimination sanguine ralentie, + sang, - foie	(Vandorpe <i>et coll.</i> , 1997)
		–	Phagocytose par granulocytes ralentie		(Zambaux <i>et coll.</i> , 2000)
	Héparine	–	CH50 : moins activation		(Passirani <i>et coll.</i> , 1998a)
	Héparine et dextran	–		Souris : élimination lente de la circulation sanguine	(Passirani <i>et coll.</i> , 1998b)
		–	Phagocytose par macrophages murins ralentie		(Jaulin <i>et coll.</i> , 2000)
	Poloxamine 908	–		Rats : + sang, - foie	(Moghimi <i>et coll.</i> , 2003)
Nanoparticules lipidiques solides	PEG	–	Phagocytose par macrophages murins ralentie		(Bocca <i>et coll.</i> , 1998)

Nanoparticules lipidiques solides	PEG	Doxorubicine		Rats : augmentation AUC, diminution clairance, - cardiotoxique	(Fundaro <i>et coll.</i> , 2000)
	Poloxamère 188	–	Phagocytose par granulocytes diminuée	Souris : limite accumulation dans foie et rate	(Muller <i>et coll.</i> , 1997)
Nanocapsules lipidiques	PEG	–	CH50 : faible activation		(Vonarbourg <i>et coll.</i> , 2006)

PEG : poly(éthylène glycol) ; MM : masse moléculaire ; SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide ; 2D-PAGE : électrophorèse bidimensionnelle sur gel d'acrylamide

V. Nanoparticules furtives d'insuline

Après avoir démontré les propriétés de furtivité de notre système de nanoparticules greffées avec de l'héparine, nous avons voulu confirmer ces capacités en encapsulant un principe actif qui présenterait une demi-vie beaucoup plus courte après administration IV d'une solution. Les peptides et les protéines thérapeutiques semblaient être un choix judicieux car ils sont très rapidement dégradés lorsqu'ils se retrouvent dans la circulation sanguine et représentent les molécules thérapeutiques de demain. Notre objectif a donc été d'encapsuler de l'insuline, petit peptide hydrophile, dans des nanoparticules furtives et d'observer leurs caractéristiques *in vitro* avant de les injecter *in vivo*. La formulation est identique à celle mise au point dans l'étude précédente, l'insuline remplaçant le chlorhydrate de propranolol.

Le diamètre moyen des particules ne varie pas et reste aux environs de 350 nm, taille toujours compatible avec les essais *in vivo*. Le potentiel de surface des particules simples est toujours positif (+ 45 mV) et dû aux groupements ammonium quaternaires de l'Eudragit® RS. En revanche, nous avons pu atteindre un potentiel plus proche de la neutralité (- 4 mV) pour les particules furtives que lors de l'étude précédente (- 18 mV). Un potentiel plus proche de la neutralité permettrait de renforcer les propriétés de furtivité des particules (Bocca *et coll.*, 1998 ; Fontana *et coll.*, 2001 ; Gbadamosi *et coll.*, 2002 ; Yang *et coll.*, 2007). Un potentiel aussi proche de la neutralité ne semble pas être un obstacle à la stabilité des particules. En effet, une étude a démontré qu'une suspension de particules PEGylées présentant un potentiel zêta de - 8 mV restait stable pendant un mois à température ambiante (Liu *et coll.*, 2007b). De plus, ce potentiel démontre que, contrairement à l'étude précédente, l'héparine semblant ne pas être en excès autour de la particule, pourrait être relarguée en plus faible quantité *in vitro* et *in vivo*. Un taux de fixation supérieur de l'héparine (86 % vs 74 %), comparativement aux nanoparticules de chlorhydrate de propranolol étudiées précédemment, corrobore ce fait.

La méthode CLHP de dosage de l'insuline précédemment décrite a dû être modifiée. En effet, il s'agit d'un dosage indirect de la quantité de principe actif non encapsulé dans la phase aqueuse externe. La présence d'héparine, elle aussi non

encapsulée, créait des interférences lors du dosage, provoquant l'absence de pic d'insuline sur le chromatogramme. Nous avons donc ajouté de la triéthylamine en proportion équivalente dans les deux phases mobiles qui est alors entré en compétition avec l'héparine. Nous avons pu ainsi récupérer un chromatogramme normal.

Les taux d'encapsulation de l'insuline sont relativement élevés (87 %) et probablement favorisés par des interactions entre l'insuline, chargée négativement au pH observé lors des expériences, et l'Eudragit® RS, chargé positivement.

Les profils de libération *in vitro* présentent une légère différence avec ceux réalisés à partir du chlorhydrate de propranolol. Une diminution de la quantité totale de principe actif a pu être observée en fin d'expérimentation avec les particules non furtives. Ce phénomène a déjà été expliqué par d'autres auteurs lors de la libération de peptide ou de protéine (Quellec *et coll.*, 1998 ; Zambaux *et coll.*, 1999 ; Fang *et coll.*, 2005). La molécule tend à venir s'adsorber à la surface des particules et dans le cas des particules furtives, la présence des chaînes d'héparine en couronne empêche cette réadsorption.

Les études *in vivo* ont été réalisées chez des rats rendus diabétiques et ont permis de confirmer le caractère furtif de nos particules. L'insuline libérée des particules furtives a pu être détectée jusqu'à 72 h après l'injection intraveineuse, tandis que les valeurs de bases ont été retrouvées après 3 h pour la solution et 8 h pour les particules non furtives. La demi-vie d'élimination de l'insuline a ainsi été augmentée 200 fois par encapsulation dans les nanoparticules furtives. L'emploi d'un peptide à demi-vie courte a pu confirmer le potentiel de furtivité des nanoparticules *in vivo*.

Comme précédemment, nous avons suivi l'évolution de l'activité anti-Xa dans le plasma des rats afin de déterminer la libération *in vivo* d'héparine. Etant donné que les taux de fixation sont supérieurs et que le potentiel de surface est plus proche de la neutralité que pour les particules de chlorhydrate de propranolol, l'augmentation de l'activité anti-Xa des plasmas est plus faible (de 0,03 à 0,11 U/mL), traduisant une libération moins importante d'héparine.

Des études complémentaires ont été effectuées afin de déterminer le potentiel de furtivité des particules *in vitro*. L'interaction des particules furtives et non furtives

avec les protéines du complément a été évaluée par la technique du CH50. Bien qu'aucune différence significative ne soit observée entre les différentes formulations, les particules furtives montrent une tendance à moins activer le complément. Contrairement à ce que nous pensions observer, les nanoparticules non furtives n'activent pas beaucoup le complément, comparativement à un contrôle positif tel que le zymosan (Vonarbourg *et coll.*, 2006), ce qui semble étonnant vu que les polymères utilisés sont de nature synthétique. Une étude de chimiluminescence réalisée sur des particules vides non furtives a confirmé leur faible réactivité vis-à-vis des protéines du complément. En effet, après incubation des particules dans du sérum, celles-ci ont été mises en contact avec des cellules phagocytaires (polynucléaires) et aucune activité de phagocytose n'a été observée, comparativement au contrôle positif (zymosan). Il reste important de noter que malgré cette absence de différence entre les particules furtives et les non furtives *in vitro*, le potentiel de furtivité de ces nanoparticules a bien été démontré *in vivo* par augmentation de la demi-vie d'élimination du principe actif encapsulé.

La fabrication de ces particules relativement simple et rapide est un atout supplémentaire comparativement à celle de particules précédemment mises au point et constituées de polymères chimiquement modifiés par greffage de molécule hydrophile (héparine ou autre polymère hydrophile) (Verrecchia *et coll.*, 1995 ; Müller *et coll.*, 1997 ; Peracchia *et coll.*, 1997 ; Vandorpe *et coll.*, 1997 ; Nakada *et coll.*, 1998 ; Passirani *et coll.*, 1998b ; Zambaux *et coll.*, 2000 ; Li *et coll.*, 2001 ; Moghimi *et coll.*, 2003 ; Beletsi *et coll.*, 2005 ; Shi *et coll.*, 2005). Cependant, l'Eudragit® RS étant un polymère non-biodégradable, il n'est pas envisageable de l'administrer par voie intraveineuse chez l'homme. Nous avons présenté ici un modèle de polymère polycationique capable d'interagir avec l'héparine afin de conférer des propriétés de furtivité à des nanoparticules.

Actuellement, la recherche pharmaceutique utilise le poly(éthylène glycol) pour prolonger la durée de vie de molécules injectables tels que les peptides et les protéines thérapeutiques. Comme nous l'avons rappelé précédemment, de telles molécules à demi-vie courte doivent faire l'objet d'injections multiples afin de maintenir

un taux constant de principe actif dans le sang. Quelques médicaments ainsi PEGylés existent déjà sur le marché et d'autres principes actifs sont en essais cliniques (tableau 7).

Tableau 7 : Médicaments PEGylés disponibles ou en essais cliniques

Nom commercial	Principe actif	Indications	Rythme d'administration	Statut
ViraferonPeg®	Interféron alfa-2b	Hépatite C chronique	1 injection / semaine	AMM
Pegasys®	Interféron alfa-2a			
Caelyx®	Doxorubicine	Cancers sein, ovaire, sarcome Kaposi	20 à 50 mg/m ² / 3 à 4 semaines	AMM
Oncaspar®	Pegaspargase	Leucémies lymphoblastiques aiguës	1 injection / 2 semaines	ATU
Neulasta®	G-CSF	Neutropénies post-chimiothérapie cytotoxique	1 injection / traitement	AMM
Puricase®	Peguricase	Goutte	1 injection / 2 ou 4 semaines	Essais phase III
—	PEG-GM-CSF	Syndrome aigu après surexposition aux rayonnements	1 injection à J1, J7 et J10	Etude chez singe

L'objectif de ces formulations est principalement de réduire le nombre d'injections ou de diminuer la dose administrée dans le cas de la doxorubicine qui est une molécule à toxicité cumulative cardiaque.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le développement des nanotechnologies pour la vectorisation des médicaments a pris, au cours des dernières années, un essor considérable et notamment depuis les années 1990. Les recherches actuelles ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques en les mettant au service de la découverte de nouveaux médicaments. L'avantage des nanotechnologies dans le domaine pharmaceutique est de permettre d'obtenir des objets biologiquement actifs, d'une manière beaucoup plus spécifique et sélective, au niveau des tissus, de la cellule, ou même du compartiment subcellulaire malade.

Les nanotechnologies galéniques offrent des possibilités pour permettre l'administration par la voie orale de molécules qui sont normalement dégradées lorsqu'elles sont administrées par cette voie ou encore qui sont incapables de diffuser à travers l'épithélium intestinal (cas des peptides et protéines). De tels systèmes présentent un grand intérêt actuellement pour l'application à la mise au point de nouveaux vaccins par voie orale (des Rieux *et coll.*, 2006).

Une autre avancée importante dans le domaine des nanotechnologies a été la conception de nanocapsules à contenu aqueux pour l'administration et le transport des acides nucléiques (gènes, oligonucléotides antisens et siRNA) (Lambert *et coll.*, 2000). Il a été montré que l'encapsulation d'un oligonucléotide antisens ou d'un petit ARN interférant (siRNA) orienté contre un oncogène de jonction permettait de traiter efficacement un modèle expérimental du sarcome d'Ewing (Maksimenko *et coll.*, 2003 ; Toub *et coll.*, 2006). Il est remarquable de noter que lorsqu'il n'est pas encapsulé, le même oligonucléotide/siRNA n'a pas d'activité sur cette tumeur pédiatrique qui résulte de la fusion entre deux gènes localisés sur des chromosomes différents. Cette observation ouvre des perspectives nouvelles dans le domaine de la manipulation génétique pour le traitement du cancer.

La possibilité d'administrer l'insuline par voie orale aurait un impact très important sur la population de patients diabétiques. En effet, le traitement classique du diabète de type I reste l'administration d'insuline par voie sous-cutanée, nécessitant de multiples injections qui influent sur le confort de vie du patient. Le premier objectif de notre travail consistait en la préparation de nanoparticules destinées à l'administration

orale d'insuline. Dans un premier temps, nous avons testé plusieurs proportions de polymères (Eudragit® RS et PCL) sur l'encapsulation et la libération de deux types d'insuline. Les nanoparticules préparées ont démontré leur capacité à encapsuler une quantité satisfaisante d'insuline et à en libérer une proportion importante dans un milieu de dissolution. Nous avons ensuite procédé à des études *in vivo* chez le rat diabétique à partir d'une formulation choisie. Etant donné que des essais ont déjà été effectués à partir de nanoparticules d'insuline Actrapid® basées sur un mélange 50/50 de PCL et Eudragit® RS (Damgé *et coll.*, 2007), nous avons voulu savoir si la modification d'un acide aminé de l'insuline (substitution d'une proline par un acide aspartique en B28) avait un retentissement sur l'efficacité des nanoparticules *in vivo*. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'efficacité de nanoparticules pour l'administration orale d'insuline asparte chez un modèle animal. En effet, une diminution significative et prolongée de la glycémie des animaux a été mise en évidence. Les tests de tolérance au glucose ont démontré que les particules d'insuline asparte présentaient une efficacité plus longue que celles d'insuline classique.

Des études de toxicité de cette formulation seront nécessaires afin de démontrer l'innocuité d'un tel système avant de procéder à d'éventuels essais chez l'homme.

Nous avons ensuite démontré que les microparticules composites représentaient une forme pharmaceutique originale susceptible de ralentir fortement la libération initiale précoce des principes actifs encapsulés à la fois pour des molécules de faible masse moléculaire (cas le plus difficile) mais aussi pour des peptides (cas le plus fréquent en thérapeutique). De plus, ces microparticules composites ont montré une tendance très forte à une prolongation de la durée d'action des principes actifs encapsulés. Cette nouvelle propriété pourrait être mise à profit puisque les laboratoires pharmaceutiques impliqués dans ce type de recherche souhaitent mettre sur le marché des formes multiparticulaires autorisant une libération pouvant s'étendre sur une année.

Notre dernier objectif était de mettre au point une technique innovante capable de conférer des propriétés furtives à des nanoparticules préparées à partir d'un

mélange de polymères : la poly- ϵ -caprolactone, biodégradable et l'Eudragit® RS, biocompatible et polycationique. De telles propriétés de furtivité sont nécessaires pour éviter la reconnaissance des particules par le système phagocytaire mononucléé après injection intraveineuse. En effet, des nanoparticules classiques (non furtives) sont rapidement opsonisées, phagocytées et éliminées quand elles sont introduites dans le système sanguin, entraînant la dégradation du principe actif qu'elles encapsulent.

Notre système repose sur l'utilisation d'une molécule qui permet non seulement d'augmenter l'hydrophilie de surface des particules mais aussi d'inhiber l'activation du complément : l'héparine. L'originalité principale d'un tel système vient de la technique de fixation de cette molécule à la surface des particules. En effet, nous avons tiré avantage des interactions électrostatiques entre les charges négatives de l'héparine et les charges positives de l'Eudragit® RS. Il serait alors intéressant de poursuivre cette étude en tentant d'identifier la partie de la molécule d'HBPM responsable du caractère de furtivité. En effet, en isolant cette structure, nous pourrions augmenter la sécurité du système en évitant l'activité potentielle anticoagulante de l'héparine *in vivo*.

Le caractère de furtivité a été mis en évidence par l'augmentation de la demi-vie d'élimination de deux principes actifs modèles *in vivo* après administration d'une formulation de nanoparticules furtives, comparativement à des nanoparticules simples (non furtives) et à une solution de principe actif de référence. La demi-vie du chlorhydrate de propranolol (molécule hydrophile) a été augmentée d'un facteur 18 tandis que celle de l'insuline (peptide hydrophile) l'a été d'un facteur 200, comparativement à la solution aqueuse administrée de la même façon.

Le travail devra se poursuivre en remplaçant l'Eudragit® RS par un autre polymère polycationique biodégradable afin d'achever la construction globale du système. La polylysine qui est chargée positivement à pH neutre pourrait être un candidat potentiel ; elle a déjà été utilisée pour la fabrication de dendrimères en vue d'une injection intraveineuse à des souris (Okuda *et coll.*, 2006). Le greffage de PEG a permis de modifier sa distribution dans l'organisme et d'éviter l'accumulation des dendrimères dans le foie ou les reins. De plus, les études de toxicité effectuées *in vivo* chez la souris ne démontrent pas d'atteinte hépatique significative. La polyéthylènimine (PEI) est quant à elle un agent cationique ayant été utilisé dans la fabrication de

microparticules en association à du PLGA, pour la transfection d'ADN (Oster *et coll.*, 2005). En dessous de 10 % de PEI dans la composition de polymères, la toxicité au niveau de la membrane des cellules est satisfaisante. Ce polymère pourrait également être une alternative à l'Eudragit® RS.

Enfin, des molécules, comme l'interféron alfa qui existe aujourd'hui sous forme PEGylée sur le marché, permettraient de tester et de comparer l'intérêt des nanoparticules furtives développées avec un produit commercial.

RÉFÉRENCES

Aprahamian, M., Michel, C., Humbert, W., Devissaguet, J.P., and Damge, C., *Transmucosal passage of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as a new drug carrier in the small intestine*. Biol Cell, 1987. **61**(1-2): p. 69-76.

Bazile, D., Prud'homme, C., Bassoullet, M.T., Marlard, M., Spenlehauer, G., and Veillard, M., *Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system*. J Pharm Sci, 1995. **84**(4): p. 493-8.

Beletsi, A., Panagi, Z., and Avgoustakis, K., *Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers*. Int J Pharm, 2005. **298**(1): p. 233-41.

Bocca, C., Caputo, O., Cavalli, R., Gabriel, L., Miglietta, A., and Gasco, M.R., *Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles*. Int J Pharm, 1998. **175**(2): p. 185-193.

Brange, J., Owens, D.R., Kang, S., and Volund, A., *Monomeric insulins and their experimental and clinical implications*. Diabetes Care, 1990. **13**(9): p. 923-54.

Damgé, C., Aprahamian, M., Humbert, W., and Pinget, M., *Ileal uptake of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules in the rat*. J Pharm Pharmacol, 2000. **52**(9): p. 1049-56.

Damgé, C., Maincent, P., and Ubrich, N., *Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats*. J Control Release, 2007. **117**(2): p. 163-170.

Damgé, C., Michel, C., Aprahamian, M., Couvreur, P., and Devissaguet, J.P., *Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery*. J Control Release, 1990. **13**(2-3): p. 233-239.

Damgé, C., Reis, C.P., and Maincent, P., *Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin*. Expert Opin Drug Deliv, 2008. **5**(1): p. 45-68.

De Rosa, G., Larobina, D., Immacolata La Rotonda, M., Musto, P., Quaglia, F., and Ungaro, F., *How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA-based microspheres: the case of insulin/hydroxypropyl-[beta]-cyclodextrin system*. J Control Release, 2005. **102**(1): p. 71-83.

des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J., and Preat, V., *Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach*. J Control Release, 2006. **116**(1): p. 1-27.

Dhoot, N.O. and Wheatley, M.A., *Microencapsulated liposomes in controlled drug delivery: strategies to modulate drug release and eliminate the burst effect*. J Pharm Sci, 2003. **92**(3): p. 679-89.

Fang, C., Shi, B., and Pei, Y.Y., *Effect of MePEG molecular weight and particle size on in vitro release of tumor necrosis factor-alpha-loaded nanoparticles*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(2): p. 242-9.

- Fang, C., Shi, B., Pei, Y.Y., Hong, M.H., Wu, J., and Chen, H.Z., *In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor-alpha-loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight and particle size*. Eur J Pharm Sci, 2006. **27**(1): p. 27-36.
- Fontana, G., Licciardi, M., Mansueto, S., Schillaci, D., and Giammona, G., *Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake*. Biomaterials, 2001. **22**(21): p. 2857-65.
- Fundaro, A., Cavalli, R., Bargoni, A., Vighetto, D., Zara, G.P., and Gasco, M.R., *Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats*. Pharmacol Res, 2000. **42**(4): p. 337-43.
- Gaur, U., Sahoo, S.K., De, T.K., Ghosh, P.C., Maitra, A., and Ghosh, P.K., *Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system*. Int J Pharm, 2000. **202**(1-2): p. 1-10.
- Gbadamosi, J.K., Hunter, A.C., and Moghimi, S.M., *PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance*. FEBS Lett, 2002. **532**(3): p. 338-44.
- Gref, R., Luck, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T., and Muller, R.H., *'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2000. **18**(3-4): p. 301-313.
- Hoffart, V., Lamprecht, A., Maincent, P., Lecompte, T., Vigneron, C., and Ubrich, N., *Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system*. J Control Release, 2006. **113**(1): p. 38-42.
- Huang, M., Wu, W., Qian, J., Wan, D.J., Wei, X.L., and Zhu, J.H., *Body distribution and in situ evading of phagocytic uptake by macrophages of long-circulating poly (ethylene glycol) cyanoacrylate-co-n-hexadecyl cyanoacrylate nanoparticles*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(12): p. 1512-8.
- Jaulin, N., Appel, M., Passirani, C., Barratt, G., and Labarre, D., *Reduction of the uptake by a macrophagic cell line of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate)*. J Drug Target, 2000. **8**(3): p. 165-72.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., Lecompte, T., and Maincent, P., *In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits*. Circulation, 2002. **105**(2): p. 230-5.
- Kim, H.K., Hong, J.H., Park, M.S., Kang, J.S., and Lee, M.H., *Determination of propranolol concentration in small volume of rat plasma by HPLC with fluorometric detection*. Biomed Chromatogr, 2001. **15**(8): p. 539-45.

- Kurtzhals, P., Schaffer, L., Sorensen, A., Kristensen, C., Jonassen, I., Schmid, C., and Trub, T., *Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use*. Diabetes, 2000. **49**(6): p. 999-1005.
- Lambert, G., Bertrand, J.R., Fattal, E., Subra, F., Pinto-Alphandary, H., Malvy, C., Auclair, C., and Couvreur, P., *EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(2): p. 401-6.
- Le, U.M. and Cui, Z., *Long-circulating gadolinium-encapsulated liposomes for potential application in tumor neutron capture therapy*. Int J Pharm, 2006. **312**(1-2): p. 105-12.
- Li, J.K., Wang, N., and Wu, X.S., *A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery*. J Pharm Sci, 1997. **86**(8): p. 891-5.
- Li, Y., Pei, Y., Zhang, X., Gu, Z., Zhou, Z., Yuan, W., Zhou, J., Zhu, J., and Gao, X., *PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats*. J Control Release, 2001. **71**(2): p. 203-11.
- Liu, J., Zhang, S.M., Chen, P.P., Cheng, L., Zhou, W., Tang, W.X., Chen, Z.W., and Ke, C.M., *Controlled release of insulin from PLGA nanoparticles embedded within PVA hydrogels*. J Mater Sci Mater Med, 2007a. **18**(11): p. 2205-10.
- Liu, W., Yang, A., Li, Z., Xu, H., and Yang, X., *PEGylated PLGA nanoparticles as tumor necrosis factor- α receptor blocking peptide carriers: Preparation, characterization and release in vitro*. Journal of Wuhan University of Technology--Materials Science Edition, 2007b. **22**(1): p. 112-116.
- Maksimenko, A., Malvy, C., Lambert, G., Bertrand, J.R., Fattal, E., Maccario, J., and Couvreur, P., *Oligonucleotides targeted against a junction oncogene are made efficient by nanotechnologies*. Pharm Res, 2003. **20**(10): p. 1565-7.
- Mandal, T.K., Bostanian, L.A., Graves, R.A., and Chapman, S.R., *Poly(D,L-lactide-co-glycolide) encapsulated poly(vinyl alcohol) hydrogel as a drug delivery system*. Pharm Res, 2002. **19**(11): p. 1713-9.
- Marschutz, M.K. and Bernkop-Schnurch, A., *Oral peptide drug delivery: polymer-inhibitor conjugates protecting insulin from enzymatic degradation in vitro*. Biomaterials, 2000. **21**(14): p. 1499-507.
- Mathiowitz, E., Jacob, J.S., Jong, Y.S., Carino, G.P., Chickering, D.E., Chaturvedi, P., Santos, C.A., Vijayaraghavan, K., Montgomery, S., Bassett, M., and Morrell, C., *Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems*. Nature, 1997. **386**(6623): p. 410-4.
- Mesiha, M., Plakogiannis, F., and Vejosoth, S., *Enhanced oral absorption of insulin from desolvated fatty acid-sodium glycocholate emulsions*. Int J Pharm, 1994. **111**(3): p. 213-216.

Mesiha, M.S., Ponnappula, S., and Plakogiannis, F., *Oral absorption of insulin encapsulated in artificial chyles of bile salts, palmitic acid and alpha-tocopherol dispersions*. Int J Pharm, 2002. **249**(1-2): p. 1-5.

Moghimi, S.M., Pavey, K.D., and Hunter, A.C., *Real-time evidence of surface modification at polystyrene lattices by poloxamine 908 in the presence of serum: in vivo conversion of macrophage-prone nanoparticles to stealth entities by poloxamine 908*. FEBS Lett, 2003. **547**(1-3): p. 177-82.

Müller, R.H., Maassen, S., Schwarz, C., and Mehnert, W., *Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes*. Journal of Controlled Release, 1997. **47**: p. 261-269.

Muller, R.H., Maassen, S., Schwarz, C., and Mehnert, W., *Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes*. J Control Release, 1997. **47**(3): p. 261-269.

Nakada, Y., Tudomi, R., Sakurai, K., and Takahashi, Y., *Evaluation of long-circulating nanoparticles using biodegradable ABA triblock copolymers containing of poly(L-lactic acid) A-blocks attached to central poly(oxyethylene) B-blocks in vivo*. Int J Pharm, 1998. **175**: p. 109-117.

Okuda, T., Kawakami, S., Maeie, T., Niidome, T., Yamashita, F., and Hashida, M., *Biodistribution characteristics of amino acid dendrimers and their PEGylated derivatives after intravenous administration*. J Control Release, 2006. **114**(1): p. 69-77.

Oster, C.G., Kim, N., Grode, L., Barbu-Tudoran, L., Schaper, A.K., Kaufmann, S.H., and Kissel, T., *Cationic microparticles consisting of poly(lactide-co-glycolide) and polyethylenimine as carriers systems for parental DNA vaccination*. J Control Release, 2005. **104**(2): p. 359-77.

Passirani, C., Barratt, G., Devissaguet, J.P., and Labarre, D., *Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system*. Life Sci, 1998a. **62**(8): p. 775-85.

Passirani, C., Barratt, G., Devissaguet, J.P., and Labarre, D., *Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate)*. Pharm Res, 1998b. **15**(7): p. 1046-50.

Peracchia, M.T., Fattal, E., Desmaele, D., Besnard, M., Noel, J.P., Gomis, J.M., Appel, M., d'Angelo, J., and Couvreur, P., *Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting*. J Control Release, 1999a. **60**(1): p. 121-8.

Peracchia, M.T., Harnisch, S., Pinto-Alphandary, H., Gulik, A., Dedieu, J.C., Desmaele, D., d'Angelo, J., Muller, R.H., and Couvreur, P., *Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles*. Biomaterials, 1999b. **20**(14): p. 1269-75.

Peracchia, M.T., Vauthier, C., Puisieux, F., and Couvreur, P., *Development of sterically stabilized poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles by chemical coupling of poly(ethylene glycol)*. J Biomed Mater Res, 1997. **34**(3): p. 317-26.

Pinto-Alphandary, H., Aboubakar, M., Jaillard, D., Couvreur, P., and Vauthier, C., *Visualization of insulin-loaded nanocapsules: in vitro and in vivo studies after oral administration to rats*. Pharm Res, 2003. **20**(7): p. 1071-84.

Quellec, P., Gref, R., Perrin, L., Dellacherie, E., Sommer, F., Verbavatz, J.M., and Alonso, M.J., *Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization*. J Biomed Mater Res, 1998. **42**(1): p. 45-54.

Rekhi, G.S., Jambhekar, S.S., Souney, P.F., and Williams, D.A., *A fluorimetric liquid chromatographic method for the determination of propranolol in human serum/plasma*. J Pharm Biomed Anal, 1995. **13**(12): p. 1499-505.

Sadzuka, Y., Nakade, A., Hiram, R., Miyagishima, A., Nozawa, Y., Hirota, S., and Sonobe, T., *Effects of mixed polyethyleneglycol modification on fixed aqueous layer thickness and antitumor activity of doxorubicin containing liposome*. Int J Pharm, 2002. **238**(1-2): p. 171-80.

Setter, S.M., Corbett, C.F., Campbell, R.K., and White, J.R., *Insulin aspart: a new rapid-acting insulin analog*. Ann Pharmacother, 2000. **34**(12): p. 1423-31.

Shi, B., Fang, C., You, M.X., Zhang, Y., Fu, S., and Pei, Y., *Stealth MePEG-PCL micelles: effects of polymer composition on micelle physicochemical characteristics, in vitro drug release, in vivo pharmacokinetics in rats and biodistribution in S180 tumor bearing mice*. Colloid Polym Sci, 2005. **283**: p. 854-967.

Thériaque. *Thériaque Infos Médicaments* [en ligne]. <http://www.theriaque.org/InfoMedicaments/home.cfm?> [page consultée le 16 07 2008]

Toub, N., Bertrand, J.R., Tamaddon, A., Elhamess, H., Hillaireau, H., Maksimenko, A., Maccario, J., Malvy, C., Fattal, E., and Couvreur, P., *Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Flt1 oncogene in Ewing sarcoma*. Pharm Res, 2006. **23**(5): p. 892-900.

Ubrich, N., Bouillot, P., Pellerin, C., Hoffman, M., and Maincent, P., *Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles: a comparative study*. J Control Release, 2004. **97**(2): p. 291-300.

Vandorpe, J., Schacht, E., Dunn, S., Hawley, A., Stolnik, S., Davis, S.S., Garnett, M.C., Davies, M.C., and Illum, L., *Long circulating biodegradable poly(phosphazene) nanoparticles surface modified with poly(phosphazene)-poly(ethylene oxide) copolymer*. Biomaterials, 1997. **18**(17): p. 1147-52.

Verrecchia, T., Spenlehauer, G., Bazile, D.V., Murry-Brelier, A., Archimbaud, Y., and Veillard, M., *Non-stealth (poly(lactic acid/albumin)) and stealth (poly(lactic acid-*

polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers. J Control Release, 1995. 36(1-2): p. 49-61.

Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Simard, P., Leroux, J.C., and Benoit, J.P., *Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. J Biomed Mater Res A, 2006. 78(3): p. 620-8.*

Wang, J., Wang, B.M., and Schwendeman, S.P., *Mechanistic evaluation of the glucose-induced reduction in initial burst release of octreotide acetate from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. Biomaterials, 2004. 25(10): p. 1919-27.*

Yamamoto, A., Taniguchi, T., Rikyu, K., Tsuji, T., Fujita, T., Murakami, M., and Muranishi, S., *Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. Pharm Res, 1994. 11(10): p. 1496-500.*

Yang, A., Yang, L., Liu, W., Li, Z., Xu, H., and Yang, X., *Tumor necrosis factor alpha blocking peptide loaded PEG-PLGA nanoparticles: preparation and in vitro evaluation. Int J Pharm, 2007. 331(1): p. 123-32.*

Zambaux, M.F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., and Vigneron, C., *Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. J Control Release, 1999. 60(2-3): p. 179-88.*

Zambaux, M.F., Faivre-Fiorina, B., Bonneau, F., Marchal, S., Merlin, J.L., Dellacherie, E., Labrude, P., and Vigneron, C., *Involvement of neutrophilic granulocytes in the uptake of biodegradable non-stealth and stealth nanoparticles in guinea pig. Biomaterials, 2000. 21(10): p. 975-80.*

Zheng, C.H., Gao, J.Q., Liang, W.Q., Yu, H.Y., and Zhang, Y.L., *Effects of additives and processing parameters on the initial burst release of protein from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. PDA J Pharm Sci Technol, 2006. 60(1): p. 54-9.*

RÉSUMÉ

Les nanoparticules constituent une forme médicamenteuse d'avenir dans le domaine pharmaceutique. Capables de véhiculer de nombreux principes actifs, elles peuvent les libérer dans l'organisme après administration in vivo mais aussi les piloter vers des cibles prédéfinies.

Ce travail repose sur la préparation, par une technique de double émulsion, de nanoparticules constituées de deux polymères : la poly- ϵ -caprolactone et un polymère polyacrylique et polycationique (Eudragit® RS). La première partie a consisté en la mise au point de nanoparticules encapsulant de l'insuline et capables de la libérer in vitro et in vivo. Ces nanoparticules ont développé une activité hypoglycémiante après administration orale. En effet, l'inconvénient majeur du traitement du diabète par l'insuline reste un mode d'administration contraignant pour le diabétique : la voie injectable. La possibilité d'administrer l'insuline par voie orale constituerait un progrès révolutionnaire dans le domaine de la diabétologie. Les nanoparticules préparées ont donc démontré leur capacité à diminuer le glucose sanguin de rats diabétiques après administration orale. Le mécanisme de passage de l'insuline semble être dû à un contact intime entre le mucus chargé négativement et les nanoparticules de charge opposée créant ainsi un fort gradient local de concentration.

La seconde partie du travail a consisté en la mise au point de nanoparticules dites furtives c'est à dire capables d'éviter leur reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé après administration intraveineuse. L'objectif était de créer un procédé innovant de furtivité reposant sur la formation d'interactions électrostatiques entre l'héparine, glycosaminoglycane polyanionique, et l'Eudragit® RS, polymère polycationique. Le potentiel de furtivité a été démontré par l'augmentation in vivo de la demi-vie plasmatique de deux principes actifs de natures différentes : le chlorhydrate de propranolol et l'insuline.

Mots-clefs : Nanoparticules, insuline, voie orale, furtivité, héparine, Eudragit® RS, voie intraveineuse

SUMMARY

Nanoparticles are innovative dosage forms in drug delivery. They can act as prolonged release dosage forms but they also have the potentiality to target specific physiological compartments after in vivo administration.

This thesis is based on the preparation of nanoparticles according to a double emulsion process. The nanoparticles are formed of two biocompatible polymers: poly- ϵ -caprolactone and a polyacrylic and polycationic polymer (Eudragit® RS). The first part describes the development of insulin-loaded nanoparticles able to release insulin both in vitro and in vivo. It has been demonstrated that such nanoparticles incorporated high amounts of insulin and were able to display a hypoglycemic activity after oral administration. It is well known that the major drawback of diabetes treatment remains the injectable administration route for insulin. The ability to administer insulin orally would be a tremendous progress in the field of diabetes. Our prepared nanoparticles have demonstrated their ability to reduce blood glucose in diabetic rats after oral administration. It is believed that the positively charged insulin-loaded nanoparticles may interact with the negatively charged mucus and create a high local gradient concentration which would favor the intestine permeation.

The second part of the thesis was devoted to the development of stealth nanoparticles able to avoid the recognition by the mononuclear phagocytosis system after intravenous administration. The objective was to create a new system based on the formation of electrostatic interactions between heparin, a polyanionic glycosaminoglycane, and Eudragit® RS, polycationic polymer. The stealth potential has been demonstrated by increasing the in vivo plasma half-life of two drugs namely propranolol hydrochloride and insulin.

Keywords: Nanoparticles, insulin, orale route, stealth, heparin, Eudragit® RS, intravenous administration