

# Les nanosphères « furtives » comme nouvelles formes galéniques injectables : espoirs et réalités

Édith Dellacherie, Ruxandra Gref, Patricia Quellec

*L'amélioration de la biodisponibilité de substances thérapeutiques est un objectif poursuivi depuis plusieurs années par de nombreuses équipes. Les bénéfices attendus sont évidents : optimisation de l'effet thérapeutique, amélioration du confort du malade par la réduction du nombre de prises, diminution de la toxicité, des coûts de santé, etc. L'encapsulation de biomolécules actives dans des nanosphères « furtives », c'est-à-dire invisibles vis-*

*à-vis des macrophages du « système des phagocytes mononucléés », permet d'envisager le développement de nouvelles formes injectables, à persistance intra-vasculaire prolongée et à libération contrôlée. De tels systèmes nanoparticulaires peuvent être élaborés à partir de polymères dégradables, encapsuler des biomolécules instables, y compris des protéines thérapeutiques, avec de bons rendements et influencer sur leur libération.*

De nombreuses thérapeutiques utilisent l'administration parentérale de principes actifs dont l'instabilité, l'insolubilité ou la toxicité peuvent parfois limiter l'efficacité. La mise au point de formes galéniques appropriées constitue un moyen pour surmonter en partie ces difficultés. C'est pourquoi, on observe depuis de nombreuses années un engouement certain pour la recherche de nouveaux systèmes permettant la vectorisation de biomolécules et le contrôle de leur libération. Dans ce domaine, le concept de nanoparticules polymères injectables et dégradables a été particulièrement développé au cours de la dernière décennie en raison des nombreux avantages potentiels, tels que :

- la protection contre la dégradation des principes actifs instables ;
- la réduction des effets toxiques de certains médicaments hautement actifs ;
- l'obtention de profils pharmacocinétiques plus favorables ;
- l'amélioration du confort du patient par la diminution du nombre d'injections ;
- dans certaines conditions, le ciblage de l'action thérapeutique vers des tissus ou des cellules spécifiques.

La nature du vecteur nanoparticulaire joue un rôle important dans son devenir *in vivo* et dans celui du principe actif encapsulé. En particulier, sa surface est un paramètre déterminant, puisque selon sa composition chimique, elle pourra améliorer le franchissement de certaines barrières physiologiques, favoriser la pénétration dans certaines cellules ou au contraire l'empêcher.

En ce qui concerne la nature des polymères constituant les nanosphères, de nombreuses structures ont été décrites et proposées. Parmi elles, les polyesters, comme la poly(-caprolactone), le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide glycolique) [1] sont des candidats de choix. Ces composés sont en effet faciles à préparer dans une gamme variée de masses molaires, et présentent l'avantage d'être dégradés en milieu aqueux par hydrolyse des fonctions ester du squelette, plus ou moins rapidement selon leur structure chimique. Le PLA  $\{HO-[CH(CH_3)-COO]_n-CH(CH_3)-COOH\}$  a été le polymère le plus étudié et utilisé pour la préparation de nanosphères, et il est agréé par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour des injections intraveineuses et intramusculaires. Le PLA est hydro-

phobe, insoluble dans l'eau mais soluble dans de nombreux solvants organiques, et ses produits de dégradation (l'acide lactique en particulier) ne sont pas toxiques.

Les premières expériences d'administration de nanoparticules ont montré que ces dernières sont rapidement capturées par les macrophages du « système des phagocytes mononucléés » (SPM) [2] : elles disparaissent donc très vite de la circulation générale, et seuls les organes du SPM peuvent bénéficier de la libération du principe actif encapsulé. Cette phagocytose résulte de l'établissement d'interactions (ioniques et/ou hydrophobes) entre les vecteurs nanoparticulaires et certaines molécules présentes dans le sang, particulièrement les protéines opsonisantes (opsonines) qui activent le système immunitaire.

Il est donc très rapidement apparu nécessaire de contrôler les propriétés de surface des nanoparticules pour les rendre invisibles vis-à-vis du SPM. Le concept de particules « furtives » était né. Dans le cas des nanosphères de PLA, la surface, comme on le verra plus loin, porte des charges négatives, et possède un caractère hydrophobe. Pour qu'elles soient « furtives », ces particules doivent être

recouvertes d'une couche hydrophile et neutre. Pour cela, l'un des moyens les plus efficaces consiste à utiliser le poly(oxyde d'éthylène), HO-[CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O]<sub>n</sub>-H, représenté par l'abréviation POE, ou PEO pour poly(ethylene oxide), ou encore PEG pour poly(éthylène glycol) de masse molaire inférieure à 20 kDa afin qu'il puisse être éliminé par les voies naturelles. Ce polymère est non toxique et également approuvé par la FDA. D'autres polymères peuvent aussi être utilisés pour effectuer le recouvrement (par exemple des polysaccharides), non seulement pour rendre les particules « furtives » mais également, dans certains cas, pour permettre un ciblage vers des cellules spécifiques.

### Méthodes de fabrication de nanosphères à propriétés de surface contrôlées

Les procédés de fabrication de nanosphères polymères sont nombreux et variés [3] et dépendent de la nature des matériaux utilisés. On citera pour mémoire la réticulation chimique de macromolécules naturelles (protéines, polysaccharides), la polymérisation interfaciale, la précipitation de polymères, en particulier la nanoprecipitation, la méthode de désolvatation et la technique dite émulsion/évaporation de solvant. Ce dernier procédé a été utilisé pour l'encapsulation de nombreuses molécules ou macromolécules, hydrophobes ou hydrophiles [4, 5].

#### Le procédé d'émulsion/évaporation de solvant

Il est fondé sur la formation d'émulsions utilisant des solvants organiques, comme l'acétate d'éthyle ou le chlorure de méthylène, et une phase aqueuse contenant ou non un agent surfactif. Dans le cas d'un principe à encapsuler hydrophobe, celui-ci est dissous dans le solvant organique avec le polymère qui va constituer la matrice, et cette solution est dispersée dans la phase aqueuse en présence d'un tensioactif. Les nanosphères se solidifient au cours de l'évaporation du solvant: il

s'agit d'un procédé d'émulsion simple huile dans eau. Lorsque la molécule à encapsuler est une biomolécule hydrosoluble (protéines, oligonucléotides), le procédé utilisé est dit de double émulsion: une première émulsion est préparée par dispersion d'une solution aqueuse de la biomolécule dans une phase organique contenant le polymère. Cette émulsion est elle-même dispersée dans une autre phase aqueuse renfermant un tensioactif et les nanosphères sont obtenues après évaporation du solvant [5]. Le principe général de ces 2 procédés est représenté sur les figures 1 et 2.

#### Nanosphères à propriétés de surface contrôlées

Le recouvrement de nanosphères hydrophobes par une couche hydrophile peut être obtenu par différentes méthodes: l'adsorption de molécules

amphiphiles (constituées à la fois de segments hydrophiles et hydrophobes) par l'intermédiaire du bloc hydrophobe, a souvent été décrite [6, 7] mais n'offre pas de garantie quant à la stabilité de la couche adsorbée, qui peut être déplacée par les protéines [7]. Une deuxième voie consiste à lier chimiquement un polymère hydrophile à la surface de la nanosphère [8]: la couche est alors bien ancrée, mais le couplage chimique n'est généralement pas facile à réaliser et le recouvrement n'est pas toujours homogène.

Une approche plus récente consiste à utiliser des copolymères amphiphiles directement au cours de la fabrication des nanosphères. Ces copolymères ont une architecture modulable: ils peuvent être séquencés selon le type bibloc (ou plus), comme dans le cas des copolymères monométhoxypoly(oxyde d'éthylène)-poly(acide lactique) (MPOE-PLA, CH<sub>3</sub>-

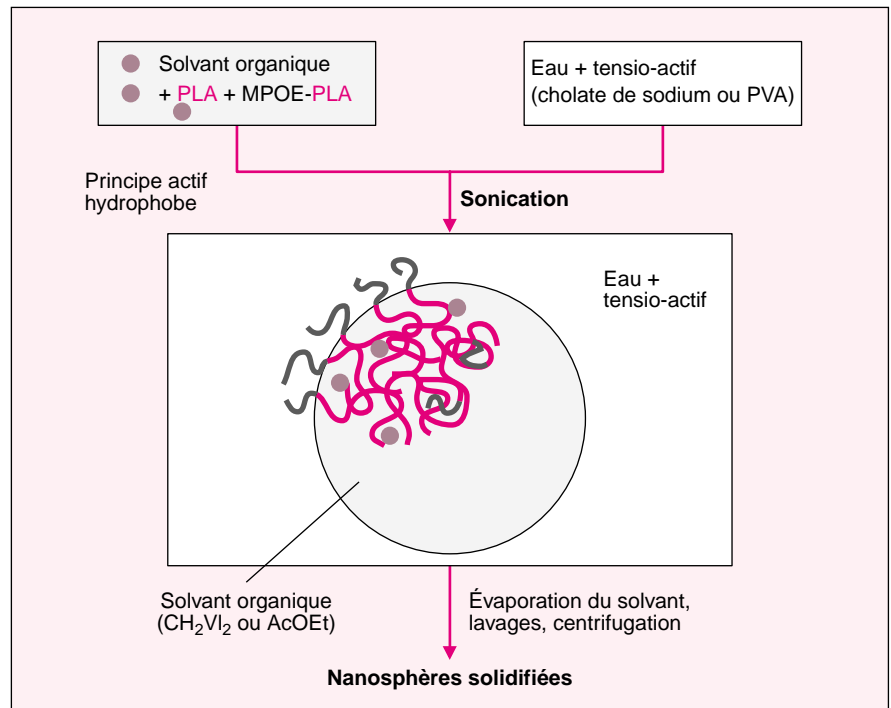


Figure 1. Schéma de principe de la préparation de nanosphères par le procédé d'émulsion simple/évaporation du solvant. Une solution de poly(acide lactique) (PLA), de co-polymère amphiphile monométhoxypoly(oxyde d'éthylène)-poly(acide lactique) (MPOE-PLA) et d'un principe actif hydrophobe dans un solvant organique, est dispersée dans de l'eau contenant du cholate de sodium ou du poly(alcool vinylique) (PVA) comme tensioactif. L'évaporation sous vide du solvant organique de l'émulsion conduit à des nanosphères solidifiées.

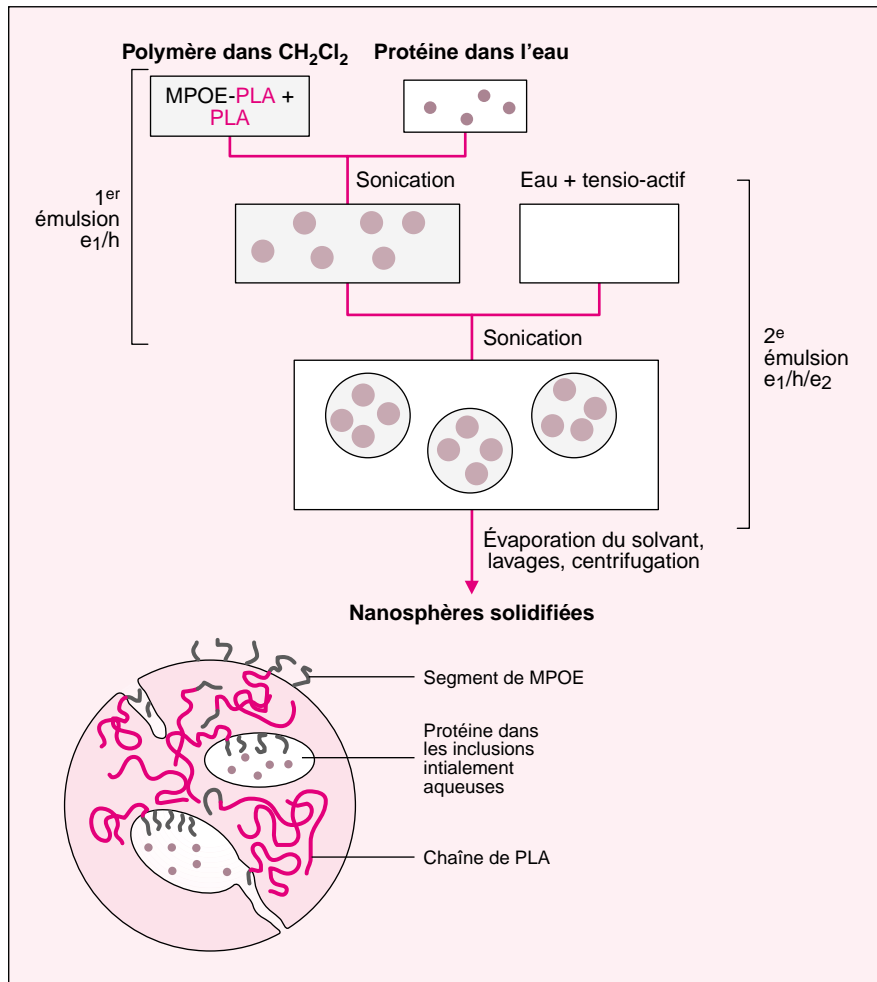


Figure 2. **Schéma de principe de la préparation de nanosphères par le procédé d'émulsion double/évaporation du solvant pour l'encapsulation de protéines.** La première émulsion huile dans eau, est faite comme décrit dans la figure 1 mais, dans la phase aqueuse, la protéine joue le rôle de stabilisant de l'émulsion. La seconde émulsion (eau dans huile dans eau), est réalisée par dispersion de la première dans de l'eau contenant un tensioactif. La structure attendue des nanosphères obtenues après évaporation du solvant organique de la double émulsion est représentée sous le schéma de l'émulsion.

$[O-CH_2-CH_2]_n-[OCO-CH(CH_3)]_p-OH$  (figure 3). C'est le cas également des copolymères de MPOE avec du poly(acide glycolique-co-acide lactique), de la poly( $\epsilon$ -caprolactone) [9], du poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) [10]. Ils peuvent également avoir une architecture en peigne, avec un squelette polymère hydrophile et des chaînes pendantes hydrophobes, tels que les dérivés amphiphiles de polysaccharides présentés sur la figure 3 [11, 12]. Des copolymères amphiphiles en peigne de cyanoacrylate de MPOE-co-cyanoacrylate d'hexadécyle

ont également été proposés pour la préparation de nanosphères « furtives » [13]. La solubilité dans l'eau de toutes ces espèces dépend du rapport entre les deux fragments hydrophile et hydrophobe.

En ce qui concerne les nanosphères préparées à partir de MPOE-PLA, le copolymère le plus étudié, elles peuvent être obtenues par une méthode de désolvatation [14], mais la technique probablement la plus utilisée pour ce type de copolymère fait appel aux procédés d'émulsion décrits dans les figures 1 et 2.

**Utilisation de copolymères amphiphiles insolubles dans l'eau, du type MPOE-PLA**

Les nanosphères à surface polyoxyéthylénique sont préparées selon le principe représenté sur la figure 1 (simple émulsion : cas de l'encapsulation de principes actifs hydrophobes) et la figure 2 (double émulsion : cas de l'encapsulation de biomolécules hydrosolubles). Dans les deux cas, par suite de la différence de solubilité des deux blocs MPOE et PLA dans les phases aqueuse et organique, respectivement, (MPOE est très soluble dans l'eau et PLA est très soluble dans le solvant organique) les blocs de MPOE ont tendance à migrer vers la phase aqueuse, ce qui conduit à une organisation du copolymère à l'interface. Des analyses physico-chimiques variées ont démontré qu'après l'évaporation du solvant organique, la couronne externe des nanosphères était effectivement enrichie en chaînes de poly(oxyde d'éthylène) disposées en brosse, le

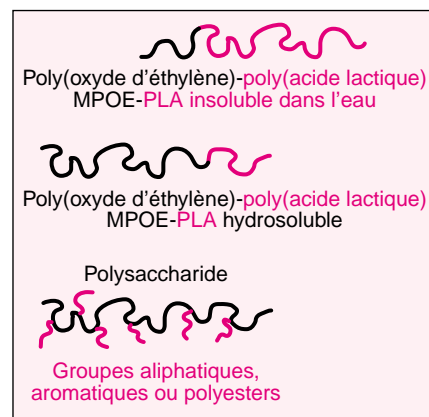


Figure 3. **Structure schématique de quelques copolymères amphiphiles utilisés dans la préparation de nanosphères « furtives » par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant.** Les copolymères à blocs du type monométhoxypoly(oxyde d'éthylène)-poly(acide lactique) (MPOE-PLA) peuvent être soit insolubles dans l'eau (longue chaîne de PLA, chaîne courte de MPOE), soit hydrosolubles dans les conditions inverses. Pour les polymères en peigne, la solubilité dans l'eau dépend en particulier de la longueur des chaînes hydrophobes et de leur taux de substitution sur le squelette polysaccharidique.

cœur étant majoritairement constitué de chaînes de PLA [9, 15-18]. Dans le cas de la double émulsion, on peut supposer que les protéines sont encapsulées au sein d'inclusions aqueuses comme cela est présenté sur la *figure 2*, mais cette hypothèse est difficile à vérifier.

#### Utilisation de copolymères amphiphiles hydrosolubles

Une autre façon de préparer des nanosphères à cœur de PLA recouvertes de polymères hydrophiles par le même procédé d'émulsion/évaporation de solvant est schématisée sur la *figure 4*. La méthode utilise les propriétés émulsionnantes des copolymères amphiphiles hydrosolubles (à blocs ou en peigne) présentés sur la *figure 3*. Ces polymères servent à stabiliser l'émulsion et se positionnent à l'interface huile/eau. Après l'évaporation du solvant organique, les nanosphères obtenues présentent les propriétés de surface correspondant au fragment hydrophile du copolymère émulsionnant [11].

### Encapsulation de protéines dans des nanosphères de PLA à surface polyoxyéthylénique

#### Propriétés de surface

En pratique, la présence de chaînes de POE à la surface des nanosphères de PLA peut être mise en évidence par des techniques d'analyse de surface [16], par un test colorimétrique après hydrolyse alcaline contrôlée [17] ou par RMN du proton [18]. L'effet de ces chaînes, de leur longueur et de leur concentration surfacique sur les propriétés de surface des nanoparticules peut être étudié à l'aide de méthodes variées, faisant appel à la détermination de l'adsorption de protéines telles que l'albumine [11, 16], les protéines plasmatiques [19, 20] ou encore le système du complément [21, 22]. Dans tous les cas étudiés, on observe une réduction importante de l'adsorption des protéines par rapport à celle obtenue avec des nanosphères de PLA nues. Des résultats similaires ont été également rapportés concernant le rôle de POE à la surface de nanoparticules préparées à partir de

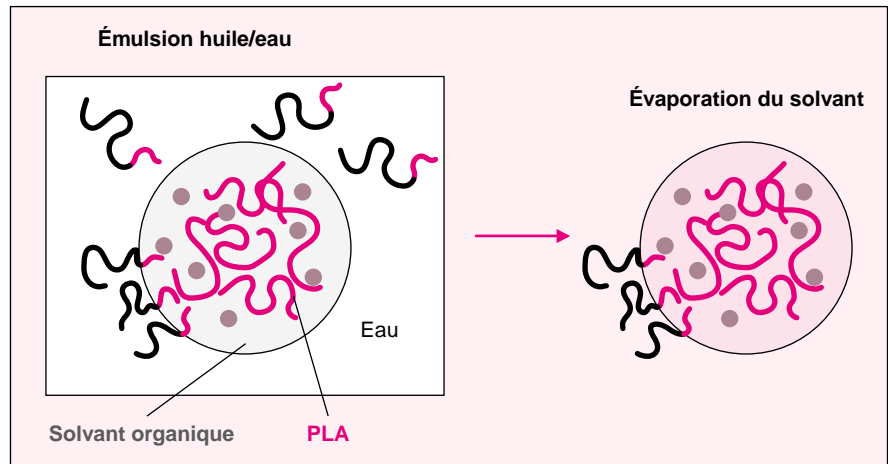


Figure 4. Schéma de principe de la préparation de nanosphères « furtives » par le procédé d'émulsion simple/évaporation du solvant à partir de copolymères amphiphiles hydrosolubles. L'émulsion est obtenue par dispersion d'une phase organique contenant du poly(acide lactique) (PLA) et un principe actif hydrophobe, dans une phase aqueuse renfermant du copolymère amphiphile (à blocs ou en peigne) utilisé comme tensioactif. Après évaporation du solvant, les fragments hydrophiles des copolymères amphiphiles sont localisés à la périphérie des nanosphères récupérées après évaporation du solvant organique.

copolymères amphiphiles dérivés de poly(cyanoacrylate), par polymérisation interfaciale [10] ou par nanopréciipitation [23].

L'action des chaînes de POE en surface se manifeste également lorsque les nanosphères sont placées au contact de cellules phagocytaires. A titre d'exemple, la *figure 5A* illustre les résultats obtenus lorsque des nanosphères préparées à partir de mélanges de MPOE-PLA et de PLA sont mises en contact avec des cellules monocytaires [24]. L'importance de la capture par les cellules des particules contenant une sonde fluorescente, le rubrène, est quantifiée par cytométrie de flux. On constate que la phagocytose des nanosphères de PLA nues est importante mais qu'elle diminue au fur et à mesure que la proportion de MPOE dans le mélange MPOE-PLA/PLA augmente, c'est-à-dire que la probabilité de présence des chaînes de MPOE en surface croît. Le seuil observé, à partir de 2% de MPOE dans le mélange, pourrait correspondre à la densité maximale de chaînes de MPOE susceptibles de se disposer en brosse à la surface. Par un calcul simple, en supposant que toutes les chaînes de MPOE sont en

brosse à la surface, il est possible de montrer que ce seuil correspond à une distance de l'ordre de 2-3 nm entre les chaînes de MPOE à la surface de la nanosphère. Au-delà de 2%, la distance théorique devient très faible et une partie des chaînes de MPOE reste enfouie dans le cœur de la particule. Des résultats analogues sont obtenus en utilisant des cellules polymorphonucléaires humaines [20].

Parallèlement, en mesurant le potentiel zéta des nanosphères contenant des taux croissants de MPOE [20, 24], on constate qu'il est égal à environ -60 mV pour les particules de PLA nues (présence des extrémités de chaînes carboxylates chargées négativement du PLA) et que sa valeur absolue diminue progressivement jusqu'à être proche de zéro à partir d'environ 10 % de MPOE dans le mélange MPOE-PLA/PLA (*figure 5B*). Toutes ces analyses indiquent que la présence de chaînes de MPOE à la surface des nanosphères de PLA masque à la fois le caractère hydrophobe et ionique du PLA, entraînant une diminution de l'adsorption des protéines et par voie de conséquence, de celle de la phagocytose. Le masquage est d'autant plus efficace que



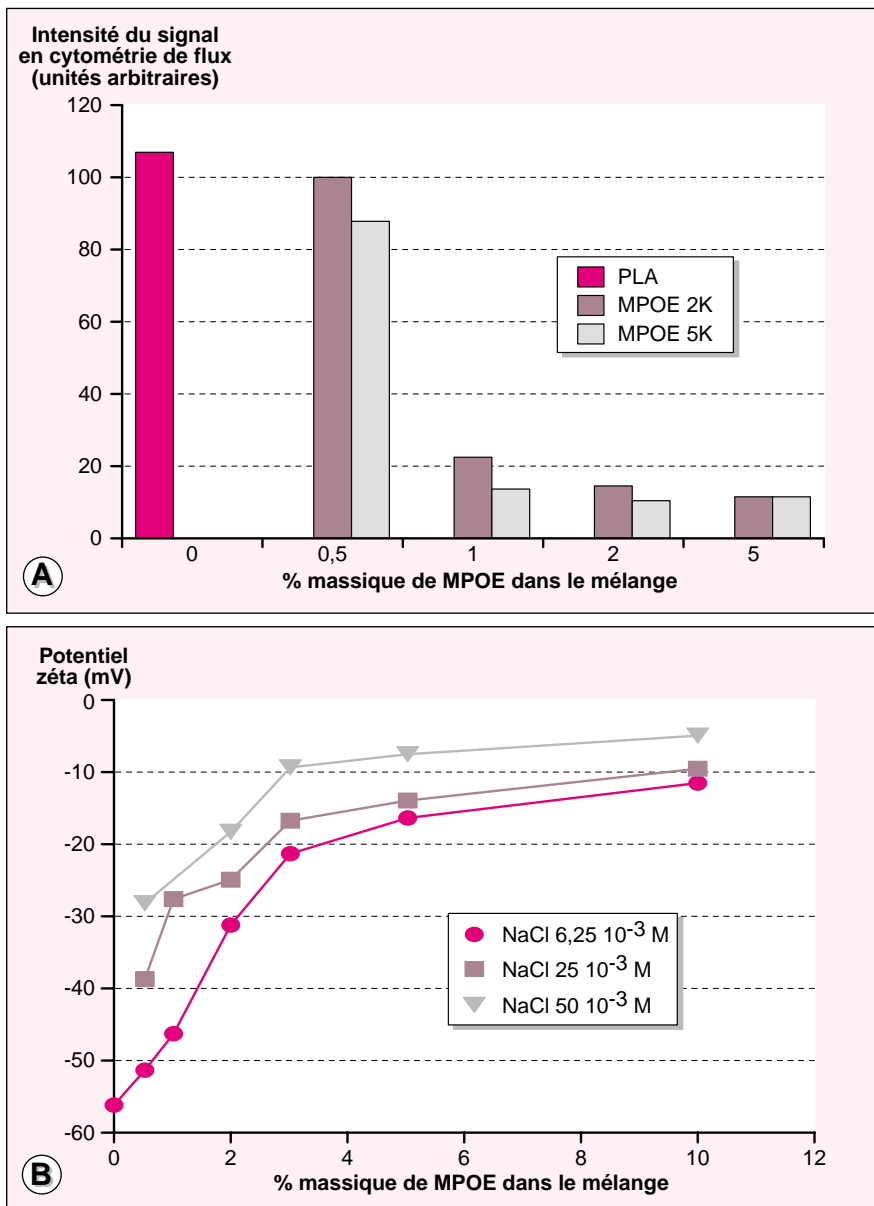


Figure 5. Effet du pourcentage massique de MPOE dans le mélange MPOE-PLA45K/PLA90K constituant les nanosphères, sur la phagocytose A. et sur le potentiel zéta B. des nanosphères (diamètre: 200 nm). K = kDa. A. MPOE2K-PLA45K (copolymère de MPOE 2 kDa et de PLA 45 kDa) et MPOE5K-PLA45K. B. MPOE5K-PLA45K. Les traits d'interpolation n'ont été représentés que pour faciliter la lecture.

les chaînes de MPOE sont longues et que leur taux de présence à la surface est important, ou en d'autres termes que la « brosse » superficielle de MPOE est épaisse et compacte [24]. Des résultats analogues ont été obtenus avec des particules préparées par désolvatation à partir de copolymères dibloc (POE-PLA) et tribloc (PLA-POE-PLA) [25]. Dans le cas du tri-

bloc, le POE se positionne en boucle à la surface et, si les chaînes sont courtes, la protection vis-à-vis de la capture cellulaire est aussi bonne que pour les chaînes en « brosse ».

#### Encapsulation de protéines

L'encapsulation de médicaments hydrophobes dans des nanosphères

« furtives » à base de MPOE-PLA, se fait facilement en utilisant le procédé de simple émulsion décrit dans la figure 1. Ainsi il a été montré que la cyclosporine A [15], la lidocaïne [26], la prednisolone ou la dexaméthasone étaient encapsulées avec un haut taux de charge et que leur libération pouvait être modulée en faisant varier la composition du copolymère [26] et la taille des nanosphères [15].

L'encapsulation de macromolécules hydrosolubles de taille importante, telles que des protéines, dans des nanosphères de taille voisine de 200 nm, constituait *a priori* un problème plus difficile à résoudre. Le développement important de l'utilisation des protéines d'intérêt thérapeutique pose cependant la question récurrente de leur stabilité quel que soit le type d'administration, et donc de leur durée de vie biologique. L'une des réponses à cette question réside dans l'encapsulation dans des particules, qui pourrait permettre à la fois une protection contre les agressions chimiques et enzymatiques, et une libération prolongée, contrôlée, voire ciblée. L'encapsulation de protéines dans des microsphères a fait l'objet de nombreuses études [27-30], mais ce type de particules n'est pas adaptée à l'administration intra-veineuse.

La faisabilité de l'encapsulation de protéines dans des nanosphères « furtives » a été démontrée à la fois en utilisant une protéine modèle, l'albumine de sérum humain (HSA), et des protéines d'intérêt thérapeutique [30-33]. L'opération est réalisée en utilisant le procédé de double émulsion représenté sur la figure 2. Ainsi, la charge des nanosphères en HSA peut être aussi élevée que 11 % (masse de protéine par rapport à la masse totale de particules). Il est possible de contrôler le profil de libération *in vitro* de la protéine en modulant la taille des nanosphères (entre 200 et 450 nm), les plus petites offrant une libération progressive sur une durée de 15 jours, alors que la libération est extrêmement limitée avec les plus grosses (figure 6A) [31]. Cette différence est à l'évidence à mettre sur le compte de la surface spécifique des nanosphères, les plus

grosses offrant au milieu environnant, pour une masse fixée de particules, une surface de contact plus faible que les plus petites. De la même façon, la composition chimique des nanosphères a un rôle important dans la libération de la HSA, comme le montre la *figure 6B* [31]. Ces expériences étant réalisées *in vitro*, c'est-à-dire dans un volume limité, la faible valeur obtenue au plateau est imposée par le coefficient de partage de la protéine entre le liquide et les particules solides.

La protéine C est une protéine de la coagulation, dont le déficit est considéré comme un facteur important de risques thrombotiques. Ces troubles, comme ceux provoqués par des déficits en facteur VIII et facteur IX, peuvent être prévenus par administration parentérale de concentrés de ces protéines. Compte-tenu de leur faible durée de vie, il est donc parfois nécessaire, lorsque la déficience est importante, de répéter les injections chez le patient, ce qui ne va pas sans présenter d'inconvénients. L'idée d'encapsuler ces protéines dans des structures protectrices peut donc apparaître comme extrêmement séduisante. Des essais précédents d'encapsulation du facteur VIII dans des liposomes (vésicules sphériques ayant une membrane phospholipidique recouvrant une cavité centrale remplie d'une phase aqueuse) destinés à une administration orale [34] n'avaient pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. De même, l'incorporation du facteur IX dans des globules rouges a été décrite en 1979 [35], mais ce travail est resté sans suite. Récemment, la protéine C a été encapsulée dans des nanosphères « furtives » à base de MPOE-PLA [33]. Le taux d'encapsulation est élevé (jusqu'à 70 % de la quantité initiale de protéine C présente dans la phase aqueuse de la première émulsion) et le profil de libération est, comme précédemment, influencé par la taille des nanosphères et leur composition chimique. L'activité antigénique de la protéine libérée dépend des conditions de l'émulsion et de la composition chimique des nanosphères et peut être pratiquement totalement conservée après optimisation de ces paramètres [33].

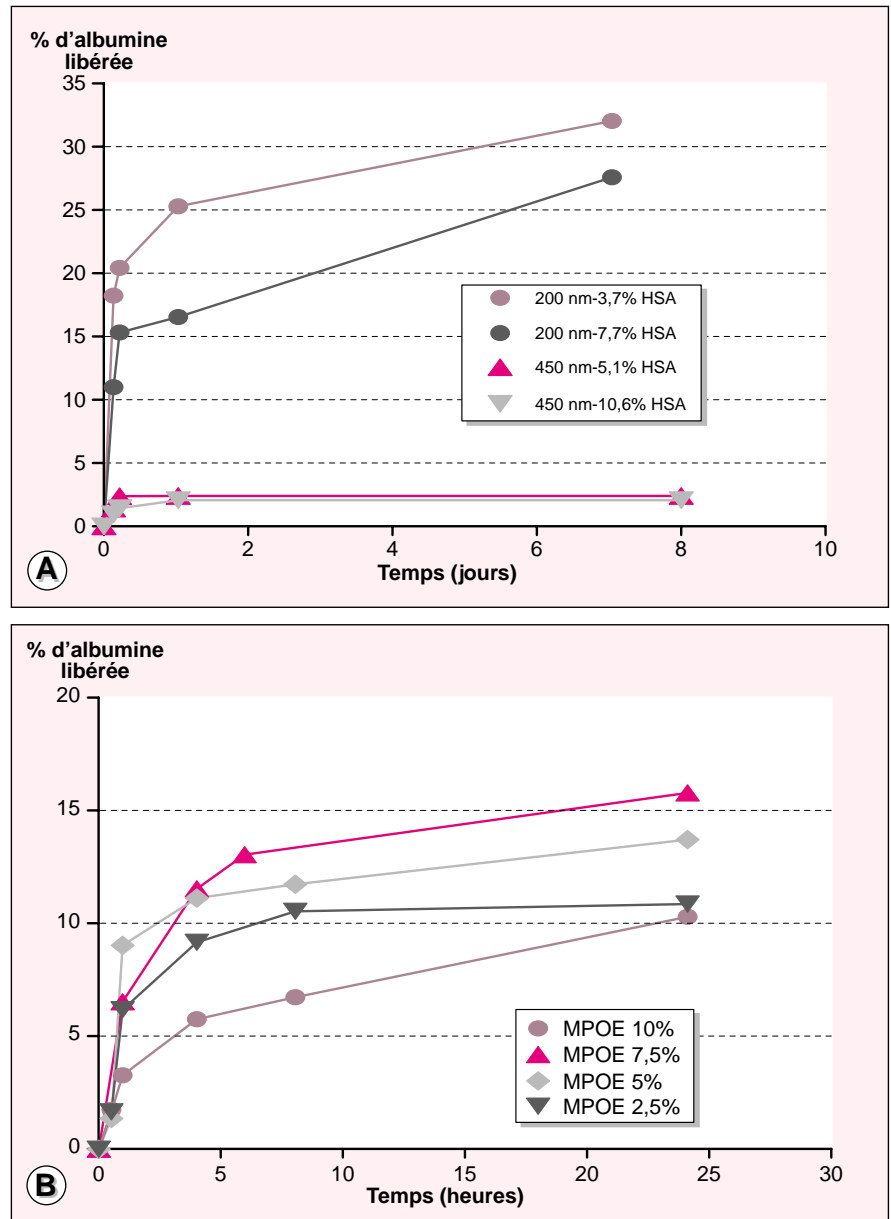


Figure 6. Évolution des profils de libération *in vitro* de HSA encapsulée dans des nanosphères « furtives » en fonction de la taille des particules (A), et de leur composition (B). A. « % HSA » indique la charge massique théorique de HSA, exprimée par rapport à la masse de particule. Le pourcentage d'albumine libérée est exprimé par rapport à la charge massique théorique. B. nanosphères de 200 nm de diamètre avec une charge massique théorique de 10 % en HSA, constituées de mélanges de MPOE5K-PLA45K/PLA50K avec des pourcentages massiques variables de MPOE.

Dans le même ordre d'idées, Tobio *et al.* [30] ont comparé l'antigénicité de la toxine tétanique (TT) libérée à partir de nanosphères de PLA et de nanosphères de MPOE-PLA (150 nm), et ont constaté qu'elle était bien meilleure dans le cas des particules de copolymère. On peut

supposer que la présence, au moment de la première émulsion et au sein des nanosphères, de chaînes de MPOE (*figure 2*) hydrophiles et capables d'empêcher l'adsorption des protéines, limite l'interaction hydrophobe dénaturante entre protéine et PLA.

Les résultats des premiers essais d'administration de protéine C encapsulée, réalisés *in vivo* sur des cobayes, sont prometteurs : d'une part ils permettent de mettre clairement en évidence le caractère « furtif » des nanosphères à base de MPOE-PLA par rapport à celles de PLA nues. En effet, 9 minutes après l'injection de sphères de PLA, des nanoparticules sont détectées dans les cellules phagocytaires du sang périphérique, alors qu'il faut attendre près de 11 heures dans le cas des nanosphères à base de MPOE-PLA [36]. Des résultats comparables ont été obtenus avec la TT encapsulée, dans le cadre d'expériences menées *in vivo* sur des souris [30].

## Conclusions

Les nombreuses études réalisées au cours des dix dernières années ont mené à des résultats qui pourraient permettre d'être optimiste quant à l'utilité de telles formes galéniques : les nanosphères, en particulier celles à base de MPOE-PLA, sont faciles à préparer à partir de polymères dont la synthèse est simple et bien maîtrisée, leur taille peut être contrôlée, leur surface est telle que l'adsorption des protéines est extrêmement réduite ainsi que la capture par les macrophages du SPM, conduisant à une prolongation significative de la persistance intra-vasculaire des particules. On peut y encapsuler des médicaments hydrophobes et surtout des protéines, macromolécules hydrosolubles souvent instables, avec des taux de charge importants. De plus, en agissant sur différents paramètres comme par exemple la composition chimique des nanosphères, on parvient à moduler la cinétique de libération de la molécule encapsulée. Par ailleurs, si la couverture de poly(oxyde d'éthylène) n'autorise pas la fixation ultérieure de molécules de reconnaissance (sucres, anticorps...) vis-à-vis de cellules spécifiques, en raison du manque de réactivité chimique du polymère, il faut signaler qu'en remplaçant ce POE par un polysaccharide neutre comme le dextrane, de manière à ce qu'il se place en position aplatie (« side-on ») à la surface, il est possible d'obtenir des nanosphères « furtives » [37]. Le dex-

trane, quant à lui, possède de nombreuses fonctions hydroxyles, qui se prêtent très bien au couplage de molécules chimiques variées. Malgré toutes ces données encourageantes, ce type de vecteurs nanoparticulaires n'a pas connu jusqu'à présent de développement industriel, contrairement aux liposomes « furtifs » (c'est-à-dire recouverts de poly(oxyde d'éthylène), dont l'utilité en thérapeutique anticancéreuse est testée depuis quelques années [38], et dont une forme chargée en doxorubicine a été récemment mise sur le marché pour le traitement du sarcome de Kaposi (Caelix, Alza Corp). Il est vrai que les liposomes ont fait l'objet de beaucoup plus d'études et d'essais biologiques que les nanosphères, principalement parce ces vésicules ont une structure membranaire très proche de celle des cellules. Cependant, la stabilité des liposomes est souvent contestée alors que les nanosphères devraient permettre un meilleur contrôle de la libération des molécules bioactives. Par ailleurs, plusieurs demandes de brevets sur les nanosphères « furtives » ont été déposées en France et à l'étranger au cours de la dernière décennie. L'ensemble des expérimentations nécessaires pour obtenir l'autorisation de mise sur le marché de formes galéniques à base de copolymères de synthèse représentent une étape longue et coûteuse. Cette démarche ne pourra être engagée que pour un principe actif pour lequel le bénéfice thérapeutique apporté par la nouvelle forme galénique est suffisamment décisif ■

### E. Dellacherie

UMR Cnrs-INPL 7568, Groupe ENSIC, BP 451, 54001 Nancy Cedex, France.

### R. Gref

UMR Cnrs 8612, Centre d'études pharmaceutiques, 92296 Châtenay-Malabry, France.

### P. Quellec

Rhône-Poulenc Industrialisation, 69153 Décines-Charpieu, France.

## RÉFÉRENCES

- Lewis DH. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin M, Langer R, ed. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. New York: Marcel Dekker, 1990: 1-41.
- Stossel TP, Mason RJ, Hartwig J, Vaughan M. Quantitative studies of phagocytosis by polymorphonuclear leucocytes. Use of emulsions to measure the initial rate of phagocytosis. *J Clin Invest* 1972; 51: 615-24.
- Alonso MJ. Nanoparticulate drug carrier technology. In: Cohen S, Bernstein H, ed. *Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines*. Drug and pharmaceutical sciences 1996; 77: 203-42.
- Gurny R, Peppas NA, Harrington DD, Banker GS. Development of biodegradable and injectable lattices for controlled release of potent drugs. *Drug Dev Ind Pharm* 1981; 7: 1-25.
- Blanco MD, Alonso MJ. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *Eur J Pharmacol Biopharm* 1997; 43: 287-94.
- Müller RH. *Colloidal carriers for controlled drug delivery and targeting*. Boca Raton: CRC Press, 1991.
- Petrak K. Design and properties of particulate carriers for intravascular administration. In: Rolland A ed. *Pharmaceutical particulate carriers*. New York: Marcel Dekker, 1993.
- Müller BG, Kissel T. Camouflage nanospheres: a new approach to by-passing phagocytic blood clearance by surface modified particulate carriers. *Pharm Pharmacol Lett* 1993; 3: 67-70.
- Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Langer R. Biodegradable long-circulating nanospheres. *Science* 1994; 263: 1600-3.
- Peracchia MT, Vauthier C, Passirani C, Couvreur P, Labarre D. Complement consumption by poly(ethylene glycol) in different conformations chemically coupled to poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. *Life Sciences* 1997; 61: 749-61.
- Rouzes C, Gref R, Léonard M, Delgado A, Dellacherie E. Surface modification of polylactic acid nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique. *J Biomed Mater Res* 2000; 50: 557-65.
- Ydens I, Rutot D, Degée P, Six JL, Dellacherie E, Dubois P. Controlled synthesis of poly(?-caprolactone)-grafted dextran copolymers as potential environmentally friendly surfactants. *Macromolecules* 2000; 33: 6713-21.
- Peracchia MT, Desmaële D, Couvreur P, d'Angelo J. Synthesis of a novel poly(MePEG cyanoacrylate-co-alkyl cyanoacrylate) amphiphilic copolymer for nanoparticle technology. *Macromolecules* 1997; 30: 846-51.
- De Jaeghere F, Allémann E, Leroux JC, et al. Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and *in vitro* cell uptake. *Pharm Res* 1999; 16: 859-66.



## RÉFÉRENCES

15. Quellec P. Nanosphères «furtives» à base de copolymères biodégradables pour la libération contrôlée de principes actifs hydrophobes et de protéines. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 1997, Nancy, France.
16. Quellec P, Gref R, Perrin L, *et al*. Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res* 1998; 42 : 45-54.
17. Bazile D, Prud'homme C, Bassoulet MT, Marlard M, Spenlehauer G, Veillard M. Stealth MePEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the Mononuclear Phagocyte System. *J Pharm Sci* 1995; 17 : 493-8.
18. Hrkach JS, Peracchia MT, Domb A, Lotan N, Langer R. Nanotechnology for biomaterials engineering: structural characterization of amphiphilic nanospheres using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Biomaterials* 1997; 18 : 27-30.
19. Tan J, Butterfield C, Voycheck C, Cawell C, Li J. Surface modification of nanoparticles by PEO/PPO block copolymers to minimize the interactions with blood components and prolong blood circulation in rats. *Biomaterials* 1993; 14 : 823-33.
20. Gref R, Lück M, Quellec P, *et al*. Stealth corona-core nanoparticles modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytosis uptake and plasma protein adsorption. *Colloid Surface B: Biointerfaces* 2000; 18 : 301-13.
21. Vittaz M, Basile D, Spenlehauer G, *et al*. Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators. *Biomaterials* 1996; 17 : 1575-81.
22. Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, Dellacherie E, Vigneron C. MPEO-PLA nanoparticles: effect of MPEO content on some of their surface properties. *J Biomed Mater Res* 1999; 44 : 109-15.
23. Peracchia MT, Harnisch S, Pinto-Alphandary H, *et al*. Visualization of *in vitro* protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 1999; 20 : 1269-75.
24. Gref R, Miralles G, Dellacherie E. Polyoxyethylene-coated nanospheres: effect of coating on zeta potential and phagocytosis. *Polym Int* 1999; 48 : 251-6.
25. De Jaeghere F, Allémann E, Feijen J, Kissel T, Doelker E, Gurny R. Cellular uptake of PEO surface-modified nanoparticles: evaluation of nanoparticles made of PLA: PEO diblock and triblock copolymers. *J Drug Target* 2000; 8 : 143-53.
26. Peracchia MT, Gref R, Minamitake Y, Domb A, Lotan N, Langer R. PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: investigation of their drug encapsulation and release characteristics. *J Control Release* 1997; 46 : 223-31.
27. Okada H, Toguchi H. Biodegradable microspheres in drug delivery. *Crit Rev Therapeut Drug Carrier Syst* 1995; 12 : 1-99.
28. Youxin L, Volland C, Kissel T. *In vitro* degradation and bovine serum albumin release of the ABA triblock copolymers consisting of poly(L(+)-lactic acid), or poly(L(+)-lactic acid-co-glycolic acid) A-blocks attached to central polyoxyethylene B-blocks. *J Control Release* 1994; 32 : 121-8.
29. Bouillot P, Sommer F, Duc TM, Loeffler JP, Dellacherie E. Protein encapsulation in biodegradable amphiphilic microspheres. II. Microsphere characterization and release profiles. *Int J Pharm* 1999; 181 : 159-72.
30. Tobio M, Gref R, Sanchez A, Langer R, Alonso MJ. Stealth PLA-PEG nanoparticles as nasal protein delivery systems. *Pharm Res* 1998; 15 : 274-9.
31. Quellec P, Gref R, Dellacherie E, Sommer F, Tran MD, Alonso MJ. Protein encapsulation within poly(ethylene glycol)-coated nanospheres. II. Controlled release properties. *J Biomed Mater Res* 1999; 47 : 388-95.
32. Song CX, Labhasetwar V, Murphy H, *et al*. Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular use. *J Control Release* 1997; 43 : 97-112.
33. Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, Dellacherie E, Vigneron C. Protein C-loaded monomethoxypoly(ethylene oxide)-poly(lactic acid) nanoparticles. *Int J Pharm* 2001; 212 : 1-9.
34. Kirby CJ, Gregoriadis G. Preparation of liposomes containing factor VIII for oral treatment of haemophilia. *J Microencapsulation* 1984; 1 : 33-45.
35. Godsmith JC, Roer MES, Orringer EP. A new strategy for hemophilia B: incorporation of factor IX into red cell ghosts. *Am J Hematol* 1979; 7 : 119-25.
36. Zambaux MF, Faivre-Fiorina B, Bonneaux F, *et al*. Involvement of neutrophilic granulocytes in the uptake of biodegradable non-stealth and stealth nanoparticles in guinea pig. *Biomaterials* 2000; 21 : 975-80.
37. Österberg E, Bergström K, Holmberg K, *et al*. Protein rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations: comparison to PEG. *J Biomed Mater Res* 1995; 29 : 741-7.
38. Martin JM. Future prospects for stealth liposomes in cancer therapy. *Oncology* 1997; 11 : 63-8.

## TIRÉS À PART

E. Dellacherie.

## Summary

### «Stealth» nanospheres as new injectable drug carriers: a promising way?

The improvement of drug delivery is a major challenge in pharmacology and a great number of studies have aimed toward this goal during the last years. The main expected benefits are: the optimisation of the therapeutic effect, the improvement of the patient comfort, a toxicity decrease... Among the various approaches which have been investigated, one of them relies on encapsulating active molecules in nanospheres (of about 100-200 nm) prepared from appropriate polymers, especially when intra-venous injection is required. Poly lactic acid (PLA) is a good candidate for this purpose, since it is well tolerated by the organism, and slowly degraded *in vivo* into non-toxic compounds. Many examples of drug encapsulation in PLA nanospheres have been described in the literature, and the emulsion/solvent evaporation procedure is often used for this nanosphere encapsulation. However, when nanoparticles are injected into an organism, their surface properties (both hydrophobicity and charge)

provoke the adsorption of opsonines, and consequently their phagocytosis by the macrophages of the Mononuclear Phagocyte System (MPS). As a result, the particles quickly disappear from the blood stream and accumulate in the MPS organs. To overcome these setbacks, nanospheres can be covered by a neutral hydrophilic layer to generate corona-core particles in which the corona is made of polyoxyethylene (POE) or polysaccharide chains. These particles can be prepared directly from amphiphilic copolymers (consisting of hydrophilic and hydrophobic segments) through various different methods, the most common being the emulsion/solvent evaporation procedure. POE coverage leads to the decrease of phagocytosis by macrophages, which parallels that of the nanosphere zeta potential and protein adsorption. In this paper, examples of hydrophobic drug and protein encapsulation are presented, and the release kinetics discussed with respect to the nanosphere size and composition.