



HAL
open science

Nanocapsules lipidiques de paclitaxel et cancer bronchique : premières données d'efficacité et de toxicité chez la souris et méthodes d'aérosolisation à partir de lots précliniques

José Hureauux

► **To cite this version:**

José Hureauux. Nanocapsules lipidiques de paclitaxel et cancer bronchique : premières données d'efficacité et de toxicité chez la souris et méthodes d'aérosolisation à partir de lots précliniques. Médicaments. Université d'Angers, 2009. Français. NNT : . tel-00492820

HAL Id: tel-00492820

<https://theses.hal.science/tel-00492820>

Submitted on 17 Jun 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NANOCAPSULES LIPIDIQUES DE PACLITAXEL ET CANCER BRONCHIQUE :
PREMIERES DONNEES D'EFFICACITE ET DE TOXICITE CHEZ LA SOURIS
ET METHODES D'AEROSOLISATION A PARTIR DE LOTS PRECLINIQUES

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Pharmacologie expérimentale et clinique
Ecole doctorale : Biologie / Santé

Présentée et soutenue publiquement
le 16 décembre 2009
à la Faculté de Pharmacie d'Angers
par José Hureauux

Devant le jury ci-dessous :

M.	Thierry	URBAN	(examineur)	Professeur	Université d'Angers
M.	Jean-Pierre	BENOIT	(président du jury)	Professeur	Université d'Angers
Mme	Marie	WISLEZ	(rapporteur)	Professeur	Université de Paris VI
M.	William	COUET	(rapporteur)	Professeur	Université de Poitiers
M.	Alain	LE PAPE	(examineur)	DR	CNRS
M.	Frédéric	LAGARCE	(examineur)	MCU-PH	Université d'Angers

Directeur de thèse : Professeur Thierry URBAN
Co-directeur de thèse : Professeur Frédéric GAGNADOUX
Co-encadrant : Frédéric LAGARCE, MCU-PH

Laboratoire d'accueil : Unité INSERM 646
Bâtiment IBT
10, rue Boquel
49100 Angers

Cette thèse est dédiée à Raphaëlle, Caroline et Jérôme.

Je remercie ma famille pour son soutien tout au long de mes études médicales.

Je remercie Thierry Urban pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail et pour avoir accepté de diriger ma thèse.

Je remercie Frédéric Gagnadoux et Frédéric Lagarce pour avoir co-dirigés cette thèse.

Je remercie Jean-Pierre Benoît pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans l'unité INSERM 646 et avoir accepté de présider le jury de thèse.

Je remercie les Professeurs Wislez et Couet pour avoir acceptés d'être rapporteurs.

Je remercie Alain Le Pape pour avoir accepté d'être membre du jury.

Je remercie Jean-Louis Racineux pour m'avoir encouragé à réaliser cette thèse.

Je remercie tous les membres de l'unité INSERM 646 pour leurs précieux conseils.

Je remercie particulièrement Anne Clavreul, Emilie Roger et Patrick Saulnier.

Je remercie Marie-Christine Rousselet, Marc Zandecki, Valérie Moal et Marie Kempf pour leur collaboration dans leur domaine d'expertise respectif.

Je remercie Patrice Diot, Etienne Lemarié et Francis Gauthier pour m'avoir permis de réaliser les tests de nébulisation au sein de l'unité INSERM 618 à Tours.

Je remercie Laurent Vecellio et Sandrine Le Guellec pour leur aide lors des tests de nébulisation.

Je remercie Stéphanie Lerondel et toute l'équipe du CIPA pour leur collaboration.

Je remercie Joël Guillemain pour ses conseils en toxicologie.

Je remercie Pierre Legras et Jérôme Roux du Service commun animalerie hospitalo-universitaire du CHU d'Angers pour leur aide.

Résumé :

Les nanocapsules lipidiques (NCL) sont une formulation sans solvant permettant d'encapsuler des principes actifs liposolubles comme le paclitaxel. Leurs propriétés sont : taille inférieure à 150 nanomètres (nm), concentration passive dans les tumeurs par effet « Enhanced Permeability and Retention » et inhibition de la glycoprotéine-P, impliquée dans un mécanisme de résistance au paclitaxel.

Ce travail a d'abord étudié les adaptations à appliquer à la formulation usuelle des NCL de paclitaxel de 50 nm en vue de réaliser les premiers lots précliniques. Une méthode de conservation par congélation des NCL de paclitaxel dans leur phase aqueuse pendant au moins 6 mois est proposée.

La toxicité systémique des lots précliniques de NCL a été étudiée selon la méthode d'Irwin. Les doses maximales tolérées et doses létales 50 du Taxol[®] et des NCL de paclitaxel sont respectivement de 12 et 19,5 mg/kg et de 96 et 216 mg/kg. Aucune toxicité n'est observée avec des NCL sans paclitaxel. Les NCL de paclitaxel sont plus efficaces que le Taxol[®] sur un modèle tumoral sous-cutané de la lignée humaine H460. Ce schéma d'administration n'induit aucune toxicité significative.

La nébulisation des NCL pour un usage expérimental chez l'animal ou thérapeutique chez l'homme est possible respectivement au moyen d'un Microsprayer[®] ou d'un nébuliseur eFlow[®]rapid.

Les NCL de paclitaxel de 50 nm ont permis d'optimiser l'effet cytotoxique du paclitaxel en s'affranchissant de la toxicité du Taxol[®]. Il est possible de générer des aérosols de NCL de paclitaxel. Ces données permettent de poursuivre les études toxicologiques et d'efficacité des NCL administrées par voie systémique et par voie pulmonaire.

TABLE DES MATIERES

1. GENERALITES SUR LES AEROSOLS	9
1.1. PRINCIPES DE PRODUCTION ET MEDICAMENTS CONCERNES.....	9
1.2. NOUVEAUX AXES DE RECHERCHE EN AEROSOLTHERAPIE.....	11
1.3. INTERET DES AEROSOLS D'ANTICANCEREUX DANS LE CANCER BRONCHIQUE	12
1.4. ANTICANCEREUX ADMINISTRES PAR AEROSOL : REVUE DES ETUDES PRECLINIQUES ET CLINIQUES.....	13
1.4.1. <i>Etudes précliniques</i>	14
1.4.2. <i>Etudes cliniques</i>	16
2. ENCAPSULATION DE MEDICAMENTS ANTICANCEREUX POUR AEROSOLTHERAPIE : QUELS DEFIS ?	19
2.1. LES OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES	19
2.2. DEFIS TENANT AUX NOUVELLES FORMATIONS ISSUES DES NANOTECHNOLOGIES	20
2.2.1. <i>Présence de solvants organiques</i>	20
2.2.2. <i>Impureté de type « organisme génétiquement modifié »</i>	21
2.2.3. <i>Adaptation d'échelles</i>	21
2.2.4. <i>Conservation</i>	21
2.2.5. <i>Coûts de fabrication</i>	21
2.2.6. <i>Risque de transmission d'agents infectieux non conventionnels</i>	22
2.3. DEFIS TENANT DES SPECIFICITES DE L' AEROSOLTHERAPIE	22
2.3.1. <i>Absence de dégradation du couple principe actif/vecteur</i>	22
2.3.2. <i>Caractéristiques physico-chimiques des solutions à nébuliser</i>	22
2.3.3. <i>Sites de dépôts des vecteurs</i>	23
2.3.4. <i>Métabolisme locorégional et clairance muco-ciliaire</i>	24
2.3.5. <i>Vectorisation active</i>	25
2.3.6. <i>Toxicologie</i>	25
2.3.7. <i>Protection de l'environnement</i>	26
3. ENCAPSULATION DE MEDICAMENTS ANTICANCEREUX POUR AEROSOLTHERAPIE : PERSPECTIVES	26
3.1. ETUDES PRECLINIQUES	26
3.2. PREMIERES ETUDES CLINIQUES	28
4. LES NANOCAPSULES LIPIDIQUES : UNE NOUVELLE PLATEFORME D'ENCAPSULATION NANOMETRIQUE	29
4.1. LES CONSTITUANTS	29
4.2. METHODE DE FORMULATION	29
4.3. STRUCTURE DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES	30
4.4. OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	31
4.5. PRINCIPES ACTIFS DEJA ENCAPSULES	32
4.6. DEVENIR INTRACELLULAIRE SUR DES CULTURES CELLULAIRES.....	32
4.7. PROPRIETES DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES.....	33
4.8. AVANTAGES THEORIQUES DES NANOCAPSULES DE PACLITAXEL PAR RAPPORT A LA FORMULATION AVEC SOLVANTS TAXOL®	34
5. BUTS DE LA THESE	35
6. ARTICLE 1 : THE ADAPTATION OF LIPID NANOCAPSULE FORMULATIONS FOR BLOOD ADMINISTRATION IN ANIMALS	36
7. ARTICLE 2 : TOXICOLOGICAL STUDY AND EFFICACY OF BLANK AND PACLITAXEL LOADED LIPID NANOCAPSULES AFTER I.V. ADMINISTRATION IN MICE	41

8. ARTICLE 3 : LIPID NANOCAPSULES: READY-TO-USE NANOVECTORS FOR THE AEROSOL DELIVERY OF PACLITAXEL 77

9. DISCUSSION ET PERSPECTIVES 86

10. CONCLUSIONS..... 92

11. BIBLIOGRAPHIE 93

1. Généralités sur les aérosols

1.1. Principes de production et médicaments concernés

L'administration de médicaments par aérosol est usuelle pour traiter des maladies broncho-pulmonaires chroniques comme l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou la mucoviscidose. Cette voie d'administration a pour principal avantage de délivrer directement au contact des bronches, bronchioles et du poumon profond un principe actif à visée thérapeutique. Cet agent va alors pouvoir agir localement comme un traitement topique sur le tissu épithélial respiratoire où il s'est déposé et dans son proche environnement. Le passage systémique du principe actif est en règle faible. Ainsi, par rapport à une administration systémique, l'aérosolthérapie permet, avec une dose faible de principe actif, de potentialiser ses effets thérapeutiques respiratoires tout en réduisant ses effets indésirables systémiques. L'administration d'un médicament par aérosol doit répondre à des critères stricts de bonnes pratiques pour être non dangereux et efficaces [1,2].

La manière la plus simple de générer un aérosol de médicament consiste à nébuliser une formulation aqueuse renfermant le principe actif d'intérêt. Il existe 3 types de générateurs d'aérosols pour nébulisation :

- les générateurs pneumatiques : la solution thérapeutique est nébulisée sous l'effet d'un gaz comprimé, qui projette par effet Venturi, une petite quantité de liquide sur un impacteur et produit un nuage de gouttelettes en suspension dans l'air. Le gaz utilisé doit être compatible avec la solution à nébuliser.
- les générateurs ultrasoniques : la solution est nébulisée sous l'effet d'ultrasons produits par un système piézo-électrique oscillant à haute fréquence. Ces générateurs ne sont pas compatibles avec tous les médicaments en raison d'un échauffement de la solution à nébuliser qui peut potentiellement dénaturer le principe actif.
- les générateurs à tamis vibrant : la solution à nébuliser est comprimée à très haute fréquence par une membrane percée de trous de taille micrométrique. Ces appareillages, compatibles avec tous les médicaments, permettent d'obtenir un débit de nébulisation élevé se traduisant par un raccourcissement de la durée de nébulisation pour les patients.

Tous ces appareils doivent répondre à la norme européenne (EN) et française (NF) 13544-1 obtenir le marquage CE avant commercialisation. Le système de nébulisation sera choisi selon

l'indication médicale, le site de dépôt privilégié, le volume à nébuliser, les recommandations de bonnes pratiques, la capacité du patient à bien utiliser le dispositif choisi et des critères économiques. Ces dispositifs peuvent être connectés au patient au moyen de différentes interfaces comme un embout buccal ou un masque facial. L'embout buccal doit être privilégié dans les pathologies broncho-pulmonaires.

D'autres systèmes peuvent être utilisés pour administrer des médicaments formulés sous forme de poudre sèche ou d'aérosols-doseurs avec gaz propulseurs.

Les médicaments ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France pour une administration par nébulisation sont présentés dans le Tableau 1 (adapté de Diot et Taytard [3]).

Classe thérapeutique	Indication	DCI	Spécialité
Bronchodilatateurs	Asthme, BPCO	Terbutaline	Bricanyl [®] solution pour inhalation
		Salbutamol	Ventoline [®] solution pour inhalation
		Ipratropium bromure	Atrovent [®] solution pour inhalation
Corticoïdes inhalés	Asthme	Budésonide	Pulmicort [®] suspension pour inhalation
		Béclométasone	Beclospin [®] suspension pour inhalation
Cromones	Asthme	Cromoglycate disodique	Lomudal [®]
Antiparasitaires	Pneumocystose	Pentamidine	Pentacarinat [®] poudre pour aérosol
Fluidifiants bronchiques	Mucoviscidose (> 5 ans)	Dornase alpha (rh-DNase)	Pulmozyme [®] solution pour inhalation
Antibiotiques	Mucoviscidose (≥ 6 ans)	Tobramycine	Tobi [®] solution pour inhalation
	Mucoviscidose (≥ 6 ans)	Colimycine	Colistine [®]
Affections bronchiques aiguës bénignes	Traitement d'appoint des affections bronchiques aiguës bénignes	Essence végétale	Goménol [®] solution pour aérosol ou huile essentielle pour inhalation
Analogue de la prostacycline	Hypertension artérielle pulmonaire primitive	Iloprost	Ventavis [®]

Tableau 1. Classes pharmaceutiques, indications thérapeutiques, dénomination commune internationale (DCI) et nom commercial des principes actifs ayant une AMM pour une administration par nébulisation en France en 2009.

Il est aussi possible de nébuliser des solutions pour instillation endotrachéobronchique comme Mucofluid[®] (mesna) ou Mucomystendo[®] (acétyl-cystéine) et des solutions hydriques ayant une action pharmacologique ou physique intéressante dans certaines situations pathologiques, comme du sérum salé hypertonique pour induire une expectoration.

1.2. Nouveaux axes de recherche en aérosolthérapie

De nouveaux axes de recherche en aérosolthérapie explorent les possibilités de nébuliser des médicaments administrés par voie orale comme des antituberculeux ou par voie intraveineuse comme des cytotoxiques. Les antituberculeux pourraient ainsi mieux atteindre les bacilles de Koch quiescents dans les macrophages alvéolaires. De même, l'action des cytotoxiques pourrait être potentialisée au moyen de cette voie d'administration.

Dans tous les pays économiquement développés, les tumeurs malignes broncho-pulmonaires représentent une cause de mortalité prématurée importante. En 2008, les estimations font état de 215 020 nouveaux cas et de 161 840 décès provoqués par cancer bronchique aux Etats-Unis d'Amérique [4]. Le nombre de décès annuel par cancer bronchique aux Etats Unis d'Amérique a été supérieur au nombre cumulé de décès par cancer colique, prostatique et mammaire en 2007 [5]. En France, les tumeurs malignes de la trachée, des bronches et des poumons représentent depuis 2004 la première cause de mortalité devant les maladies cardiovasculaires avec 26 860 nouveaux cas annuels [6]. Dans 80% des cas, il s'agit d'un cancer bronchique primitif non à petites cellules (CBNPC). La survie à 5 ans (tous stades confondus) ne dépasse pas 12% chez l'homme et 16% chez la femme [7]. Les facteurs expliquant ce mauvais pronostic sont : l'absence de méthode de dépistage de masse, le diagnostic tardif en raison de l'absence de symptôme chez les patients et l'agressivité intrinsèque des tumeurs. Une autre raison est l'efficacité inconstante et transitoire des médicaments cytotoxiques qui serait, en partie, attribuable à leur concentration trop faible au niveau de la tumeur primitive pulmonaire [8] et des lésions secondaires [9] après administration intraveineuse.

Sur la base de ce rationnel, il est logique de rechercher des nouvelles modalités thérapeutiques permettant d'augmenter le rapport dose de cytotoxique délivrée à la tumeur/dose totale délivrée au patient dans le CBNPC. Dans d'autres pathologies tumorales comme les lésions hépatiques secondaires [10], les tumeurs ovariennes [11], les méningites carcinomateuses [12] et les tumeurs

cérébrales [13], l'intérêt de l'administration locorégionale de cytotoxiques a été démontré.

1.3. Intérêt des aérosols d'anticancéreux dans le cancer bronchique

L'administration de cytotoxiques par aérosol est une voie de recherche qui permettrait théoriquement de réaliser une *intensification thérapeutique intra-thoracique* par rapport au traitement par voie intraveineuse chez des patients porteurs d'un CBNPC localement avancé ou inopérable tout en évitant le premier passage hépatique. L'aérosolthérapie de cytotoxiques pourrait également compléter l'arsenal thérapeutique pour certaines formes de CBNPC aujourd'hui difficiles à prendre en charge en raison de possibilités de traitement limitées. Ainsi les carcinomes *in situ* multiples et/ou synchrones d'une lésion invasive peuvent être difficiles à contrôler avec les techniques de destruction endoscopique et/ou peuvent limiter les possibilités de résection de la lésion opérable. Les rechutes de tumeurs proximales à développement endo-bronchique sont le plus souvent inopérables et le traitement repose alors sur des techniques de destruction endoscopique, complétées par de la radiothérapie et parfois la mise en place de prothèses endo-bronchiques. La chimiothérapie systémique est peu efficace pour freiner le développement endoluminal de telles lésions. Les carcinomes à développement endo-alvéolaire sont provoqués par la prolifération de cellules tumorales dans les alvéoles pulmonaires. Dans ces situations pathologiques particulières, délivrer le traitement cytotoxique directement dans les alvéoles au contact des cellules tumorales semble une option très pertinente [14].

De même, après l'exérèse complète d'un CBNPC, il est parfois indiqué de réaliser un traitement complémentaire dit adjuvant par chimiothérapie et/ou radiothérapie. Il pourrait être intéressant de proposer une chimiothérapie loco-régionale qui, par rapport à la chimiothérapie systémique, permettrait d'augmenter la concentration des cytotoxiques au niveau des poumons, du lit opératoire et des ganglions lymphatiques. Cette modalité pourrait potentialiser l'effet des traitements adjuvants conventionnels et réduire le risque de rechute intra-thoracique et peut-être le risque de dissémination métastatique [15].

Une autre technique pour augmenter le rapport dose délivrée à la tumeur/dose totale délivrée au patient dans les pathologies cancéreuses est l'encapsulation des principes actifs dans des transporteurs ou vecteurs (« drug carrier ») de taille nanométrique issus des nouvelles technologies [16]. Actuellement, le mode d'administration le plus fréquent d'une chimiothérapie est la voie intraveineuse. Comme le médicament est délivré dans le compartiment vasculaire, il

en découle des concentrations sériques élevées induisant directement les effets indésirables systémiques. La concentration médicamenteuse est le plus souvent faible dans la tumeur. La vectorisation des médicaments par encapsulation a pour but de transporter le médicament et d'optimiser sa biodistribution. La distribution du médicament vectorisé dépend alors des propriétés de surface du vecteur et de sa taille. Cette vectorisation est dite passive. Les médicaments ainsi vectorisés, lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse, se concentrent passivement dans les tumeurs sous l'effet du phénomène « Enhanced Permeability and Retention » (EPR) et amplifient l'effet cytotoxique du principe actif sur les cellules cancéreuses. La surface de ces nouvelles formulations peut aussi être modifiée par la liaison d'agents dont le rôle va être de guider le vecteur vers une cible moléculaire de manière à optimiser l'effet de l'agent thérapeutique vectorisé. Ce type de vectorisation est dite active. L'effet attendu est une amélioration de l'effet cytotoxique par une augmentation de l'accès du médicament à la tumeur et une réduction des effets indésirables potentiels.

En 2009, des principes actifs vectorisés dans des liposomes de 85 nanomètres de diamètre (nm) (doxorubicine liposomale, Caelyx[®] [17]) ou solubilisés sur de l'albumine humaine de 130 nm de diamètre (paclitaxel lié à de l'albumine humaine, Abraxane[®] [17]) sont déjà disponibles dans certaines situations cliniques en cancérologie. Ces nouvelles formulations de principes actifs ont démontré leur intérêt lors d'études de Phase III sur le contrôle de la maladie cancéreuse et la réduction d'effets toxiques limitants.

De plus, ces nouvelles formulations offrent la possibilité d'administrer par voie pulmonaire des principes actifs ne pouvant l'être actuellement. C'est le cas de la formulation Taxol[®], renfermant du paclitaxel solubilisé dans du Crémophor[®]EL (un surfactant non ionique composé d'huile de ricin polyoxyéthyléné) et de l'éthanol déshydraté, qui est trop visqueux pour être nébulisé (données non publiées). Pour pouvoir nébuliser du paclitaxel, il est nécessaire de solubiliser ce principe actif en utilisant, par exemple, des nouvelles technologies basées sur les nanosciences. Ainsi, l'Abraxane[®], qui a obtenu une AMM européenne dans le traitement du cancer du sein métastatique et qui est en phase de développement dans le CBNPC [18-20], peut être administré par voie pulmonaire chez l'animal [21].

1.4. Anticancéreux administrés par aérosol : revue des études précliniques et cliniques

Nous allons passer en revue les principales études précliniques et cliniques publiées sur les essais d'aérosolthérapie de médicaments anticancéreux non encapsulés.

1.4.1. Etudes précliniques

Des données précliniques ont été obtenues sur des modèles expérimentaux de tumeurs pulmonaires spontanées ou secondaires (sarcomes, carcinomes, mélanomes) chez le chien [22]. Ainsi, Hershey et coll. ont montré chez des chiens que des aérosols de doxorubicine (solubilisée dans de l'éthanol à 20%, concentration finale 16 mg/ml) ou de paclitaxel (solubilisé dans du polyéthylène glycol 200 et de l'éthanol, concentration finale 75 mg/ml) pouvaient stopper la progression des lésions cancéreuses pulmonaires chez 6 animaux sur 24 (25%) [23]. Les taux plasmatiques étaient 10 fois plus faibles qu'après une administration intraveineuse à des doses thérapeutiques. Des cas de fibrose pulmonaire après aérosols de doxorubicine ont été observés. Ce modèle canin a permis de démontrer la preuve du concept d'intensification thérapeutique. En effet, un aérosol de doxorubicine radiomarquée a permis d'augmenter la radioactivité des poumons par un facteur 20 à 30 par rapport à l'injection intraveineuse de la même quantité de doxorubicine [8].

D'autres études ont concerné des modèles expérimentaux de cancers bronchiques primitifs utilisant des lignées tumorales humaines induits chez des rongeurs immunodéprimés et ont permis d'étudier d'autres aérosols d'anticancéreux [24].

Les travaux de Gagnadoux et coll. ont permis de montrer que la gemcitabine, un cytotoxique de la classe des antimétaboliques ayant une AMM dans le traitement intraveineux du CBNPC, pouvait être nébulisée sans modification de son pouvoir cytotoxique [25]. Cet agent, administré sous forme d'un spray trachéal hebdomadaire chez le rat, n'a induit aucune toxicité limitante [26]. Ces données ont été confirmées chez le babouin [25]. Plus récemment, des sprays de gemcitabine ont permis d'inhiber la croissance d'un modèle tumoral orthotopique de cancer bronchique chez la souris nude. Un effet dose-réponse a été mis en évidence [27]. Des aérosols de gemcitabine ont également inhibé la croissance de métastases pulmonaires d'ostéosarcomes [28]. De plus, les auteurs ont observé un effet anti-tumoral sur la tumeur primitive de la gemcitabine administrée par aérosol alors que l'administration intrapéritonéale de gemcitabine n'en avait pas sur les métastases pulmonaires.

Certains auteurs ont étudié l'intérêt du celecoxib en aérosol par rapport à la voie orale pour renforcer un traitement intraveineux par docétaxel dans un modèle de CBNPC chez la souris nude [29]. Les auteurs ont observé une augmentation de l'effet thérapeutique dans les lots recevant le celecoxib quelque soit la voie d'administration. Ils ont conclu que le celecoxib par voie inhalée à la dose de 4,56 mg/kg/jour était aussi efficace et mieux toléré chez la souris que le celecoxib oral à la dose de 150 mg/kg/jour. D'autres auteurs ont montré que des aérosols de composés inhibiteurs de la 5 lipo-oxygénase étaient en voie de développement [30]. Une inhalation par jour pendant 16 semaines permettait de réduire le pourcentage de tumeurs chez les animaux. Il est à noter que la voie d'administration pulmonaire a été étudiée car les nouveaux principes actifs ne pouvaient pas être administré par voie orale.

Sur un modèle murin de métastases pulmonaires, des aérosols d'interleukine-2 (IL-2) ont permis de réduire significativement le nombre de lésions secondaires et d'augmenter la survie des animaux traités [31].

De même, des aérosols de difluoromethylornithine and 5-fluorouracil (5-FU) réalisés une fois par semaine chez le hamster ont montré leur potentiel inhibiteur sur l'apparition de carcinome épidermoïde induit par la méthylnitrosourée [32]. Chez le rat Fischer 344 après injection de cellules provenant d'adénocarcinome mammaire MADB106, l'instillation trachéale de macrophage-activating lipopeptide-2 a réduit significativement l'apparition des métastases pulmonaires [33].

Chez la souris A/J exposée à des procarcinogènes inhalés, l'administration d'aérosols de polyphénol E a réduit la charge tumorale de 59% [34]. Chez des souris prétraitées par du carcinogène spécifique du tabac, le [4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone], des aérosols d'épigallocatechine gallate ont diminué l'apparition de tumeurs de 20 à 30% [35]. Chez des souris exposées à ce même carcinogène, l'inhalation d'isotrétinoïne (acide 13-cis rétinolique) a été associée à une réduction de tumeurs induites pouvant atteindre 80% [36]. Il semblait exister un effet dose-réponse.

A la marge de cette revue, une équipe a montré que l'inhalation de budésonide à la dose de 25 µg/kg trois fois par semaine associée à la prise de myo-inositol chez des souris exposées à du benzopyrène réduisait le risque de formation de tumeurs de 79% [37]. De plus, si cette thérapeutique est instaurée sur des lésions d'hyperplasie, l'évolution vers les stades plus sévères est freinée [38]. Dans un modèle expérimental de cancer bronchique chez la souris, l'inhalation

de substance P a permis de réduire le nombre de lésions pulmonaires et d'augmenter la survie [39]. De même, l'adjonction de substances immuno-modulatrices comme la cyclosporine peut potentialiser l'effet cytotoxique d'un agent comme le paclitaxel [40].

1.4.2. Etudes cliniques

De manière paradoxale, alors que les données chez l'animal sont les plus nombreuses en situation de chémo-prévention et de traitement précoce, les études cliniques ont été réalisées le plus souvent chez des patients atteints de tumeurs bronchopulmonaires primitives ou secondaires. Les principales données cliniques disponibles sont présentées ici.

Plusieurs études chez l'homme ont confirmé l'intérêt de ce mode d'administration endobronchique de la chimiothérapie. La voie d'administration par inhalation a été étudiée dès 1968 [41]. Ces premiers résultats montraient l'intérêt d'aérosols de cytotoxiques en plus d'une irradiation thoracique. En 1983, Tatsumura et coll. ont publié les résultats d'une étude chez 6 patients atteints d'un CBNPC traités par aérosols de 5-fluorouracil (5-FU) [42]. Quatre réponses cliniques ont été observées dans ce groupe. Le principal effet indésirable des aérosols de 5-FU a été une inflammation de la glotte. Le taux sérique de 5-FU a été très faible par rapport aux taux observés après perfusion. Dans une deuxième étude, la même équipe a administré à 19 patients ayant un CBNPC résecable un aérosol de 250 mg de 5-FU 2 heures avant une intervention planifiée. Un dosage du 5-FU et de ses principaux métabolites a ensuite été réalisé dans des échantillons de tissus pulmonaires sains, de tissus néoplasiques et de ganglions lymphatiques thoraciques. Les concentrations de 5-FU étaient 5 à 15 fois plus élevées dans les tumeurs que dans le tissu pulmonaire sain avoisinant. De même, du 5-FU était retrouvé dans les ganglions lymphatiques hilaires et médiastinaux. Les métabolites du 5-FU ont été dosés dans les tissus réséqués attestant du métabolisme local du médicament. Ensuite, 10 patients chimio-naïfs porteurs d'un CBNPC non-opérables ont été traités par aérosols de 5-FU (250 mg, deux fois par jour, de 1 à 3 fois par jour). Une réponse tumorale a été observée chez 6 patients (dont 2 réponses complètes) avec une bonne tolérance [43].

Les aérosols de doxorubicine ont été étudiés chez l'homme lors d'une étude de phase I avec escalade de doses [44]. Cinquante-trois patients ont été inclus à 13 niveaux de doses croissantes

de 0,4 à 9,4 mg/m² toutes les 3 semaines. Les auteurs ont mis en évidence que la dose maximale tolérée était de 7,5 mg/m² toutes les 3 semaines. Aucun effet indésirable systémique n'a été observé.

Des études ont été réalisées sur des cytokines comme l'interféron-alpha chez 8 patients ayant un CBNPC prétraité [45]. Une étude pharmacocinétique et toxicologique avec escalade de doses a montré qu'aux doses les plus fortes (au delà de 60.10⁶ UI), un syndrome grippal apparaissait dans les heures suivant l'inhalation. Ce syndrome était comparable à celui observé après une injection intraveineuse et provoquait parfois une obstruction bronchique réversible. Ce traitement a été testé chez 6 patients porteurs d'un carcinome bronchioloalvéolaire (1 à 6.10⁶ UI trois fois par jour jusqu'à progression ou mauvaise tolérance) [46]. Les auteurs concluent à l'absence d'efficacité de l'interféron-alpha. Une seconde étude chez 10 patients (1 à 10.10⁶ UI une fois par jour ou 3 fois par semaine) a mis en évidence une stabilisation tumorale d'une durée médiane de 15 semaines chez 6 des 8 patients évaluable [47]. L'interféron-gamma a aussi été étudié chez 4 patients ayant des métastases pulmonaires de tumeurs solides sous-diaphragmatiques en complément d'un traitement systémique [48]. La tolérance a été bonne. De nombreux travaux ont porté sur l'administration d'interleukine-2 (IL-2) par voie inhalée pour traiter des métastases pulmonaires de carcinome rénal [49,50]. Des cas de réponses tumorales ont été observées chez des patients porteurs de métastases pulmonaires sans toxicité limitante, dont un cas de réponse complète [51]. Une phase I a été réalisée chez 16 patients [52]. Le principal effet indésirable a été une toux non productive dose-dépendante. Plus rarement, des cas de bronchospasme sévère ont été observés [53]. Des études toxicologiques ont montré que les aérosols d'IL-2 induisaient une inflammation bronchique similaire à celle observée dans l'asthme [54]. Des lavages alvéolaires réalisés après traitement ont mis en évidence l'apparition de lymphocytes activés témoignant du potentiel immunomodulateur local du traitement par IL-2 inhalé. Une étude rétrospective portant sur une série de 116 patients ayant des métastases pulmonaires d'un cancer rénal a été publiée en 1997 [55]. Les principaux résultats ont montré que les patients intolérants à l'IL-2 par voie systémique supportaient les aérosols d'IL-2. Chez 15% des patients, les tumeurs régresaient pendant une durée médiane de 15,5 mois (intervalle de 4,1 à 33 mois). Le taux de stabilisation était de 55 % pendant une durée médiane de 6,6 mois (intervalle de 3 à 51,7 mois). Les données accumulées chez presque 200 patients par la même équipe ont confirmé ces résultats [56]. L'IL-2 par voie inhalée était mieux tolérée que par voie systémique et aussi efficace (même

survie) [57,58]. La même équipe a aussi traité par cette méthode des sujets atteints de métastases pulmonaires de mélanomes et de cancers gynécologiques [59]. Récemment, il a été démontré que les aérosols d'IL-2 pouvaient être une nouvelle thérapeutique chez patients atteints de métastases pulmonaires de mélanome [60]. Parmi les 27 patients traités, 5 ont présenté une réponse complète, 8 une réponse partielle et 5 une stabilisation. Un autre facteur de croissance, le Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF), a été expérimenté chez 7 patients porteurs de métastases pulmonaires lors d'une phase I avec escalade de doses [61]. Pour 6 patients, l'augmentation de doses est réalisée jusqu'à 240 µg deux fois par jour pendant 7 jours sans toxicité. Cinq patients ont poursuivi le traitement de 2 à 6 mois. Une deuxième étude a été réalisée chez 45 patients identiques qui refusaient les traitements « standards » ou en situation d'échec thérapeutique. Chez vingt-quatre patients, une stabilisation ou une régression des lésions pulmonaires a été observé [62].

D'autres principes actifs non anti-tumoraux ont été étudiés dans des pathologies pulmonaires néoplasiques. Une préparation à base de streptocoque, l'OK-432, a été nébulisée chez 6 patients atteint d'un cancer bronchiolo-alvéolaire [63]. Le traitement a été bien toléré. L'intérêt d'aérosols de vitamine A (retinyl palmitate) a été recherché sur l'évolution de lésions métaplasiques de 11 patients fumeurs ou anciens fumeurs [64]. Une régression complète ou partielle des lésions a été observée dans 56% des cas. Une étude de phase IIB a été menée pour décrire l'effet d'un traitement inhalé à base de budésonide sur des lésions bronchiques dysplasiques du fumeur [65]. Cette étude n'a pas mis en évidence d'effet du budésonide pour réduire ou accélérer l'aggravation des lésions dysplasiques. Cependant une étude de cohorte portant sur plus de 10 000 patients a mis en évidence une réduction du risque de cancer chez des fumeurs inversement proportionnelle à la dose de corticostéroïde inhalé [66].

A ce jour, aucune formulation de principe actif anticancéreux non vectorisée n'a obtenu une AMM pour un traitement par aérosol en traitement d'une néoplasie bronchopulmonaire. Les innovations constantes dans le domaine de l'encapsulation des médicaments par des nanotechnologies sont susceptibles de fournir des couples principe actif/vecteur très intéressants dans ce domaine dans un avenir proche. Nous allons maintenant passer en revue les objectifs à atteindre pour qu'une formulation vectorisée ayant démontré un intérêt thérapeutique *in vitro* et

chez l'animal puisse commencer son développement préclinique dans le domaine de l'aérosolthérapie.

2. Encapsulation de médicaments anticancéreux pour aérosolthérapie : quels défis ?

Les premières formulations médicamenteuses de taille nanométrique (moins de 150 nm de diamètre) issues des nouvelles technologies sont actuellement disponibles en France. Ainsi, le Caelyx® est une formulation liposomale de doxorubicine dont le diamètre moyen est de 85 nm pouvant être utilisé dans les cancers gynécologiques en cas de risque cardiaque augmenté. De même, le médicament Abraxane® est une formulation composée de molécules d'albumine humaine de 130 nm de diamètre sur lesquelles des molécules de paclitaxel sont fixées. Ce médicament est indiqué dans le cancer mammaire métastatique. Des études de phase I et II ont été réalisées dans le CBNPC avec cette formulation [18,20].

2.1. Les obligations réglementaires

Lorsqu'une formulation originale a démontré son intérêt thérapeutique sur des modèles cellulaires et animaux pertinents, son développement, en vue de devenir un nouveau médicament, doit suivre une réglementation stricte visant à assurer la meilleure connaissance possible du médicament avant de l'administrer pour la première fois chez l'homme. Ainsi, toute nouvelle formulation pharmaceutique, même si elle renferme un principe actif déjà utilisé dans la pharmacopée, doit subir les étapes usuelles du développement d'un nouveau médicament [67]. Ces études doivent être réalisées en accord avec les "bonnes pratiques de laboratoire" pour obtenir des résultats de qualité.

La première étape est la réalisation du dossier technique et analytique qui doit comporter :

- la description de la composition qualitative et quantitative du médicament ;
- la description du mode de préparation du médicament ;
- la description des matières premières utilisées ;
- la description des contrôles du médicament : contrôle de la forme (caractéristiques physicochimiques, cinétique de dissolution ...), l'identification et le dosage du principe actif, des produits de dégradation, des excipients ;

- les essais de stabilité.

Toutes ces informations permettent d'assurer la qualité et la reproductibilité du médicament (sécurité d'emploi, efficacité, fiabilité).

Cette étape doit être suivie par les études pharmacocinétiques qui évaluent l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion du principe actif à l'étude.

Les études de toxicité chez l'animal doivent débiter par l'étude de la toxicité par administration unique (toxicité aiguë). Ces études permettent de déterminer des paramètres comme la dose maximale tolérée (dose maximale n'induisant jamais un décès) et la dose létale 50 (dose qui provoque 50% de décès) dans des lots d'animaux homogènes. Ces données doivent être complétées par l'étude de la toxicité par administration répétée qui vise à mettre en évidence les altérations fonctionnelles ou anatomopathologiques consécutives à l'administration du nouveau médicament. Elles doivent être réalisées sur au moins deux espèces (dont une non rongeur), à plusieurs posologies, par la même voie d'administration que celle qui sera utilisée chez l'homme.

D'autres études sont nécessaires : études de reproduction (recherche d'un impact possible d'un nouveau médicament sur les fonctions de reproduction), études de mutagenèse, étude de carcinogénicité, études de pharmacologie générale et orientée et de cinétique animale.

Pour débiter une étude de phase I avec un nouveau médicament anticancéreux, il faut disposer des éléments suivants : dossier technique et analytique, études de toxicité par administration unique, d'études courtes de toxicités par administration répétée, de résultats préliminaires concernant la mutagenèse, la pharmacologie générale et orientée et la cinétique animale.

2.2. Défis tenant aux nouvelles formations issues des nanotechnologies

2.2.1. Présence de solvants organiques

Un des avantages théoriques des médicaments issus des nanotechnologies est la suppression des excipients à effet notoire souvent nécessaires pour solubiliser des molécules lipophiles. Cependant, il est possible de retrouver des traces de solvants dans certains excipients primaires. Il faudra vérifier que la concentration finale de ces solvants est bien inférieure aux taux autorisés.

2.2.2. Impureté de type « organisme génétiquement modifié »

Il est important que l'emploi de tous les excipients des nouvelles nano-formulations soit autorisé pour un usage médical par la pharmacopée. La pureté de ces excipients doit être garantie par le fournisseur. En particulier, si des composés à base de plantes sont utilisés, il est impératif de vérifier l'absence d'impureté de type « organisme génétiquement modifié » (OGM). En effet, les composés OGM n'ont le plus souvent pas fait l'objet d'études toxicologiques et ne sont donc pas utilisables pour un usage galénique. L'absence d'impureté de type OGM doit être bien documentée.

2.2.3. Adaptation d'échelles

Les nouvelles nano-formulations doivent aussi pouvoir être fabriquées à grande échelle en vue d'un usage pré-clinique puis clinique. Cette possibilité doit être vérifiée précocement lors des études de formulation.

2.2.4. Conservation

De même, la conservation et la stabilité de ces formulations sont des points cruciaux. Les liposomes sont peu présents dans l'arsenal thérapeutique en raison de leur manque de stabilité dans le temps. Les liposomes de doxorubicine Caelyx[®] renferment dans leur paroi du cholestérol qui en stabilisant leur paroi phospholipidique qui permet, avec un gradient de pH, de les conserver à température ambiante et bloque le processus de relargage passif pendant plusieurs mois. Le relargage passif de principes actifs lipophiles expose à la formation de cristaux dans la formulation et à un risque d'embolies micro vasculaires multiples lors de l'injection à un être vivant. Les experts toxicologues recherchent systématiquement ce risque, qui doit donc être parfaitement maîtrisé pour chaque nouvelle formulation.

2.2.5. Coûts de fabrication

Les coûts de nouveaux médicaments issus des biotechnologies, comme les anticorps thérapeutiques, sont généralement très élevés. Cela s'explique par les coûts élevés de recherche et de développement ayant dû être utilisés pour fabriquer ces formulations. Pour réduire ces coûts, il est logique de chercher à fabriquer les nouveaux médicaments à base de nano-objets à partir de substances premières produites à proximité du lieu de synthèse et d'utiliser des nouvelles technologies peu consommatrices d'énergie.

2.2.6. Risque de transmission d'agents infectieux non conventionnels

Enfin, pour limiter les risques de transmission d'agents non conventionnels, les composés dérivés du sang ou de tissus humains doivent être employés avec prudence.

2.3. Défis tenant des spécificités de l'aérosolthérapie

En vue d'une administration sous forme d'aérosol, d'autres contraintes supplémentaires devront être surmontées. L'Agence européenne des médicaments (EMA) a défini des critères précis de qualité lors de la formulation des médicaments en 2006 [68].

2.3.1. Absence de dégradation du couple principe actif/vecteur

Le principe actif et son vecteur ne devront pas être dégradés par le processus de nébulisation. Ainsi, les liposomes, ont tendance à fusionner lors du processus de nébulisation ce qui se traduit par une augmentation de leur taille et réduit leur possibilité de nébulisation en modifiant leur site de dépôt intrathoracique. Des vecteurs plus stables lors du stress physique de la nébulisation sont nécessaires.

2.3.2. Caractéristiques physico-chimiques des solutions à nébuliser

De même, pour des raisons physico-chimiques, les vecteurs doivent être hautement solubles dans l'eau pour être faciles à nébuliser. En effet, certains excipients doivent être évités car ils peuvent

rendre la solution incompatible avec tout processus de nébulisation (comme les excipients huileux) ou provoquer des dépôts dans les systèmes de nébulisation (comme des sels minéraux).

Le résumé des caractéristiques de la nouvelle formulation devra ainsi préciser :

- la nature physique du principe actif (solution, suspension, émulsion, ...);
- sa sensibilité au chauffage ;
- sa stabilité ;
- sa compatibilité avec d'autres principes lors de la nébulisation ;
- la liste des excipients ;
- son pH ;
- son osmolarité ;
- les types de systèmes de nébulisation compatibles et leurs caractéristiques précises.

La solution nébulisée devra toujours être stérile sous peine de nébuliser des bactéries.

Il est par contre non recommandé de nébuliser :

- des substances huileuses ou lipidiques susceptibles de provoquer une pneumopathie lipidique ;
- des solutions non iso-osmolaires ou des solutions acides. Ces solutions sont susceptibles d'induire un bronchospasme et de la toux [69-72];
- des solutions renfermant des additifs potentiellement toxiques.

2.3.3. Sites de dépôts des vecteurs

Ensuite, ces nouvelles formulations devront démontrer qu'elles permettent de réaliser une intensification thérapeutique pulmonaire (et ganglionnaire thoracique) avec un faible passage systémique [14].

Pour atteindre cet objectif, l'aérosol devra se déposer à des niveaux précis de l'arbre bronchique. Un des principaux facteurs influençant le site de dépôt broncho-pulmonaire des aérosols est la taille des particules en suspension.

2.3.3.1. Impact de la taille des particules inhalées

Ce paramètre est caractérisé par le diamètre aérodynamique médian (MMAD) qui est le diamètre des particules qui divise la masse de l'aérosol en deux moitiés égales. Cette valeur est représentative de la taille des particules de l'aérosol produit. Les gouttelettes se déposent dans l'arbre respiratoire selon 3 mécanismes physiques dépendant de leur MMAD : l'impaction, la sédimentation sous l'effet de la pesanteur et la diffusion. Selon le MMAD, le site de déposition majoritaire des gouttelettes est :

- la sphère ORL : si le MMAD est supérieur à 5 μm ;
- la trachée ou les bronches : si le MMAD est compris entre 2 et 5 μm ;
- les alvéoles pulmonaires : si le MMAD est inférieure 2 μm .

2.3.3.2. Impact de l'état respiratoire du patient

Cependant, ces données, si elles sont pertinentes chez le sujet sain, devront être validées chez les sujets porteurs des remaniements anatomiques des voies respiratoires basses. En effet, ces remaniements sont susceptibles de modifier les modes d'écoulement des gaz dans les voies respiratoires. De plus, chez les sujets anciens fumeurs, l'état respiratoire de base est souvent altéré du fait d'une BPCO sous-jacente [73].

Il a été montré que dans certaines situations pathologiques tumorales, les écoulements gazeux ne sont plus laminaires, ce qui modifie les sites de dépôts des aérosols [74,75]. Des outils informatiques utilisant des techniques de modélisation pourraient permettre de prédire l'évolution du dépôt d'un aérosol d'intérêt en fonction de la présence d'une pathologie pulmonaire obstructive (BPCO) et/ou tumorale [76].

2.3.4. Métabolisme locorégional et clairance muco-ciliaire

Une fois les gouttelettes de l'aérosol déposées dans l'arbre bronchique, le principe actif encapsulé sera protégé d'une dégradation précoce par un mécanisme de métabolisme locorégional. Cependant, la clairance muco-ciliaire réduira la charge thérapeutique intra-bronchique et intra-pulmonaire.

Le métabolisme des médicaments inhalés est très peu connu [77]. Le médicament inhalé peut atteindre la tumeur soit par contact direct avec les bronches puis pénétration dans une tumeur

péri-bronchique, soit après un passage vasculaire pour les lésions situées à distance des bronches comme les carcinomes périphériques ou les métastases. Le métabolisme locorégional d'un médicament inhalé peut influencer sa pharmacocinétique et son efficacité.

La concentration de la formulation devra être élevée pour réduire le nombre et la durée des aérosols. De même, les formes à libération prolongée sont intéressantes pour augmenter le temps entre 2 aérosols.

2.3.5. Vectorisation active

Dans le cas d'un médicament vectorisé, la biodistribution du médicament après administration par aérosol sera dépendante des propriétés de surface du vecteur. Cette propriété intrinsèque des vecteurs colloïdaux est à la base de vectorisation passive des anticancéreux. Il semble possible de construire des vecteurs préférentiellement capables de se concentrer dans une tumeur primitive ou dans ses ganglions lymphatiques satellites. De plus, la surface des vecteurs colloïdaux peut être modifiée pour fixer des molécules d'intérêt thérapeutique pour effectuer une vectorisation active. Ainsi, des cibles moléculaires surexprimées à la surface des cellules cancéreuses permettraient de mieux délivrer le principe actif au contact des cellules cancéreuses au sein de l'organe malade.

De même, des traitements associés comme des immunomodulateurs sont susceptibles de renforcer l'action cytotoxique d'un anticancéreux, comme la cyclosporine A [78].

2.3.6. Toxicologie

Les médicaments utilisés en cancérologie sont parfois pneumotoxiques, comme l'irinotécan, la doxorubicine, la gemcitabine, le paclitaxel ou le docétaxel. Un tel médicament administré par aérosol peut induire une réaction toxique locale pendant ou après le traitement [79,80]. Ce risque a freiné le développement d'aérosols de cytotoxiques [8].

Le principal défi pour les nouvelles nanoformulations sera de démontrer leur innocuité [81,82]. En effet, les risques toxiques potentiels sont imprévisibles. En raison de la taille nanométrique de ces

nano-objets, leur capacité de translocation au travers des cellules épithéliales et des barrières biologiques usuelles est réelle d'où des risques toxicologiques nouveaux et inconnus à ce jour. Récemment, la toxicité pulmonaire de nanoparticules inhalées a été décrite chez le rongeur [83] et une observation a été publiée chez des ouvrières chinoises [84]. Sept ouvrières (19 à 47 ans, non fumeuses, sans antécédent) travaillant dans le même atelier textile durant 8 à 12 heures par jour ont présenté entre janvier 2007 et avril 2008, les mêmes symptômes : essoufflement et épanchements pleuro-péricardiques. Un bilan exhaustif a permis d'éliminer les pathologies usuelles. Dans le liquide pleural, il a été mis en évidence de nombreuses nanoparticules de polyacrylate d'un diamètre inférieur à 100 nm. Les biopsies pulmonaires ont documenté une inflammation pulmonaire avec granulomes et évolution vers la fibrose pulmonaire. Deux des patientes sont décédées. L'analyse du lieu de travail a permis de découvrir que le système de climatisation était tombé en panne quelques mois avant les premiers cas et qu'une colle à base de polyacrylate était utilisée dans l'atelier. Cette observation montre les risques potentiels de toxicité pulmonaire des nanoparticules inhalées en cas d'accumulation et d'activation de mécanismes immuno-allergiques pathologiques.

2.3.7. Protection de l'environnement

Enfin, il faudra disposer d'équipements permettant de réaliser les aérosols de cytotoxiques dans une enceinte close hermétique dont l'air expulsé aura été filtré de tout aérosol d'anticancéreux. Ce type de dispositif à base d'un filtre absolu de type « High-Efficiency Particulate Air (HEPA) a démontré son efficacité pour protéger l'environnement immédiat du patient et les professionnels de santé [85].

3. Encapsulation de médicaments anticancéreux pour aérosolthérapie : perspectives

3.1. Etudes précliniques

Quelques formulations d'agents anti-cancéreux encapsulés sont en phase de développement préclinique avec des études d'efficacité de la voie d'administration pulmonaire. Ces études ont porté sur des stratégies de chimoprévention et de traitement de lésions en place.

Les liposomes ont été le plus étudiés car ils sont peu coûteux, hautement biocompatibles et parce qu'ils augmentent le temps de présence du principe actif dans les poumons [86]. Le paclitaxel, peut être encapsulé dans des liposomes. Lorsque ces liposomes ont été délivrés sous forme d'un aérosol dans un modèle murin de métastases pulmonaires de cellules murines RENCA, cette formulation a permis de réduire significativement le nombre de lésions secondaires [87]. De même, des aérosols de liposomes de paclitaxel et un analogue de la vitamine E ont permis de réduire la taille de tumeurs mammaires murines et ont freiné la dissémination des micrométastases pulmonaires [88].

Des liposomes de 9-camptothécine ont permis de prévenir le développement de métastases pulmonaires de mélanome B16 dans un modèle murin [89]. De même, un effet thérapeutique a été observé sur métastases d'oséotarcomes établies [89]. Comme avec les liposomes de paclitaxel, l'ajout d'un analogue de la vitamine E aux liposomes de 9-camptothécine a réduit la taille de tumeurs mammaires murines et la dissémination de métastases pulmonaires [90]. Toutes ces formulations liposomiques ont été nébulisées par des appareils pneumatiques.

Des nanoparticules à coque lipidique renfermant du 5-FU dans leur cœur (fabriquées par une méthode de lyophilisation) peuvent être nébulisées par un système ultrasonique dans des gouttelettes de 3 μm [91]. Un dépôt pulmonaire significatif et un effet de relargage passif sont observés au niveau des poumons de hamsters [92].

Des nouvelles stratégies d'aérosolthérapie pour réaliser un traitement génétique des pathologies cancéreuses sont maintenant disponibles. Ainsi, des stratégies d'interférence avec les acides ribonucléiques (ARN) (siRNA) ou d'oligonucléotides anti-sens sont développées au moyen de vecteurs colloïdaux. Des liposomes permettent ainsi de délivrer par voie pulmonaire (instillation trachéale directe de la solution) des oligonucléotides anti-sens ou des siRNA [93]. Après un aérosol de liposome, l'aire sous la courbe de l'exposition pulmonaire aux siRNA est multipliée par un facteur 4 à 75 par rapport à une injection intraveineuse. Xu et coll. ont utilisé cette stratégie pour délivrer au moyen d'un nébuliseur pneumatique un siRNA anti-Akt1 en utilisant un nanovecteur de type polymère de polyester-amine [94]. Ce traitement a permis de réduire la taille de lésions pulmonaires dans un modèle murin.

Des siRNA et des fragments d'ADN peuvent aussi être administrés par voie pulmonaire au moyen de vecteurs à base de chitosan ou de substances dérivées [95].

Récemment, une stratégie de ciblage actif des cellules surexprimant le récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGFR) au moyen de nanoparticules de gélatine chargées en cisplatine et biotynilée en surface par de l'Epidermal Growth Factor (EGF) a été publiée [96]. Ces objets se concentrent dans les cellules surexprimant le récepteur du ligand biotynilé et sont nébulisables par une méthode pneumatique.

Des nanoparticules de doxorubicine préparées par une méthode d'émulsion-polymérisation ont été formulées en poudre sèche par lyophilisation en vue d'une administration inhalée [97].

3.2. Premières études cliniques

Verschraegen et coll. ont récemment rapporté les résultats d'une étude de phase I montrant la faisabilité et la bonne tolérance de l'administration d'une formulation liposomale de 9-nitrocamptothécine en aérosol chez 25 patients porteurs d'un cancer broncho-pulmonaire primitif ou de métastases pulmonaires avec un effet thérapeutique chez 5 patients dans une situation d'échappement [98]. La dose recommandée pour une étude de phase II est de 0,5 mg/m²/jour 5 jours sur 7 pendant 8 semaines.

Une autre étude de phase I avec escalade de doses a testé l'administration d'aérosols d'une forme liposomal de cisplatine nommée « cisplatin Sustained Lipid Inhalation Targeting » (SLIT) [99]. Dix-huit patients dont un trachéostomisé ont été inclus. Aucune toxicité limitante n'a été observée à la dose maximale. Le passage systémique a été faible. Ce traitement semble faisable et peu toxique.

Une étude de phase I a été conduite chez des patients atteints de métastases pulmonaires pour étudier la toxicité de liposomes d'IL-2 [100]. Neuf patients ont été inclus. Aucune toxicité n'a été observée.

Toutes ces études ont utilisé des systèmes de nébulisation pneumatique.

Tous ces travaux précliniques et cliniques illustrent des nouvelles possibilités de délivrance pulmonaire de médicaments anti-cancéreux vectorisés.

4. Les nanocapsules lipidiques : une nouvelle plateforme d'encapsulation nanométrique

L'unité INSERM 646 a développé une plateforme d'encapsulation originale dans un vecteur nanométrique lipophile, dénommé nanocapsule lipidique (NCL) [101,102].

4.1. Les constituants

Les constituants des NCL sont une huile composée de triglycérides à chaînes moyennes (Captex[®] 8000), une lécithine de soja (Lipoïd[®] S75-3 ou P75-3), des esters de polyéthylène glycol (Solutol[®] HS 15), du chlorure de sodium et de l'eau distillée (1,2 g ; 67,2 mg ; 1,0 g ; 73,3 mg et 1,8 g, respectivement).

4.2. Méthode de formulation

Ce vecteur original est produit par une méthode d'inversion de phase à basse énergie sans solvant organique (Figure 1). Les composés sont chauffés à 90°C sous agitation magnétique. Puis, trois cycles de chauffage à 90°C suivi d'un refroidissement à 70°C sont réalisés sous agitation magnétique constante. Durant ces cycles, la nature physico-chimique du mélange, qui est une émulsion d'huile dans de l'eau à 70°C, se transforme en une émulsion d'eau dans de l'huile à 90°C. Après un dernier chauffage à 90°C, la formation des NCL sera provoquée par l'ajout de 13,2 ml d'eau distillée à 0°C dans le mélange. Pour fabriquer des NCL chargées en paclitaxel, il faut d'abord solubiliser le paclitaxel (sous forme de poudre-mère) dans le Captex[®] 8000 (21,6 mg dans 12 g, soit 1,8%) puis chauffer à 50°C sous agitation constante pendant 30 minutes. Le

protocole sus décrit est ensuite appliqué au mélange obtenu. Après filtration à 0,22 μm , 16 millilitres (ml) de formulation de NCL sont disponibles.

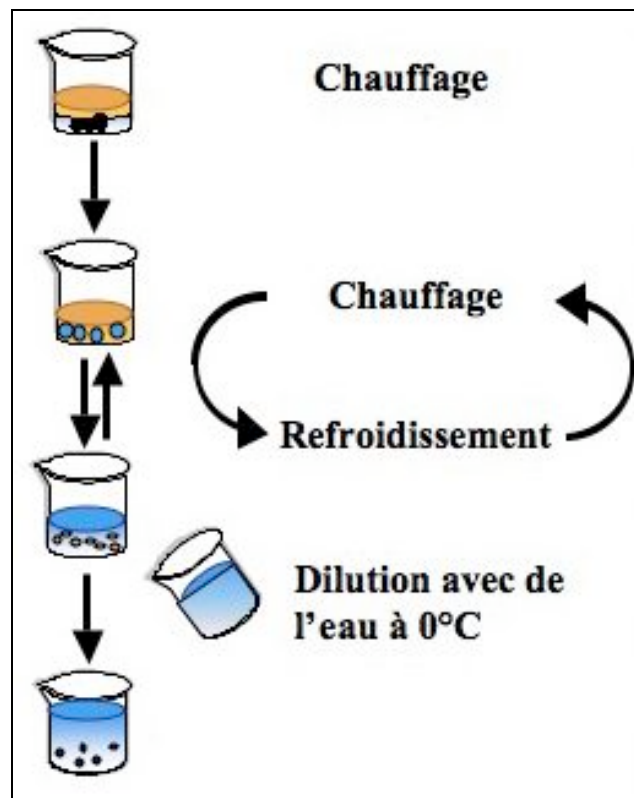


Figure 1. Schéma du principe de formulation des NCL par inversion de phase.

4.3. Structure des nanocapsules lipidiques

Le vecteur colloïdal obtenu a une structure hybride entre des nanocapsules polymères et des liposomes. Leur structure générale ressemble à celle d'une apo-lipoprotéine humaine avec une structure cœur/enveloppe. Le cœur de la particule est composé par l'huile (Captex[®] 8000). Le principe actif est solubilisé dans cette phase au centre du vecteur. La surface du nanovecteur est formée d'une coque de lécithine de soja (Lipoïd[®] S75-3 ou P75-3) rigide à 25°C dans laquelle s'enchâssent des chaînes flexibles hydrophiles de polyéthylène glycol (Solutol[®] HS 15) orientées vers l'extérieur et permettant d'assurer le caractère hydrophile du vecteur et d'échapper aux opsonines qui favorisent la phagocytose (Figure 2). Le diamètre des NCL peut être facilement choisi entre 20 et 150 nm en modifiant les rapports entre les différents constituants [103].

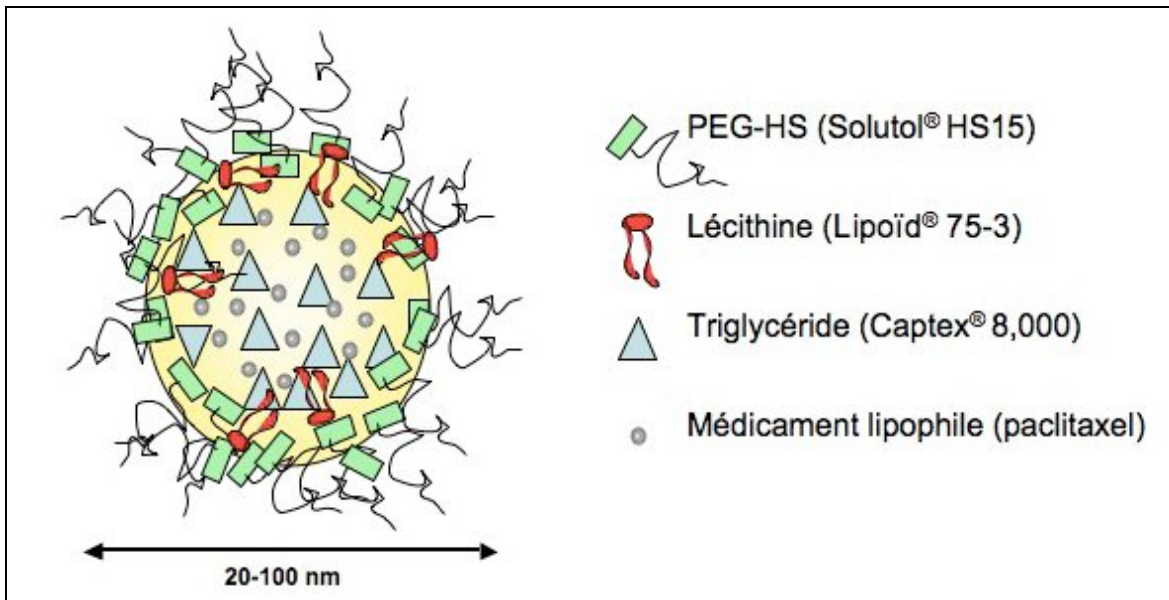


Figure 2. Schéma d'une NCL.

Les mesures de taille par diffraction laser ont montré une très faible dispersion du diamètre obtenu évalué par l'index de polydispersité (qui doit être inférieur à 0,1).

4.4. Observation en microscopie électronique

Les images obtenues par microscopie électronique à transmission en congélation (cryo-TEM) confirment le caractère monodisperse du vecteur ainsi obtenu (Figure 3).

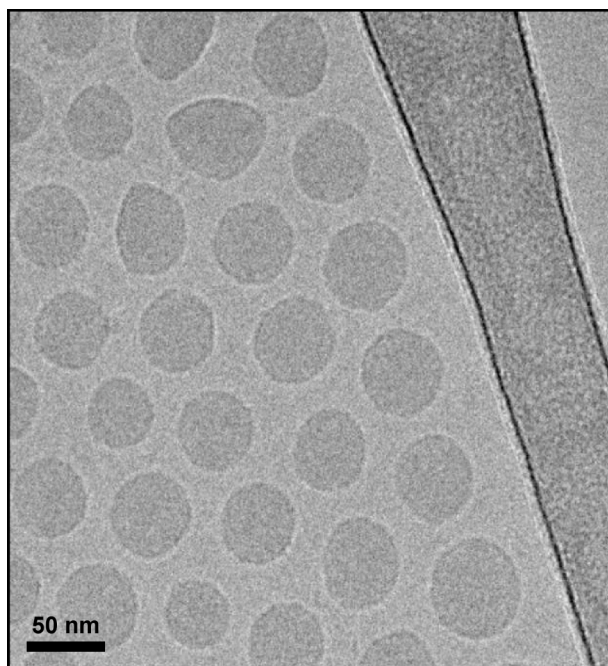


Figure 3. Image de microscopie électronique en congélation montrant de grande homogénéité d'une dispersion de NCL d'un diamètre moyen de 50 nm.

Dans un millilitre de formulation de NCL de 50 nm, il a été dénombré $1,5 \cdot 10^{15}$ nano-objets.

4.5. Principes actifs déjà encapsulés

De nombreux médicaments lipophiles peuvent être encapsulés comme de l'amiodarone [104], de l'ibuprofène [105], de la triptentone [106], du ferrocenyl diphénol [107], de l'étoposide [108], du docétaxel [109] et du paclitaxel [110]. *In vitro*, la cinétique de libération des principes actifs varie de plusieurs jours à plusieurs semaines. Des travaux récents montrent qu'il est possible d'encapsuler des principes hydrophiles dans les NCL [111].

4.6. Devenir intracellulaire sur des cultures cellulaires

Sur des cultures cellulaires, il a été montré que les NCL sont retrouvées dans le cytoplasme cellulaire [110]. Leur passage membranaire semble être sous le contrôle de vésicules qui échappent à la dégradation lysosomale acide [112].

4.7. Propriétés des nanocapsules lipidiques

Les propriétés des NCL sont nombreuses. Tout d'abord, la fabrication des NCL n'emploie aucun solvant organique. Aucun catalyseur n'est utilisé permettant de garantir l'absence de tels résidus dans la préparation finale. Tous les excipients utilisés sont soit disponibles dans la Pharmacopée européenne ou approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) soit des excipients « Generally Recognized as Safe » (GRAS). Ensuite, le principe actif étant solubilisé dans le cœur lipidique des NCL, il est protégé de toute dégradation avant d'atteindre sa cible ou d'une fixation sur des protéines sériques qui réduirait sa biodisponibilité. Un autre résultat de cette vectorisation est de modifier la biodistribution du principe actif. La biodistribution du principe actif encapsulé n'est plus fonction de ses propriétés physico-chimiques mais est fonction de la composition de la surface extérieure des NCL, c'est-à-dire uniquement des interactions entre le vecteur et son environnement. Classiquement, les vecteurs colloïdaux après injection dans le sang, sont éliminés du secteur vasculaire sous l'effet de la phagocytose des macrophages hépatiques (cellules de Küpffer) et spléniques du système réticulo-endothélial. Les études de biodistribution des NCL ont confirmé ces résultats [113]. La demi-vie plasmatique d'une formulation de NCL « classiques » est courte (environ 30 à 40 minutes). Cependant, la furtivité des NCL, leur capacité à rester dans le système vasculaire en échappant au système réticulo-endothélial, est modulable en fonction de la couche périphérique de chaînes flexibles hydrophiles de polyéthylène glycol [114]. En allongeant la longueur des chaînes de poly-éthylène glycol à la surface des NCL, la furtivité des NCL augmente. Une étude sur des NCL de docétaxel a bien confirmé cette propriété des NCL [109]. L'autre avantage en terme de biodistribution dans le domaine de la cancérologie est que les NCL vont préférentiellement sortir du secteur vasculaire au niveau des capillaires tumoraux immatures fenestrés. Du fait de la relative pauvreté des tumeurs en vaisseaux lymphatiques, les NCL vont être séquestré dans la tumeur. Ces deux observations expliquent l'effet EPR propre à tous les vecteurs colloïdaux dont les NCL et supportent l'hypothèse (non vérifiée à ce jour) selon laquelle les NCL pourraient permettre d'améliorer la pénétration intratumorale des anticancéreux qu'elles véhiculent. Il a été montré *in vitro* que le paclitaxel diffuse au travers de l'enveloppe de la NCL de manière passive et très prolongée (Figure 4).

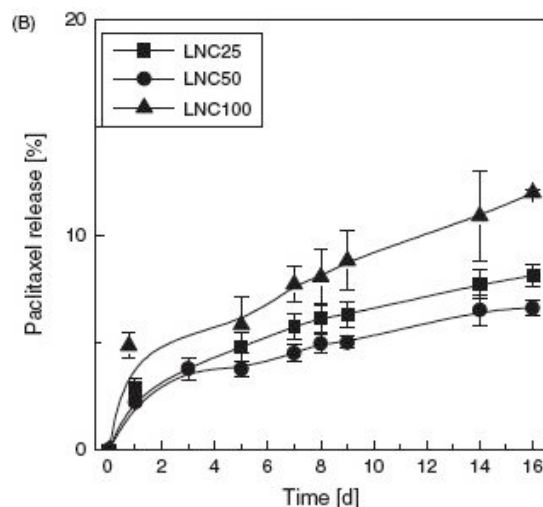


Figure 4. Cinétique de libération du paclitaxel de 3 formulations de nanocapsules lipidiques de diamètre moyen croissant (25, 50 et 100 nm). En ordonnées, le pourcentage de paclitaxel relâgé en pourcentage de la charge initiale (100%). En abscisses, le temps en jours.

In [115] avec la permission du Dr Franck Lacœuille.

La libération prolongée du principe actif dans l'environnement péri-tumoral permet d'exposer plus de cellules cancéreuses au principe actif sans nouvelle administration thérapeutique au patient. En effet, à un instant donné, un faible pourcentage de cellules cancéreuses est engagé dans le cycle cellulaire et sensible à un cytotoxique donné. La libération très prolongée du cytotoxique vectorisé par les NCL permet d'augmenter la probabilité de présence du cytotoxique au voisinage d'une cellule cancéreuse engagée dans le cycle cellulaire.

Le mode de libération du principe actif dans les cellules n'est pas clairement connu (libération prolongée ou dégradation de la NCL). En tout cas, dans la cellule, un des composants des NCL, le Solutol[®] HS 15 va potentialiser l'action du cytotoxique en inhibant le système d'efflux basé sur la glycoprotéine-P. L'inhibition de ce mécanisme de résistance est une propriété intrinsèque très originale des NCL.

Récemment, les NCL ont été modifiées pour permettre de vectoriser des ARN thérapeutiques. Un effet biologique a été démontré sur l'inhibition de l'expression du gène EGFR.

4.8. Avantages théoriques des nanocapsules de paclitaxel par rapport à la formulation avec solvants Taxol[®]

La découverte du principe actif paclitaxel a constitué une grande avancée thérapeutique dans le domaine de la cancérologie humaine [116]. Cependant, ce principe actif très lipophile est difficile à solubiliser de manière stable en phase aqueuse. Dans la première formulation commerciale Taxol[®], le paclitaxel a été solubilisé au moyen d'excipients à effet notoire que sont le Crémophor[®]EL et de l'éthanol (396 mg/ml). Le Crémophor[®]EL est une huile polyéthoxylée susceptible d'induire une toxicité aiguë sévère chez l'homme par relargage histaminique dont la fréquence et la gravité est réduite par une prémédication (corticoïdes, antihistaminiques et antagonistes des récepteurs H2). Ce composé peut aussi interagir avec le polychlorure de vinyle (PVC) qui compose les tubulures perfusion usuelles et d'induire le relargage de phtalates hépatotoxiques. Il est donc nécessaire d'utiliser des tubulures de perfusion ne renfermant pas de PVC. Malgré ces deux excipients, des cristaux de paclitaxel peuvent se former dans la perfusion. Pour éviter tout accident micro-embolique, la solution de Taxol[®] en cours de perfusion doit passer au travers d'un filtre de 0,22 µm inséré dans la tubulure non-PVC.

Le Taxol[®] ne peut être administré par nébulisation car il est trop visqueux. Cependant, il existe un rationnel scientifique pour cette voie d'administration [117]. Des études précliniques ont montré que des formulations de paclitaxel sans solvant étaient efficaces sur des modèles de tumeurs pulmonaires chez l'animal [23,87].

5. Buts de la thèse

Ce but de ce travail de thèse est de déterminer si la formulation de paclitaxel encapsulé dans des NCL :

- est adaptée à une administration chez l'animal ;
- de comparer la toxicité de cette formulation chez la souris et son efficacité sur un modèle de tumeur bronchique sous-cutanée par rapport au Taxol[®] ;
- et de déterminer si les NCL de paclitaxel peuvent subir un processus de nébulisation en vue d'un usage thérapeutique chez l'homme.

6. Article 1 : The adaptation of lipid nanocapsule formulations for blood administration in animals

L'intérêt des NCL pour vectoriser des anticancéreux a été montré dans de nombreux systèmes cellulaires. Ces résultats permettent de poursuivre les études d'efficacité et de toxicité chez l'animal. Dans cet article, une recherche systématique de la présence d'impuretés de type « organisme génétiquement modifié » (OGM) a été réalisée dans les composants des NCL. L'effet de l'acidité des dispersions de NCL (pH voisin de 6) a été étudié chez le rat. Plusieurs protocoles de conservation des NCL dans leur phase aqueuse par congélation durant 6 mois ont été comparés. Les résultats ont montré que le Lipoïd S75-3[®] ne pouvait pas être certifié sans impureté de type OGM par le fabricant. Le remplacement de ce composé par un composé identique certifié sans OGM a permis d'obtenir des NCL sans impureté de type OGM. L'injection de 20 ml/kg de dispersion de NCL à pH = 6 n'a pas induit d'acide métabolique mais a provoqué une diminution importante de l'excès de base plasmatique. Des injections répétées (lors des études de toxicologiques réglementaires, par exemple) pourraient induire une toxicité iatrogénique par acidose métabolique. Enfin, le meilleur protocole de conservation des NCL par congélation pendant 6 mois est le protocole de conservation dans l'azote liquide. Ce protocole a permis de bloquer le phénomène de libération prolongée du paclitaxel, modifie le moins les caractéristiques morphologiques des NCL.

Ces données originales doivent permettre de préparer des lots de NCL bien adaptés à l'administration intraveineuse chez l'animal.

Ce chapitre a été publié dans : *International Journal of Pharmaceutics*, 379 (2009) 266-269.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Pharmaceutical Nanotechnology

The adaptation of lipid nanocapsule formulations for blood administration in animals

J. Hureauux^{a,b,c,*}, F. Lagarce^{b,d}, F. Gagnadoux^{a,c}, A. Clavreul^b, J.-P. Benoit^{b,d}, T. Urban^{a,c}^a Pulmonology department, Academic Hospital, Angers, France^b INSERM U646, IFR 132, University of Angers, Angers, France^c Equipe PYVER, University of Angers, Angers, France^d Pharmacy, Academic Hospital, Angers, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2009

Received in revised form 14 April 2009

Accepted 18 May 2009

Available online 23 May 2009

Keywords:

Lipid nanocapsule

Paclitaxel

Animal experimentation

Intravenous injections

Plants

Genetically modified

Drug storage

ABSTRACT

In many cell-culture and animal models, the therapeutic effects of the entrapped drugs in lipid nanocapsules (LNCs) were preserved with low toxicity. These results allow foreseeing further preclinical efficiency and toxicity studies in animals. In this article, preliminary studies were performed to check the genetically modified organism (GMO) status of the LNCs components and to determine the effects of the acidity of the LNCs dispersions in acid–base balance in rats. Then, several freezing protocols to store paclitaxel-loaded LNCs dispersions for a 6-month period were compared. Results indicate that the Lipoid® S75-3 could not be certified GMO-free. The same soya bean lecithin certified to be GMO-free permitted to produce LNCs with expected characteristics. The blood administration of blank LNCs dispersions in rats induced no modifications of blood acidity, but a significant decrease of the base excess was observed. Injections of LNCs dispersions in animals might induce iatrogenic acidosis. We finally demonstrated that the best protocol to store LNCs dispersion for a 6-month period is by freezing in liquid nitrogen. This protocol minimized the characteristics modifications and interrupted the drug-release phenomenon. These original data are expected to prepare of LNCs dispersions well adapted for i.v. administration in animals.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lipid nanocapsules (LNCs) are the result of original, solvent-free technology allowing the production of new drug nanocarriers able to transport soluble, lipophilic drugs (Heurtault et al., 2002). Many different drugs have been encapsulated, such as amiodarone (Lamprecht et al., 2002), ibuprofen (Lamprecht et al., 2004), tripartite (Malzert-Freon et al., 2006), etoposide (Lamprecht and Benoit, 2006), ferrocenyl diphenol (Allard et al., 2008), docetaxel (Khalid et al., 2006) and paclitaxel (Garcion et al., 2006; Peltier et al., 2006).

In many cell-culture and animal models, the therapeutic effects of the entrapped drugs were preserved with a low level of toxicity. For example, paclitaxel-loaded LNCs demonstrated a significant anti-tumoral effect on cell-culture and human tumour models in mice in comparison with the commercially available formulation Taxol® (Garcion et al., 2006; Lacœuille et al., 2007). These results are attributed to the intrinsic properties of LNCs that reduce potential cytotoxic effects of paclitaxel by increasing the amount of paclitaxel in the tumour due to enhanced permeability and retention (EPR), the sustained release of paclitaxel (Lacœuille et al., 2007),

and the inhibition of P-glycoprotein (P-gp) (Garcion et al., 2006). These results allow us to foresee further preclinical efficiency and toxicity studies in animals.

Captex® 8000 and Lipoid® S75-3, two major components of the LNCs, are extracted from coconut, palm and soya bean oils, respectively. The systematic research of the presence of genetically modified organisms (GMOs) in all the components of the LNCs was needed prior to undertaking animal toxicity studies. Additionally, it has been noted that LNCs dispersions are acidic, but no data are available concerning the impact of single LNCs dispersion via blood injection on the acid–basic blood balance in animals. It is important to have this information before providing repeated injections in animals during toxicological screening. Finally, the best protocol for the storage of paclitaxel-loaded LNCs dispersions for preclinical studies is not currently known. Three 6-month freeze-storage protocols for paclitaxel-loaded LNCs were set up and compared.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Captex® 8000 (glyceryl tricaprilate from coconut and palm oils) and Solutol® HS15 (polyglycol ester of 12-hydroxystearic acid and polyethylene glycol) were purchased from Abitec Corp

* Corresponding author. Tel.: +33 2 41 35 3678; fax: +33 2 41 35 4974.
E-mail address: johureauux@chu-angers.fr (J. Hureauux).

(Columbus, OH, USA) and BASF (Ludwigshafen, Germany), respectively. Lipoid® S75-3 and Lipoid® P75-3 (both soya bean lecithin at 69% phosphatidylcholine) were purchased from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Paclitaxel powder was provided by AMPAC Fine Chemicals (Rancho Cordova, CA, USA). Distilled water from Cooper (Melun, France) was used. Sodium chloride (NaCl) was obtained from Prolabo VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Ministar 0.20 µm high-flow filters were purchased from Sartorius AG (Goettingen, Germany). CRYO.S cryotubes from Greiner Bio-one were used (Frickenhausen, Germany).

2.2. LNCs formulation

The study was performed using 55 nm-diameter LNCs prepared according to an original method described elsewhere (Heurtault et al., 2002). Captex® 8000, Lipoid® S75-3, Solutol® HS 15, NaCl and water (1.2 g; 67.2 mg; 1.0 g; 73.3 mg and 1.8 g, respectively) were mixed and heated at 90 °C under magnetic stirring. Three cycles of heating and cooling between 90 °C and 70 °C were carried out before fast cooling was induced at 78 °C by adding 13.2 mL of 0 °C deionised water. Paclitaxel powder was first dissolved in Captex® 8000 at 1.8% (w/w) (i.e. 21.6 mg in 1.2 g) under magnetic stirring and heated at 50 °C for 30 min to form the oily phase. Then, the drug-loaded LNCs were manufactured according to the aforementioned process described.

2.3. Size distribution

The LNCs were analysed for size distribution by photon correlation spectroscopy and zeta potential using Malvern Zetasizer®, Nano Series DTS 1060 (Malvern Instruments SA, Worcestershire, UK) after filtration through a 0.20 µm Sartorius filter.

2.4. Drug payload and encapsulation efficiency

Paclitaxel-loaded LNCs were filtered through a 0.20 µm Sartorius filter before using a validated protocol to measure the payload and encapsulation efficiency by using a high-performance liquid chromatography (HPLC) protocol before and after 6-month storage.

2.5. Genetically modified organism status of the LNCs components

The genetically modified organism (GMO) status of the LNCs components was assessed by requesting the suppliers of each component to provide a GMO statement.

2.6. LNCs dispersion acidity and an animal, single-dose injection study

pH measurements of LNCs dispersions were performed by calibrated micro-pH CRISON 2001 OSI (Paris, France). The rats (Sprague Dawley, 290–318 g females) were obtained from the Faculty of Medicine of Angers University and had access to water and food *ad libitum*, prior to the experimental procedure. During inhalational anaesthesia, the rats received a slow injection of 20 ml/kg blank LNCs dispersion in the tail vein (Diehl et al., 2001). An intracardiac puncture was performed before the injection and 15 min later to collect arterial blood in order to carry out a blood gas analysis with an Opit CCA analyser (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The animals were sacrificed after the second blood puncture. The experimental protocol was approved by the *Pays-de-la-Loire* ethics committee on animal experiments under number 2008-4, and studies were completed in conformance with French law.

2.7. Storage protocols

Paclitaxel-loaded LNCs dispersions were stored in CRYO.S cryotubes; they were firstly frozen in liquid nitrogen for 12 h, and then maintained in liquid nitrogen or stored at either –80 °C or –20 °C for 6 months. A specific thawing protocol was applied to each batch: liquid nitrogen-stored LNCs were kept for 1 h at –80 °C, then for 1 h at –20 °C and then thawed at room temperature for 30 min; –80 °C-stored LNCs were kept for 1 h at –20 °C before thawing at room temperature for 30 min; –20 °C-stored LNCs were thawed at room temperature for 30 min. These paclitaxel-loaded LNCs dispersions were then analysed for size distribution, zeta potential, drug payload and cytotoxicity assays.

2.8. In vitro cytotoxicity studies

The *in vitro* cytotoxic activity levels of fresh LNCs and the three groups of thawed paclitaxel-loaded LNCs for NCI-H460 human lung cancer cells were determined using a growth-inhibition assay. The NCI-H460 human, large-cell lung carcinoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). The cells were cultured in 1,640 RPMI medium containing glutamine (Lonza, Verviers, Belgium), 10 mM HEPES (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA), 1 mM sodium pyruvate (Lonza, Verviers, Belgium), 1.5 g/L bicarbonate (Cambrex Bio Sciences, Verviers, Belgium), 10% foetal bovine serum (Lonza, Verviers, Belgium), 50 U/mL penicillin, and 50 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich Co., Ayrshire, UK). The cells were routinely maintained at 37 °C in a humid atmosphere with 5% CO₂. The culture medium was replaced every 2 or 3 days and the cells were subcultured weekly using 0.25% trypsin-1 mM EDTA (Sigma-Aldrich Co., Ayrshire, UK). Tumor cells were seeded in 24-well plates at 50,000 cells/well. All assays were performed with exponentially growing cultures. After 72 h, a drug-containing medium was added. Each sample, with a dose-range from 10⁻³ to 100 nM of paclitaxel-encapsulated LNCs or of blank LNC formulations, was tested. The cytotoxicity was assessed after 2 days of exposure by adding 80 µl of CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent (Promega, Madison, WI) to each well according to the manufacturer's instructions. After 4 h in culture, the cell viability was determined by measuring the absorbency level at 492 nm using a Multiskan Ascent microplate reader (Thermo Fisher Scientific Cergy-Pontoise, France). Because the culture medium was not translucent when the LNCs were added, the absorbency of wells containing the cells was subtracted from the absorbency of wells containing culture subtract alone for each point. The concentration of the drug causing 50% growth inhibition (IC₅₀) was calculated. Three independent experiments were performed in triplicate.

2.9. Statistical analysis

The results are expressed as a mean ± SD. For the analysis of statistical significance, the Mann-Whitney *U*-test was applied with Bonferroni's correction. For the comparison of several groups, a Kruskal-Wallis test was applied with Bonferroni's correction. In all cases, *P* < 0.05 was considered to be the level of statistical significance.

3. Results

3.1. Genetically modified organism check

Based on the certificates provided by the suppliers, only the Lipoid® S75-3 (soya bean lecithin at 69% of phosphatidylcholine) could not be certified GMO-free. This element was replaced by Lipoid® P75-3, a soya bean lecithin certified by the supplier to be GMO-free. The replacement of this component did not affect the

Table 1

Characterisations of blank LNCs produced by using Lipoid® S75-3 and Lipoid® P75-3: experiments performed in triplicate.

	Mean particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	Volume (ml)
Formulation with Lipoid® S75-3	50.4 ± 0.7	0.05 ± 0.01	-4.85 ± 0.55	15
Formulation with Lipoid® P75-3	52.4 ± 0.5	0.05 ± 0.02	-5.76 ± 0.40	15
Mann-Whitney U-test	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	–

Table 2

Results of a blood gas analysis of three rats before and 15 min after the i.v. administration of blank LNCs.

	Time (min.)	pH	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)	Base excess	Haemoglobin (g/l)	Hematocrit value (%)	Oxygen saturation (%)
Rat 1	0	7.39	49	95	3.5	10.2	31	94
	15	7.40	41	227	-0.3	11.9	36	100
Rat 2	0	7.48	34	174	1.8	11.3	34	99
	15	7.47	36	223	-2.8	12.0	35	98
Rat 3	0	7.47	43	150	5.9	14.4	43	100
	15	7.37	44	324	0.9	14.1	42	100

Table 3

Characterisations of paclitaxel-loaded LNCs after the 6-month storage protocols in comparison with fresh paclitaxel-loaded LNCs.

	Mean particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	Drug payload (mg/ml)
Fresh paclitaxel-loaded LNCs	53.4 ± 1.9	0.08 ± 0.02	-5.84 ± 0.87	1.65 ± 0.08
Paclitaxel-loaded LNCs stored for 6 months in liquid nitrogen	63.4 ± 1.3 ^a	0.13 ± 0.02 ^a	-6.61 ± 0.30	1.64 ± 0.08
Paclitaxel-loaded LNCs frozen in liquid nitrogen then stored for 6 months at -80 °C	65.6 ± 1.4 ^a	0.14 ± 0.01 ^a	-4.01 ± 0.41 ^{a,c}	1.61 ± 0.07
Paclitaxel-loaded LNCs frozen in liquid nitrogen then stored for 6 months at -20 °C	105.0 ± 17 ^{a,b}	0.21 ± 0.01 ^{a,b}	-3.34 ± 0.25 ^{a,d}	1.58 ± 0.09
Kruskal-Wallis test (between four groups)	<i>P</i> = 0.005	<i>P</i> = 0.006	<i>P</i> = 0.006	<i>P</i> > 0.05
Kruskal-Wallis test (between frozen groups only)	<i>P</i> = 0.013	<i>P</i> = 0.009	<i>P</i> = 0.009	<i>P</i> > 0.05

^a *P* = 0.025 versus fresh paclitaxel-loaded LNCs (Mann-Whitney U-test).^b *P* = 0.025 versus the '-80 °C' or 'liquid nitrogen' groups (Mann-Whitney U-test).^c *P* = 0.025 versus the 'liquid nitrogen' group (Mann-Whitney U-test).^d *P* = 0.025 versus the '80 °C' group (Mann-Whitney U-test).

characteristics of a GMO-certified LNCs dispersion in comparison with LNCs dispersion produced with the Lipoid® S75-3 (Table 1).

3.2. The effects of LNCs dispersion acidity on the rat acid-base balance

A blank formulation with a mean size of 50.4 nm had a pH of 5.93 ± 0.05. For the three rats, 20 ml/kg of this blank LNCs dispersion (2.9–3.1 ml), corresponding to the maximum recommended volume, was slowly injected into the lateral tail vein. Blood gas analysis results are presented in Table 2. During the procedure, no modifications of vital clinical signs or of the pCO₂ levels or the haemoglobin levels were observed. No clinically pertinent modifications of blood acidity were observed, but a significant decrease of the base excess by a mean value of 4.5 ± 0.6 mmol/l was constantly observed.

3.3. Storage protocols

Results of the characterisation of the paclitaxel-loaded LNCs after 6 months storage are presented in Table 3. Statistical analysis revealed significant differences in mean particle size (*P* = 0.005), the polydispersity index (*P* = 0.006) and the zeta potential (*P* = 0.006) between frozen and fresh paclitaxel-loaded LNCs groups. Each storage protocol induced a significant increase in the mean particle size and the polydispersity index in all the frozen LNCs groups (*P* = 0.025 versus fresh paclitaxel-loaded LNCs – Mann-Whitney U-test). A significant decrease of the zeta potential was observed in LNCs dispersions not stored in liquid nitrogen (*P* = 0.025 versus fresh

paclitaxel-loaded LNCs – Mann-Whitney U-test). No modifications of the paclitaxel payload were observed. The specific statistical analysis of the frozen paclitaxel LNCs groups showed significant differences in mean particle size (*P* = 0.013), the polydispersity index (*P* = 0.009) and the zeta potential (*P* = 0.009). The mean particle size and the polydispersity index were significantly increased in the '-20 °C storage' group (*P* = 0.025 versus the '-80 °C' or 'liquid nitrogen' groups). Zeta potentials were significantly decreased in the

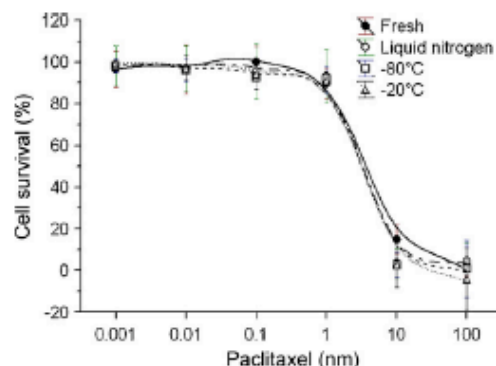


Fig. 1. The effects of paclitaxel-loaded LNCs stored for 6 months according to three different protocols (liquid nitrogen, -80 °C, and -20 °C) in comparison with fresh paclitaxel-loaded LNCs on NCI-H460 cell growth.

–80 °C group ($P = 0.025$ versus the 'liquid nitrogen' group) and in the –20 °C group ($P = 0.025$ versus the '80 °C' group). Cytotoxicity assays are presented in Fig. 1. The IC 50 values of paclitaxel for NCI-H460 cell lines were equal to 5.7 ± 0.2 nM, 5.3 ± 0.3 , 5.2 ± 0.1 and 5.2 ± 0.1 for fresh, liquid nitrogen-stored, –80 °C stored and –20 °C stored paclitaxel-loaded LNCs ($P > 0.05$), respectively.

4. Discussion

In this study, three original topics concerning LNCs dispersions are studied. Firstly, potential contamination from GM soya bean in Lipoid® S75-3 was unveiled. As the clinical output of GM products on human health are not known, and as numerous complementary studies for registration by regulatory agencies could be requested, as suggested by a U.S. Food and Drug Administration draft guidance (U.S. Food and Drug Administration, 2002), the replacement of this component was required. This step was easily reached by using a similar, GMO-free product from the same supplier. GMO-free LNCs dispersions, strictly similar to original ones, are now available for further studies. By using the GMO-free Lipoid® P75-3 lecithin, we are guaranteed to formulate LNCs with constant-quality using GMO-free components only, and hence avoid supplementary safety studies.

Since repeated injections of LNCs dispersions in animals are used for this research, and since LNCs dispersions are known to be acidic, it is necessary to measure the pH levels of LNCs dispersions and to determine their impact on the acid–base homeostasis of animals. The pH level was below 6. LNCs administration in rats was carried out at the maximum possible volume during a slow injection to reveal any potential effects on the acid–base balance. During the experiment, no clinical modifications in the animals were observed. The absence of respiratory failure or internal haemorrhaging as indicated by the blood samples are well documented by unchanged levels of both pCO₂ and haemoglobin during the experiment. The results showed the absence of clinically significant blood acidity modification, but a notable diminution of the base excess was observed. We hypothesised that repeated injections of acid LNCs dispersions in animals might induce iatrogenic acidosis by exceeding acid intake levels for physiological control systems in animals as observed in humans (Lim, 2007). For this reason, the pH of the LNCs dispersions for i.v. administration needs to be buffered to reach a more physiologically-acceptable pH range. Studies to buffer LNCs dispersions are on going.

Because LNCs are sustained release drug carriers, storage methods must preserve their structure and also interrupt the drug-release phenomenon. Our research looked at freezing strategies because freezing seems easy to carry out and avoids complex manipulations of anticancer-loaded nanocarriers. Fast cooling with liquid nitrogen followed by conservation in liquid nitrogen or in a freezer at very low (–80 °C) or low (–20 °C) temperatures were compared. Standardised protocols were applied to the LNCs dispersions to allow them to thaw out. Although no significant modifications of the drug payload and the IC 50 values were observed, some modifications of the LNCs structural characteristics were noticed. Firstly, each storage protocol induced an increase of the mean particle size and of the polydispersity index. Modifications were low for the liquid nitrogen and the –80 °C groups, but significantly higher for the LNCs stored at –20 °C. Secondly, a modification of the zeta potential was observed when LNCs were not stored in liquid nitrogen and was, interestingly, inversely correlated with the storage temperature (linear correlation coefficient = 0.98). We conclude that the 6-month freezing storage protocol in liquid nitrogen induces the lowest number of modifications to the paclitaxel-

loaded LNCs dispersions. The two other protocols induced greater modifications of LNCs characteristics, especially the zeta potential; this could modify their biodistribution in animals or even trigger toxicity. Complementary studies are needed to verify that the freezing storage protocol in liquid nitrogen do not modify future LNCs dispersions compatible with repeated i.v. administration.

5. Conclusions

In this study we made two important adaptations of the LNCs standard formulation. Firstly, we replaced a potentially GMO-polluted component with its GMO-free equivalent. Secondly, we demonstrated that the acidity of LNCs dispersions can induce physiological disorders by acidifying blood after a single i.v. administration. Before using repeated injections in animals, the acidity of the dispersions should be buffered to avoid metabolic acidosis. Finally, we demonstrated that the best protocol for a 6-month storage period of paclitaxel-loaded LNCs is to freeze them in liquid nitrogen which avoids any significant modifications to their main characteristics. These results are expected to prepare of LNCs dispersions well adapted for i.v. administration in animals.

Acknowledgements

The authors would like to thank Pierre Legras and Jérôme Roux (Angers University, Faculty of Medicine, Angers, France) for help in the animal studies. This study was supported by grants from the Comité Départemental du Maine-et-Loire de la Ligue Contre le Cancer, the Cancéropôle Grand Ouest and the Régions Bretagne, Centre, Pays de la Loire et Poitou-Charentes.

References

- Allard, E., Passirani, C., Garcion, E., Pigeon, P., Vessières, A., Jaouen, G., Benoit, J., 2008. Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas. *J. Control Release* 130, 146–153.
- Diehl, K.H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.M., van de Vorstenbosch, C., 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol.* 21, 15–23.
- Garcion, E., Lamprecht, A., Heurtault, B., Paillard, A., Aubert-Pouessel, A., Denizot, B., Menei, P., Benoit, J.P., 2006. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1710–1722.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., Benoit, J.P., 2002. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* 19, 875–880.
- Khalid, M.N., Simard, P., Hoarau, D., Dragomir, A., Leroux, J.C., 2006. Long circulating poly(ethylene glycol)-decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid tumors. *Pharm. Res.* 23, 752–758.
- Lacœuille, F., Garcion, E., Benoit, J.P., Lamprecht, A., 2007. Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 4612–4617.
- Lamprecht, A., Benoit, J.P., 2006. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J. Control Release* 112, 208–213.
- Lamprecht, A., Bouligand, Y., Benoit, J.P., 2002. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *J. Control Release* 84, 59–68.
- Lamprecht, A., Saumet, J.L., Roux, J., Benoit, J.P., 2004. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int. J. Pharm.* 278, 407–414.
- Lim, S., 2007. Metabolic acidosis. *Acta Med. Indones.* 39, 145–150.
- Malzert-Freon, A., Vrignaud, S., Saulnier, P., Lisowski, V., Benoit, J.P., Rault, S., 2006. Formulation of sustained release nanoparticles loaded with a tripeptide, a new anticancer agent. *Int. J. Pharm.* 320, 157–164.
- Peltier, S., Oger, J.M., Lagarce, F., Couet, W., Benoit, J.P., 2006. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm. Res.* 23, 1243–1250.
- U.S. Food and Drug Administration, 2002. Drugs, Biologicals, and Medical Devices Derived from Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals (<http://www.fda.gov/cber/gdlns/bioplant.pdf>).

7. Article 2 : Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel loaded lipid nanocapsules after i.v. administration in mice

Les NCL sont une formulation originale sans solvant qui permet d'encapsuler du paclitaxel et potentialise son effet anti-tumoral sur des modèles animaux après injection intraveineuse. La tolérance et l'efficacité des NCL après injections répétées chez la souris a été étudiée. La dose maximale tolérée (DMT) et la dose létale 50 (DL50) ont été déterminées.

Les formulations de NCL chargées en paclitaxel ont été administrées à la dose de 12 mg/kg/jour pendant 5 jours de suite. Des lots-témoins ont reçu le même volume d'une formulation de NCL sans paclitaxel ou de sérum physiologique. Une étude histologique, une numération sanguine complète et biochimique (inonogramme, créatininémie, ALAT, bilirubine totale et protéine C réactive) ont été réalisés 7 jours après la dernière injection. L'inhibition de croissance d'un modèle de tumeur sous-cutanée NCI-H460 chez la souris nude a été étudié avec le schéma thérapeutique. La DMT et la DL50 ont été déterminées selon le protocole d'Irwin.

Aucune mortalité n'a été observée lors de l'étude d'injections répétées. Les études histologiques n'ont révélé aucune lésion ou accumulation de lipide. Les bilans biologiques sont comparables dans tous les lots. La croissance tumorale des tumeurs sous-cutanées NCI-H460 a été significativement plus inhibée dans le lot NCL de paclitaxel par rapport à lot Taxol[®] et témoins. La DMT et la DL50 du Taxol[®], des NCL chargées en paclitaxel et des NCL sans paclitaxel ont respectivement égales à 12/19,5 ; 96/216 et supérieur à 288/288mg/kg.

Cette étude démontre qu'une administration intraveineuse pendant 5 jours consécutifs de NCL de paclitaxel n'induit aucune lésion tissulaire ou biologique chez les souris. L'encapsulation du paclitaxel dans les NCL améliore son effet thérapeutique par rapport au Taxol[®] avec une augmentation de la DMT et de la DL50 respectivement de 8 et 11 fois. L'efficacité du paclitaxel dans les NCL est supérieure à celle du Taxol[®].

Ce chapitre est en cours de relecture après révision 1 dans Pharmaceutical Research (soumis le 18 octobre 2009).

Pour compléter ces données, nous avons réalisé des études d'hémolyse sur 5 échantillons de sang humains. Ces analyses complémentaires ont montré l'absence d'hémolyse lors que le sang total est mis en contact avec un volume final de 15% de dispersion de NCL sans paclitaxel durant 24 heures par trois méthodes (observation au microscope, étude de la vitesse de sédimentation et appréciation colorimétrique de la teinte du plasma surnageant).

1 Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after *i.v.*
2 administration in mice

3

4 Toxicity and efficacy of lipid nanocapsules in mice

5

6 José Hureauux^{1,2,3,*}, Frédéric Lagarce^{2,4}, Frédéric Gagnadoux^{1,3}, Marie-Christine Rousselet⁵,
7 Valérie Moal⁶, Thierry Urban^{1,3} and Jean-Pierre Benoit^{2,4}

8

9 ¹ Pulmonology department, Academic Hospital, Angers, 49933, France

10 ² INSERM U646, IFR 132, University of Angers, 10, rue Boquel, Angers, 49100, France

11 ³ Team PYVER, University of Angers, Angers, 49933, France

12 ⁴ Pharmacy department, Academic Hospital, Angers, 49933, France

13 ⁵ Cell and Tissue Pathology department, Academic Hospital, Angers, 49933, France

14 ⁶ Biochemistry department, Academic Hospital, Angers, 49933, France

15

16

* Corresponding author. Phone number: +33 2 41 35 59 96. Fax number: +33 2 41 35 49 74.
E-mail: johureauux@chu-angers.fr or jose.hureauux@inserm.fr or jose.hureauux@gmail.com

1 **Abstract**

2 **Purpose**

3 Lipid nanocapsules (LNCs) are solvent-free drug nanocarriers permitting to entrap paclitaxel
4 and increasing its antitumoural effect in animal models after *i.v.* injection. The tolerance and
5 efficacy of LNCs after repeated dose *i.v.* administration were assessed in mice. The maximum
6 tolerated dose (MTD) and 50% lethal dose (LD50) were studied.

7 **Methods**

8 Paclitaxel-loaded LNC formulation was given *i.v.* at the dose of 12mg/kg per day for 5
9 consecutive days in comparison with blank-LNCs and saline. Histological examination,
10 complete blood counts and biochemical quantification were performed after a recovery of 7
11 days. Growth of NCI-H460 subcutaneous xenografts in nude mice receiving one of the
12 aforementioned schedules was assessed. MTD and LD50 were determined by Irwin test.

13 **Results**

14 No mortality was observed in repeated injections studies. Histological studies revealed no
15 lesions, no accumulation of lipids. Blood studies were normal. The tumoural growth was
16 significantly reduced in the group treated by paclitaxel-loaded LNCs. The MTDs/LD50s of
17 Taxol®, paclitaxel-loaded LNCs and blank LNCs were 12/19.5, 96/216 and above
18 288/288mg/kg, respectively.

19 **Conclusions**

20 This study demonstrates that a five-day *i.v.* injection schedule of paclitaxel-loaded LNC
21 dispersions induces no histological or biochemical abnormalities in mice and improves
22 paclitaxel efficacy and therapeutic index in comparison with Taxol®.

23

24 **Keywords**

25 Controlled drug release, Drug delivery, In vivo test, Nanoparticle, Biocompatibiliy

1 **Introduction**

2 Taxol® chemotherapy has provided a major therapeutic improvement for several solid
3 tumours such as ovarian, breast and non-small cell lung cancers (1). Paclitaxel, the first drug
4 of the taxane class, has resulted in observations of tumour reduction in refractory cases.
5 Microtubule-assembly inducing, antiproliferative, antiangiogenic, and antimetastatic effects
6 have been proposed to explain the observed therapeutic effects (2, 3). Nevertheless, paclitaxel
7 is water-insoluble and has a low solubility in most pharmaceutically-acceptable solvents. In
8 Taxol®, the first paclitaxel formulation used in clinical practice, paclitaxel is solubilised by a
9 surfactant in an organic medium, Cremophor®EL (polyethoxylated castor oil), and
10 dehydrated ethanol in a 1:1 (vol/vol) ratio. Cremophor®EL is an excipient with notorious
11 effects on humans such as life-threatening anaphylaxis (4-6), hyperlipidaemia (7), abnormal
12 lipoprotein patterns (8, 9), the aggregation of erythrocytes (10), and peripheral neuropathy
13 (11-13). Some studies indicate that Cremophor®EL may trigger complement activation (14-
14 16). In rats, Cremophor®EL may induce adverse haemodynamic effects (17). Because of
15 these numerous side effects, Cremophor®EL-free formulations of paclitaxel have been
16 developed and are expected to show less toxicity for patients during chemotherapy treatment.
17 Different strategies to formulate paclitaxel have been developed such as polymers (18),
18 prodrugs (19), microemulsions (20), nanoemulsions (21), micrometer-size porous particles
19 (22), nanoparticles (23), nanospheres (24), liposomes (25) and an albumin-stabilised
20 nanoparticle formulation (26). To date, only the last solvent-free formulation, Abraxane®, has
21 demonstrated better efficacy and an alleviation of toxic effects than Taxol® during a Phase III
22 study in metastatic breast cancer patients (27). This new formulation was approved by the
23 Food and Drug Administration (FDA) for clinical use in February 2007. Encouraging Phase I
24 and II clinical studies have been published for solid tumours as well as for non-small cell lung
25 cancer (28) and recurrent ovarian, peritoneal, or fallopian tube cancer (29). The albumin-

1 bound paclitaxel nanoparticle (NAB-paclitaxel) has an original tumoural concentration
2 mechanism *via* an albumin receptor, and is analogous to the opening of a “trap door” on the
3 endothelial cell wall within neo-vascularisation (30). This nano-technology eliminates the use
4 of toxic excipients like Cremophor®EL and thereby allows an increase in the quantity of
5 paclitaxel administered to patients, producing reasonable toxicity effects (31).

6 Lipid nanocapsules (LNCs) represent nanocarriers designed to encapsulate lipophilic drugs
7 such as paclitaxel without using organic solvents. An original phase-inversion process allows
8 the production of nanocarriers ranging from 25 to 100nm in a saline solution (32). The carrier
9 had an unimodal size distribution and a low polydispersity index. Structurally, the lipophilic
10 drug is solubilised into the central lipid core which is surrounded by a membrane of lecithins
11 and pegylated hydroxystearate (HS-PEG) in order to provide stealth properties (33). At
12 human body temperature, the core of the LNC is liquid whereas the membrane is rigid.

13 Numerous drugs can be encapsulated in LNCs: amiodarone (34), ibuprofen (35), triptonone
14 (36), etoposide (37), ferrocenyl diphenol (38), docetaxel (39), and paclitaxel (40, 41). In the
15 field of oncology, etoposide- and paclitaxel-loaded LNCs have shown higher cytotoxicity
16 effects than free drugs after systemic administration; this has been explained by the properties
17 of LNCs to concentrate into tumoural tissues due to by the Enhanced Permeability and
18 Retention (EPR) effect, sustained release of paclitaxel and P-glycoprotein (P-gp) inhibition by
19 Solutol® HS15 (37, 40).

20 To date, no data about the toxicity of LNCs administered in blood are available in animals. In
21 addition, no study have been realised to test the efficacy of repeated *i.v.* injections of
22 paclitaxel-loaded LNCs in xenografts models. The aim of this study is to carry out the first *in*
23 *vivo* toxicological studies after *i.v.* injections of blank and paclitaxel-loaded LNC dispersions
24 in Swiss mice. Firstly, the toxicity, survival, behaviour modifications, gross and microscopic
25 anatomy, complete blood count, blood biochemical assays (liver and renal excretion

1 functions), and C-Reactive protein dosage were studied in Swiss mice after the repeated blood
2 injection of blank and paclitaxel-loaded LNCs. Secondly, the efficacy of the same schedule of
3 paclitaxel-loaded LNC dispersions was assessed in a NCI-H460 subcutaneous xenografts
4 model in nude mice. Thirdly, since the LNCs are composed of an oily core, the potential
5 accumulation of lipids in the lungs, liver, spleen and kidneys of Swiss mice after the repeated
6 blood-administration of LNCs was studied in histological slices. Finally, the maximum
7 tolerated dose (MTD) and 50% lethal dose (LD50) of blank and paclitaxel-loaded LNCs from
8 a single administration were determined.

9 **Materials and methods**

10 **Materials**

11 Lipoïd® S75-3 (genetically-modified, organism-free, soybean lecithin at 69% of
12 phosphatidylcholine), Captex® 8000 (glyceryl tricaprylate) and Solutol® HS15
13 (polyethyleneglycol ester of 12-hydroxystearic acid and polyethylene glycol) were obtained
14 from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany), Abitec Corp (Columbus, OH, USA) and
15 BASF (Ludwigshafen, Germany), respectively. Taxol® 6mg/mL solutions and paclitaxel
16 powder were supplied by Bristol-Myers Squibb (Rueil-Malmaison, France) and AMPAC Fine
17 Chemicals (Rancho Cordova, CA, USA), respectively. Distilled water and sodium chloride
18 were purchased from Cooper (Melun, France) and Prolabo VWR International (Fontenay-
19 sous-Bois, France), respectively. Ministar® 0.20µm high-flow filters from Sartorius AG
20 (Goettingen, Germany) were used. CRYO.S cryotubes were purchased from Greiner Bio.one
21 (Frickenhausen, Germany). The 4% phosphate-buffered formalin was provided by Labonord
22 (Templemars, France). Animal injections were performed with 1ml Ultra-Fine, 29-gauge
23 insuline syringes (Plastipack, BD, Erembodegem, Belgium).

24 **LNC Formulation**

25 The study was made on 55nm diameter LNCs prepared according to a scaled-up protocol that

1 respects the original process (32) and allows the production of standard batches for *in vivo*
2 studies (32, 42, 43). Briefly, Captex® 8000, Lipoid® S75-3, Solutol® HS15, NaCl and water
3 (12g; 672mg; 10g; 733mg; and 18g, respectively) were mixed and heated under magnetic
4 stirring up to 90°C. Three cycles of progressive heating and cooling between 90°C and 70°C
5 were then carried out. Thermal exchanges were optimised by bathing in water at 95°C and at
6 room temperature. This step was followed by an irreversible shock, induced by dilution with
7 112mL of 0°C, deionized water added to the mixture when it was at 78°C. Magnetic stirring
8 was applied to the suspension of LNCs for 5 minutes at room temperature and molar sodium
9 hydroxide and NaCl were added (50µl and 110mg, respectively). The dispersion was filtered
10 through a 0.20µm Ministar® filter into a CRYO.S cryotube.

11 For the formulation of paclitaxel-loaded LNCs, 1.8% w/w of paclitaxel powder was first
12 solubilised in Captex® 8000 (i.e. 216mg in 12g) under magnetic stirring and heating at 50°C
13 for 30 minutes. The above-cited procedure was then applied to this mixture.

14 According to the same process, high-concentration formulations were prepared. The complete
15 process was applied by mixing Lipoid® S75-3, Solutol® HS15, NaCl and water (12g;
16 672mg; 10g; 250mg; and 18g, respectively). The final dilution was made with 38ml of
17 deionized water at 0°C added at 88°C. Magnetic stirring was applied to the suspension of
18 LNCs for 5 minutes at room temperature and molar sodium hydroxyde was added (50µl). The
19 dispersion was filtered through a 0.20µm Ministar® filter into a CRYO.S. cryotube. For the
20 formulation of paclitaxel-loaded LNCs, 2.0% w/w of paclitaxel powder was first solubilised
21 in Captex® 8000 (i.e. 240mg in 12g) under magnetic stirring and heating at 50°C for 30
22 minutes. The above-cited procedure was then applied to this mixture.

23 **LNC conservation protocol**

24 The CRYO.S cryotubes, that had previously been filled with LNC dispersions, were frozen in
25 liquid nitrogen. The thawing protocol consisted of thawing the CRYO.S cryotubes at room

1 temperature for 30 minutes.

2 **LNC characterisation and drug payload**

3 Size distribution, the polydispersity index and the zeta potential measurements of thawed
4 LNC dispersions were characterised by photon-correlation spectroscopy performed by using a
5 Malvern Zetasizer®, Nano Series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire,
6 UK). In order to determine the drug payload, the paclitaxel-loaded LNC dispersions were
7 filtered by 0.20µm Ministar® high-flow filters. Paclitaxel concentrations and encapsulation
8 efficiency were measured in the supernatant by High Performance Liquid Chromatography
9 (HPLC) in triplicate experiments according to a described protocol (42).

10 **Animals**

11 Ninety-eight female, Swiss mice (7 weeks old; 20-22g) and 27 male nude (nu/nu) athymic
12 mice (6 weeks; 18-22g) were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France).
13 The mice had access to water and food *ad libitum*, prior to and during experimental
14 procedures. The animals were acclimatised for 7 days before being included in the studies.
15 Both LNC formulations and saline serum were slowly injected in the lateral tail vein during
16 short, inhalational anaesthesia induced by isoflurane. Weight loss, the aspect of the fur,
17 respiratory rate, behaviour and responses to normal stimuli were evaluated daily according to
18 the toxicity scale presented in Table 1. The animals were put down if the daily score was
19 greater than 8. The research adhered to the « Principles of Laboratory Animal Care » (NIH
20 publication #85-23, revised in 1985). The experimental protocols were approved by the Pays-
21 de-la-Loire ethics committee on animal experiments (number 2008-7) and the studies were
22 completed in compliance with French law.

23 **Repeated-dose toxicity studies**

24 Thirty-five mice received either: an intravenous injection of saline serum; or a standard, blank
25 LNC dispersion; or a standard paclitaxel-loaded LNC dispersion for 5 consecutive days. The

1 injected volume of the standard, paclitaxel-loaded LNC dispersions corresponds to the dosage
2 of 12mg/kg/day (146 to 160µl per injection). The volume of saline serum and standard blank
3 LNCs was equal to the volume of the standard paclitaxel-loaded LNC dispersion.

4 *Histological study*

5 Groups of six, six, and three Swiss mice received paclitaxel-loaded LNCs (P group), blank
6 LNCs (B group) and saline serum (S group) for 5 days, respectively. After a 7 day recovery
7 period, the Swiss mice were sacrificed by lethal, inhalational anaesthesia. Macroscopic and
8 histological examinations of the lungs, liver, spleen and kidneys, fixed in 4% phosphate-
9 buffered formalin, were performed. The organs were embedded in paraffin, and 5µm-sections
10 were stained with haematoxylin-eosin-saffron. A new histopathological score was designed to
11 assess lung inflammation in four lung sectors: peribronchiolar, perivascular, interstitial and
12 alveolar. For each sector, the histopathological aspect was scored on a scale from 0 (no
13 change: normal aspect), 1 (mild inflammation: dispersed mononuclear leukocytes), 2
14 (moderate inflammation: presence of 1 to 3 nodules of mononuclear leukocytes), 3 (severe
15 inflammation: more than 3 nodules of mononuclear leukocytes). The final score was the sum
16 of the highest scores observed in each sector of the lungs. The pathologist was unaware of the
17 treatment received by the mice.

18 *Lipid accumulation*

19 Two groups of three Swiss mice received either a blood injection of saline serum or blank
20 LNC dispersions at the dosage of 12mg/kg/day of paclitaxel-loaded LNCs for 5 days. After a
21 recovery period of one week, the mice were sacrificed by lethal anaesthesia. The liver, spleen
22 and kidneys were removed and frozen in liquid nitrogen before staining for fat by Oil Red O.

23 *Biological study*

24 Groups of five, five, and four Swiss mice received paclitaxel-loaded LNCs (P group), blank
25 LNCs (B group) and saline serum (S group) for 5 days, respectively. After one week of

1 recovery, the mice were sacrificed by lethal, inhalational anaesthesia. Blood samples were
2 collected by intracardiac puncture on ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA) tubes for a
3 complete blood count and a haematocrit count. Analyses were performed in the Haematology
4 Ward of the Academic Hospital of Angers with an XE-2100 haematology analyser (Sysmex).
5 After centrifugation of whole blood, serums were obtained for the biological analysis of
6 natremia, kaliemia, chloremia, the alanine aminotransferase (ALAT) rate, the total bilirubin
7 rate and creatinine levels. These analyses were carried out at the Biochemistry Ward of the
8 Academic Hospital of Angers on a Modular P® (Roche diagnostics). The C-Reactive protein
9 was quantified in the serum by using a Demeditec C-Reactive protein ELISA assay according
10 to the supplier's instructions.

11 **Single-dose toxicity study**

12 The maximum tolerated dose (MTD) and 50% lethal dose (LD50) were assessed for high-
13 concentration blank LNCs and paclitaxel-loaded LNCs in comparison with Taxol® (diluted at
14 1.2mg/ml in saline serum), and saline serum, in accordance with Irwin test (44, 45). Sixty-
15 three Swiss mice were included in this study. The MTD is defined as the highest possible
16 dose resulting in no animal deaths, less than 20% weight loss of the control animals and no
17 particular changes in general signs (Table 1). Animals showing a weight loss exceeding 20%
18 were sacrificed for ethical reasons. The LD50 value is the amount of LNC dispersion that
19 induces the death of 50% of the animals according to the Wilcoxon method. Tested doses
20 were 12, 18 and 24mg/kg for Taxol® and 12, 24, 48, 96, 192 and 288mg/kg for the high-
21 concentration, paclitaxel-loaded LNCs. Equivalent volumes of saline serum and blank, high-
22 concentration LNCs were used in corresponding groups. The animals were observed daily.
23 After a survey period of 28 days, the Swiss mice were sacrificed by lethal anaesthesia. The
24 research adhered to the « Principles of Laboratory Animal Care » (NIH publication #85-23,
25 revised in 1985). The experimental protocol was approved by the Pays-de-la-Loire ethics

1 committee on animal experiments (number 2009-5) and the study was completed in
2 compliance with French law.

3 **Efficacy study**

4 *Tumour cell line*

5 NCI-H460 human large cell lung carcinoma cell line was obtained from the American Type
6 Culture Collection (Rockville, MD, USA). Cells were cultured in RPMI 1640 medium
7 containing glutamine (Lonza, Verviers, Belgium), 10mM HEPES (Sigma Chemical Co., Saint
8 Louis, USA), 1mM sodium pyruvate (Lonza, Verviers, Belgium), 1.5g/L bicarbonate
9 (Cambrex Bio Sciences, Verviers, Belgium), 10% fetal bovine serum (Lonza, Verviers,
10 Belgium), 50U/mL penicillin, and 50mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich Co., Ayrshire,
11 UK). Cells were routinely maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.
12 The culture medium was replaced every 2 or 3 days and cells were subcultured weekly using
13 0.25% trypsin-1 mM EDTA (Sigma-Aldrich Co., Ayrshire, UK).

14 *Xenograft model*

15 Nude mice were injected subcutaneously in the right flank with 0.1ml of cell suspension
16 containing 1×10^6 NCI-H460 cells. Treatments were started when tumour in the nude mice
17 reached a tumour volume of 100mm³. This day was designated Day 1 and defined as the day
18 treatments started after randomly division of the mice into 3 groups of 9 mice. At Days 1, 2,
19 3, 4 and 5, a daily *i.v.* of the paclitaxel-loaded LNCs, Taxol® or saline serum was
20 administered intravenously through the tail vein. The dosage of paclitaxel was 12mg/kg/day
21 (150 to 220µl per injection) for paclitaxel-loaded LNCs and Taxol®. Before animal injections,
22 Taxol® solution was diluted in saline serum at a final concentration of 1.2mg/ml. The volume
23 of saline serum was equal to the volume of the paclitaxel-loaded LNC dispersion calculated
24 aforementioned.

25 *In vivo antitumour activity*

1 Mice were observed daily, and body weight measurements and signs of stress (*e.g.*, lethargy,
2 ruffled coat, and ataxia) were used to detect toxicities. Animals with ulcerated tumours or
3 whose tumours exceeded 600 mm³ were euthanized for ethical considerations. Electronic
4 calliper (Mitutoyo Corp., Kawasaki, Japan) measurements of tumours were converted into
5 mean tumour volume (TV) in mm³ using the following formula: $1/2[\text{length (mm)}] \times [\text{width}$
6 $(\text{mm})]^2$. Each tumour volume at Day 8 was expressed as relative tumour volume (RTV)
7 according to the formula: $\text{RTV} = \text{TV}_8 / \text{TV}_1$, where TV₈ is the tumour volume at Day 8, and TV₁
8 is the tumour volume at Day 1. Tumour regression (T/C%) at Day 8 was determined by
9 calculating RTV according to the following formula: $\text{T/C}\% = 100 \times (\text{mean RTV of the treated}$
10 $\text{group}) / (\text{mean RTV of control group})$. After sacrifice, the tumours were excised and fixed in
11 4% phosphate-buffered formalin and embedded in paraffin for histological control.

12 **Statistical analysis**

13 The results are expressed as the mean \pm SD. Multiple comparisons were made using Kruskal-
14 Wallis's one-way analysis of variance with Bonferroni's correction (Statistica 8.0; Statsoft
15 Inc., Maisons-Alfort, France). For the statistical significance analysis, a Mann-Whitney test
16 (non-parametric) with Bonferroni's correction was used to measure statistical significance
17 between two treatment groups. In all cases, $P < 0.05$ was considered to be significant.

18 **Results**

19 **Physico-chemical properties of the LNCs**

20 Preclinical batches of standard, blank and paclitaxel-loaded LNCs were formulated, stored in
21 liquid nitrogen and thawed before use. Monomodal particle size distributions were $65.7 \pm$
22 1.8nm and $67.5 \pm 0.5\text{nm}$ (mean \pm SD) for blank and paclitaxel-loaded LNCs, respectively,
23 with a narrow distribution (polydispersity index < 0.1) (Figure 1). The zeta potentials for blank
24 and paclitaxel-loaded LNC dispersions were equal to $-5.66 \pm 0.19\text{mV}$ and $-5.26 \pm 0.49\text{mV}$,
25 respectively. After thawing, the payload and the encapsulation efficiency were equal to

1 1.65mg/ml and $100.5 \pm 3.0\%$, respectively. For both batches, the acidity and osmolarity were
2 7.3 ± 0.1 pH and 267 ± 3 mOsm/kg, respectively.
3 High-concentration formulations of preclinical batches of blank and paclitaxel-loaded LNCs
4 were obtained, stored in liquid nitrogen and thawed before use. Monomodal particle size
5 distributions were 61.7 ± 1.2 nm and 69.8 ± 0.3 nm (mean \pm SD) for blank and paclitaxel-
6 loaded LNCs, respectively, with a narrow distribution (polydispersity index <0.2). The zeta
7 potentials for blank and paclitaxel-loaded LNC dispersions were equal to -5.96 ± 0.37 mV and
8 -7.61 ± 0.60 mV, respectively. After thawing, the payload and the encapsulation efficiency
9 were equal to 2.99mg/ml and $99.1 \pm 4.0\%$, respectively. For both batches, the acidity and
10 osmolarity were 7.2 ± 0.2 pH and 333 ± 2 mOsm/kg, respectively.

11 **Repeated-dose toxicity studies**

12 No mortality was observed during these studies.

13 *Histological study*

14 At Day 1, the day of the first injection, mean weights were 20.3 ± 0.4 g, 20.8 ± 0.4 g and 20.5
15 ± 0.6 g in groups P, B and S, respectively ($P > 0.05$). During the study, the mean body weight
16 of the animals of all groups increased and were similar at Day 12 ($P > 0.05$). The behavioural
17 study provided mean, daily, toxicity scores in all groups of 0.0 ± 0.0 at Days 0, 8 and 12. At
18 Day 5, the scores were 0.0 ± 0.0 in the S group and 0.2 ± 0.2 in both the P and B groups ($P >$
19 0.05). During autopsy, no abnormalities were observed. The mean weights of the organs of
20 interest are presented in Table 2. No statistical differences were found. Histological studies
21 revealed that the livers, spleens and kidneys were normal. The anatomic lung sections and
22 global histopathological scores for lungs are presented in Table 3. No statistical differences
23 were observed.

24 *Lipid accumulation*

25 The weight of the Swiss mice was not significantly different in the two groups and the

1 toxicity scores were 0 throughout the study. No lipid accumulation was observed in the liver,
2 spleen or kidneys.

3 **Biological study**

4 The mean weights of the mouse groups remained similar during the experiment. No toxicity
5 was observed. Complete blood count results are presented in Table 4. Natremia, kaliemia,
6 chloremia, ALAT, total bilirubin, serum creatinine and C-Reactive protein in serum data are
7 presented in Table 5. No statistical differences were observed.

8 **Single dose toxicity study**

9 No mortality was observed with saline serum. No mortality nor toxicity were observed after
10 blood injection of blank LNCs. This result indicates that the blank LNC drug nanocarrier is
11 not the limiting factor of toxicity. Total lipid amount that could solubilised up to 288mg/kg of
12 paclitaxel is not toxic. The MTD of blank LNCs was equal or above 288mg/kg and the LD50
13 was not reached. For Taxol®, the MTD and LD50 were 12mg/kg and 19.5mg/kg,
14 respectively. The MTD and LD50 of paclitaxel-loaded LNCs were 96mg/kg and 216mg/kg,
15 respectively. Detailed results are presented in Table 6.

16 **Antitumour efficiency study**

17 Twenty-seven nude mice were randomised in three groups: a control group received saline
18 serum (S group) alone, a group received Taxol® (T group) and a group received standard
19 paclitaxel-loaded LNCs (N group). At Day 1, the mean size tumours were equal to $102.0 \pm$
20 5.4mm^3 , $108.1 \pm 16.6\text{mm}^3$ and $105.7 \pm 7.4\text{mm}^3$ for S, T and N groups, respectively ($P >$
21 0.05). During the study, no death and no sign of stress were observed. Some mice lost up to
22 20% weight in groups T and N. No tumour size regression was observed in S group during
23 the study. A reduction of the tumoural volume superior to 20 % was observed in three and six
24 mice in T and N groups, respectively. The mean tumoural volume regressions were equal to
25 $25.3\% \pm 4.0$ and $48.5\% \pm 25.8$ in T and N groups, respectively. Mean tumour growths per

1 groups from Day 1 to Day 8 were presented in Fig. 2. At Day 8, the mean tumoural volume
2 was equal to $423 \pm 42\text{mm}^3$, $277 \pm 19\text{mm}^3$ * et $167 \pm 34\text{mm}^3$ *,** in the S, T and N groups,
3 respectively (* $P < 0.04$ vs group S ; ** $P < 0,04$ vs T, U tests with Bonferroni 's correction).
4 At Day 8, the T/C% was equal to $64\%^{\dagger}$ and $38\%^{\ddagger}$ in T and N groups in comparison to the S
5 group, respectively ($^{\dagger}P < 0.04$ vs S group ; $^{\ddagger}P < 0,05$ vs T, U tests with Bonferroni 's
6 correction). The median time to reach a tumour volume superior or equal to 600mm^3 was 11,
7 16^{\dagger} and $20^{\dagger\dagger}$ days in groups S, T and N, respectively ($^{\dagger}P < 0.04$ vs group S ; $^{\dagger\dagger}P < 0,04$ vs T,
8 U tests with Bonferroni 's correction). Survival curves (until tumours exceeded 600mm^3)
9 were presented in Fig. 3.

10 Discussion

11 As with 40% of new medical drugs, paclitaxel is a highly lipophilic drug that can not be
12 solubilised in water without an excipient. For the market formulation Taxol®, the excipients
13 are a 1/1 (vol/vol) mixture of dehydrated ethanol and Cremophor®EL. Cremophor®EL is a
14 polyoxyethylene castor oil derivative that can induce life-threatening events caused by
15 histamine release, in spite of medical premedication with corticoids, H1 and H2 antihistamine
16 drugs. Even if paclitaxel is solubilised with Cremophor®EL and ethanol, crystals of paclitaxel
17 may form during perfusion requiring $0.22\mu\text{m}$ filtration during administration. For these
18 reasons, less-toxic formulations of paclitaxel are needed. LNCs are drug nanocarriers able to
19 entrap many hydrophobic drugs such as paclitaxel. The structure of this vector is unique,
20 composed of an oily core (where the drug is solubilised), limited by lecithin surfactants, and
21 surrounded by polyethylene-glycol chains. Paclitaxel-loaded LNCs have been widely studied
22 over the last few years and have demonstrated an improvement of paclitaxel efficacy on cell
23 cultures and tumour-bearing animal models in comparison with Taxol® (40, 46). To date, no
24 toxicological data for LNC vectors are available. In this study, we present the first toxicity
25 study of an *i.v.* injection schedule of both blank and paclitaxel-loaded LNC dispersions in

1 Swiss mice as proposed by the International Life Sciences Institute Research Foundation/Risk
2 Science Institute (ILSI RF/RSI) Nanomaterial Toxicity Screening Working Group (47). We
3 started the toxicological evaluation with the administration schedule of paclitaxel-loaded
4 LNCs at the dosage of 12mg/kg/day of paclitaxel over five days in mice; this corresponds to
5 the dosage of 175mg/m² every three weeks of Taxol® in humans used for a cycle of
6 chemotherapy (48). Blank and paclitaxel-loaded LNCs were tested against saline serum to
7 discriminate between specific LNC toxicity (saline serum vs blank LNCs) and paclitaxel-
8 induced tissue lesions (blank LNCs vs paclitaxel-loaded LNCs). Studies were performed with
9 marketable, insurance-quality, standard batches of LNCs, well-characterised for mean particle
10 size, size distribution, zeta potential, sterility and pyrogenicity (42). The LNC conservation
11 protocol was studied and did not modify the LNC structure, drug payload, or cytotoxic effect
12 (43). As the LNCs were injected just after thawing into animals, this procedure lets us know
13 the precise characteristics of LNCs, which is a key point in order to describe the *in vivo*
14 toxicity and efficacy of LNC dispersions.

15 At the dose of 12mg/kg per injection per day for 5 consecutive days for paclitaxel-loaded
16 LNCs (or the corresponding volume for blank LNCs), no mortality, behaviour modification or
17 weight loss were observed after a recovery period of one week. Gross and histological
18 analysis of vital organs such as the liver, spleen, kidneys and lungs revealed no abnormalities
19 in comparison with blank LNCs and serum groups. A new histopathological score designed to
20 assess lung inflammation showed no inflammatory reaction in four lung sectors. As with
21 many colloid vectors, lipid nanocapsules have been found in the liver, spleen and kidneys
22 after intravenous injection in rats (49). This distribution is driven by the rapid clearance from
23 systemic circulation by macrophages of the reticulo-endothelial system in the liver and spleen
24 (50). This biodistribution is typical of the passive targeting of LNCs *in vivo* and can trigger
25 lesions in these organs (49, 51). In our study, histological examinations of these organs were

1 both paclitaxel-loaded LNCs and blank LNCs were sequestered, showed no tissue lesions or
2 lipid accumulation. Our study showed a non-significant increase of the ALAT in serum in
3 paclitaxel-loaded LNC groups vs the blank LNC dispersion group and serum group. However,
4 this result could suggest that liver tolerance may be the limiting step. To the contrary, no
5 effect was observed on complete blood counts, indicating the absence of a myelosuppressive
6 effect of LNCs. Complement system activation and the macrophage uptake of LNCs (with a
7 range of 20-100nm) has been previously studied (33). The results indicated that the
8 consumption of CH50 units with LNC dispersions was very low in parallel with positive
9 controls (polymethyl methacrylate nanoparticles and Zymosan). These results seem consistent
10 with our results which do not reveal any mark of complement activation such as haemolysis
11 or glomerular lesions or dysfunction. Finally, biological parameters such as cell count, ions,
12 total bilirubin, creatinine and C-Reactive protein measurements were similar in the different
13 groups. Our study demonstrates the high level of tolerance in mice of the paclitaxel-loaded
14 LNC dispersions at 60mg/kg over five days. The corresponding volume of blank LNC
15 dispersions was also well tolerated. Toxicokinetic study is needed to confirm these first
16 results.

17 Interestingly, the dose of 12mg/kg per injection per day for 5 consecutive days for paclitaxel-
18 loaded LNCs was more effective than Taxol® in NCI-H460 subcutaneous bearing tumours in
19 nude mice. Ours results demonstrated an improvement of the antitumoural efficacy associated
20 to a better survival. The results could seem discordant with previous data showing that 50%
21 growth inhibition (IC50) for Taxol® and paclitaxel-loaded LNC dispersion IC50 were 4.4nM
22 and 3.8nM, respectively (42). These results are expected to be related to the intrinsic
23 properties of the LNCs as tissue-concentration driven by the EPR effect. The therapeutic
24 effect is also amplify by sustained release of paclitaxel and P-gp inhibition by Solutol®
25 HS15. These original data confirm the great interest of LNC dispersions in oncology field.

1 The single-dose toxicity study with a 28-day follow-up showed that the MTD and LD50 of
2 paclitaxel-loaded LNCs were 96mg/kg and 216mg/kg, respectively. In comparison with the
3 paclitaxel-solvent formulation Taxol®, the paclitaxel-loaded LNC dispersion tolerance in
4 mice was increased to levels where the LD50 and MTD were respectively eight-fold and
5 eleven-fold higher than the commercial formulation. The entrapment of paclitaxel in LNCs
6 results in an improvement of its therapeutic index in comparison with Taxol®. The blank-
7 LNC dispersion (injected at the corresponding volume of the paclitaxel-loaded LNC
8 dispersion) was well tolerated with no mortality or toxicity up to the level of 288mg/kg. For
9 this drug nanocarrier, the MTD was equal or above 288mg/kg and the LD50 was above
10 288mg/kg. The injected volume was superior to international recommendations and induced a
11 non-physiological situation that mimics extracellular hyperhydration. In mice with normal
12 renal function (your experimental situation), we expected a rapid renal response based on the
13 increase of renal excretion without any specific tissue lesion. In mice receiving saline serum,
14 a transitory sedation has been observed at the highest dose but no renal function impairment
15 has been observed during the 28-day follow-up. This result indicates the absence of specific
16 toxicity due to extracellular hyperhydration. In mice receiving high concentration, blank
17 LNCs, no mortality was observed at the highest dosage. Our study demonstrates that an *i.v.*
18 single dose of high concentration, blank LNC dispersion induces no mortality at the highest
19 tested dose. This dose corresponds to a No-Observed-Adverse-Effect-Level (NOAEL). To the
20 opposite, in mice receiving the two highest dosages of high concentration, paclitaxel-loaded
21 LNCs, delayed lethality may be attributed to paclitaxel toxicity.

22 Toxicity reduction has been reported for paclitaxel solubilised with other drug-carrier systems
23 (18-20, 31, 52). Two major causes can be proposed to explain this reduction in toxicity: the
24 absence of Cremophor® EL replaced by less toxic excipients, and the modification of the
25 biodistribution that induces less drug concentration in bone marrow. As paclitaxel-loaded

1 LNCs are produced by solvent-free technology such as NAB-paclitaxel, the premedication of
2 the animals with corticosteroids and anti-histamine drugs is not required. No chemical
3 catalyser is used during the LNC preparation, providing the assurance of an absence of
4 residual catalyser in the final formulation. All the excipients of the LNCs are either FDA-
5 approved or Generally Recognized as Safe (GRAS). Nevertheless, the analysis of the
6 composition of Solutol® HS15 based on the supplier's data, allowed us to identify the
7 presence of class 2 solvents (ethylene glycol and 1,4-dioxane) and a class 3 solvent (acetic
8 acid) below the limits provided in European Pharmacopoeia 5.4. In standard LNC
9 formulations, Solutol® HS15 makes up 6.5% of the final weight, providing final solvent
10 concentrations that are well below the limits given in European Pharmacopoeia 5.4.
11 Our results have shown that LNC nanotechnology has not triggered any limiting toxicity
12 effects after five consecutive days of administration at 60mg/kg in Swiss mice. This schedule
13 is also more effective than Taxol® in a tumour-bearing model without any premedication.
14 These first results mean that we can set up chronic-toxicity schedule studies and
15 complementary biological endpoints.

16 **Conclusions**

17 The five-day *i.v.* injection schedule of 12mg/kg/day of paclitaxel in LNCs and blank LNCs is
18 well tolerated in mice and induces no toxic effects. The entrapment of paclitaxel in LNCs
19 allows an improvement of its therapeutic index in comparison with Taxol®, based on the
20 eight-fold and eleven-fold respective increase in the LD50 and MTD. Efficacy of paclitaxel in
21 LNC drug nanocarrier is increased in comparison with Taxol®.

23 **Acknowledgements**

24 The authors would like to thank Pr J.-L. Racineux (Pulmonology department, Academic
25 Hospital, Angers, France) for his support, Pr Zandacki (Haematology Laboratory, Academic

1 Hospital, Angers, France) for carrying out the complete blood counts, Dr Tourmen
2 (Biochemistry department, Academic Hospital, Angers, France) for carrying out the
3 biochemical analysis, Joël Guillemain (Biopharm Consulting) for advice on toxicological
4 studies, Pierre Legras and Jérôme Roux (University of Angers, Faculty of Medicine, Angers,
5 France) for help in the animal studies. Research supports: This study was supported by grants
6 from the *Comité Départemental du Maine-et-Loire de la Ligue Contre le Cancer*, the
7 *Cancéropôle Grand Ouest* and the *Régions Bretagne, Centre, Pays de la Loire et Poitou-*
8 *Charentes*.

1 **Legend of figures**

2

3 Fig. 1. Cryo-TEM image of the LNCs.

4

5 Fig. 2. Response to paclitaxel's formulations in the three groups S (saline serum), T (Taxol[®])
6 and P (paclitaxel-loaded LNCs) during the 8th first days. Mean size tumour \pm SD is
7 represented. Arrow heads indicate days of treatment.

8

9 Fig. 3. Survival curves of the groups S (saline serum), T (Taxol[®]) and P (paclitaxel-loaded
10 LNCs) of mice until the experimental limit point (tumour volume superior to 600 mm³).

11

1 **Tables**

2

	No point	1 point	2 points	3 points
Loss of weight	<5%	5-12%	13-20%	>20%
Aspect of the fur	Normal	Mild alteration	Moderate alteration	Severe alteration
Respiratory rate	Normal (100/minute)	Increase or decrease less than 10%	Increase or decrease less than 20%	Increase or decrease less than 30%
Behaviour	Normal	Mild modification	Moderate modification	Severe modification
Responds to normal stimuli	Normal	Mild modification	Moderate modification	Severe modification

3 Table 1. Toxicity scale. The sum of each criterion allows the calculation of the daily score for
4 each mouse.

1

	Liver	Spleen	Lungs	Kidneys
S group (n=3)	1335.0 ± 213.5	97.7 ± 22.8	228.7 ± 16.6	385.7 ± 28.7
B group (n=6)	1431.8 ± 66.6	117.2 ± 8.7	253.8 ± 10.4	383.0 ± 38.6
P group (n=6)	1315.0 ± 53.0	91.8 ± 5.0	204.3 ± 10.6	354.3 ± 32.0
Kruskal-Wallis test	NS	NS	NS	NS

- 2 Table 2. Mean weight of the organs of interest in milligrammes in S (saline serum), B (blank
3 LNCs) and P (paclitaxel-loaded LNCs) groups. Mean values ± SD are presented.

1

	Peribronchial sector	Perivascular sector	Interstitial sector	Alveolar sector	Global score
S group (n=3)	1.0 ± 0.0	1.3 ± 0.3	1.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.3 ± 0.3
B group (n=6)	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	2.3 ± 0.3
P group (n=6)	1.5 ± 0.2	1.0 ± 0.0	0.7 ± 0.2	0.0 ± 0.0	3.3 ± 0.4
Kruskal-Wallis test	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>

2 Table 3. Histopathological scores by lung anatomic sectors in S (saline serum), B (blank

3 LNCs) and P (paclitaxel-loaded LNCs) groups. Mean values ± SD are presented.

1

	Haemoglobin rate (g/dL)	Leukocytes (giga/L)	Platelets count (giga/L)	Hematocrit (%)
S group (n=4)	15.1 ± 0.1	1.6 ± 0.5	449.5 ± 79.2	47.6 ± 1.2
B group (n=5)	14.5 ± 0.8	2.2 ± 0.5	213.0 ± 117.5	45.8 ± 2.7
P group (n=5)	15.2 ± 0.3	1.5 ± 0.3	327.0 ± 178.4	47.4 ± 1.2
Kruskal- Wallis test	NS	NS	NS	NS

- 2 Table 4. Complete blood counts in S (saline serum), B (blank LNCs) and P (paclitaxel-loaded
3 LNCs) groups. Mean values ± SD are presented.

1

	Natremia (mmol/L)	Kaliemia (mmol/L)	Chloremia (mmol/L)	ALAT (UI/L)	Total bilirubine level (μ mol/L)	Serum creatinine (μ mol/L)	C- Reactive protein (ng/mL)
S group (n=4)	151.8 \pm 3.3	24.0 \pm 2.5	101.7 \pm 1.7	25.5 \pm 4.1	0.5 \pm 0.1	11.3 \pm 1.7	16.8 \pm 6.0
B group (n=5)	153.2 \pm 3.3	24.1 \pm 2.8	102.4 \pm 2.7	29.0 \pm 5.9	1.0 \pm 0.2	9.6 \pm 1.5	23.3 \pm 4.0
P group (n=5)	153.8 \pm 4.0	19.5 \pm 3.8	104.2 \pm 1.6	37.8 \pm 11.9	0.6 \pm 0.1	13.2 \pm 1.6	22.4 \pm 8.2
Kruskal- Wallis test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

2 Table 5. Biological analysis in S (saline serum), B (blank LNCs) and P (paclitaxel-loaded

3 LNCs) groups.. Mean values \pm SD are presented.

4

1 a) Saline serum.

Dose (mg/kg)					
12	24	48	96	192	288
No change	No change	No change	No change	No change	Sedation + (3/3) at 15 min → 30 min

2

3 b) Taxol®.

Dose (mg/kg)		
12	18	24
No change	Convulsions ++ (1/3) at 5 min → 30 min Lethality + (1/3) at Day 10	Convulsions ++ (3/3) at 5 min → 30 min Sedation + (2/3) at 30 min → 48 h + (1/3) at 30 min → Day 4 Lethality + (2/3) at 48 h, (1/3) at Day 4

4

5 c) High concentration, blank LNCs.

Dose (mg/kg)					
12	24	48	96	192	288
No change	No change	No change	No change	No change	Sedation + (3/3) at 15 min → 30 min

6

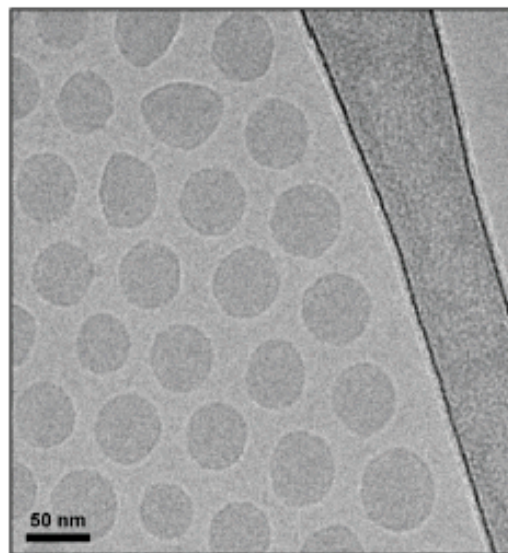
7 d) High concentration, paclitaxel-loaded LNCs.

Dose (mg/kg)					
12	24	48	96	192	288
No change	No change	No change	Sedation + (3/3) at 15 min → 45 min	Sedation + (3/3) at 15 min → 45 min Lethality + (1/3) at Day 13	Sedation + (3/3) at 15 min → 45 min Lethality + (3/3) at Days 4,6 and 8

8

9 Table 6. Complete results of the Irwin tests in Swiss mice (a,b,c,d). Each volume is slowly *i.v.*
10 injected. Each group comprises by 3 mice.

1 **Figures**
2



3
4
5

Fig. 1.

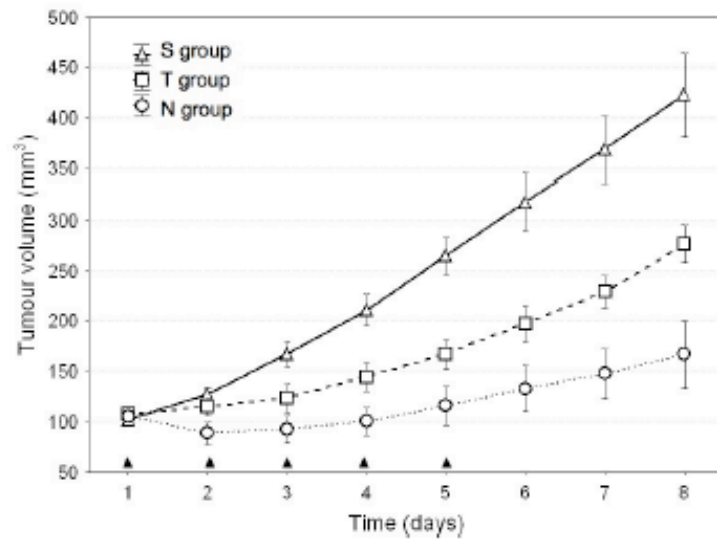
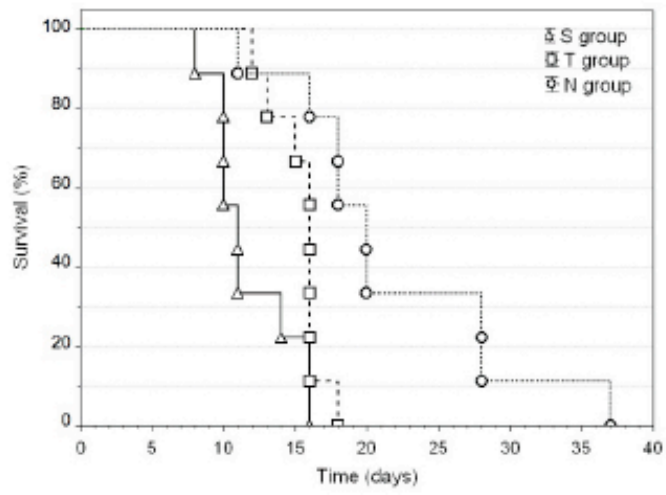


Fig. 2.

1
2
3
4



1
2
3

Fig. 3.

1 References

2

- 3 1. E. K. Rowinsky and R. C. Donehower. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med* **332**: 1004-14
4 (1995).
- 5 2. N. Klauber, S. Parangi, E. Flynn, E. Hamel, and R. J. D'Amato. Inhibition of
6 angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-
7 methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res* **57**: 81-6 (1997).
- 8 3. M. E. Stearns and M. Wang. Taxol blocks processes essential for prostate tumor cell
9 (PC-3 ML) invasion and metastases. *Cancer Res* **52**: 3776-81 (1992).
- 10 4. D. Dye and J. Watkins. Suspected anaphylactic reaction to Cremophor EL. *Br Med J*
11 **280**: 1353 (1980).
- 12 5. R. B. Weiss, R. C. Donehower, P. H. Wiernik, T. Ohnuma, R. J. Gralla, D. L. Trump,
13 J. R. Baker, Jr., D. A. Van Echo, D. D. Von Hoff, and B. Leyland-Jones.
14 Hypersensitivity reactions from taxol. *J Clin Oncol* **8**: 1263-8 (1990).
- 15 6. L. van Zuylen, M. O. Karlsson, J. Verweij, E. Brouwer, P. de Bruijn, K. Nooter, G.
16 Stoter, and A. Sparreboom. Pharmacokinetic modeling of paclitaxel encapsulation in
17 Cremophor EL micelles. *Cancer Chemother Pharmacol* **47**: 309-18 (2001).
- 18 7. A. G. Bagnarello, L. A. Lewis, M. C. McHenry, A. J. Weinstein, H. K. Naito, A. J.
19 McCullough, R. J. Lederman, and T. L. Gavan. Unusual serum lipoprotein
20 abnormality induced by the vehicle of miconazole. *N Engl J Med* **296**: 497-9 (1977).
- 21 8. M. Kongshaug, L. S. Cheng, J. Moan, and C. Rimington. Interaction of cremophor EL
22 with human plasma. *Int J Biochem* **23**: 473-8 (1991).
- 23 9. K. Woodburn and D. Kessel. The alteration of plasma lipoproteins by cremophor EL. *J*
24 *Photochem Photobiol B* **22**: 197-201 (1994).
- 25 10. T. Shimomura, H. Fujiwara, S. Ikawa, J. Kigawa, and N. Terakawa. Effects of Taxol
26 on blood cells. *Lancet* **352**: 541-2 (1998).
- 27 11. C. D. Scripture, W. D. Figg, and A. Sparreboom. Peripheral neuropathy induced by
28 Paclitaxel: recent insights and future perspectives. *Curr Neuropharmacol* **4**: 165-72
29 (2006).
- 30 12. A. J. Windebank, M. D. Blehrud, and P. C. de Groen. Potential neurotoxicity of the
31 solvent vehicle for cyclosporine. *J Pharmacol Exp Ther* **268**: 1051-6 (1994).
- 32 13. G. J. Lesser, S. A. Grossman, S. Eller, and E. K. Rowinsky. The distribution of
33 systemically administered [³H]-paclitaxel in rats: a quantitative autoradiographic
34 study. *Cancer Chemother Pharmacol* **37**: 173-8 (1995).
- 35 14. J. Szebeni, F. M. Muggia, and C. R. Alving. Complement activation by Cremophor
36 EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: an in vitro study. *J Natl*
37 *Cancer Inst* **90**: 300-6 (1998).
- 38 15. J. Szebeni, C. R. Alving, S. Savay, Y. Barenholz, A. Prie, D. Danino, and Y.
39 Talmon. Formation of complement-activating particles in aqueous solutions of Taxol:
40 possible role in hypersensitivity reactions. *Int Immunopharmacol* **1**: 721-35 (2001).
- 41 16. L. van Zuylen, L. Gianni, J. Verweij, K. Mross, E. Brouwer, W. J. Loos, and A.
42 Sparreboom. Inter-relationships of paclitaxel disposition, infusion duration and
43 cremophor EL kinetics in cancer patients. *Anticancer Drugs* **11**: 331-7 (2000).
- 44 17. V. D. Bowers, S. Locker, S. Ames, W. Jennings, and R. J. Corry. The hemodynamic
45 effects of Cremophor-EL. *Transplantation* **51**: 847-50 (1991).
- 46 18. S. C. Kim, D. W. Kim, Y. H. Shim, J. S. Bang, H. S. Oh, S. Wan Kim, and M. H. Seo.
47 In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy.
48 *J Control Release* **72**: 191-202 (2001).

- 1 19. A. L. Seligson, R. C. Terry, J. C. Bressi, J. G. Douglass, 3rd, and M. Sovak. A new
2 prodrug of paclitaxel: synthesis of Protaxel. *Anticancer Drugs* 12: 305-13 (2001).
- 3 20. D. G. Rodrigues, D. A. Maria, D. C. Fernandes, C. J. Valduga, R. D. Couto, O. C.
4 Ibanez, and R. C. Maranhao. Improvement of paclitaxel therapeutic index by
5 derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo
6 studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 55: 565-76 (2005).
- 7 21. S. Khandavilliand R. Panchagnula. Nanoemulsions as versatile formulations for
8 paclitaxel delivery: peroral and dermal delivery studies in rats. *J Invest Dermatol* 127:
9 154-62 (2007).
- 10 22. J. A. Straub, D. E. Chickering, J. C. Lovely, H. Zhang, B. Shah, W. R. Waud, and H.
11 Bernstein. Intravenous hydrophobic drug delivery: a porous particle formulation of
12 paclitaxel (AI-850). *Pharm Res* 22: 347-55 (2005).
- 13 23. H. F. Liang, C. T. Chen, S. C. Chen, A. R. Kulkarni, Y. L. Chiu, M. C. Chen, and H.
14 W. Sung. Paclitaxel-loaded poly(gamma-glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as
15 a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer. *Biomaterials* 27:
16 2051-9 (2006).
- 17 24. T. Musumeci, L. Vicari, C. A. Ventura, M. Gulisano, R. Pignatello, and G. Puglisi.
18 Lyoprotected nanosphere formulations for paclitaxel controlled delivery. *J Nanosci*
19 *Nanotechnol* 6: 3118-25 (2006).
- 20 25. A. Sharmaand R. M. Straubinger. Novel taxol formulations: preparation and
21 characterization of taxol-containing liposomes. *Pharm Res* 11: 889-96 (1994).
- 22 26. T. E. Stinchcombe. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel: a novel Cremphor-EL-
23 free formulation of paclitaxel. *Nanomed* 2: 415-23 (2007).
- 24 27. W. J. Gradishar, S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, M. Hawkins,
25 and J. O'Shaughnessy. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel
26 compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer.
27 *J Clin Oncol* 23: 7794-803 (2005).
- 28 28. N. A. Rizvi, G. J. Riely, C. G. Azzoli, V. A. Miller, K. K. Ng, J. Fiore, G. Chia, M.
29 Brower, R. Heelan, M. J. Hawkins, and M. G. Kris. Phase I/II trial of weekly
30 intravenous 130-nm albumin-bound paclitaxel as initial chemotherapy in patients with
31 stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 26: 639-43 (2008).
- 32 29. M. G. Teneriello, P. C. Tseng, M. Crozier, C. Encarnacion, K. Hancock, M. J.
33 Messing, K. A. Boehm, A. Williams, and L. Asmar. Phase II evaluation of
34 nanoparticle albumin-bound paclitaxel in platinum-sensitive patients with recurrent
35 ovarian, peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol* 27: 1426-31 (2009).
- 36 30. Abi 007. *Drugs R D* 5: 155-9 (2004).
- 37 31. P. N. EMEA/H/C/778. Assesment report for Abraxane, European Medicines Agency
38 Evaluation of Medicines for Human Use, Doc.Ref.:EMEA/47053/2008.
- 39 32. B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J. E. Proust, and J. P. Benoit. A novel phase
40 inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 19: 875-
41 80 (2002).
- 42 33. A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, P. Simard, J. C. Leroux, and J. P. Benoit.
43 Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and
44 macrophage uptake. *J Biomed Mater Res A* 78: 620-8 (2006).
- 45 34. A. Lamprecht, Y. Bouligand, and J. P. Benoit. New lipid nanocapsules exhibit
46 sustained release properties for amiodarone. *J Control Release* 84: 59-68 (2002).
- 47 35. A. Lamprecht, J. L. Saumet, J. Roux, and J. P. Benoit. Lipid nanocarriers as drug
48 delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int J Pharm* 278: 407-14 (2004).
- 49 36. A. Malzert-Freon, S. Vrignaud, P. Saulnier, V. Lisowski, J. P. Benoit, and S. Rault.
50 Formulation of sustained release nanoparticles loaded with a tripeptide, a new

- 1 anticancer agent. *Int J Pharm* **320**: 157-64 (2006).
- 2 37. A. Lamprecht and J. P. Benoit. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by
3 intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J Control*
4 *Release* **112**: 208-13 (2006).
- 5 38. E. Allard, C. Passirani, E. Garcion, P. Pigeon, A. Vessières, G. Jaouen, and J. Benoit.
6 Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel
7 drug-carrier system for experimental malignant gliomas. *J Control Release* **130**: 146-
8 53 (2008).
- 9 39. M. N. Khalid, P. Simard, D. Hoarau, A. Dragomir, and J. C. Leroux. Long circulating
10 poly(ethylene glycol)-decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid tumors.
11 *Pharm Res* **23**: 752-8 (2006).
- 12 40. E. Garcion, A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-Pouessel, B. Denizot,
13 P. Menei, and J. P. Benoit. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal
14 vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats.
15 *Mol Cancer Ther* **5**: 1710-22 (2006).
- 16 41. S. Peltier, J. M. Oger, F. Lagarce, W. Couet, and J. P. Benoit. Enhanced oral paclitaxel
17 bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res*
18 **23**: 1243-50 (2006).
- 19 42. J. Hureauux, F. Lagarce, F. Gagnadoux, L. Vecellio, A. Clavreul, E. Roger, M. Kempf,
20 J. L. Racineux, P. Diot, J. P. Benoit, and T. Urban. Lipid nanocapsules: ready-to-use
21 nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. *Eur J Pharm Biopharm* **73**: 239-46
22 (2009).
- 23 43. J. Hureauux, F. Lagarce, F. Gagnadoux, A. Clavreul, J.-P. Benoit, and T. Urban. The
24 adaptation of lipid nanocapsule formulations for blood administration in animals. *Int J*
25 *Pharm* **379**: 266-69 (2009).
- 26 44. S. Irwin. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative
27 procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse.
28 *Psychopharmacologia* **13**: 222-57 (1968).
- 29 45. S. Roux, E. Sable, and D. R. Porsolt. Primary Observation (Irwin) Test in Rodents for
30 Assessing Acute Toxicity of a Test Agent and its Effects on Behavior and
31 Physiologica Function. *Current Protocols in Pharmacology* 10.10.1-10.10.23 (2004).
- 32 46. F. Lacoeyille, E. Garcion, J. P. Benoit, and A. Lamprecht. Lipid nanocapsules for
33 intracellular drug delivery of anticancer drugs. *J Nanosci Nanotechnol* **7**: 4612-7
34 (2007).
- 35 47. G. Oberdorster, A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman,
36 J. Carter, B. Karn, W. Kreyling, D. Lai, S. Olin, N. Monteiro-Riviere, D. Warheit, and
37 H. Yang. Principles for characterizing the potential human health effects from
38 exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* **2**: 8
39 (2005).
- 40 48. E. J. Freireich, E. A. Gehan, D. P. Rall, L. H. Schmidt, and H. E. Skipper. Quantitative
41 comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and
42 man. *Cancer Chemother Rep* **50**: 219-44 (1966).
- 43 49. S. Ballot, N. Noiret, F. Hindre, B. Denizot, E. Garin, H. Rajerison, and J. P. Benoit.
44 ^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and
45 therapy: formulation and biodistribution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **33**: 602-7
46 (2006).
- 47 50. S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and J. C. Murray. Nanomedicine: current status and
48 future prospects. *Faseb J* **19**: 311-30 (2005).
- 49 51. A. Cahouet, B. Denizot, F. Hindre, C. Passirani, B. Heurtault, M. Moreau, J. Le Jeune,
50 and J. Benoit. Biodistribution of dual radiolabeled lipidic nanocapsules in the rat using

- 1 scintigraphy and gamma counting. *Int J Pharm* **242**: 367-71 (2002).
2 52. A. Sharma, E. Mayhew, L. Bolcsak, C. Cavanaugh, P. Harmon, A. Janoff, and R. J.
3 Bernacki. Activity of paclitaxel liposome formulations against human ovarian tumor
4 xenografts. *Int J Cancer* **71**: 103-7 (1997).
5
6

8. Article 3 : Lipid nanocapsules: Ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel

Les aérosols de médicaments anticancéreux permettent de proposer une stratégie d'intensification thérapeutique dans les cancers bronchopulmonaires. Le but de ce travail est de montrer que l'encapsulation du paclitaxel dans des NCL permet de nébuliser ce principe actif en vue d'études précliniques et cliniques. Les tests ont été réalisés au moyen de nébuliseurs disponibles dans le commerce. Après nébulisation, la structure, la charge médicamenteuse et la cytotoxicité des NCL de paclitaxel ont été comparées à une solution de NCL de paclitaxel non nébulisée. Seuls les nébuliseurs à tamis vibrant n'ont pas altéré pas la structure des NCL. Seul le nébuliseur eFlow[®]rapid a permis de nébuliser des NCL dans des conditions compatibles avec un usage clinique : un volume de 3 ml de dispersion de NCL a été nébulisé en moins de 9 minutes, le diamètre aérodynamique médian était égal à $2,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ et le taux de particules fines entre 1 et $5 \mu\text{m}$ était de $81,5 \pm 3,1\%$. Aucune modification du taux d'encapsulation ni de la cytotoxicité des NCL de paclitaxel nébulisées avec eFlow[®]rapid n'a été observée. Pour pouvoir réaliser des études précliniques puis cliniques, une procédure d'adaptation d'échelle de la fabrication des NCL a été proposée (augmentation du volume produit lors d'une formulation par 10). Des paramètres physico-chimiques importants en vue d'une délivrance par aérosol, comme l'acidité et l'osmolarité, ont été modifiés. La conservation par congélation n'altère pas ses paramètres après ajustement. Des études chez l'animal sont nécessaires pour déterminer la tolérance et l'efficacité des aérosols de NCL.

Ce chapitre a été publié dans : *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73 (2009) 239-246.

En complément de ces informations, nous avons montré qu'il est possible d'aérosoliser des NCL au moyen du Microsprayer[®]. Ce dispositif génère un spray composé de gouttelettes d'environ $18 \mu\text{m}$ directement dans la trachée d'un animal au moyen d'une canule lors d'une courte anesthésie générale.

Nous disposons donc des deux méthodes pour nébuliser les NCL : la première est utilisable chez le rongeur (Microsprayer[®]) et la seconde chez l'animal (rongeur ou primate) ou l'homme.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejpb

Research paper

Lipid nanocapsules: Ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel

José Hureau^{a,b,c,*}, Frédéric Lagarce^{b,d}, Frédéric Gagnadoux^{a,c}, Laurent Vecellio^e, Anne Clavreul^b, Emilie Roger^b, Marie Kempf^f, Jean-Louis Racineux^{a,c}, Patrice Diot^e, Jean-Pierre Benoit^{b,d}, Thierry Urban^{a,c}^a Pulmonology Department, Academic Hospital, Angers, France^b INSERM U646, University of Angers, Angers, France^c Equipe PYVER, University of Angers, Angers, France^d Pharmacy, Academic Hospital, Angers, France^e INSERM U618, IFR 135, François Rabelais University and CHU of Tours, France^f Bacteriology, Academic Hospital, Angers, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2008

Accepted in revised form 22 June 2009

Available online 26 June 2009

Keywords:

Drug carriers

Drug delivery systems

Lipid nanocapsule

Paclitaxel

Cancer

Chemotherapy

Nebulisation

Aerosol

Pulmonary delivery

Administration

Inhalation

ABSTRACT

Aerosol drug delivery permits the development of dose-intensification strategies in severe, malignant lung diseases. The aim of the study was to demonstrate that the encapsulation of paclitaxel in lipid nanocapsules (LNCs), a novel drug nanocarrier for lipophilic components, allows one to provide pulmonary drug delivery of paclitaxel by nebulisation, thereby allowing preclinical and clinical studies. LNC dispersions are made into aerosols with commercial nebulisers. The structure, drug payload and cytotoxicity of nebulised LNCs were compared to fresh LNCs. The results demonstrated that LNC dispersions could be made into aerosols by using mesh nebulisers without altering the LNC structure. Only eFlow[®] rapid-produced aerosols are compatible with human use: the mean duration to nebulise 3 ml of LNC dispersion is less than 9 min, with an aerosol mass median aerodynamic diameter equal to $2.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$ and a fine-particle fraction (between 1.0 and $5.0 \mu\text{m}$) of $81.5 \pm 3.1\%$. No modifications of drug payload or cytotoxicity effects of paclitaxel-loaded LNC (PTX-LNC) were observed. In order to carry out preclinical studies, a scaled-up LNC formulation protocol was used. Chemical parameters, such as acidity and osmolarity, were optimised, and a storage procedure for PTX-LNC batches was set-up. Animal studies are now needed to determine the tolerance and therapeutic potential of LNC dispersion aerosols.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aerosol drug delivery constitutes an emerging field of knowledge with considerable interest for human medicine [1]. Whereas this method of administration is mandatory for asthma, the incorporation of a drug or a drug carrier into breathable droplets becomes more and more interesting to treat other bronchial and pulmonary diseases such as lung tumours [2]. Preclinical studies in thoracic oncology have demonstrated that this route of administration allows the delivery of a large quantity of chemotherapy agents directly into the lower airways and lungs of a patient with minimal systemic diffusion of the drug [3]. This dose-intensification strategy allows the promotion of an anti-tumoural effect with a reduced quantity of drug and with reduced or no systemic side effects. Some clinical studies of aerosol chemotherapies have been published [2]. A few clinical studies are ongoing and are registered on the ClinicalTrials.gov website [4].

Nevertheless, the design and the production of a new treatment to be administered by aerosol for human use is a complex process. First, the therapeutic properties of the drug (and the drug carrier) must be unchanged following the nebulisation process. Secondly, the aerosol must be mainly composed of 1–5 μm droplets in aerodynamic diameter, and the duration to nebulise the targeted dose must be less than 15 min. Thirdly, the nebulised solution must conform to precise pH and osmolarity characteristics. Some products, such as hypoosmolar or acid solutions, that induce coughing and bronchospasms are poorly tolerated [5–8]. Finally, the solution must be produced in large quantities and must be stable during storage for several weeks in order to allow preclinical and clinical studies to take place. All these points must be addressed to produce a nebulisable drug solution or drug carrier solution compatible with human use and with marketable insurance quality standards.

Lipid nanocapsules (LNCs) are patented nanocarriers designed to encapsulate lipophilic drugs without organic solvents. Their synthesis is based on an original phase-inversion process, allowing the production of nanocarriers in a sodium hydroxide aqueous solution with a size ranging from 25 to 100 nm [9]. The size distribution of

* Corresponding author. INSERM U646, IFR 132, University of Angers, 10, rue André Boquet, 49 100 Angers, France. Tel.: +33 241 735855; fax: +33 241 735853. E-mail addresses: jose.hureau@inserm.fr, jose.hureau@gmail.com (J. Hureau).

the carrier is unimodal with a low polydispersity index. The LNC structure is composed of a lipid core in which the solubilised lipophilic drug is limited by a membrane of lecithin and pegylated poly-ethyleneglycol hydroxystearate (PEG) chains conferring some degree of stealthiness [10]. All the excipients of the LNC are FDA approved. At a temperature of 37 °C, the core is liquid, whereas the membrane is rigid. Previous studies have demonstrated the ability to entrap amiodarone [11], ibuprofen [12], triptentone [13], etoposide [14], docetaxel [15] and paclitaxel [16,17] into LNCs. In preclinical studies, etoposide and paclitaxel-loaded LNC showed a higher cytotoxicity effect than free drugs after systemic administration. This can be explained by sustained drug release and P-glycoprotein (P-gp) inhibition [14–16]. Interestingly, radioactive components such as ^{99m}Tc and ¹⁸⁸Re can be used to label LNC allowing the imaging of the distribution for diagnostic and therapeutic uses [18].

Taxol[®], the first worldwide available formulation of paclitaxel, was a major step in therapeutic progress in the systemic treatment of ovarian, breast and non-small cell lung cancer patients. Paclitaxel, its active component, has many pharmacological effects that are particularly well adapted to cancer treatment. Paclitaxel is an antiproliferative [19], antiangiogenic [19], antimetastatic [20] and proapoptotic drug [21]. Nevertheless, paclitaxel is also a highly hydrophobic drug; in order to be solubilised; it requires the addition of dehydrated ethanol and Cremophor[®]EL (polyoxyl 35 castor oil) to allow it to be solubilised in water. This last excipient can induce shock syndrome after intravenous injection in humans due to histamine release in spite of medical preparation, and is not suitable for aerosol administration because of its high viscosity. For these reasons, Cremophor[®]EL-free formulations of paclitaxel are expected to show less toxicity for patients during chemotherapy treatment, improving patient tolerance [22] and aerosol delivery strategies. Over the last two decades, paclitaxel has been formulated into liposomes [23]. Systemic delivery has been well tolerated in mice and significant tumour growth inhibition has been observed in a subcutaneous murine model [24]. Aerosols of liposomal paclitaxel formulations have been developed and were effective on tumoural models of animal lungs and were found to significantly reduce tumoural growth [25,26]. These studies proved the high potential of aerosol paclitaxel for its administration in lung tumours and have stimulated further studies.

The aim of the present study was to demonstrate that the encapsulation of paclitaxel in LNC allows the pulmonary drug delivery of paclitaxel by nebulisation in order to carry out preclinical and clinical studies. First, the production of LNC dispersions was scaled-up, and the determinant physical and chemical parameters were optimised for aerosol delivery. Secondly, the storage of paclitaxel-loaded LNC dispersions was set-up. Finally, the feasibility of LNC aerosol of dispersions was studied.

2. Methods and materials

2.1. Materials

Captex[®] 8000 (glyceryl tricaprilate), Lipoid[®] S75-3 (soybean lecithin at 69% of phosphatidylcholine) and Solutol[®] HS15 (polyglycol ester of 12-hydroxystearic acid and polyethylene glycol) were purchased from Abitec Corp (Columbus, OH, USA), Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and BASF (Ludwigshafen, Germany), respectively. Paclitaxel powder was provided by AMPAC Fine Chemicals (Rancho Cordova, CA, USA). Distilled water from Cooper (Melun, France) was used. Sodium chloride (NaCl) was obtained from Prolabo VWR International (Fontenay-sous-bois, France). Taxol[®] 6 mg/ml solutions were obtained from Bristol-Myers Squibb (Rueil-Malmaison, France). Methanol and

tetrahydrofuran were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade and were from Fischer Scientific (Elancourt, France) and Carlo Erba Reactifs (Val de Reuil, France), respectively. Ministar 0.20 µm high-flow filters from Sartorius AG (Goettingen, Germany) were used. Cryotubes CRYO.S were purchased from Greiner Bio.one (Frickenhausen, Germany).

2.2. LNC formulation

The study was performed on 55-nm-diameter LNC prepared according to an original method already described elsewhere [9]. Briefly, Captex[®] 8000, Lipoid[®] S75-3, Solutol[®] HS 15, NaCl and water (1.2 g; 67.2 mg; 1.0 g; 73.3 mg and 1.8 g, respectively) were mixed and heated under magnetic stirring to 90 °C. Three cycles of heating and cooling between 90 °C and 70 °C were carried out followed by fast cooling induced at 78 °C by adding 13.2 ml of 0 °C deionised water. Magnetic stirring was applied to the suspension of LNC for 5 min at room temperature.

For the formulations of paclitaxel-loaded LNC, 1.8% of paclitaxel powder was first solubilised in Captex[®] 8000 (i.e. 21.6 mg in 1.2 g) under magnetic stirring and heated at 50 °C for 30 min. This rate is inferior to the solubility threshold of 2.0% of paclitaxel in Captex[®] 8000 (personal data). The same method was then applied to this mixture.

2.3. Size distribution

The LNCs were analysed for size distribution by photon-correlation spectroscopy and zeta potential using Malvern Zetasizer[®], Nano Series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK) after filtration through a 0.20-µm Sartorius filter.

2.4. Drug payload and encapsulation efficiency

Three samples of each batch of paclitaxel-loaded LNCs were filtered by 0.20-µm Ministar high-flow filters in order to remove insoluble paclitaxel crystals. Then, paclitaxel-loaded LNC samples were prepared by dissolving a determined quantity of LNC dispersion in a 96/4 (v/v) methanol/tetrahydrofuran solution. Aliquots of 50 µl and 500 µl were used for the payload study and for the aerosol characterisation, respectively. High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed using a Waters Alliance[®] 2690 system (Waters S.A., Saint-Quentin en Yvelines, France). A 20-µm aliquot of each filtrate was injected in triplicate into an HPLC XTerra[®] RP18 column 5 µm 4.6 mm × 150 mm (Waters S.A.). The mobile phase consisted of water and acetonitrile. Paclitaxel was eluted using a gradient elution programme of 50–80% acetonitrile. The flow rate was 1.0 ml/min. Data were analysed by Empower Pro software, version 5.00. Good linearity was observed in the range from 39.0 to 390.2 mg/l with a correlation coefficient above 0.99. The detection limit was 10.0 mg/ml and the quantification limit was 20.0 mg/ml. The paclitaxel peak was observed at 2 min 42 s. A diode array detector was used to identify the paclitaxel peak.

2.5. Scaled-up procedure

A scaled-up procedure was used by proportionately increasing the quantities of all the compounds. Thermal exchanges during the heating and cooling steps were optimised by immersing glasses in water at 95 °C and room temperature. The rest of the procedure remained unchanged.

2.6. Osmolarity studies

Osmolality was measured using a 5520 Vapro vapour osmometer from Wescor (Logan, Utah, USA).

2.7. Acidity studies

Using calibrated micro-pH CRISON 2001 OSI (Paris, France), pH measurements were taken.

2.8. Sterilisation procedure

Each formulation was filtered through a 0.20- μm Sartorius filter into a laminar flux hood and aliquoted in 2 ml sterile and apyrogen cryotubes CRYO.S before storage.

2.9. Sterility and apyrogenicity controls

Aliquots of 100 μl of blank LNC dispersions were plated onto trypticase soy agar with 5% horse blood. After overnight incubation at 37 °C, bacterial colonies were counted and their number was expressed as colony-forming units (CFU)/ml. Dispersions of fresh blank LNC dispersions were stored at +4 °C, and the tests were performed once a month for 4 months. Lipopolysaccharide (LPS) levels in fresh blank LNC dispersions were quantified by using Limulus Amebocyte Lysate from Endosafe Charles River (Charleston, USA), according to the manufacturer's protocol [27]. Results were negative when the LPS level was below 0.25 UI/ml.

2.10. Storage protocol

The storage protocol was based on a freezing method. The cryotubes CRYO.S, previously filled with LNC dispersions, were frozen in liquid nitrogen. The thawing protocol consisted of thawing the cryotubes CRYO.S at room temperature for 30 min. After the protocol was completed, the size distribution, dispersal, potential zeta, pH, osmolarity, drug payload and cytotoxicity of the LNC dispersions were checked.

2.11. Nebulisation tests

Our aim was to determine how to produce an aerosol of LNC dispersions compatible with human use.

A two-step procedure was used. First, the nebulisation of blank LNCs was carried out to determine which nebulisers were able to produce an aerosol without significant modification of the size and polydispersity of the LNC dispersions in less than 15 min. Six different nebulisers were tested with their specific power supply: two jet nebulisers: atomisor NL9M nebuliser (Diffusion Technique Française, France) and PARI LC sprint nebuliser (PARI, Germany); two ultrasonic nebulisers: Atomisor Megahertz nebuliser (Diffusion Technique Française, France) and Multisonic[®] nebuliser (Otto Schill, Germany); and two mesh nebulisers: Aeroneb[®] Pro nebuliser (Aerogen, CA, USA) and eFlow[®] rapid (PARI, Germany). For each apparatus, 3 ml of the blank LNC dispersions was loaded (in triplicate) before gathering samples in the liquid phase (1.0 ml of distilled water) with an impinger (Ace Glass Inc., Vineland, USA) operating at an airflow rate of 12.0 l/min. The duration of the nebulisation was timed. The size and polydispersity of nebulised LNC collected into the impinger at the end of the process were evaluated by photon-correlation spectroscopy using Malvern Zetasizer[®], Nano Serie DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK).

For the second-step of evaluation, only the devices selected from the first step were tested to study the drug payload and cytotoxicity of the paclitaxel-loaded LNC dispersions after nebulisation, to determine the aerosol mass median aerodynamic diameter (MMAD) and the fine-particle fraction (FPF). Paclitaxel-loaded LNC dispersions were nebulised (in triplicate) to gather samples in a liquid phase with an impinger (Ace Glass Inc., Vineland, USA) operating at an airflow rate of 12.0 l/min. Volumes of nebulised samples and residual volumes were measured. The aerosol

output rate was calculated. Samples of nebulised paclitaxel-loaded LNC dispersions and of paclitaxel-loaded LNC dispersions remnants were sampled to assay the drug payload by using the previously mentioned HPLC protocol and to carry out cytotoxicity assays. A Next Generation Pharmaceutical Impactor model 170 cascade impactor (MSP Corporation, Shoreview, MN, USA) was used to measure the size distribution of droplets at a flow rate of 15.0 l/min. The deposited aerosol on each impactor stage was re-suspended in 5 ml of distilled water. The drug payload of aerosol samples was quantified by the HPLC protocol. The MMAD and FPF levels between 1.0 and 5.0 μm were determined using cascade impaction data according to European Norm (EN) 13544-1:2007 from three independent experiments.

2.12. In vitro cytotoxicity study

The *in vitro* cytotoxic activity levels of fresh and thawed blank LNC, fresh and thawed paclitaxel-loaded LNC, and nebulised paclitaxel-loaded LNC against NCI-H460 human lung cancer cells were determined using a growth inhibition assay and compared with Taxol[®] and fresh non-nebulised paclitaxel-loaded LNC. Taxol[®] was supplied in vials containing 6 mg of solution for injection. The tested solution was obtained by diluting Taxol[®] in 0.9% NaCl for a final concentration of 1.2 mg/ml. To check the cytotoxic effect of the nebulised paclitaxel-loaded LNC dispersions, we compared two methods. First, we used the method previously described by Gagnadoux et al. on gemcitabine [28]. According to this method, samples were taken from the nebuliser reservoir before (T0) and after various nebulisation times (2, 4, 6 min and the end of nebulisation). Secondly, these tests were carried out with nebulised LNC dispersions sampled in an impinger at the end of complete nebulisation. A NCI-H460 human, large-cell lung carcinoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Cells were cultured in RPMI 1640 medium containing glutamine (Lonza, Verviers, Belgium), 10 mM HEPES (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA), 1 mM sodium pyruvate (Lonza, Verviers, Belgium), 1.5 g/L bicarbonate (Cambrex Bio Sciences, Verviers, Belgium), 10% fetal bovine serum (Lonza, Verviers, Belgium), 50 U/ml penicillin, and 50 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich Co., Ayrshire, UK). Cells were routinely maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. The culture medium was replaced every 2 or 3 days, and cells were subcultured weekly using 0.25% trypsin – 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich Co., Ayrshire, UK). Tumour cells were seeded in 24-well plates at 50,000 cells/well. All assays were performed with exponentially growing cultures. After 48 h, a drug-containing medium was added. For each sample, with a dose range from 10⁻³ to 100 nM of paclitaxel encapsulated LNC or of blank LNC formulations was tested. The cytotoxicity was assessed after 2 days of exposure by adding 80 μl of CellTiter 96[®] Aq_uRESIST One Solution Reagent (Promega, Madison, WI) to each well according to the manufacturer's instructions [29,30]. After 4 h in culture, the cell viability was determined by measuring the absorbance at 492 nm using a Multiskan Ascent microplate reader (Thermo Fisher Scientific Cergy-Pontoise, France). Because LNC dispersions are not translucent, the absorbance of wells containing the cells was subtracted from the absorbance of wells containing culture subtract alone for each point. The concentration of the drug causing 50% growth inhibition (IC₅₀) was calculated. Three independent experiments were performed in triplicate.

2.13. Statistical analysis

The results are expressed as a mean \pm SD. For the analysis of statistical significance, the Kruskal–Wallis test was applied with Bonferroni's correction. In all cases, $P < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. LNC formulations with a scaled-up procedure

The size distribution of LNC dispersions obtained by a scaled-up procedure was compared to the standard protocol. For all the scaled-up batches, the size distribution was unimodal. The mean value and standard deviation of particle size, polydispersity index and zeta potential of triplicate measurements were unchanged for both blank and paclitaxel-loaded LNC dispersions ($P > 0.05$). Results of blank LNC dispersions are presented in Table 1. Results of paclitaxel-loaded LNC are presented in Table 2.

3.2. Sterility and pyrogenicity tests

Three different scaled-up formulations of blank LNC dispersions were sterile for up to 4 months. No additional sterility control was performed beyond this time point. These sterile formulations were non-pyrogenic.

3.3. Osmolarity and pH studies

The pH and osmolarity levels were measured in triplicate in fresh blank LNC formulations at 20 °C. The mean pH values were 5.93 ± 0.05 and 5.92 ± 0.04 with standard and scaled-up protocols, respectively. The mean osmolarity values were 253 ± 2 mOsm/kg and 253 ± 3 mOsm/kg with standard and scaled-up protocols, respectively. Results were similar for paclitaxel-loaded LNC produced by the standard and the scaled-up protocol (data not shown). Because these two chemical parameters can be aggressive to bronchial and alveolar cells and can induce adverse effects, the pH of the LNC dispersion was increased to reach the tissue's pH by adding molar sodium hydroxide solution; the osmolarity was also increased to a near-human iso-osmolarity value by adding sodium chloride. These adjustments were made after LNC fabrication. By adding 10 μ l of molar sodium hydroxide solution per 30 ml of final volume LNC dispersion and 15% of sodium chloride (calculated on the formulation protocol), a pH value of 7.28 ± 0.02 and an osmolarity level of 267 ± 2 mOsm/kg were obtained. The pH and the osmolarity levels of all the LNC dispersions were modified as described above for further experiments.

3.4. Storage procedure

The mean particle size, polydispersity index and zeta potential of blank and paclitaxel-loaded LNC dispersions were measured before and after freezing in liquid nitrogen for several hours. The visual aspect of all the thawed LNC dispersions was identical to fresh LNC dispersions. Results are presented in Table 3. The osmolarity and pH of blank and paclitaxel-loaded LNC dispersions were unchanged after freezing in liquid nitrogen (data not shown).

3.5. Aerosol tests

For first step studies, a thawed blank LNC batch of 65.7 nm with a 0.05 polydispersity index was tested with Atomisor NL9M,

Atomisor Megahertz and eFlow[®] rapid nebulisers. No cloud was seen with the Atomisor Megahertz device. The results are presented in Table 4.

To complete these results, a different thawed, blank LNC pre-clinical batch of 84.2 nm with a 0.14 polydispersity index was tested with PARI LC Sprint, Multisonic[®] and Aeroneb[®] Pro nebulisers. No cloud was seen with the Multisonic[®] device. The results are presented in Table 5.

We considered that the results of step one proved that jet nebulisers greatly disorganise LNC dispersion which lose their unimodal size distribution. Likewise, we observed that ultrasonic devices were unable to produce an aerosol with LNC dispersions. For these reasons, neither jet nor ultrasonic nebulisers were selected for further studies. Two different mesh nebulisers were able to produce aerosols of LNC dispersions without breaking the LNC. The duration of nebulisation was 8.4 and 62.3 min. for eFlow[®] rapid and Aeroneb[®] Pro, respectively. For this reason, Aeroneb[®] Pro was not selected for the second-step analysis.

The second-step analysis was performed with eFlow[®] rapid only. The residual volume in the medication reservoir was 1.08 ± 0.06 ml. The nebulised volume (including 1 ml of distilled water) was 2.13 ± 0.06 ml. The aerosol output rate was 0.22 ± 0.01 ml/min. The MMAD was 2.7 ± 0.1 μ m. The RPF between 1.0 and 5.0 μ m was $81.5 \pm 3.1\%$.

3.6. Drug payload

Typical results of HPLC are presented in Fig. 1. A paclitaxel peak can be observed at 2.5 min (shown by an arrow). Paclitaxel payload in fresh paclitaxel-loaded LNC was equal to 1.65 mg/ml $\pm 3.0\%$. The encapsulation efficiency is 100% for all fresh paclitaxel-loaded LNC dispersions. Because eFlow[®] rapid has a residual volume in the medication reservoir, the payload was obtained by adding the quantity of paclitaxel measured to the residual volume collected in the reservoir after nebulisation and the quantity of paclitaxel measured in the nebulised volume collected in the impinger bottle. The paclitaxel payload in the residual volume was unchanged in comparison with the non-nebulised solution. The paclitaxel's concentration in the nebulised volume was equal to 1.45 mg/ml $\pm 1.9\%$. Quantification results were expressed as a percentage of drug payload in comparison with fresh paclitaxel-loaded LNC. The amount of paclitaxel was $100.0 \pm 4.9\%$, $102.4 \pm 3.0\%$ and $98.2 \pm 2.1\%$ for fresh paclitaxel-loaded LNC thawed after freezing in liquid nitrogen, fresh paclitaxel-loaded LNC, and eFlow[®] rapid nebulised paclitaxel-loaded LNC, respectively.

3.7. Cytotoxicity tests

The results of cytotoxicity assays are presented in Figs. 2 and 3. Taxol[®] IC50 was 4.4 nM as published elsewhere (4.8 nM) [31]. For frozen Taxol[®] in liquid nitrogen, the cell survival curve and the IC50 were unchanged. The cytotoxic effects of fresh paclitaxel-loaded LNC dispersion were similar to Taxol[®] and the IC50 was 3.8 nM (Fig. 2). The cytotoxic effect was unchanged for paclitaxel-loaded LNC frozen in liquid nitrogen (Fig. 2). Interestingly, the IC50 of fresh blank LNC dispersion was 5.4 nM (Fig. 2).

Table 1
Characterisations of blank LNCs produced by the scaled-up procedure. Experiments performed in triplicate.

	Multiplier	Mean particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	Volume (ml)
Standard protocol	None	50.4 ± 0.7	0.052 ± 0.011	-4.85 ± 0.55	15
Scaled-up procedure #1	10	52.4 ± 0.5	0.053 ± 0.019	-5.76 ± 0.40	150
Scaled-up procedure #2	10	53.8 ± 1.2	0.041 ± 0.010	-5.64 ± 0.94	150
Scaled-up procedure #3	10	53.9 ± 1.2	0.055 ± 0.013	-4.54 ± 0.15	150
Kruskal–Wallis test	–	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	–

Table 2

Characterisations of paclitaxel LNC produced by the scaled-up procedure. Experiments performed in triplicate.

	Multiplier	Mean particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	Volume (ml)
Standard protocol	None	49.0 ± 1.8	0.061 ± 0.017	-6.51 ± 0.25	15
Scaled-up procedure #4	4	53.4 ± 1.9	0.078 ± 0.023	-6.94 ± 0.56	60
Scaled-up procedure #5	10	48.4 ± 0.5	0.038 ± 0.010	-4.53 ± 0.15	150
Kruskal-Wallis test	-	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	-

Table 3

Characterisations of blank and paclitaxel LNCs after the conservation protocol in liquid nitrogen.

	Mean particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
Fresh, blank LNCs	53.3 ± 0.5	0.06 ± 0.01	-5.12 ± 0.32
Thawed, blank LNCs	65.7 ± 1.8	0.05 ± 0.01	-5.66 ± 0.19
Fresh, paclitaxel-loaded LNC	53.4 ± 1.9	0.08 ± 0.02	-5.84 ± 0.87
Thawed, paclitaxel-loaded LNC	67.5 ± 0.5	0.07 ± 0.01	-5.26 ± 0.49

Table 4

Characterisations of a blank LNC of 65.7 nm with a 0.05 polydispersity index after nebulisation by three different devices.

Nebuliser	Mean particle size (nm)	Polydispersity index	Duration (min) mean ± SD
Atomisor N19 M	Trimodal distribution of LNC	-	7.5 ± 2.4
Atomisor Megahertz	Signal too low because dispersion was too diluted	-	10.1 ± 0.2
eFlow [®] rapid	83.8	0.17	8.4 ± 0.4

Table 5

Characterisations of a blank LNC of 84.2 nm with a 0.14 polydispersity index after nebulisation by three other different devices.

Nebuliser	Mean particle size (nm)	Polydispersity index	Duration (min) mean ± SD
PARI LC Sprint	Trimodal distribution of LNC	-	5.5 ± 0.9
Multisonic [®]	Signal too low because dispersion was too diluted	-	11.3 ± 0.6
Aeroneb [®] Pro	84.9	0.20	62.3 ± 4.0

For nebulised paclitaxel-LNC, the growth inhibition curves were similar to fresh paclitaxel-loaded LNC dispersion (Fig. 3). The IC50 parameters were also identical.

4. Discussion

The commercial formulation Taxol[®] cannot be nebulised because of the presence of Cremophor[®]EL used as a solvent for paclitaxel. For this reason, promising drug intensification strategies by aerosol therapy in lung malignancies cannot be expected from Taxol[®] in its current commercial form. The present study demonstrates that a new formulation of paclitaxel without Cremophor[®]EL, in which paclitaxel is encapsulated in a nanovector, allows a suitable form of paclitaxel aerosol to be produced. This aerosol, composed of water droplets in which the LNCs are dispersed, is compatible with a therapeutic study in humans, and could permit the research of new therapeutic effects of paclitaxel in pulmonary delivery strategies for both primary and secondary lung malignancies.

A scaled-up LNC formulation protocol was used in order to produce LNC batches adapted to preclinical and clinical studies. The standard formulation protocol produced 15 ml of LNC dispersion per batch. This volume was insufficient to carry out repeated *in vivo* administrations of LNC. The scaling-up of the standard formulation protocol was obtained by increasing the proportions of all the components by a multiple of 10. The main modification was the optimisation of thermal exchange by water baths. The characterisation of the LNC produced by the scaled-up protocol by diffraction laser revealed no differences with the LNC produced with the standard protocol.

Osmolarity, acidity, sterility and pyrogenicity, the main chemical and biological parameters of the LNC dispersions particularly involved in tolerance of aerosols in humans, were studied. Previous published data have demonstrated that hypotonic aerosols may

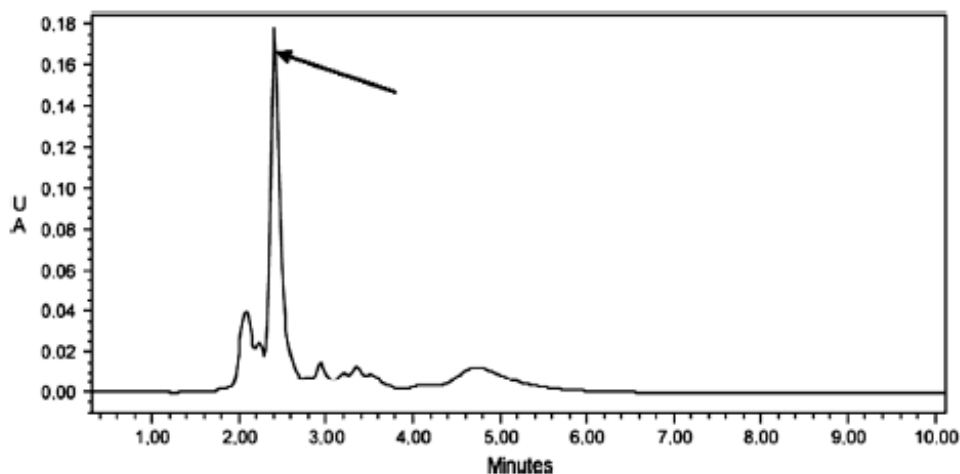


Fig. 1. A typical chromatogram of paclitaxel exhibiting a retention time of about 2.5 min (arrow).

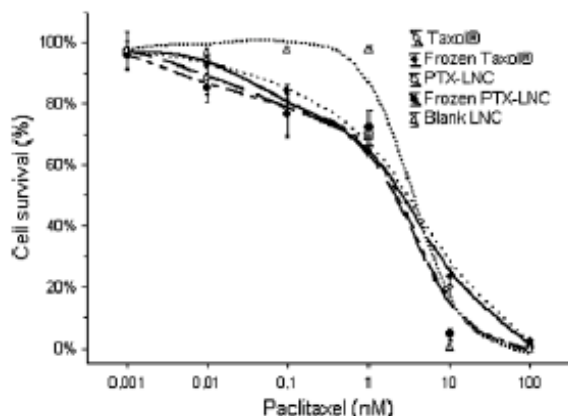


Fig. 2. Growth inhibition assay of Taxol[®], Taxol[®] previously frozen in liquid nitrogen, PTX-LNC, PTX-LNC stored in liquid nitrogen and blank LNC in NCI-H460.

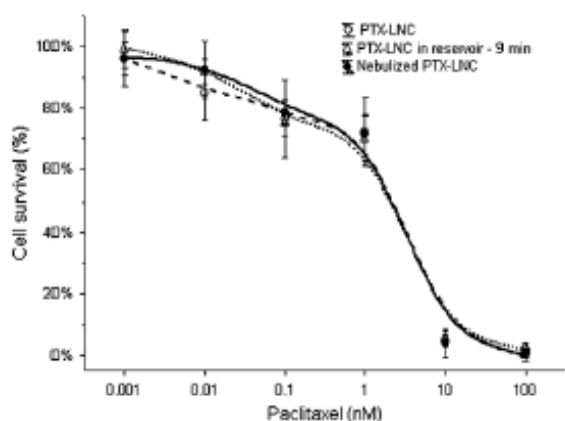


Fig. 3. A growth inhibition assay of non-nebulised and nebulised PTX-LNC on NCI-H460. Nebulised PTX-LNCs were sampled in the impinger at the end of the nebulisation process.

induce coughing [5,6] and that acidic aerosols (pH = 5) may trigger significant alteration of pulmonary functions due to bronchospasms [7]. Moreover, acidity and hypo-osmolarity could exacerbate these deleterious bronchial effects [8]. It was, therefore, considered necessary to assess these parameters for LNC dispersions. The osmolarity was not measured by the technique of 'freezing point depression', the reference method for solutes or ions in water, but by a vapour-pressure method. This method was chosen as it does not modify the physical status of the sample, a key point for colloid dispersion and LNC dispersion. Hypo-osmolarity of the LNC dispersions (253 mOsm/kg) was compensated by the adjunction of sodium chloride after the formulation until the level of 270 mOsm/kg was reached. This threshold was chosen to avoid the theoretical risk of flocculation. Acidity was compensated for by adding a small quantity of molar sodium hydroxide solution at the end of the formulation. This step did not modify the osmolarity value. LNC formulations were demonstrated to be sterile and apyrogenic with two conventional tests. These results showed that LNC dispersions could display the principal chemical and biological parameters required for aerosol delivery in humans.

A new PTX-LNC storage protocol utilising a freezing procedure in liquid nitrogen was described. A freeze-drying storage protocol

of the LNC dispersion was not used because there was a risk of environmental contamination by paclitaxel during the sublimation step and a risk of LNC sterility loss during the rehydration step [32]. Because LNCs are slow-release carriers, it was mandatory to demonstrate that the storage protocol was able to suspend the drug release [16,33]. Small volumes of LNC and PTX-LNC dispersions were stored in liquid nitrogen for 4 months. After thawing, the zeta potential remained unchanged but the mean size increased by 15%, this supposedly being related to the increase of hydration of the PEG chains. The polydispersity index was multiplied by a factor of two. However, this index remained below 0.1, thus the size distribution of the LNC dispersions remained unimodal and log-normal. The drug payload of thawed PTX-LNC was found to remain unchanged. As the PTX-LNC dispersions were filtered before quantification with an HPLC protocol, the possible paclitaxel crystals remaining in the water phase, and thus non-encapsulated, were removed. This methodological point confirmed that the quantified paclitaxel was encapsulated and proved that the freeze-storage protocol had not destroyed the PTX-LNC and had effectively stopped the drug release process. After freezing storage, the cytotoxic effect of the PTX-LNC was identical to fresh PTX-LNC and the chemical parameters were not modified. These results demonstrated that the LNC storage protocol in liquid nitrogen did not alter the PTX-LNC and was well suited to conserve them.

The nebulisation studies were performed with commercial nebulisers on power input and showed that only mesh nebulisers were able to produce aerosols for LNC dispersion. Jet nebulisers seemed to disorganise the LNC size distribution which did not remain unimodal after the nebulisation process. This observation may reflect a phenomenon of destruction-rearrangement of LNC caused by the stress of the jet effect that has been applied to the LNCs several times before being aerosolised. Because LNCs encapsulate lipophilic drugs that precipitate in water, jet nebulisers cannot be used to nebulise LNC dispersions. The ultrasonic nebulisers were unable to nebulise a detectable quantity of LNCs. The two mesh nebulisers tested succeeded in producing LNC aerosols from LNC dispersions. As these devices produce aerosols by a vibrating process without recirculation system, the LNCs have endured the nebulisation stress during the droplet formation only one time. This characteristic could explain the absence of disorganisation of the LNCs structure with mesh nebulisers contrary to jet nebulisers. The Aeroneb[®] Pro nebuliser did not modify the mean size distribution of the LNC but was not compatible with human use because the duration of nebulisation for 3 ml of LNC dispersion took over 1 h. A recent study has demonstrated that the output rate of Aeroneb[®] nebuliser was inversely correlated with viscosity of the nebulised solution [34]. As with all colloidal dispersion, the LNC dispersions had a higher viscosity than saline solutions; this could explain why the output rate was so low. On the contrary, the eFlow[®] rapid nebuliser was able to nebulise 3 ml of LNC dispersion in less than 9 min. No modifications of the drug amount and the cytotoxic effect on NCI-H460 cell line was observed even if the mean size of the LNC was increased by 25% and the polydispersity index was multiplied by three. The MMAD and the FPF rates (between 1.0 and 5.0 μm) were 2.7 μm and 81.5%, respectively. These main aerosol parameters were found to be highly compatible with the bronchial target for human use. The eFlow[®] rapid was considered as the only tested device able to nebulise LNC dispersions with good characteristics for human use.

Pulmonary drug delivery of paclitaxel by nebulisation is a new and highly potential therapeutic strategy [22]. Nebulisation of paclitaxel was first carried out from formulations of paclitaxel solubilised in organic solvents [26,35]. Recently, formulations of paclitaxel encapsulated in liposomes have been tested in preclinical studies. Koshkina et al. tested a liposomal formulation of

paclitaxel in a mouse model of lung metastasis [25]. In 2005, a fullerene–paclitaxel conjugate was encapsulated in liposomes for aerosol therapy [36]. New nanovector colloidal formulations of paclitaxel without Cremophor[®]EL have been described in the literature such as nanoparticles [37], nanospheres [38], nanoemulsions [39] and linked to human albumin [40]. These formulations must be administered intravenously but none of these formulations have already been administered by inhalation. LNC, an original nanostructure vector hybrid between polymeric nanocapsules and liposomes, is the first nanocolloidal vector to deliver paclitaxel by aerosol compatible with therapeutic use in humans. Because PTX–LNC is a sustained-release drug nanocarrier and can be nebulized, the traditional limitations for the blood infusion paclitaxel route of administration – such as a low concentration into the lungs; insufficient drug delivery to the tumour cells, inducing cell resistance; and non-specific distribution associated with systemic toxicity – could be overcome with aerosols of PTX–LNC in lung malignancy patients. In addition, the LNC carrier acts as an inhibitor of the P-gp, which is a major mechanism of resistance to paclitaxel [41], allowing us to enhance the therapeutic potential of PTX.

To date, only a few non-liposomal vectors for conventional chemotherapy allow aerosol delivery. Tseng et al. presented gelatin nanoparticles with biotinylated epidermal growth factor set at the outside of the structure to allow the active targeting to the EGF receptor for lung cancer targeting [42]. These nanoparticles had a diameter of between 200 and 300 nm and could encapsulate cisplatin. A dry powder formulation of doxorubicin encapsulated in nanoparticles was described by Azami et al. [43]. This vector was produced by a method of polymerisation/emulsion and then dried. After being re-dissolved in deionised water, the particles had an average size of 173 ± 43 nm. The lipid nanocapsule is a new and original ready-to-use nanovector for aerosol delivery. As the LNC can encapsulate many different anticancer drugs such as paclitaxel or etoposide, this drug nanocarrier allows the testing of new pulmonary delivery strategies in lung malignancy treatment.

5. Conclusions

This study demonstrates the feasibility of an LNC paclitaxel aerosol. The characteristics of the aerosols are compatible with use in human medicine. A scaled-up procedure and a mid-term conservation procedure have been developed for preclinical and clinical studies. Animal studies are needed to determine the therapeutic potential of the aerosols of LNC dispersion.

Acknowledgements

The authors would like to thank Pascal Gayet and Patrick Saulnier (INSERM U 646, IFR 132, Angers, France) for their help concerning the preparations of LNC dispersions, Valérie Moal (Biochemistry, Academic hospital, Angers, France) for osmolarity tests and Sandrine Le Guellec for help in aerosols studies (INSERM U 618, IFR 135, Université François Rabelais et CHU de Tours, France).

Research supports: This study was supported by grants from the Comité Départemental du Maine-et-Loire de la Ligue Contre le Cancer, the Cancéropôle Grand Ouest and the Régions Bretagne, Centre, Pays de la Loire et Poitou-Charentes.

References

- G.C. Smaldone, Advances in aerosols: adult respiratory disease, *J. Aerosol. Med.* 19 (2006) 36–46.
- F. Gagnadoux, J. Hureau, L. Vecellio, T. Urban, A. Le Pape, I. Valo, J. Montharu, V. Leblond, M. Boisdrion-Celle, S. Lerondel, C. Majoral, P. Diot, J.L. Racineux, E. Lemarie, Aerosolized chemotherapy, *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug. Deliv.* 21 (2008) 61–70.
- S. Sharma, D. White, A.R. Imondi, M.E. Placke, D.M. Vail, M.G. Kris, Development of inhalational agents for oncologic use, *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 1839–1847.
- <<http://clinicaltrials.gov/>>.
- W.L. Eschenbacher, H.A. Boushey, D. Sheppard, Alteration in osmolarity of inhaled aerosols cause bronchoconstriction and cough, but absence of a permeant anion causes cough alone, *Am. Rev. Respir. Dis.* 129 (1984) 211–215.
- D. Sheppard, N.W. Rizk, H.A. Boushey, R.A. Bethel, Mechanism of cough and bronchoconstriction induced by distilled water aerosol, *Am. Rev. Respir. Dis.* 127 (1983) 691–694.
- M. Mric, D. Plavec, Risk of acute bronchospasm and bronchial hyperreactivity from inhaled acid aerosol in healthy subjects: randomized, double-blind controlled trial, *Croat. Med. J.* 45 (2004) 709–714.
- J.R. Balmes, J.M. Fine, D. Christian, T. Gordon, D. Sheppard, Acidity potentiates bronchoconstriction induced by hyposmolar aerosols, *Am. Rev. Respir. Dis.* 138 (1988) 35–39.
- B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.E. Proust, J.P. Benoit, A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers, *Pharm. Res.* 19 (2002) 875–880.
- A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, P. Simard, J.C. Leroux, J.P. Benoit, Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 78 (2006) 620–628.
- A. Lamprecht, Y. Bouligand, J.P. Benoit, New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone, *J. Control Release* 84 (2002) 59–68.
- A. Lamprecht, J.L. Saunet, J. Roux, J.P. Benoit, Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment, *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 407–414.
- A. Malzert-Freon, S. Vrignaud, P. Saulnier, V. Lisowski, J.P. Benoit, S. Rault, Formulation of sustained release nanoparticles loaded with a triptentone, a new anticancer agent, *Int. J. Pharm.* 320 (2006) 157–164.
- A. Lamprecht, J.P. Benoit, Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition, *J. Control Release* 112 (2006) 208–213.
- M.N. Khalid, P. Simard, D. Hoarau, A. Dragomir, J.C. Leroux, Long circulating poly(ethylene glycol) decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid tumors, *Pharm. Res.* 23 (2006) 752–758.
- E. Gardon, A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-Pouessel, B. Denizot, P. Menei, J.P. Benoit, A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats, *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 1710–1722.
- S. Peltier, J.M. Oger, F. Lagarde, W. Couet, J.P. Benoit, Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules, *Pharm. Res.* 23 (2006) 1243–1250.
- S. Baillet, N. Noiret, F. Hindre, B. Denizot, E. Garin, H. Rajerison, J.P. Benoit, ^{99m}Tc/188Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 33 (2006) 602–607.
- N. Klauer, S. Parangi, E. Flynn, E. Hamel, R.J. D'Amato, Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol, *Cancer Res.* 57 (1997) 81–86.
- M.E. Stearns, M. Wang, Taxol blocks processes essential for prostate tumor cell (PC-3 ML) invasion and metastases, *Cancer Res.* 52 (1992) 3776–3781.
- W.C. Yen, M.G. Wientjes, J.L. Au, Differential effect of taxol in rat primary and metastatic prostate tumors: site-dependent pharmacodynamics, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1305–1312.
- A. Gautam, N. Koshkina, Paclitaxel (taxol) and taxoid derivatives for lung cancer treatment: potential for aerosol delivery, *Curr. Cancer Drug Targets* 3 (2003) 287–296.
- R.M. Straubinger, A. Sharma, M. Murray, E. Mayhew, Novel taxol formulations: taxol-containing liposomes, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* (1993) 69–78.
- A. Sharma, E. Mayhew, R.M. Straubinger, Antitumor effect of taxol-containing liposomes in a taxol-resistant murine tumor model, *Cancer Res.* 53 (1993) 5877–5881.
- N.V. Koshkina, J.C. Waldrep, L.E. Roberts, E. Golumski, S. Melton, V. Knight, Paclitaxel liposome aerosol treatment induces inhibition of pulmonary metastases in murine renal carcinoma model, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 3258–3262.
- A. Hershey, I. Kurzman, L. Forrest, C. Bohling, M. Stonerook, M. Placke, A. Imondi, D. Vail, Inhalation chemotherapy for macroscopic primary or metastatic lung tumors: proof of principle using dogs with spontaneously occurring tumors as a model, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 2653–2659.
- C.C. Mascoli, M.E. Weary, Applications and advantages of the limulus amoebocyte lysate (LAL) pyrogen test for parenteral injectable products, *Prog. Clin. Biol. Res.* 29 (1979) 387–402.
- F. Gagnadoux, A.L. Pape, E. Lemarie, S. Lerondel, I. Valo, V. Leblond, J.L. Racineux, T. Urban, Aerosol delivery of chemotherapy in an orthotopic model of lung cancer, *Eur. Respir. J.* 26 (2005) 657–661.
- A.H. Cory, T.C. Owen, J.A. Barltrop, J.G. Cory, Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture, *Cancer Commun.* 3 (1991) 207–212.
- T.L. Riss, R.A. Moravec, Comparison of MIT, XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays, *Mol. Biol. Cell. (Suppl. 3)* (1992) 184a.
- T. Yamori, S. Sato, H. Chikazawa, T. Kadota, Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts, *Jpn. J. Cancer Res.* 88 (1997) 1205–1210.

- [32] C. Dulieu, D. Bazile, Influence of lipid nanocapsules composition on their aptness to freeze-drying, *Pharm. Res.* 22 (2005) 285–292.
- [33] F. Lacoëuille, E. Garcion, J.P. Benoit, A. Lamprecht, Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7 (2007) 4612–4617.
- [34] G. Zhang, A. David, T.S. Wiedmann, Performance of the vibrating membrane aerosol generation device: aereon[®] micropump nebulizer, *J. Aerosol. Med.* 20 (2007) 408–416.
- [35] Y. Zou, H. Fu, S. Ghosh, D. Farquhar, J. Klostergaard, Antitumor activity of hydrophilic paclitaxel copolymer prodrug using locoregional delivery in human orthotopic non-small cell lung cancer xenograft models, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 7382–7391.
- [36] T.Y. Zakharian, A. Seryshev, B. Sitharaman, B.E. Gilbert, V. Knight, L.J. Wilson, A fullerene-paclitaxel chemotherapeutic: synthesis, characterization, and study of biological activity in tissue culture, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 12508–12509.
- [37] H.F. Liang, C.T. Chen, S.C. Chen, A.R. Kulkarni, Y.L. Chiu, M.C. Chen, H.W. Sung, Paclitaxel-loaded poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer, *Biomaterials* 27 (2006) 2051–2059.
- [38] T. Musumeci, L. Vicari, C.A. Ventura, M. Gulisano, R. Pignatello, G. Puglisi, Lyoprotected nanosphere formulations for paclitaxel controlled delivery, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6 (2006) 3118–3125.
- [39] S. Khandavilli, R. Panchagnula, Nanoemulsions as versatile formulations for paclitaxel delivery: peroral and dermal delivery studies in rats, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 154–162.
- [40] T.E. Stinchcombe, Nanoparticle albumin-bound paclitaxel: a novel Cremphor-EL-free formulation of paclitaxel, *Nanomedicine* 2 (2007) 415–423.
- [41] A. Sparreboom, J. van Asperen, U. Mayer, A.H. Schinkel, J.W. Smit, D.K. Meijer, P. Borst, W.J. Nooijen, J.H. Beijnen, O. van Tellingen, Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 2031–2035.
- [42] C.J. Tseng, S.Y. Wu, W.H. Wang, C.L. Peng, F.H. Lin, C.C. Lin, T.H. Young, M.J. Shieh, Targeting efficiency and biodistribution of biotinylated-EGF-conjugated gelatin nanoparticles administered via aerosol delivery in nude mice with lung cancer, *Biomaterials* 29 (2008) 3014–3022.
- [43] S. Azarmi, X. Tao, H. Chen, Z. Wang, W.H. Finlay, R. Lobenberg, W.H. Roa, Formulation and cytotoxicity of doxorubicin nanoparticles carried by dry powder aerosol particles, *Int. J. Pharm.* 319 (2006) 155–161.

Discussion et perspectives

Ce travail de thèse fait suite aux travaux du Professeur Gagnadoux et de notre équipe sur les aérosols de gemcitabine. Ces travaux ont montré que cet anticancéreux validé dans le traitement du cancer bronchique pouvait être nébulisé sans perte de ses caractéristiques cytotoxiques *in vitro* [25], que les aérosols de gemcitabine étaient bien tolérés à raison d'un aérosol par semaine pendant 9 semaines chez le rat [26], n'induisaient aucune toxicité chez le primate [25] et était efficace pour prévenir le développement de tumeurs bronchiques NCI-H460 dans un modèle orthotopique murin [27]. Ces résultats ont abouti à la réalisation d'une étude de phase I, dont les résultats sont en cours d'analyse.

La poursuite de ce travail de recherche translationnelle s'est portée sur un autre anticancéreux, le paclitaxel. Des résultats préliminaires nous avaient permis de constater que la formulation commerciale Taxol® ne pouvait pas être nébulisé en raison d'excipients trop visqueux. Ainsi, une nouvelle formulation de paclitaxel solubilisé en phase aqueuse par des nanocapsules lipidiques mises au point par l'équipe du Professeur Benoît dans l'unité INSERM 646 [101,102] à Angers était potentiellement intéressante pour développer une stratégie de traitement locorégional du cancer bronchique avec le paclitaxel. Aucune donnée n'était disponible sur ce point lors de l'initiation du travail.

Dès les premiers essais de nébulisation ou d'utilisation chez l'animal, plusieurs difficultés pratiques majeures sont apparues. La première était que le volume de nanocapsules lipidiques préparé lors d'une synthèse, 16 ml, était trop faible pour réaliser toutes les expérimentations utiles et pertinentes. Ce volume devait être augmenté tout en respectant le principe de fabrication des nanocapsules lipidiques. De plus, des données importantes avant l'administration chez l'animal n'étaient pas déterminées en routine comme le pH ou l'osmolarité. Enfin, les nanocapsules lipidiques étant fabriquées sur une paillasse conventionnelle dans des conditions non strictement stériles (pas de hotte à flux laminaire), leur stérilité et la quantité d'endotoxines lipopolysaccharidiques devaient être connus. Lors de cette thèse, une partie du travail a consisté à mettre au point une méthode d'adaptation d'échelle de la synthèse des nanocapsules lipidiques et de vérifier que cette méthode produisait bien des nanocapsules lipidiques. L'augmentation d'échelle par un facteur dix a été choisi arbitrairement car elle permettait de produire la quantité

voulue de nanocapsules lipidiques et semblait conceptuellement pertinente. Le point crucial de cette recherche a consisté à optimiser les échanges thermiques au moyen de bains d'eau chauffés. Cette étape était indissociable d'une étape d'adaptation des paramètres physico-chimiques les plus importants de la phase aqueuse renfermant les nanocapsules lipidiques. Ainsi, la mise en évidence des propriétés acides et hypo-osmolaires des dispersions de nanocapsules lipidiques a été très importante [118,119]. En effet, la modification de ces paramètres pouvait directement modifier les mécanismes physio-chimiques en jeu lors de l'inversion de phase au moment de la formation des nanocapsules lipidiques. Pour cette raison, il a été décidé de modifier ces paramètres *une fois* la formulation réalisée. Comme il fallait augmenter ces paramètres, l'ajout de faibles quantités de soude molaire et de chlorure de sodium a résolu le problème. Enfin, la recherche de la présence d'impuretés de type « organisme génétique modifié » (OGM) a permis d'identifier un composé non certifié sans OGM, qui a été remplacé par le composé identique certifié sans OGM. Une fois ce travail effectué sur des nanocapsules lipidiques sans médicament, nous avons montré la robustesse des modifications apportées sur les nanocapsules lipidiques renfermant du paclitaxel. Ce travail a permis de proposer un protocole complet de fabrication de lots précliniques de nanocapsules lipidiques. Ces lots de 150 ml sont stériles, apyrogènes, renferment pas d'OGM et leur propriété chimiques sont connues et stables.

Cependant, la conservation de ces lots précliniques à +4°C s'est révélée impossible. En effet, au fur et à mesure du temps, des cristaux blancs étaient observés dans les lots de nanocapsules de paclitaxel. Ces cristaux étaient identiques à ceux observés dans un flacon de Taxol[®] conservé à +4°C. Dans des échantillons conservés à +20°C, la formation de ces cristaux était plus précoce et plus rapide qu'à +4°C. Dans des lots conservés à +37°C, les mêmes cristaux étaient présents encore plus tôt. Cette observation posait deux questions : de quoi sont composés ces cristaux ? que faire pour qu'ils n'apparaissent pas, car il était exclu d'utiliser chez l'animal une telle solution ?

Nous avons considéré que ces cristaux étaient très probablement composés de paclitaxel, provenant des nanocapsules lipidiques, qui précipitait en phase aqueuse. Faute de temps, cette hypothèse n'a pas été documentée par des dosages de paclitaxel ni par des observations au microscope polarisé. Nous avons considéré que le phénomène de relargage passif lent et progressif du paclitaxel, propre aux nanocapsules lipidiques, était en cause dans la formation temps-dépendant et température-dépendante de ces cristaux similaires à ceux observés dans des

flacons de Taxol[®]. La stabilité dans le temps de la structure des nanocapsules lipidiques est connue et le phénomène de relargage lent et progressif du principe actif encapsulé, décrit *in vitro*, se produit aussi lors de la phase de conservation. Nous devions trouver une méthode de conservation qui bloque ce phénomène. Nous n'avons pas utilisé la méthode de lyophilisation des nanocapsules lipidiques publiée pour plusieurs raisons [120]. Cette procédure est consommatrice de temps, impose d'ajouter un cryoprotecteur (dont on ne connaît pas l'influence sur la structure des nanocapsules et sur leurs propriétés) et posait le risque de contamination de l'appareillage par du paclitaxel. Nous avons donc testé une solution par congélation, qui est la première étape de la lyophilisation. L'avantage principal de cette méthode est de laisser les nanocapsules lipidiques dans leur phase aqueuse. Nous avons testé 3 protocoles et avons retenu le protocole de congélation dans l'azote liquide car les modifications de taille observées sur les nanocapsules étaient les moins importantes. Aucune modification du pouvoir cytotoxique des nanocapsules lipidiques n'a été observé. Par ailleurs, les caractéristiques de la phase aqueuse des lots de nanocapsules lipidiques congelées étaient inchangées après décongélation. Ces résultats nous ont permis de valider définitivement ce protocole qui préserve aussi la stérilité, l'apyrogénicité et les caractéristiques chimiques (pH et l'osmolarité) des lots précliniques de nanocapsules lipidiques.

Nous avons ensuite pu démontrer pour la première fois l'intérêt des nanocapsules lipidiques de paclitaxel par rapport au Taxol[®] dans un modèle murin sous-cutané de cancer bronchique. Notre étude a retrouvé l'effet antitumoral attendu du Taxol[®] et met a mis en évidence un effet supérieur de la formulation de nanoparticules de paclitaxel. La comparaison entre les nanocapsules lipidiques de paclitaxel et la nouvelle formulation de paclitaxel complexée avec de l'albumine humaine (Abraxane[®]) serait intéressante. L'augmentation de l'effet antitumoral est expliquée par les propriétés intrinsèques des nanocapsules lipidiques parmi lesquelles la concentration dans les tumeurs via les fenestrations des capillaires immatures (effet EPR), la libération prolongée du paclitaxel et l'inhibition de la glycoprotéine-P. Ces données s'ajoutent à de nombreux résultats sur d'autres modèles tumoraux avec les nanocapsules lipidiques [107,110,121].

Ce travail a aussi produit des données toxicologiques originales sur les nanocapsules lipidiques. Ainsi, nous avons montré que le protocole utilisé dans l'étude d'efficacité sus-citée était très bien toléré chez la souris Swiss. Nous avons étudié pour la première fois la dose maximale tolérée (DMT) et la dose létale 50 (DL50) des nanocapsules lipidiques (sans et avec paclitaxel) après

injection unique chez la souris selon la méthodologie d'Irwin. Ces résultats ont montré une augmentation des paramètres DMT et DL50 par un facteur dix des nanocapsules lipidiques de paclitaxel par rapport au Taxol[®]. Les données précliniques de la formulation Abraxane[®], disponible sur le site de l'Agence européenne du Médicament, permettent de savoir que la DL50 chez la souris est égale à 447 mg/kg [122]. D'autres études toxicologiques réglementaires sont planifiées.

Le dernier apport de nos travaux a été de montrer nouvelle caractéristique des nanocapsules lipidiques : leur capacité à pouvoir être nébulisée. Cette propriété ouvre un nouveau champ de recherche et d'applications à ce vecteur. Un seul appareil parmi les 6 testés, l'eflow[®] rapid, nébuliseur à tamis oscillant à plus de 100 000 Hertz, a permis de créer un aérosol dont les caractéristiques permettent de prévoir un dépôt dans les bronches et bronchioles après inhalation chez l'homme. Bien que cette technique de nébulisation puisse aussi être utilisée chez l'animal, nous avons testé l'appareillage dédié Microsprayer[®] qui permet de délivrer un spray dans la trachée d'un rongeur de manière reproductible [26] et nous avons montré que les nanocapsules lipidiques restaient inchangées dans ces conditions d'utilisation en spray. Il est intéressant de noter que différentes nanoformulations d'anticancéreux peuvent être nébulisées. Cependant, le type d'appareillage n'est pas toujours le même (nébuliseur pneumatique pour les liposomes [87-90] et des nanoparticules de gélatine [96], ultrasonique pour des nanoparticules à coque lipidique [91] ou à tamis vibrant pour les nanoparticules lipidiques [123]) et aucune méthode en permet de savoir à l'avance quel appareillage sera le plus adapté : seule l'expérimentation permet de répondre à cette question. Certaines peuvent probablement être inhalées aussi sous forme de poudre sèche comme les nanoparticules de doxorubicine [97]

Nous ne disposons encore d'aucune donnée validée sur la biodistribution des nanocapsules lipidiques mais une étude préliminaire nous a montré qu'un radio-élément incorporé dans le cœur lipidique des NCL restait au moins 24 heures au niveau du poumon profond sans être résorbé (données non publiées). Il sera important d'étudier ce paramètre de manière approfondie. En effet, la biodistribution pulmonaire après administration par nébulisation ou spray permettra de déterminer les doses optimales à délivrer, le rythme d'administration le plus judicieux pour observer une effet thérapeutique sans toxicités locales. Des modèles d'épithélium pulmonaire ou de microdialyse pulmonaire chez le rat pourront aussi permettre ces études [124].

Un de nos objectifs, déterminer si le paclitaxel encapsulé dans des nanocapsules lipidiques peut inhiber la croissance tumorale dans les poumons, n'a pas été atteint en raison de difficultés pour induire le modèle de cancer bronchique orthotopique proposé par McLemore [125]. Cependant, des mises au point récentes ont permis d'obtenir ce modèle au moyen de la lignée Bioware Ultra Cell Line NCI-H460-luc2 dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Le Pape (Centre d'Imagerie du Petit Animal, CNRS, Orléans). Cette lignée est transfectée de manière stable par un gène de la luciférase. Il existe donc une corrélation linéaire entre le nombre de cellules et le nombre de photons émis. Cela permet de suivre chez un animal hôte vivant l'évolution du cancer en cours de traitement par une méthode non-invasive. Nous disposons maintenant d'un modèle original pour montrer l'intérêt antitumoral des nanocapsules lipidiques de paclitaxel en aérosol (Figure 5). D'autres modèles pourraient aussi être étudié comme des modèles de cancers bronchiques à développement endoalvéolaire ou des modèles de métastases pulmonaires.

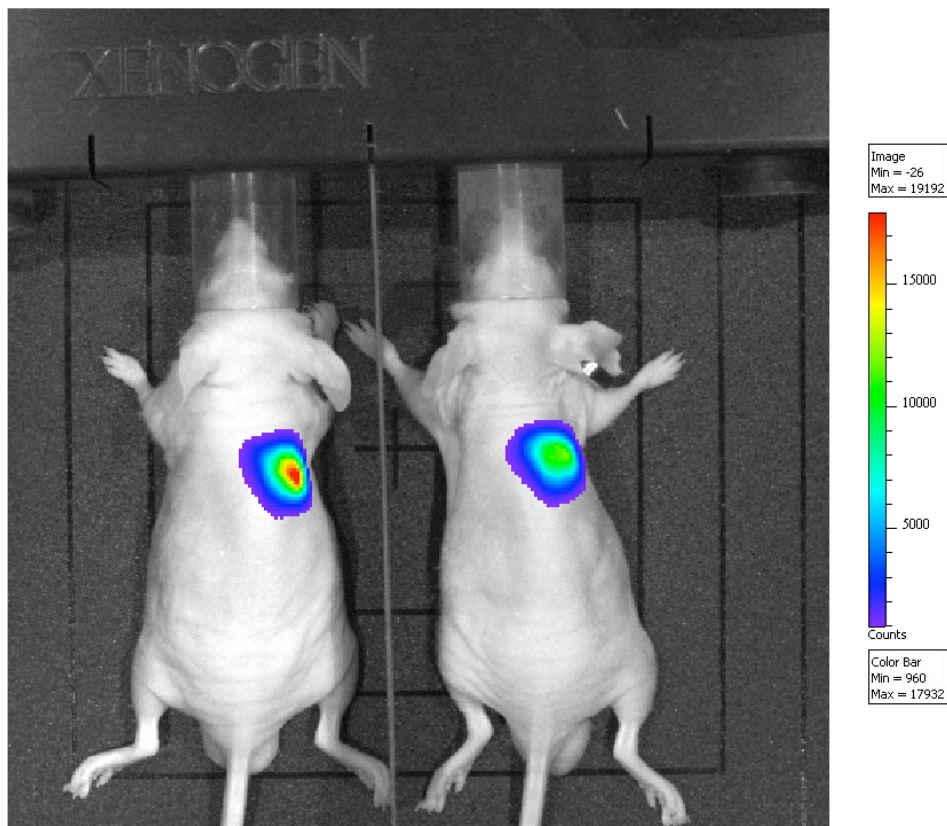


Figure 5. Deux souris nude porteuses d'une tumeur bronchique orthotopique induite par la lignée Bioware Ultra Cell Line NCI-H460-luc2.

Les premiers résultats toxicologiques présentés dans cette thèse montrent une bonne tolérance des nanocapsules lipidiques par voie intraveineuse. Des données complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats. Nous prévoyons une étude toxicologique après injection unique sur une deuxième espèce de rongeurs avec des analyses histologiques et sanguines plus nombreuses. De même, nous sommes en train de réaliser avec l'équipe du Dr Le Pape (Centre d'Imagerie du Petit Animal, CNRS, Orléans) l'étude du risque d'induction de macrophages intravasculaires pulmonaires (MIP) par des nanocapsules lipidiques de 20 et de 45 nm chez le rat après administration intraveineuse. Cette étude est recommandée par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) [126]. L'apparition de MIP rendrait potentiellement dangereux l'emploi des nanocapsules lipidiques chez l'homme. Enfin, la toxicologie des aérosols de nanocapsules lipidiques doit être étudié. Il existe tout d'abord un risque théorique d'accumulation de lipides faisant partie des NCL dans les poumons. Ces lipides sont susceptibles d'induire une pneumopathie lipidique traduisant un dépassement des capacités de dégradation locorégionale par rapport aux apports. D'autre part, l'inhalation de substances exogènes peut induire des réactions inflammatoires locales. Enfin, les médicaments vectorisés dans les nanocapsules lipidiques inhalées pourraient aussi induire ou aggraver des phénomènes toxiques indésirables. Pour toutes ses raisons, des études toxicologiques pulmonaires poussées seront nécessaires.

Pour déterminer le champ exact des applications potentielles, nous avons sollicité le Professeur Saulnier (Unité INSERM 646) pour réaliser l'étude du devenir des nanocapsules lipidiques après administration dans les voies respiratoires. En particulier, nous souhaitons savoir comment se comportent les nanocapsules lipidiques au contact du mucus bronchique et du surfactant qui tapisse les alvéoles pulmonaires. Lorsque l'étude du devenir des nanocapsules lipidiques après spray ou nébulisation *in vivo* sera terminée, le champ des applications potentielles pourra être défini. En effet, au-delà des applications thérapeutiques, d'autres usages à visée diagnostiques semblent possibles comme la détection de lésions précancéreuses aux moyens de nanocapsules lipidiques dédiées.

8. Conclusions

Ce travail a permis de caractériser pour la première fois que les nanocapsules lipidiques pouvaient être nébulisées en vue d'un usage chez l'homme. Cette nouvelle propriété des nanocapsules lipidiques ouvre un nouveau champ d'exploration dans le domaine de l'aérosolthérapie par nébulisation. En effet, de nombreux principes actifs sont vectorisables dans les NCL donc nébulisables.

Ce travail démontre un intérêt de l'encapsulation du paclitaxel dans des nanocapsules lipidiques pour augmenter l'effet thérapeutique du paclitaxel par rapport au Taxol[®] par administration systémique et s'affranchir de la toxicité des excipients à effet notoire actuellement présent dans la formulation commerciale Taxol[®].

L'index thérapeutique du paclitaxel vectorisé dans des nanocapsules lipidiques est supérieur à celui de Taxol[®]. Nos travaux autorisent la poursuite des études toxicologiques des nanocapsules lipidiques après administration intraveineuse.

Notre objectif futur est de respecter les obligations réglementaires dans ce domaine qui nous permettrons de déterminer si les nanocapsules lipidiques sont susceptibles de pouvoir être utilisé chez l'homme.

9. Bibliographie

- [1] Boe J, Dennis JH, O'Driscoll BR, Bauer TT, Carone M, Dautzenberg B et al. European Respiratory Society Guidelines on the use of nebulizers. *Eur Respir J* 2001;18:228-242.
- [2] Dautzenberg B, Becquemin MH, Chaumuzeau JP, Diot P. [Good practice for aerosol therapy by nebulisation]. *Rev Mal Respir* 2007;24:751-757.
- [3] <http://www.respir.com/doc/abonne/base/AerosoltherapieNebulisationAMN.asp>.
- [4] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
- [5] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43-66.
- [6] Aouba A, Pequignot F, Le Toullec A, Jouglu E. Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution 1980-2004. *Bul Epidémiol Hebd* 2007;35-36:308-314.
- [7] Urban T, Hureauux J. Epidémiologie et histologie des cancers broncho-pulmonaires primitifs. *La Lettre du Cancérologue* 2008;XVII:5-10.
- [8] Sharma S, White D, Imondi AR, Placke ME, Vail DM, Kris MG. Development of inhalational agents for oncologic use. *J. Clin. Oncol.* 2001;19:1839-1847.
- [9] Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2006;6:583-592.
- [10] Kemeny NE, Niedzwiecki D, Hollis DR, Lenz HJ, Warren RS, Naughton MJ et al. Hepatic arterial infusion versus systemic therapy for hepatic metastases from colorectal cancer: a randomized trial of efficacy, quality of life, and molecular markers (CALGB 9481). *J Clin Oncol* 2006;24:1395-1403.
- [11] Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2006;354:34-43.
- [12] Guerin C, Olivi A, Weingart JD, Lawson HC, Brem H. Recent advances in brain tumor therapy: local intracerebral drug delivery by polymers. *Invest New Drugs* 2004;22:27-37.
- [13] Glantz MJ, Jaeckle KA, Chamberlain MC, Phuphanich S, Recht L, Swinnen LJ et al. A randomized controlled trial comparing intrathecal sustained-release cytarabine (DepoCyt) to intrathecal methotrexate in patients with neoplastic meningitis from solid tumors. *Clin Cancer Res* 1999;5:3394-3402.
- [14] Gagnadoux F, Hureauux J, Vecellio L, Urban T, Le Pape A, Valo I et al. Aerosolized chemotherapy. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2008;21:61-70.
- [15] Hitzman CJ, Elmquist WF, Wattenberg LW, Wiedmann TS. Development of a respirable, sustained release microcarrier for 5-fluorouracil I: In vitro assessment of liposomes, microspheres, and lipid coated nanoparticles. *J Pharm Sci* 2006;95:1114-1126.
- [16] Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:1649-1659.
- [17] <http://www.vidalpro.net/medicaments/>.
- [18] Green MR, Manikhas GM, Orlov S, Afanasyev B, Makhson AM, Bhar P et al. Abraxane, a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2006;17:1263-1268.
- [19] Nyman DW, Campbell KJ, Hersh E, Long K, Richardson K, Trieu V et al. Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2005;23:7785-7793.

- [20] Rizvi NA, Riely GJ, Azzoli CG, Miller VA, Ng KK, Fiore J et al. Phase I/II trial of weekly intravenous 130-nm albumin-bound paclitaxel as initial chemotherapy in patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:639-643.
- [21] Abi 007. *Drugs R D* 2004;5:155-159.
- [22] Khanna C, Vail DM. Targeting the lung: preclinical and comparative evaluation of anticancer aerosols in dogs with naturally occurring cancers. *Curr Cancer Drug Targets* 2003;3:265-273.
- [23] Hershey AE, Kurzman ID, Forrest LJ, Bohling CA, Stonerook M, Placke ME et al. Inhalation chemotherapy for macroscopic primary or metastatic lung tumors: proof of principle using dogs with spontaneously occurring tumors as a model. *Clin Cancer Res* 1999;5:2653-2659.
- [24] Guilbaud N, Kraus-Berthier L, Meyer-Losic F, Pierré A, Hickman J. Nouvelles approches en cancérologie expérimentale: à la recherche de modèles thérapeutiques. *Bulletin du Cancer* 2000;88:75-84.
- [25] Gagnadoux F, Leblond V, Vecellio L, Hureauux J, Le Pape A, Boisdron-Celle M et al. Gemcitabine aerosol: in vitro antitumor activity and deposition imaging for preclinical safety assessment in baboons. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58:237-244.
- [26] Gagnadoux F, Le Pape A, Urban T, Montharu J, Vecellio L, Dubus JC et al. Safety of pulmonary administration of gemcitabine in rats. *J Aerosol Med* 2005;18:198-206.
- [27] Gagnadoux F, Pape AL, Lemarie E, Lerondel S, Valo I, Leblond V et al. Aerosol delivery of chemotherapy in an orthotopic model of lung cancer. *Eur. Respir. J.* 2005;26:657-661.
- [28] Koshkina NV, Kleinerman ES. Aerosol gemcitabine inhibits the growth of primary osteosarcoma and osteosarcoma lung metastases. *Int J Cancer* 2005;116:458-463.
- [29] Fulzele SV, Chatterjee A, Shaik MS, Jackson T, Singh M. Inhalation delivery and anti-tumor activity of celecoxib in human orthotopic non-small cell lung cancer xenograft model. *Pharm Res* 2006;23:2094-2106.
- [30] Myrdal PB, Karlage K, Kuehl PJ, Angersbach BS, Merrill BA, Wightman PD. Effects of novel 5-lipoxygenase inhibitors on the incidence of pulmonary adenomas in the A/J murine model when administered via nose-only inhalation. *Carcinogenesis* 2007;28:957-961.
- [31] Kessler R, Dumont S, Bartholeyns J, Weitzenblum E, Poindron P. Antitumoral potential of aerosolized interferon-gamma in mice bearing lung metastases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;10:202-206.
- [32] Wattenberg LW, Wiedmann TS, Estensen RD. Chemoprevention of cancer of the upper respiratory tract of the Syrian golden hamster by aerosol administration of difluoromethylornithine and 5-fluorouracil. *Cancer Res* 2004;64:2347-2349.
- [33] Shingu K, Kruschinski C, Luhrmann A, Grote K, Tschernig T, Von Horsten S et al. Intratracheal macrophage-activating lipopeptide-2 reduces metastasis in the rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:316-321.
- [34] Yan Y, Cook J, McQuillan J, Zhang G, Hitzman CJ, Wang Y et al. Chemopreventive effect of aerosolized polyphenon E on lung tumorigenesis in A/J mice. *Neoplasia* 2007;9:401-405.
- [35] Witschi H, Espiritu I, Ly M, Uyeminami D, Morin D, Raabe OG. Chemoprevention of tobacco smoke-induced lung tumors by inhalation of an epigallocatechin gallate (EGCG) aerosol: a pilot study. *Inhal Toxicol* 2004;16:763-770.

- [36] Dahl AR, Grossi IM, Houchens DP, Scovell LJ, Placke ME, Imondi AR et al. Inhaled isotretinoin (13-cis retinoic acid) is an effective lung cancer chemopreventive agent in A/J mice at low doses: a pilot study. *Clin Cancer Res* 2000;6:3015-3024.
- [37] Wattenberg LW, Wiedmann TS, Estensen RD, Zimmerman CL, Steele VE, Kelloff GJ. Chemoprevention of pulmonary carcinogenesis by aerosolized budesonide in female A/J mice. *Cancer Res* 1997;57:5489-5492.
- [38] Estensen RD, Jordan MM, Wiedmann TS, Galbraith AR, Steele VE, Wattenberg LW. Effect of chemopreventive agents on separate stages of progression of benzo[alpha]pyrene induced lung tumors in A/J mice. *Carcinogenesis* 2004;25:197-201.
- [39] Harris DT, Witten M. Aerosolized substance P protects against cigarette-induced lung damage and tumor development. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2003;49:151-157.
- [40] Koshkina NV, Golunski E, Roberts LE, Gilbert BE, Knight V. Cyclosporin A aerosol improves the anticancer effect of paclitaxel aerosol in mice. *J Aerosol Med* 2004;17:7-14.
- [41] Shevchenko IT, Resnik GE. Inhalation of chemical substances and oxygen in radiotherapy of bronchial cancer. *Neoplasma* 1968;15:419-426.
- [42] Tatsumura T, Yamamoto K, Murakami A, Tsuda M, Sugiyama S. [New chemotherapeutic method for the treatment of tracheal and bronchial cancers--nebulization chemotherapy]. *Gan No Rinsho* 1983;29:765-770.
- [43] Tatsumura T, Koyama S, Tsujimoto M, Kitagawa M, Kagamimori S. Further study of nebulisation chemotherapy, a new chemotherapeutic method in the treatment of lung carcinomas: fundamental and clinical. *Br J Cancer* 1993;68:1146-1149.
- [44] Otterson GA, Villalona-Calero MA, Sharma S, Kris MG, Imondi A, Gerber M et al. Phase I study of inhaled Doxorubicin for patients with metastatic tumors to the lungs. *Clin Cancer Res* 2007;13:1246-1252.
- [45] Kinnula V, Mattson K, Cantell K. Pharmacokinetics and toxicity of inhaled human interferon-alpha in patients with lung cancer. *J Interferon Res* 1989;9:419-423.
- [46] Kinnula V, Cantell K, Mattson K. Effect of inhaled natural interferon-alpha on diffuse bronchioalveolar carcinoma. *Eur J Cancer* 1990;26:740-741.
- [47] van Zandwijk N, Jassem E, Dubbelmann R, Braat MC, Rumke P. Aerosol application of interferon-alpha in the treatment of bronchioloalveolar carcinoma. *Eur J Cancer* 1990;26:738-740.
- [48] Kawata N, Takimoto Y, Hiraoka H, Fuse T, Hirano D, Yamanaka Y. [Clinical trial of inhalant recombinant interferon-gamma in patients with pulmonary metastasis from renal tumor (preliminary report)]. *Hinyokika Kyo* 1994;40:773-776.
- [49] Huland E, Huland H, Heinzer H. Interleukin-2 by inhalation: local therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 1992;147:344-348.
- [50] Huland E, Heinzer H, Huland H. Inhaled interleukin-2 in combination with low-dose systemic interleukin-2 and interferon alpha in patients with pulmonary metastatic renal-cell carcinoma: effectiveness and toxicity of mainly local treatment. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994;120:221-228.
- [51] Rohrman K, Schleypen J, Adam C, Hofstetter A, Siebels M. [Complete remission of pulmonary metastasis from renal cell carcinoma through inhalation therapy with Interleukin-2 after unsuccessful systemic immunochemotherapy]. *Urologe A* 2004;43:1271-1274.
- [52] Lorenz J, Wilhelm K, Kessler M, Peschel C, Schwulera U, Lissner R et al. Phase I trial of inhaled natural interleukin 2 for treatment of pulmonary malignancy: toxicity, pharmacokinetics, and biological effects. *Clin Cancer Res* 1996;2:1115-1122.

- [53] Suda T, Hashizume H, Aoshima Y, Yokomura K, Sato J, Inui N et al. Management of interleukin-2-induced severe bronchoconstriction. *Eur Respir J* 2007;29:612-613.
- [54] Loppow D, Huland E, Heinzer H, Gronke L, Magnussen H, Holz O et al. Interleukin-2 inhalation therapy temporarily induces asthma-like airway inflammation. *Eur J Med Res* 2007;12:556-562.
- [55] Huland E, Heinzer H, Mir TS, Huland H. Inhaled interleukin-2 therapy in pulmonary metastatic renal cell carcinoma: six years of experience. *Cancer J Sci Am* 1997;3 Suppl 1:S98-105.
- [56] Heinzer H, Huland E, Aalamian M, Huland H. [Treatment of pulmonary metastases from kidney cell carcinoma with inhalational interleukin-2. 10-year experience Hamburger Unicenter]. *Urologe A* 1999;38:466-473.
- [57] Huland E, Heinzer H, Huland H. A comparison of systemic versus inhaled recombinant IL-2 administration for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Folia Biol (Praha)* 2000;46:241-250.
- [58] Heinzer H, Huland E, Huland H. [Regional immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma]. *Urologe A* 2002;41:239-248.
- [59] Huland E, Heinzer H, Huland H, Yung R. Overview of interleukin-2 inhalation therapy. *Cancer J Sci Am* 2000;6 Suppl 1:S104-112.
- [60] Enk AH, Nashan D, Rubben A, Knop J. High dose inhalation interleukin-2 therapy for lung metastases in patients with malignant melanoma. *Cancer* 2000;88:2042-2046.
- [61] Anderson PM, Markovic SN, Sloan JA, Clawson ML, Wylam M, Arndt CA et al. Aerosol granulocyte macrophage-colony stimulating factor: a low toxicity, lung-specific biological therapy in patients with lung metastases. *Clin Cancer Res* 1999;5:2316-2323.
- [62] Rao RD, Anderson PM, Arndt CA, Wettstein PJ, Markovic SN. Aerosolized granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) therapy in metastatic cancer. *Am J Clin Oncol* 2003;26:493-498.
- [63] Yano T, Ichinose Y, Yokoyama H, Fukuyama Y, Sugio K, Sugimachi K. Inhalation therapy using a streptococcal preparation (OK-432) against bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Anticancer Res* 1999;19:5511-5514.
- [64] Kohlhauf M, Haussinger K, Stanzel F, Markus A, Tritschler J, Muhlhofer A et al. Inhalation of aerosolized vitamin a: reversibility of metaplasia and dysplasia of human respiratory epithelia -- a prospective pilot study. *Eur J Med Res* 2002;7:72-78.
- [65] Lam S, leRiche JC, McWilliams A, Macaulay C, Dyachkova Y, Szabo E et al. A randomized phase IIb trial of pulmicort turbuhaler (budesonide) in people with dysplasia of the bronchial epithelium. *Clin Cancer Res* 2004;10:6502-6511.
- [66] Parimon T, Chien JW, Bryson CL, McDonnell MB, Udris EM, Au DH. Inhaled corticosteroids and risk of lung cancer among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:712-719.
- [67] Bourin M, Lièvre M, Allain H. *Cours de pharmacologie*. 3ème édition. 1993.
- [68] www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/4931305en.pdf.
- [69] Eschenbacher WL, Boushey HA, Sheppard D. Alteration in osmolarity of inhaled aerosols cause bronchoconstriction and cough, but absence of a permeant anion causes cough alone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984;129:211-215.
- [70] Sheppard D, Rizk NW, Boushey HA, Bethel RA. Mechanism of cough and bronchoconstriction induced by distilled water aerosol. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983;127:691-694.

- [71] Miric M, Plavec D. Risk of acute bronchospasm and bronchial hyperreactivity from inhaled acid aerosol in healthy subjects: randomized, double-blind controlled trial. *Croat. Med. J.* 2004;45:709-714.
- [72] Balmes JR, Fine JM, Christian D, Gordon T, Sheppard D. Acidity potentiates bronchoconstriction induced by hypoosmolar aerosols. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988;138:35-39.
- [73] Sarna L, Padilla G, Holmes C, Tashkin D, Brecht ML, Evangelista L. Quality of life of long-term survivors of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:2920-2929.
- [74] Martonen TB, Guan X. Effects of tumors on inhaled pharmacologic drugs: I. Flow patterns. *Cell Biochem Biophys* 2001;35:233-243.
- [75] Martonen TB, Guan X. Effects of tumors on inhaled pharmacologic drugs: II. Particle motion. *Cell Biochem Biophys* 2001;35:245-253.
- [76] Kleinstreuer C, Zhang Z. Targeted drug aerosol deposition analysis for a four-generation lung airway model with hemispherical tumors. *J Biomech Eng* 2003;125:197-206.
- [77] Labiris NR, Dolovich MB. Pulmonary drug delivery. Part II: the role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol* 2003;56:600-612.
- [78] Knight V, Koshkina NV, Golunski E, Roberts LE, Gilbert BE. Cyclosporin A aerosol improves the anticancer effect of paclitaxel aerosol in mice. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2004;115:395-404; discussion 404.
- [79] Camus P, Fanton A, Bonniaud P, Camus C, Foucher P. Interstitial lung disease induced by drugs and radiation. *Respiration* 2004;71:301-326.
- [80] Camus P. Interstitial lung disease in patients with non-small-cell lung cancer: causes, mechanisms and management. *Br J Cancer* 2004;91 Suppl 2:S1-2.
- [81] Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005;113:823-839.
- [82] Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part I. *Fibre Toxicol* 2005;2:8.
- [83] Onischuk AA, Tolstikova TG, Sorokina IV, Zhukova NA, Baklanov AM, Karasev VV et al. Analgesic effect from Ibuprofen nanoparticles inhaled by male mice. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2009;22:245-253.
- [84] Song Y, Li X, Du X. Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. *Eur Respir J* 2009;34:559-567.
- [85] Wittgen BP, Kunst PW, Perkins WR, Lee JK, Postmus PE. Assessing a system to capture stray aerosol during inhalation of nebulized liposomal cisplatin. *J Aerosol Med* 2006;19:385-391.
- [86] McCullough HN, Juliano RL. Organ-selective action of an antitumor drug: pharmacologic studies of liposome-encapsulated beta-cytosine arabinoside administered via the respiratory system of the rat. *J Natl Cancer Inst* 1979;63:727-731.
- [87] Koshkina NV, Waldrep JC, Roberts LE, Golunski E, Melton S, Knight V. Paclitaxel liposome aerosol treatment induces inhibition of pulmonary metastases in murine renal carcinoma model. *Clin Cancer Res* 2001;7:3258-3262.
- [88] Latimer P, Menchaca M, Snyder RM, Yu W, Gilbert BE, Sanders BG et al. Aerosol delivery of liposomal formulated paclitaxel and vitamin E analog reduces murine mammary tumor burden and metastases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009;234:1244-1252.

- [89] Koshkina NV, Kleinerman ES, Waidrep C, Jia SF, Worth LL, Gilbert BE et al. 9-Nitrocamptothecin liposome aerosol treatment of melanoma and osteosarcoma lung metastases in mice. *Clin Cancer Res* 2000;6:2876-2880.
- [90] Lawson KA, Anderson K, Snyder RM, Simmons-Menchaca M, Atkinson J, Sun LZ et al. Novel vitamin E analogue and 9-nitro-camptothecin administered as liposome aerosols decrease syngeneic mouse mammary tumor burden and inhibit metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54:421-431.
- [91] Hitzman CJ, Elmquist WF, Wiedmann TS. Development of a respirable, sustained release microcarrier for 5-fluorouracil II: In vitro and in vivo optimization of lipid coated nanoparticles. *J Pharm Sci* 2006;95:1127-1143.
- [92] Hitzman CJ, Wattenberg LW, Wiedmann TS. Pharmacokinetics of 5-fluorouracil in the hamster following inhalation delivery of lipid-coated nanoparticles. *J Pharm Sci* 2006;95:1196-1211.
- [93] Garbuzenko OB, Saad M, Betigeri S, Zhang M, Vetcher AA, Soldatenkov VA et al. Intratracheal versus intravenous liposomal delivery of siRNA, antisense oligonucleotides and anticancer drug. *Pharm Res* 2009;26:382-394.
- [94] Xu CX, Jere D, Jin H, Chang SH, Chung YS, Shin JY et al. Poly(ester amine)-mediated, aerosol-delivered Akt1 small interfering RNA suppresses lung tumorigenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:60-73.
- [95] Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev* 2009.
- [96] Tseng CL, Su WY, Yen KC, Yang KC, Lin FH. The use of biotinylated-EGF-modified gelatin nanoparticle carrier to enhance cisplatin accumulation in cancerous lungs via inhalation. *Biomaterials* 2009;30:3476-3485.
- [97] Azarmi S, Tao X, Chen H, Wang Z, Finlay WH, Lobenberg R et al. Formulation and cytotoxicity of doxorubicin nanoparticles carried by dry powder aerosol particles. *Int J Pharm* 2006;319:155-161.
- [98] Verschraegen CF, Gilbert BE, Loyer E, Huaranga A, Walsh G, Newman RA et al. Clinical evaluation of the delivery and safety of aerosolized liposomal 9-nitro-20(s)-camptothecin in patients with advanced pulmonary malignancies. *Clin Cancer Res* 2004;10:2319-2326.
- [99] Wittgen BP, Kunst PW, van der Born K, van Wijk AW, Perkins W, Pilkiewicz FG et al. Phase I study of aerosolized SLIT cisplatin in the treatment of patients with carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* 2007;13:2414-2421.
- [100] Skubitz KM, Anderson PM. Inhalational interleukin-2 liposomes for pulmonary metastases: a phase I clinical trial. *Anticancer Drugs* 2000;11:555-563.
- [101] Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* 2002;19:875-880.
- [102] Brevet d'invention. LIPID NANOCAPSULES, PREPARATION METHOD AND USE AS MEDICINE. (WO/2001/064328).
- [103] Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, Phan-Tan-Luu R et al. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci* 2003;18:55-61.
- [104] Lamprecht A, Bouligand Y, Benoit JP. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *J. Control Release* 2002;84:59-68.
- [105] Lamprecht A, Saumet JL, Roux J, Benoit JP. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int. J. Pharm.* 2004;278:407-414.

- [106] Malzert-Freon A, Vrignaud S, Saulnier P, Lisowski V, Benoit JP, Rault S. Formulation of sustained release nanoparticles loaded with a triptentone, a new anticancer agent. *Int. J. Pharm.* 2006;320:157-164.
- [107] Allard E, Passirani C, Garcion E, Pigeon P, Vessières A, Jaouen G et al. Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas. *J Control Release* 2008;130:146-153.
- [108] Lamprecht A, Benoit JP. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J. Control Release* 2006;112:208-213.
- [109] Khalid MN, Simard P, Hoarau D, Dragomir A, Leroux JC. Long circulating poly(ethylene glycol)-decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid tumors. *Pharm. Res.* 2006;23:752-758.
- [110] Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B et al. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol. Cancer Ther.* 2006;5:1710-1722.
- [111] Vrignault S (2009) in: Thèse d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université d'Angers.
- [112] Roger E, Lagarce F, Garcion E, Benoit JP. Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. *J Control Release* 2009.
- [113] Ballot S, Noiret N, Hindre F, Denizot B, Garin E, Rajerison H et al. ^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33:602-607.
- [114] Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux JC, Benoit JP. Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J Biomed Mater Res A* 2006;78:620-628.
- [115] Lacoëuille F, Garcion E, Benoit JP, Lamprecht A. Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. *J Nanosci Nanotechnol* 2007;7:4612-4617.
- [116] Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med* 1995;332:1004-1014.
- [117] Gautam A, Koshkina N. Paclitaxel (taxol) and taxoid derivatives for lung cancer treatment: potential for aerosol delivery. *Curr Cancer Drug Targets* 2003;3:287-296.
- [118] Levine S, Saltzman A. Peritoneal toxicity of water: a model of chronic peritonitis caused by osmotic dysequilibrium in rats. *J Appl Toxicol* 2001;21:303-306.
- [119] de Estable-Puig RF, Estable-Puig JF, Manz HJ. [Pathology of cerebral edema. II. Experimental models and modifying agents]. *Acta Neurol Latinoam* 1981;27:125-154.
- [120] Dulieu C, Bazile D. Influence of lipid nanocapsules composition on their aptness to freeze-drying. *Pharm. Res.* 2005;22:285-292.
- [121] Lacoëuille F, Hindre F, Moal F, Roux J, Passirani C, Couturier O et al. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel. *Int J Pharm* 2007;344:143-149.
- [122] <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/abraxane/H-778-en6.pdf>.
- [123] Hureauux J, Lagarce F, Gagnadoux F, Vecellio L, Racineux JL, Diot P et al. The lipid nanocapsule, a ready-to-use nanovector for aerosol delivery of paclitaxel. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;doi:10.1016/j.ejpb.2009.06.013.
- [124] Marchand S, Frasca D, Dahyot-Fizelie C, Breheret C, Mimoz O, Couet W. Lung microdialysis study of levofloxacin in rats following intravenous infusion at steady state. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3074-3077.

- [125] McLemore TL, Liu MC, Blacker PC, Gregg M, Alley MC, Abbott BJ et al. Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice. *Cancer Res* 1987;47:5132-5140.
- [126] <http://www.afssaps.fr/Infos-de-securite/Information-produit-Information-traitement/Evaluation-toxicologique-des-medicaments-sous-forme-nanoparticulaire>.