
Nanoparticules muco-pénétrantes: véhicules pour l'administration orale du paclitaxel

Muco-penetrating nanoparticles: vehicles for the oral administration of paclitaxel

Virginia Zabaleta¹, Patricia Calleja¹, Socorro Espuelas¹, Leticia Corrales², Rubén Pío², Maite Agüeros¹, Juan M. Irache¹

(1) Farmacia y Tecnología Farmacéutica, University of Navarra, 31080-Pamplona, Spain

(2) Division of Oncology, Center for Applied Medical Research, University of Navarra, 31080-Pamplona, Spain

Auteur correspondant:

Juan M. Irache
Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Université de Navarre
C/Irunlarrea
31080 – Pamplona
Espagne

Tel: +34948425600
jmirache@unav.es

Résumé

Le paclitaxel est un agent anticancéreux utilisé en solution pour perfusion intraveineuse dans le traitement de différents types de cancer. Dans les dernières années, de nombreuses stratégies ont été proposées pour le développement d'une formulation orale de cet anticancéreux. Toutefois, la faible solubilité aqueuse du paclitaxel et le fait qu'il soit un substrat de la p-glycoprotéine intestinale et du complexe enzymatique cytochrome P450 compliquent énormément le problème.

Dans ce travail, des nanoparticules pégylées avec des propriétés muco-pénétrantes ont été développées pour acheminer le paclitaxel jusqu'à la surface des entérocytes. Des particules présentant une taille moyenne d'environ 180 nm et un contenu en paclitaxel proche de 15% ont été préparées. Une étude pharmacocinétique chez la souris a montré que les nanoparticules permettent d'obtenir des niveaux plasmatiques efficaces et soutenus du paclitaxel pendant 3 jours. Au total, la biodisponibilité relative orale du paclitaxel, encapsulé dans des nanoparticules pégylées avec du PEG 2000, est proche du 85%. Chez la souris, sur un modèle de tumeur sous-cutanée, ces mêmes nanoparticules administrées par voie orale, une fois tous les trois jours, ont permis d'obtenir une efficacité similaire à celle offerte par le médicament commercialisé administré par voie intraveineuse journalièrement pendant 9 jours.

L'ensemble des résultats tend à démontrer que les nanoparticules développées sont capables de traverser la couche du mucus intestinal et d'atteindre, ainsi, la surface des entérocytes. Les molécules de PEG favorisent l'adhésion des particules à la surface des cellules, évitent la métabolisation du paclitaxel et accroissent son absorption.

Mots-clés : nanoparticules, paclitaxel, orale, poly (éthylène glycol), libération contrôlée

Summary

Paclitaxel is an anticancer drug used as solution for perfusion for the treatment of certain types of cancers. In the last years, a number of strategies have been proposed for the development of an oral formulation of this drug. However, this task is quite complicated due to the poor aqueous solubility of paclitaxel as well as the fact that this compound is substrate of the intestinal P-glycoprotein and the cytochrome P450 enzymatic complex.

In this work, we have developed pegylated nanoparticles with muco-penetrating properties in order to conduct paclitaxel till the surface of the enterocyte. These nanoparticles displayed a size of about 180 nm and a drug loading close to 15% by weight. The pharmacokinetic study in mice has shown that these nanoparticles were capable to offer therapeutic plasma levels of paclitaxel up to 72 hours. In addition, the oral relative bioavailability of paclitaxel when loaded in nanoparticles pegylated with poly(ethylene glycol) 2000 (PEG) was found to be 85%. In a subcutaneous model of tumour in mice, these pegylated nanoparticles administered orally every 3 days have demonstrated a similar efficacy than Taxol administered intravenously every day during 9 days.

All of these results suggested that these pegylated nanoparticles were capable to cross the mucus layer of the gut and, then, reach the surface of the enterocytes. The PEG molecules would facilitate the adhesion of nanoparticles to this epithelial surface, minimise the pre-systemic metabolism of paclitaxel and, thus, promote its absorption.

Key words : nanoparticles, paclitaxel, oral, poly(ethylene glycol), controlled release

Introduction

Le paclitaxel ($C_{47}H_{51}NO_{14}$) est considéré comme un pseudo-alcaloïde avec une structure diterpénique et une masse moléculaire de 853 Da [1]. A l'origine, tout le paclitaxel provenait de l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*). Depuis 1992, il est obtenu à partir d'un précurseur, le 10-désacétylbaccatine, isolé des aiguilles de l'if européen (*Taxus Baccata*) puis transformé en paclitaxel par un processus semi-synthétique [2].

Le paclitaxel (PTX) est un agent antimétabolique; il s'oppose à la mitose en agissant principalement sur les microtubules impliqués dans plusieurs types de fonctions cellulaires, telles la mitose, la morphogénèse, la mobilité et le transport intracellulaire d'organelles [3]. Le paclitaxel est indiqué principalement dans le traitement des cancers de l'ovaire [4], du sein [5], ou du poumon (non à petites cellules) tels l'adénocarcinome, le carcinome épidermoïde et le carcinome à grandes cellules [6]. Il est aussi utilisé, en deuxième intention, dans le traitement du sarcome de Kaposi chez les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [7]. Les doses recommandées varient entre 100 et 250 mg/m² selon l'indication [3].

Le paclitaxel est administré aux patients par perfusion intraveineuse. Etant donnée sa faible solubilité dans l'eau, (0,7 µg/ml) [8], les formulations commerciales (Taxol® et génériques) font appel à un mélange d'éthanol avec un tensioactif, le Cremophor EL (huile de ricin polyoxyéthylée) comme solubilisant [9]. La quantité de Cremophor EL dans les médicaments commerciaux est particulièrement élevée et contribue significativement aux effets néfastes qu'engendre la formulation avec, en particulier, la possibilité d'une réaction de choc anaphylactique et d'hypersensibilité qui peut être sévère [10]. Afin de minimiser le risque d'une telle réaction, tous les patients reçoivent une prémédication composée de glucocorticostéroïdes, de diphenhydramine et d'antagonistes des récepteurs H₂ [10]. D'autre part, le Cremophor EL peut entraîner une certaine neurotoxicité et une altération du niveau des lipoprotéines sanguines [11]. Afin de limiter les réactions indésirables causées par l'administration de cet agent de surface, de nombreux efforts ont été faits pour développer des formulations alternatives sans Cremophor EL®. C'est ainsi qu'en 2005, une nouvelle formulation consistant en des nanocristaux de paclitaxel stabilisés par des molécules d'albumine sérique humaine [12] a été mise sur le marché (Abraxane®). Les nanoparticules d'albumine accroissent la dose maximale tolérée et favorisent l'exposition de la tumeur à la drogue [13]. Tout laisse à penser que le développement d'une formulation orale de paclitaxel pourrait offrir de sérieux avantages, notamment une meilleure acceptation par les patients et une réduction des coûts associés à l'administration parentérale [14]. Une telle formulation faciliterait, de plus, les traitements chroniques et le recours à la chimiothérapie métronomique. Malheureusement, la biodisponibilité orale du paclitaxel est très faible (inférieure à 10%) [15, 16]. Cette situation peut s'expliquer par l'hydrophobicité de la molécule et par le fait que cet anticancéreux est un substrat de la glycoprotéine P intestinale (P-gp) et du complexe enzymatique lié au cytochrome P450 [17, 18].

Afin d'augmenter l'absorption orale du paclitaxel, différentes stratégies ont été proposées. Parmi ces dernières, la synthèse d'analogues du paclitaxel, tels que

le BMS-275183 ou l'ortotaxel, s'est avérée une solution adéquate pour augmenter de manière significative la biodisponibilité orale de l'anticancéreux [19]. Malheureusement, au moins dans certains cas, l'index thérapeutique de ces produits est plus faible que celui du paclitaxel [19, 20]. Pour résoudre ce problème tout en promouvant la biodisponibilité orale du paclitaxel, le recours à plusieurs systèmes de délivrance de médicaments a été envisagé : micelles [21], systèmes autoémulsionnables [22, 23], nanoémulsions [24] et nanocapsules lipidiques [16]. De tels systèmes permettent, en général, l'association, à la formulation, d'inhibiteurs de la P-gp et du cytochrome P450, tels que la cyclosporine A [22] ou des flavonoïdes [25].

Le présent travail est consacré à la mise au point d'un système permettant l'administration du paclitaxel par voie orale. La formulation choisie est celle de nanoparticules muco-pénétrantes capables d'acheminer leur contenu (paclitaxel associé à un inhibiteur de son métabolisme présytémique) jusqu'à la surface des entérocytes puis de libérer leur contenu dans leur cible, d'une façon contrôlée. Parmi les objectifs, figurent d'une part l'amélioration de la biodisponibilité du paclitaxel, grâce à la présence, dans la formulation, de l'inhibiteur de la P-gp intestinale et du cytochrome P450 ; d'autre part une protection contre les risques pharmacologiques et toxicologiques éventuellement associés à l'utilisation des inhibiteurs, grâce à la présence de poly(éthylène glycol) dans le système envisagé.

Matériel et Méthodes

Matériel

Le poly(anhydride maléique-co-méthyle vinyle éther) ou poly(anhydride) [Gantrez AN 119 ; MW 200,000] a été fourni par ISP (Barcelona, Spain). Les poly(éthylène glycol)s avec une masse moléculaire de 2000, 6000 et 10.000 (PEG 2000 ; PEG 6000 ; PEG 10000) et l'édétate disodique (EDTA) ont été obtenus chez Fluka (Suisse). Le paclitaxel (USP 26; grade >99.5%) a été fourni par 21CEC (Londres, UK), la glycine par Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne), le Taxol® par Bristol-Myers Squibb (New York, USA) et le docetaxel (Taxotere®) par Sanofi-Aventis (Paris, France). L'acétone et l'éthanol ont été obtenus chez VWR Prolabo (Fontenay sous Bois, France). Les autres solvants et matières premières utilisées, de grade "analytique", ont été obtenus chez Merck (Darmstadt, Germany).

Préparation de nanoparticules pegylées contenant du paclitaxel

La préparation des nanoparticules a été réalisée en suivant un protocole préétabli [26, 27] : dissolution du copolymère de méthyle vinyle éther et de l'anhydride maléique (100 mg) dans l'acétone puis addition de 12,5 mg du poly(éthylène glycol) et de 10 mg de paclitaxel. Après incubation du mélange sous agitation à température ambiante pendant 1 h, les nanoparticules sont formées par addition de 10 ml d'éthanol puis de 10 ml d'une solution aqueuse contenant de la glycine (50 mg) et de l'édétate disodique (20 mg). Après homogénéisation, les solvants organiques sont évaporés (Büchi R-144, Suisse) et les suspensions resultantes sont purifiées par filtration dans des tubes Vivaspin a 3000 x g pendant 20 minutes. Les surnageants sont éliminés et les

culots sont redispersés dans une solution aqueuse à 5% de saccharose. Enfin, les suspensions résultantes sont congelées et lyophilisées (Genesis 12EL, Virtis, USA).

En fonction du PEG utilisé, trois types de formulations ont été étudiées : PTX-NP2 (nanoparticules contenant du paclitaxel et pégylées avec du PEG 2000, PTX-NP6 (nanoparticules contenant du paclitaxel et pégylées avec du PEG 6000) et PTX-NP10 (nanoparticules contenant du paclitaxel et pégylées avec du PEG 10000).

Des nanoparticules « contrôle » (PTX-NP) ont été préparées de la même façon mais en l'absence de paclitaxel.

Caractérisation des nanoparticules

Le diamètre moyen des nanoparticules ainsi que leur potentiel zêta ont été déterminés avec un appareil Zetamaster analyzer system (Malvern Instruments, UK). Pour la mesure de la taille, les nanoparticules ont été dispersées dans l'eau. Pour la mesure du potentiel zêta, les nanoparticules ont été dispersées dans une solution aqueuse 0.1 mM de KCl ajustée à pH 7,4.

Le rendement de la méthode d'obtention des nanoparticules a été déterminé par gravimétrie en utilisant le protocole décrit par Arbos et al. [26].

Les caractéristiques morphologiques des nanoparticules ont été évaluées par microscopie électronique à balayage à l'aide d'un appareil Zeiss DSM 940A SEM (Oberkochen, Germany) muni d'un système de capture d'image DISS (Point Electronic GmbH; Halle, Germany). Pour cela, les particules lyophilisées ont été resuspendues dans l'eau et centrifugées pour éliminer le cryoprotecteur. Les culots ont été récupérés mis en suspension à nouveau dans l'eau et déposés sur un porte-échantillon recouvert d'un ruban adhésif double-face. Enfin, l'échantillon a été desséché pour éliminer l'humidité.

Dosage du paclitaxel

La quantité de paclitaxel encapsulée dans les nanoparticules a été déterminée par chromatographie liquide à haute performance [28]. A cette fin, un appareil CLHP Agilent 1100 series (Waldbornn, Germany) muni d'un système de prélèvement automatique et d'un détecteur à barrette de diodes a été utilisé. La séparation du paclitaxel a été effectuée à l'aide d'une colonne C18 Phenomenex Gemini (150 x 3 mm; 5 µm) précédée par une pré-colonne du même type. Une phase mobile, avec un flux de 0,5 µl/min et faite d'un mélange d'acétonitrile et d'une solution tampon phosphate 0.01 M de pH 2 (50 % : 50%), a été choisie. La détection a été réalisée à 228 nm et le docetaxel a été utilisé comme étalon interne.

La linéarité, appréciée par le coefficient de corrélation de la courbe de régression, a été de 0,999 pour des concentrations allant de 80 à 7000 ng/ml. La limite de quantification a été trouvée égale à 40 ng/ml avec une déviation standard relative du 5,2%. Aucun des constituants des nanoparticules (le polymère ou les PEG) n'interférait pas avec le dosage du paclitaxel.

Pour le dosage, les nanoparticules ont été dissoutes dans du DMSO. Chaque échantillon a été analysé trois fois et les résultats ont été exprimés en mg de paclitaxel par mg de nanoparticules.

Etude pharmacocinétique chez la souris

L'étude pharmacocinétique chez la souris a été approuvée par le Comité d'Ethique de l'Université de Navarre (protocole 011-08) conformément à la législation européenne en la matière.

Des souris C57BL/6J (4-6 semaines; Harlan, Espagne) ont été divisées en groupes de 6 animaux. Aux animaux du premier groupe a été administré du Taxol® par voie intraveineuse après dilution avec du tampon phosphate salin (PBS) jusqu'à un volume de 300 µl (10 mg/kg). Aux autres groupes a été administré du paclitaxel (10 mg/kg), sous forme de nanoparticules et par voie orale. Les nanoparticules (PTX-NP2, PTX-NP-6, PTX-NP10 ou PTX-NP), au moment de l'administration, ont été dispersées dans l'eau jusqu'à un volume de 200 µl.

Après l'administration des différents traitements, des échantillons de sang ont été prélevés à différentes moments en utilisant de l'EDTA comme anticoagulant. Les échantillons ont été centrifugés à 10000 rpm pendant 10 min et la fraction de plasma a été congelée à -80°C jusqu'à son dosage par CLHP.

La quantité de paclitaxel a été mesurée dans le plasma par CLHP en suivant le protocole décrit antérieurement. Un échantillon de plasma (100 µl) a été mélangé avec une solution de méthanol (25 µl) à 4 mg/ml de docetaxel (étalon interne) puis, juste après, 4 ml de méthyl tert-butyl éther ont été ajoutés et agités avec le plasma pendant 1 min. Le mélange a été centrifugé pendant 10 min à 5000 rpm puis la partie organique a été évaporée à sec. Le résidu a été redispersé dans 125 µl de la phase mobile (acetonitrile – solution tampon phosphate 0.01M pH=2; 50/50 v/v) puis analysé par CLHP.

La linéarité, appréciée par le coefficient de corrélation de la courbe de régression, a été de 0,999 pour des concentrations allant de 80 à 3200 ng/ml et la limite de quantification de 80 ng/ml.

L'analyse pharmacocinétique a été réalisée en suivant une approche non-compartimentale et en utilisant le logiciel WinNonlin 5.2 (Pharsight Corporation, Mountain View, EEUU). Les paramètres pharmacocinétiques suivants ont été déterminés: concentration maximale du pic plasmatique (C_{max}), le temps correspondant à l'apparition de C_{max} (T_{max}), la demi-vie d'élimination ($t_{1/2}$), l'aire sous la courbe concentration plasmatique / temps ($ASC_{0-\infty}$), le temps de résidence moyen (TRM) et la biodisponibilité orale relative (Fr).

Etude de l'activité antitumorale

L'activité antitumorale du paclitaxel encapsulé dans des nanoparticules a été évaluée chez un modèle animal murin (souris femelle C57BL/6J ; 4-6 semaines ; Harlan, Espagne) porteur d'une tumeur modèle sous-cutanée. Le protocole a été approuvé par le Comité d'Ethique de l'Université de Navarre (protocoles 011-08 et 129-11).

La tumeur sous-cutanée a été développée par injection sous-cutanée dans le dos des souris, de cellules tumorales de la lignée cellulaire du carcinome de poumon de Lewis (3LL). Lorsque les tumeurs ont atteint un volume d'environ 100 mm³, les souris ont été divisées en trois groupes. Les souris du premier groupe ont été traitées avec du Taxol® administré par voie intraveineuse (Taxol

i.v.). Les animaux du second groupe ont reçu la formulation PTX-NP2 par voie orale. Enfin, le troisième groupe ou « groupe contrôle » a reçu du Taxol® par voie orale.

Le taxol a été dilué dans une solution saline et une dose de 10 mg/kg a été administrée toutes les 24 heures pendant 9 jours. Les nanoparticules muco-pénétrantes ont été dispersées dans l'eau avant l'administration et les animaux ont reçu une dose de 10 mg/kg tous les 3 jours (jours 1, 4 et 7).

Après administration des préparations, le volume des tumeurs a été suivi régulièrement et mesuré au terme de l'expérimentation.

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel SPSS® (Microsoft, USA). Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi par le test U de Mann et Whitney avec correction de Bonferroni a été utilisé pour déterminer les différences statistiques des études *in vivo*. Dans tous les cas, une probabilité inférieure à 0,05 a été considérée comme significative

Résultats

Le Tableau 1 donne les principales caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules utilisées dans cette étude. Le diamètre moyen des nanoparticules pégylées est similaire à celui des « nanoparticules contrôle » (environ 180 nm). La pégylation des nanoparticules de poly (anhydride) diminue légèrement le potentiel zêta négatif des « nanoparticules contrôle » (-40 mV vs -44 mV). Elle permet, par ailleurs, de doubler la quantité de paclitaxel incorporé aux nanoparticules et d'arriver à un contenu en anticancéreux proche de 15%. Il est intéressant de constater que la quantité de paclitaxel encapsulée est indépendante de la masse moléculaire du poly (éthylène glycol) utilisée pour péguler les nanoparticules de poly (anhydride). La morphologie des nanoparticules pégylées est représentée sur la figure 1. Les nanoparticules sont sphériques, apparemment spongieuses et dépourvues de cristaux de paclitaxel à leur surface (Fig 1).

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules chargées en paclitaxel. Les résultats sont exprimés sous forme d'une moyenne \pm SD (n=8).

Formulation	Diamètre (nm)	Potentiel zêta (mV)	Contenu en paclitaxel (μ g/mg NP)	Efficacité d'encapsulation (%)
PTX-NP	177 \pm 3	-44,2 \pm 7,1	78,1 \pm 3,2	38,2 \pm 5,3
PTX-NP2	178 \pm 4	-40,3 \pm 1,1	150,1 \pm 5,2	88,3 \pm 7,4
PTX-NP6	180 \pm 5	-39,5 \pm 4,2	144,1 \pm 3,1	78,1 \pm 7,3
PTX-NP10	188 \pm 2	-41,1 \pm 1,3	144,5 \pm 6,4	74,9 \pm 6,2

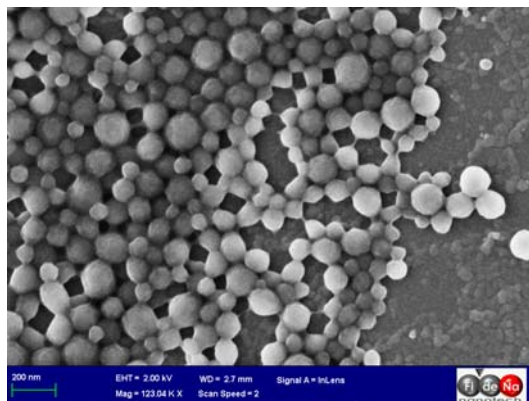


Figure 1. Image au microscope électronique à balayage de nanoparticules pégylées chargées en paclitaxel (PTX-NP2).

La Figure 2 représente les concentrations plasmatiques de paclitaxel chez la souris C57BL/6J en fonction du temps après l'administration intraveineuse de Taxol® (dose unique de 10 mg/kg). Les paramètres pharmacocinétiques sont résumés dans le Tableau 2.

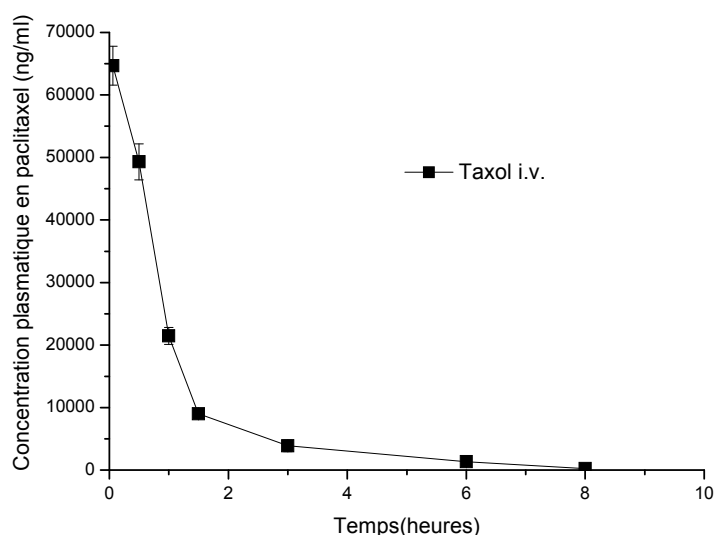


Figure 2. Concentrations plasmatiques de paclitaxel en fonction du temps après administration intraveineuse de Taxol® à la dose unique de 10 mg paclitaxel/kg. Les résultats sont exprimés sous forme d'une moyenne \pm SD (n=6).

La Figure 3 montre l'évolution des concentrations plasmatiques de paclitaxel après l'administration orale d'une dose unique (10 mg/kg) de cet anticancéreux formulé sous forme de nanoparticules. L'administration de Taxol® ne permet pas d'observer des niveaux plasmatiques de paclitaxel supérieures à la limite de détection de la technique chromatographique (80 ng/ml) utilisée. Avec les nanoparticules pégylées, en revanche, les niveaux plasmatiques de paclitaxel augmentent rapidement pendant les premières 3-6 h après l'administration.

Plus intéressant encore, ces niveaux élevés et thérapeutiques de l'anticancéreux se maintiennent pendant 72 heures. A noter que les niveaux plasmatiques de paclitaxel sont plus élevés avec PTX-NP2 et TX-NP6 qu'avec PTX-NP10. Dans le cas des « nanoparticules contrôle » (PTX-NP), les niveaux plasmatiques de paclitaxel restent médiocres et l'anticancéreux ne reste dosable que pendant les premières 8 heures suivant l'administration.

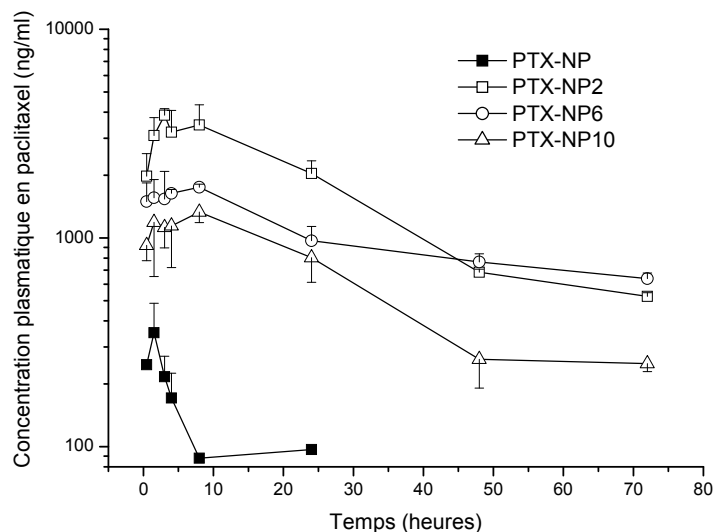


Figure 3. Concentrations plasmatiques de paclitaxel en fonction du temps après administration orale d'une dose de 10 mg/kg de paclitaxel encapsulée dans des nanoparticules (PTX-NP, PTX-NP2, PTX-NP6 et PTX-NP10). Les résultats sont exprimés sous forme d'une moyenne \pm SD (n=6).

Le Tableau 2 donne les paramètres pharmacocinétiques du paclitaxel calculées selon une analyse non-compartmental des données obtenues après administration de Taxol® ou de différents types de nanoparticules. C_{max} est 4 à 12 fois plus élevé qu'avec les « nanoparticules contrôle » quand le paclitaxel est incorporé dans les nanoparticules pégylées. La comparaison des différentes nanoparticules pégylées, montre que C_{max} est significativement plus élevé avec PTX-NP2 qu'avec PTX-NP6 et PTX-NP10. L'ASC fournie par PTX-NP2 et PTX-NP6 est, pour sa part, respectivement 2,5 et 1,7 fois plus grande que celle calculée pour PTX-NP10. Le temps de résidence moyen (TRM) du principe actif dans le plasma et la demi-vie d'élimination sont significativement plus élevés quand le paclitaxel est administré par voie orale et encapsulé dans les nanoparticules que lorsqu'il est formulé sous forme de Taxol® et administré par voie parentérale. La biodisponibilité orale relative (Fr) du paclitaxel formulé dans les nanoparticules pégylées est d'environ 35% pour PTX-NP10, 58% pour PTX-NP6 et 85% pour PTX-NP2.

Tableau 2. Paramètres pharmacocinétiques des différentes formulations de paclitaxel utilisées dans cette étude, après administration d'une dose de 10 mg/kg chez la souris C57BL/6J. Les résultats sont exprimés sous forme d'une moyenne \pm SD (n=6).

Formulation	Voie	ASC _{0-∞} ($\mu\text{g h/ml}$)	C _{max} (μg)	T _{max} (h)	TRM (h)	t _{1/2} (h ⁻¹)	F _r
Taxol®	i.v.	89 \pm 6	65 \pm 3	0,06	1,8 \pm 0,3	2,3 \pm 0,5	100
PTX-NP	Oral	6,2 \pm 0,3**	0,3 \pm 0,1	1.5	33 \pm 4	33 \pm 3	7,0
PTX-NP2	Oral	76 \pm 2*‡	4,0 \pm 0,4	4.0	27 \pm 6	25 \pm 3	85
PTX-NP6	Oral	52 \pm 2**†	2,0 \pm 0,3	5.0	33 \pm 1	42 \pm 7	58
PTX-NP10	Oral	31 \pm 3**	1,5 \pm 0,3	3,8	24 \pm 4	33 \pm 2	35

(*) Test U de Mann et Whitney entre PTX-NP2 et Taxol® (p < 0,05)

(**) Test U de Mann et Whitney en comparant PTX-NP6, PTX-NP10 et PTX-NP avec le Taxol® (p < 0,01)

(†) Test U de Mann et Whitney entre PTX-NP6 et PTX-NP10 ou PTX-NP (p < 0,05).

(‡) Test U de Mann et Whitney entre PTX-NP2 et PTX-NP6 ou PTX-NP10 ou PTX-NP (p < 0,01).

La Figure 4 montre l'évolution du volume des tumeurs des souris au cours de l'expérience de croissance tumorale. Au début du traitement (jour 1), le volume des tumeurs est similaire pour toutes les souris. Au terme de l'expérience, le volume des tumeurs des souris du groupe traité par voie orale avec du Taxol® (10 mg/kg toutes les 24 heures pendant 9 jours) est proche de 1500 mm³. Lorsque les animaux sont traités par voie intraveineuse avec le même médicament, en revanche, le volume des tumeurs est 2 fois inférieur (environ 770 mm³). Dans le cas des animaux traités par des nanoparticules pégylées (PTX-NP2 et recevant une dose de paclitaxel toutes les 72 heures (jours 1, 4 et 7), le volume des tumeurs se maintient au-dessous de 300 mm³ jusqu'au cinquième jour de l'expérience. A ce moment, les tumeurs grossissent mais, à la fin de l'expérience, le volume moyen des tumeurs est du même ordre que celui observé pour les animaux traités avec du Taxol® par voie intraveineuse.

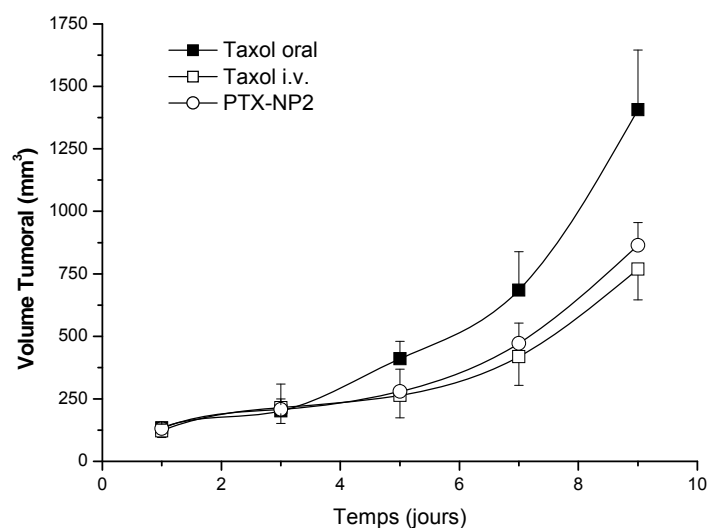


Figure 4. Evolution du volume tumoral de souris C57BL/6J porteuses d'une tumeur sous-cutanée en fonction du traitement reçu. Taxol i.v.: solution de paclitaxel administré par voie intraveineuse (10 mg/kg) tous les 24 h pendant 9 jours. Taxol® oral : solution de paclitaxel administrée par voie orale (10 mg/kg) toutes les 24 heures pendant 9 jours. PTX-NP2 : paclitaxel encapsulé dans des nanoparticules pégyliées avec du PEG 2000 et administré tous les 3 jours (jours 1, 4 et 7) à une dose de 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés sous forme d'une moyenne \pm SD (n=6).

Discussion et conclusions

Au cours des dernières années un nombre important de stratégies différentes ont été développées en vue de l'administration orale du paclitaxel. Malheureusement, l'absorption orale de cet anticancéreux est rendu difficile par son hydrophobicité et son métabolisme présystémique lié à l'activité de la P-gp et du cytochrome P450. Tout cela fait que le paclitaxel appartient au group IV du système de classification biopharmaceutique (SCB) [29] où se trouvent les molécules peu solubles et peu perméables.

Une des premières alternatives proposées (pour augmenter la faible biodisponibilité orale de cet anticancéreux) a été sa co-administration avec des substances capables d'inhiber les enzymes et les systèmes d'extrusion des xénobiotiques localisés au niveau de la muqueuse gastro-intestinale. Dans cet esprit, l'utilisation de vérapamil, de cyclosporine A ou de flavonoïdes a été proposée [17, 18, 30]. Dans le même esprit, il nous a semblé que le recours à un système d'administration contenant du poly (éthylène glycol) pouvait être intéressant. Mises à part ses propriétés solubilisantes, cet excipient possède en effet une l'activité inhibitrice de la P-gp et du cytochrome P450 [31, 32]. De plus, il est connu que la pégylation des nanoparticules leur confère des propriétés lubrifiantes et muco-adhésives. Pour toutes ces raisons, nous avons pensé que le recours à ces vecteurs colloïdaux pouvait permettre l'administration orale du paclitaxel en favorisant son cheminement, à travers la

couche de mucus intestinal, jusqu'à la surface des entérocytes [33] et en inhibant, à ce niveau, les systèmes à la base de son métabolisme présystémique. A noter qu'au cours de ce travail, la pharmacocinétique et l'efficacité du paclitaxel après incorporation dans des nanoparticules pégylées ont été évalués chez des souris femelles C57BL/6J possédant le gène *mdr1a* codant pour la P-gp intestinale [34].

Les résultats décrits dans ce travail montrent que les nanoparticules avec enrobage de poly (éthylène glycol) ont une taille d'environ 180 nm, une charge superficielle négative et un contenu en paclitaxel d'environ 150 mg par mg de nanoparticules. Ce résultat est en accord avec ceux publiés par Bartolli et collaborateurs, qui observent une augmentation importante du contenu en cet anticancéreux après pégylation de liposomes [35]. Il est à noter, par ailleurs, que la masse moléculaire du PEG utilisée pour la pégylation des nanoparticules est sans influence sur l'encapsulation du paclitaxel.

Lors des études pharmacocinétiques chez la souris, une dose de 10 mg/kg a été sélectionnée. Après l'administration intraveineuse du médicament commerciale (Taxol®), le profil de la courbe plasmatique du paclitaxel en fonction du temps est typiquement bi-phasique (Fig. 2) Un tel profil a été décrit auparavant dans la littérature [24, 36]. La demi-vie d'élimination du principe actif est de 4,5 h et le TRM de 2,6 h. Ces deux résultats concordent aussi avec des valeurs antérieurement décrites [16, 22, 23].

Quand le médicament commercial est administré par voie orale, les niveaux plasmatiques du paclitaxel sont inférieurs à la limite de détection de la technique analytique utilisée. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits précédemment par van Asperen et collaborateurs, qui annoncent, pour le paclitaxel (sous forme de Taxol) un C_{max} proche de 80 ng/ml [30]. Quand, en revanche, des nanoparticules pégylées contenant du paclitaxel sont administrées par voie orale chez la souris, les niveaux plasmatiques sont particulièrement élevés (Fig. 3) et, résultat important, ils se maintiennent dans le temps. De tels niveaux prolongés du paclitaxel témoignent du contrôle de la libération qu'exercent les nanoparticules de poly (anhydride). Les nanoparticules utilisées assurent une certaine gastrorésistance ; elles ne libèrent pas leur contenu en milieu acide et permettent, au contraire, sa libération lente dans les milieux aqueux proches de la neutralité [27, 28]. Particulièrement intéressant est le fait que les niveaux plasmatiques de paclitaxel obtenus avec les nanoparticules pégylées sont plus élevés que la concentration minimale considérée comme thérapeutique (environ 85 ng/ml [37]). Les résultats obtenus au cours de ces travaux montrent clairement que la pharmacocinétique du paclitaxel est influencée par la masse moléculaire du PEG utilisé. La biodisponibilité orale du paclitaxel diminue avec l'augmentation de la masse moléculaire du PEG utilisé pour la pégylation des nanoparticules. Avec PTX-NP2, ce paramètre est de 85%, alors qu'il est de 60% pour PTX-NP6 et de 35% pour PTX-NP10. De tels résultats concordent avec la capacité précédemment décrite pour ces nanoparticules de pénétrer dans la couche du mucus qui tapisse l'épithélium intestinal. La pégylation par du PEG 2000 ou du PEG 6000 permet l'obtention de nanoparticules capables de minimiser les interactions avec le contenu du lumen et avec la couche de mucus d'une manière beaucoup plus efficace que les nanoparticules pégylées par du PEG

10000 [27, 33]. Il en résulte que la dose d'anticancéreux capable d'arriver à la surface de l'épithélium et de résider plus longtemps à la surface des entérocytes est plus importante avec PTX-NP2 et PTX-NP6 qu'avec PTX-NP10. Tout ceci fait que la pégylation des nanoparticules permet l'obtention d'une biodisponibilité relative significativement supérieure à celle obtenue avec les « nanoparticules contrôle » (6%) ou avec d'autres décrites dans la littérature [38-40].

La formulation PTX-NP2 fournissant la meilleure biodisponibilité orale est celle qui a été retenue pour les études de croissance tumorale chez l'animal. Dans ces études, il a été démontré que le traitement fondé sur l'utilisation de nanoparticules pégylées, administrées par voie orale tous les 3 jours, ralentit de manière significative la croissance de la tumeur, en comparaison avec les animaux du « groupe contrôle » (Taxol oral ; Fig. 4).

Il est particulièrement intéressant de voir que les nanoparticules pégylées montrent une efficacité similaire à celle observée chez les animaux qui ont été traités par le médicament commercial (Taxol®) administré par voie parentérale. De cette étude on peut conclure que l'association du PEG aux nanoparticules de poly (anhydride) permet effectivement l'obtention attendue de systèmes muco-pénétrants capables de libérer leur contenu de manière contrôlée et soutenue dans le temps (Fig. 5). On peut aussi penser que la présence de ces nanoparticules en contact étroit avec l'épithélium permet, par la présence du PEG, d'inhiber l'activité enzymatique associée au cytochrome P450 ainsi que l'effet d'extrusion propre à la P-gp intestinale. L'absorption du paclitaxel est ainsi favorisée et le système permet d'obtenir des niveaux plasmatiques thérapeutiques, soutenus et prolongés dans le temps, de l'anticancéreux.

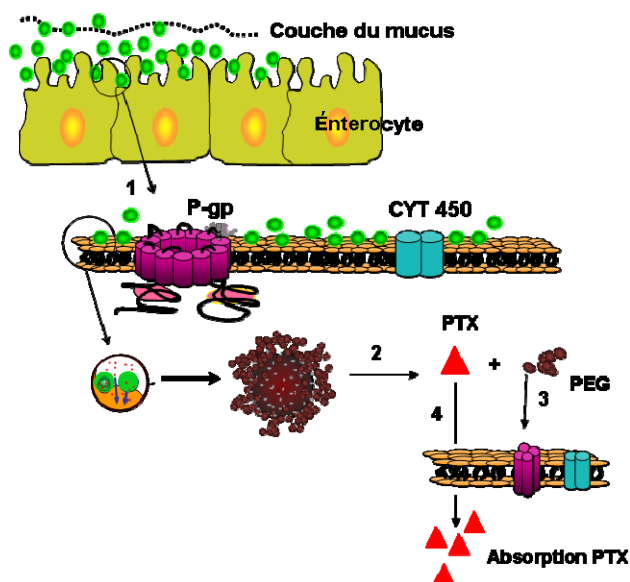


Figure 5. Diagramme récapitulatif du mécanisme d'action possible de nanoparticules muco-pénétrantes susceptibles d'être utilisées comme véhicules pour l'administration orale du paclitaxel. (1) Les nanoparticules traversent la couche de mucus et arrivent à la surface des entérocytes. (2) Les nanoparticules libèrent leur contenu. (3) La nanoparticule, en contact étroit avec la surface des entérocytes, facilite l'effet inhibiteur du PEG sur l'activité de la

glycoprotéine P (P-gp) et du cytochrome P450 (CYT 450). (4) Le paclitaxel (PTX) peut s'absorber.

Remerciements

Ce travail a bénéficié du soutien financier du Ministère de la Science et de la Technologie (Project SAF2008-02538) et de la fondation « Caja Navarra » (Project 10828) en Espagne. Nous voudrions aussi remercier au Prof. Francis Puisieux, ancien directeur du Laboratoire de Pharmacie Galénique à l'Université Paris-XI, pour ses conseils, indications et remarques ainsi que pour avoir pris le temps de corriger ce manuscrit.

Conflits d'intérêts : aucun

Références

- [1] Fang WS, Liang XT. Recent progress in structure activity relationship and mechanistic studies of taxol analogues. *Mini Rev Med Chem* 2005;5:1-12.
- [2] Samaranyake G, Neidigh KA, Kingston DG. Modified taxols, 8. Deacylation and reacylation of baccatin III. *J Nat Prod* 1993;56:884-898.
- [3] Rowinsky EK, Calvo E. Novel agents that target tubulin and related elements. *Semin Oncol* 2006;33:421-435.
- [4] Green H, Soderkvist P, Rosenberg P, Mirghani RA, Rymark P, Lundqvist EA, Peterson C. Pharmacogenetic studies of paclitaxel in the treatment of ovarian cancer. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009;104:130-137.
- [5] Sparano JA, Wang M, Martino S, Jones V, Perez EA, Saphner T, Wolff AC, Sledge GW, Wood WC, Davidson NE. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1663-1671.
- [6] Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilienbaum R, Johnson DH. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2542-2550.
- [7] Gill PS, Tulpule A, Espina BM, Cabriales S, Bresnahan J, Ilaw M, Louie S, Gustafson NF, Brown MA, Orcutt C, Winograd B, Scadden DT. Paclitaxel is safe and effective in the treatment of advanced AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol* 1999;17:1876-1883.
- [8] Mathew AE, Mejillano MR, Nath JP, Himes RH, Stella VJ. Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of taxol with antitumor activity. *J Med Chem* 1992;35:145-151.
- [9] Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations, *Int J Pharm* 2002; 235:179-192.
- [10] Kloover JS, den Bakker MA, Gelderblom H, van Meerbeeck JP. Fatal outcome of a hypersensitivity reaction to paclitaxel: a critical review of premedication regimens, *Br J Cancer* 2004;90:304-305.
- [11] Scripture CD, Szebeni J, Loos WJ, Figg WD, Sparreboom A. Comparative in vitro properties and clinical pharmacokinetics of paclitaxel following the administration of Taxol® and Paxene®. *Cancer Biol Ther* 2005;4:555-560.

- [12] Gradishar WJ. Albumin-bound paclitaxel: a next generation taxane. *Expert Opin Pharmacother* 2006;7:1041-1053.
- [13] Desai NP, Trieu V, Hwang LY, Wu R, Soon-Shiong P, Gradishar WJ. Improved effectiveness of nanoparticles albumin-bound (nab) paclitaxel versus polysorbate-based docetaxel in multiple xenografts as a function of HER2 and SPARC status. *Anticancer Drugs* 2008;19:899-909.
- [14] Kruijtzter CM, Beijnen JH, Schellens JH. Improvement of oral drug treatment by temporary inhibition of drug transporters and/or cytochrome P450 in the gastrointestinal tract and liver: an overview. *Oncologist* 2002;7:516-530.
- [15] Malingre MM, Beijnen JH, Schellens JH. Oral delivery of taxanes. *Invest New Drugs* 2001;19:155-162.
- [16] Peltier S, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoît JP. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res* 2006;23:1243-1250.
- [17] Zhang Y, Benet LZ. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 2001;40:159-168.
- [18] Bansal T, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2009;12:46-78.
- [19] Hennenfent KL, Govindan R. Novel formulations of taxanes: a review. *Old wine in a new bottle? Ann Oncol* 2006;17:735-749.
- [20] Bayes M, Rabasseda X, Prous JR. Gateways to clinical trials. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2004;26:53-84.
- [21] Yoncheva K, Calleja P, Agüeros M, Petrov P, Miladinova I, Tszvetanov C, Irache JM. Stabilized micelles as delivery vehicles for paclitaxel. *Int J Pharm* 2012;436:258-264.
- [22] S. Yang S, R.N. Gursoy RN, G. Lambert G, S. Benita S. Enhanced oral absorption of paclitaxel in a novel self-microemulsifying drug delivery system with or without concomitant use of P-glycoprotein inhibitors. *Pharm Res* 2004;21:261-270.
- [23] Gao P, Rush BD, Pfund WP, Huang T, Bauer JM, Morozowich W, Kuo MS, Hageman MJ. Development of a supersaturable SEDDS (S SEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability, *J Pharm Sci* 2003;92:2386–2398.
- [24] Khandavilli S, Panchagnula R. Nanoemulsions as versatile formulations for paclitaxel delivery: peroral and dermal delivery studies in rats. *J Invest Dermatol* 2007;127:154-62.
- [25] Zhang S, Sagawa K, Arnold RD, Tseng E, Wang X, Morris ME. Interactions between the flavonoid biochanin A and P-glycoprotein substrates in rats: in vitro and in vivo. *J Pharm Sci* 2010;99:430-441.
- [26] Arbós P, Wirh M, Arango MA, Gabor F, Irache JM. Gantrez® AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates. *J Control Release* 2002;83:321-330.
- [27] Zabaleta V, Ponchel G, Salman H, Agüeros M, Vauthier C, Irache JM. Oral administration of paclitaxel with pegylated poly(anhydride) nanoparticles: permeability and pharmacokinetic study. *Eur J Pharm Biopharm* 2012;81:514-523

- [28] Agüeros M, Ruiz-Gatón L, Vauthier C, Bouchemal K, Espuelas S, Ponchel G, Irache JM. Combined hydroxypropyl- β -cyclodextrin and poly(anhydride) nanoparticles improves the oral permeability of paclitaxel. *Eur J Pharm Sci* 2009;38:405-413.
- [29] Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res* 1998;15:11-22.
- [30] van Asperen J, van Tellingen O, van der Valk MA, Rozenhart M, Beijnen JH. Enhanced oral absorption and decreased elimination of paclitaxel in mice cotreated with cyclosporin A. *Clin Cancer Res* 1998;4:2293-2297.
- [31] Hugger ED, Audus KL, Borchardt RT. Effects of poly(ethylene glycol) on efflux transporter activity in Caco-2 cell monolayers. *J Pharm Sci* 2002;91:1980-1990.
- [32] Collnot E.-M, Baldes C, Wempe MF, Kappl R, Hüttermann J, Hyatt JA, Edgar KJ, Schaefer UF, Lehr C.-M. Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by vitamin E TPGS: Influence of ATPase activity and membrane fluidity. *Mol Pharmaceutics* 2007;4:465-474.
- [33] Yoncheva K, Guembe L, Campanero MA, Irache JM. Evaluation of bioadhesive potential and intestinal transport of pegylated poly(anhydride) nanoparticles. *Int J Pharm* 2007;334:156-165.
- [34] Couture L, Nash JA, Turgeon J. The ATP-Binding Cassette Transporters and their implication in drug disposition: A special look at the heart. *Pharmacol Rev* 2006;58:244-258.
- [35] Bartoli MH, Boitard M, Fessi H, Beriel H, Devissaguet JP, Picot F, Puisieux F. In vitro and in vivo antitumoral activity of free, and encapsulated taxol. *J Microencapsul* 1990;7:191-197.
- [36] Agüeros M, Zabaleta V, Espuelas S, Campanero MA, Irache JM. Increased oral bioavailability of paclitaxel by its encapsulation through complex formation with cyclodextrins in poly(anhydride) nanoparticles. *J Control Release* 2010;145:2-8.
- [37] Huizing MT, Misser VH, Pieters RC, ten Bokkel Huinink WW, Veenhof CH, Vermorken JB, Pinedo HM, Beijnen JH. Taxanes: a new class of antitumor agents. *Cancer Invest* 1995;13:381-404.
- [38] Varma MV, Panchagnula R. Enhanced oral paclitaxel absorption with vitamin E-TPGS: effect on solubility and permeability in vitro, in situ and in vivo. *Eur J Pharm Sci* 2005;25:445-453.
- [39] Mu L, Feng SS. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J Control Release* 2003;86:33-48.
- [40] Ho PY, Yeh TK, Yao HT, Lin HL, Wu HY, Lo YK, Chang YW, Chiang TH, Wu SH, Chao YS, Chen CT. Enhanced oral bioavailability of paclitaxel by D-alphatocopheryl polyethylene glycol 400 succinate in mice. *Int J Pharm* 2008;359:174-181.