

Optimisation de la distribution tissulaire de dérivés organoarsénisés à visée antileucémique et trapanocide : exemple du médranol

Siham Ben Zirar-Baya

▶ **To cite this version:**

Siham Ben Zirar-Baya. Optimisation de la distribution tissulaire de dérivés organoarsénisés à visée antileucémique et trapanocide : exemple du médranol. Biotechnologies. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2007. Français. NNT : 2007NAN12504 . tel-01754355

HAL Id: tel-01754355
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754355

Submitted on 30 Mar 2018

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.

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

ppn 131060414
lois 2000792
T/D/PH/N/2007/04D

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

2007

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT"

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 12 novembre 2007

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE NANCY

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1

Mention : Bioingénierie et biomatériaux

Par

Siham BEN ZIRAR-BAYA

Née le 14 mai 1976

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

Sujet :

Optimisation de la distribution tissulaire de dérivés organoarséniés à visée antileucémique et trypanocide : exemple du mélarsoprol

MEMBRES DU JURY :

Dr. Stéphane GIBAUD	Directeur de thèse
Pr. Robert FARINOTTI	Rapporteur
Pr. Véronique ROSILIO	Rapporteur
Pr. Alain ASTIER	
Dr. Muriel PAUL	

« La vie humaine n'a pas pour fin la recherche du bonheur ».

A mes parents sans qui je ne serais rien

A mon mari

A ma famille

A mes amies

Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Stéphane GIBAUD, pour m'avoir encadrée tout au long de ce travail. Sa bonne humeur, sa disponibilité, son dynamisme et son éternel optimisme malgré des résultats parfois désespérés, m'ont soutenue durant ces quelques années passées ensemble.

Un grand merci également à Monsieur le Professeur Alain ASTIER pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de pharmacie clinique. Je le remercie d'avoir eu la patience d'essayer de m'inculquer quelques notions de chimie analytique et de m'avoir fait confiance en me proposant ce sujet.

Je remercie également Monsieur le Professeur Philippe MAINCENT pour m'avoir accueilli dans son unité de recherche et pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire quelques temps.

Je remercie le Professeur Pierre MUTZENHARDT pour avoir accepter de réaliser les spectres de RMN.

Je remercie vivement :

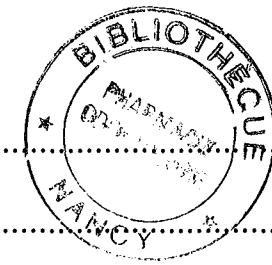
Monsieur le Professeur Robert FARINOTTI
pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse

Madame le Docteur Muriel PAUL
pour avoir accepter de participer au jury de cette thèse.

Madame le Professeur Veronique ROSILIO
pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse

Enfin, je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire de pharmacie clinique pour leur soutien : Mr. Christophe MOTT, Mme Pascale CARNET et Mme Huguette FRENOT.

Table des matières



Introduction générale 1

Rappels bibliographiques 7

I. Le mélarsoprol 8

1. Caractéristiques générales 8
2. Synthèse du mélarsoprol et des phényldithiarsolanes 9
   2.1. Historique 9
   2.2. Méthode de synthèse 9
3. Efficacité thérapeutique 10
   3.1. Sur la trypanosomiase africaine 10
      3.1.1. Mode d'action antiparasitaire 10
      3.1.2. Principe de traitement antiparasitaire 11
   3.2. Sur les hémopathies malignes 12
      3.2.1. Activité antileucémique in vitro 12
      3.2.2. Activité antileucémique chez l'homme 14
4. Propriétés pharmacocinétiques 16
   4.1. Métabolisme 16
   4.2. Paramètres pharmacocinétiques 17
   4.3. Distribution 18
   4.4. Elimination et excrétion 20
5. Limites de son utilisation thérapeutique 21

II. Vecteurs de médicaments 23

1. Les nanoparticules polymériques 23
2. Les nanosuspensions 24
3. Les cyclodextrines 27
   3.1. Historique 27
   3.2. Structure des cyclodextrines 27
   3.3. Profil pharmacocinétique des cyclodextrines après administration parentérale 29
   3.4. Toxicité des cyclodextrines 29
   3.5. Inclusion -Complexation 30
      3.5.1. Caractérisation des complexes d'inclusion 30
      3.5.2. Intérêt de la complexation 31

III. Techniques utilisées pour la formulation des principes actifs peu solubles 33

1. Ajustement de pH 33

2. Solutions à base de solvants organiques 33

3. Utilisation des cyclodextrines 34

4. Micro- et nanosuspensions 35

IV. Distribution tissulaire des vecteurs 36

A. Distribution au niveau de la moelle osseuse 36

1. La barrière hémato-médullaire (BHM) 36

1.1. Physiologie de la BHM 36

1.2. Rôle de la BHM 37

2. La vectorisation médullaire 38

2.1. Historique de la vectorisation médullaire 38

2.2. Le ciblage médullaire par les nanoparticules 39

2.2.1. Aspects pharmacocinétiques des vecteurs passifs 40

2.2.2. Modulation de la biodistribution en faveur d'une capture médullaire 41

2.2.1.1. Modification de la taille des vecteurs 41

2.2.1.2. Modification des propriétés de surface 41

3. Rôle et place des cyclodextrines dans la distribution médullaire 43

B. Distribution au niveau du cerveau 44

1. La barrière hémato-encéphalique (BHE) 44

1.1. Données historiques 44

1.2. Propriétés de la BHE 44

1.2.1. Morphologie et anatomie de la BHE 44

1.2.2. Passage à travers la BHE 47

2. Quelques stratégies pour faciliter le passage des médicaments à travers la BHE 47

2.1. Utilisation des nanoparticules 48

2.2. Autres méthodes 49

3. Mécanismes impliqués dans le transport des nanoparticules 50

4. Effet des cyclodextrines sur le transport à travers la BHE 52

V. Conclusion 54

Travail expérimental 55

I. Formulation galénique 56

Chapitre I : Mise au point des nanosphères et des nanocapsules des phényldithiarsolanes synthétisés au sein du laboratoire 57

1. Matières premières 57
1.1. Phényldithiarsolanes 57
1.2. Les polymères 59
1.2.1. La poly (ε-caprolactone) (PCL) 59
1.2.2. Le poly (acide L-lactique) (PLA) 59
1.3. Les agents tensioactifs 60
1.3.1. Le Pluronic® F68 60
1.3.2. L'alcool polyvinylique (PVA) 60
2. Méthode de préparation des nanosphères et des nanocapsules 61
2.1. Préparation des nanosphères de poly (ε-caprolactone) et de poly (acide L-lactique) 61
2.2. Préparation des nanocapsules de poly (ε-caprolactone) et de poly (acide L-lactique) 62
3. Purification des nanoparticules 63
4. Contrôle des nanoparticules 63
4.1. Mesure de la taille des nanoparticules 63
4.2. Dosage du principe actif incorporé 63
5. Résultats et discussion 64
6. Conclusion 66

Chapitre II : Etude et caractérisation du complexe d'inclusion mélarsoprol-cyclodextrine 67

Résumé de la publication n°1 68

Publication n°1 : Melarsoprol-cyclodextrins inclusion complexes 69

II. Etude pharmacocinétique 85

Chapitre I : Etude de la pharmacocinétique du mélarsoprol et d'arsthinol chez la souris 86

Résumé de la publication n°2 87

Publication n°2: Pharmacokinetics and tissue distribution of the antileukaemic organoarsenicals arsthinol and melarsoprol in mice 89

Chapitre II : Comparaison de la pharmacocinétique des nouvelles formulations galéniques du mélarsoprol 95

Résumé de la publication n°3 96

Publication n°3: Comparison of nanosuspensions and hydroxypropyl-ß-cyclodextrin complex of melarsoprol: pharmacokinetics and tissue distribution in mice. 98

Discussion générale 123

Conclusion 142

Liste des figures 145

Liste des Tableaux 148

Références bibliographiques 149

Liste des abréviations

BIBLIOTHEQUE
NANCY

- APO: Apoliprotein
- As : Arsenic
- As^{III}: Arsenic trivalent
- As^{V}: Arsenic pentavalent
- As_2O_3: anhydride arsénieux
- ATRA: All-Trans Retinoic Acid
- BAL: British Anti Lewisite
- BHE : Barrière hémato-encéphalique
- BHM : Barrière hémato-médullaire
- CBZ : Carbamazepine
- CD: Cyclodextrine
- CLHP : Chromatographie Liquide à Haute performance
- Clt : Clairance plasmatique totale
- DFMO : Difluorométhylornithine
- DMSO: Diméthylsulfoxide
- HIV: Human Immune Virus
- LAL : Leucémie aiguë lymphoïde
- LAM : Leucémie aiguë myéloïde
- LAP : Leucémie aiguë promyélocytaire
- LCR: Liquide céphalorachidien
- LDL: Low Density Lipid
- LLC: Leucémie lymphoïde chronique
- LMC: Leucémie myéloïde chronique
- Mel: Mélarsoprol
- OE : Oxyde d'Ethylène

- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- OP : Oxyde de Propylène
- PBCA: Poly (butylcyanoacrylate)
- PCL: Polycaprolactone
- PEG: Polyéthylène glycol
- PG: Propylène glycol
- PLA: Poly Lactic Acid
- PVA: Polyvinyl Alcohol
- RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire
- SAA : Spectroscopie d'Absorption Atomique
- SAB : Sérum Albumine Bovine
- SPM : Système des Phagocytes Mononuclées
- SRE : Système réticulo-endothélial
- V_d : Volume de distribution

Introduction générale



Depuis des décennies, les préparations contenant de l'arsenic ont été utilisées dans le traitement des cancers: les travaux de König et coll. (1997) citent des articles des années 1930, voire de 1914 (Brainbridge, 1914). C'est au cours du XVIII^{ème} siècle que la chimiothérapie arsenicale s'est développée avec la solution de Fowler. Cette solution d'arsénite de potassium à 1% a permis de traiter des patients atteints d'hémopathies dont le pronostic est très réservé. Pendant un siècle et demi, du fait des résultats très intéressants, la solution de Fowler devint le traitement de référence contre les leucémies (Kwong et Todd, 1997). En Asie, au début des années 1970, l'efficacité d'une médication traditionnelle contenant principalement de l'oxyde d'arsenic trivalent (As^{III}) ou encore de l'anhydride arsénieux (As_2O_3) a été mise en évidence dans le traitement des leucémies aiguës promyélocytaires (LAP) nouvellement diagnostiquées ou en rechute après un traitement conventionnel à l'acide tout *trans*-rétinoïque (ATRA) (Castaigne et coll., 1990; Castaigne et coll., 1993).

Parallèlement, le trioxyde d'arsenic et les dérivés de l'acide phénylarsonique (As^{V}) sont utilisés à partir de la seconde moitié du XIX^{ème} siècle, pour traiter des parasitoses comme les trypanosomiases et les filarioses. Les dérivés aromatiques de l'arsenic trivalent (As^{III}) mis au point par Paul Erlich et son école, semblèrent d'emblée mieux tolérés. L'arsphénamine (Salvarsan®) fut présentée dès 1910 comme le médicament miracle de la syphilis avant l'arrivée de la pénicilline. C'est en 1938 que E.A.H. Friedheim synthétise le mélarsène comportant un groupement mélaminyl qui potentialise nettement l'activité trypanocide mais ce composé reste doté d'une très grande toxicité liée au groupement oxyde d'arsine –As=O (ou arsènoxyde) (Friedheim, 1948). Ce chercheur a démontré en 1942 que le BAL (British Anti Lewisite ou 2,3-dimercaptopropanol), utilisé comme antidote de la sinistre Lewisiste (gaz de combat utilisé durant la Grande Guerre), réagit avec les arsènoxydes pour former des composés cycliques, les dithiaarsanes, nettement moins toxiques (Jennings et coll., 1996). Friedheim fut ainsi à l'origine du mélarsoprol (Arsobal®), médicament qui, dans les mains des médecins coloniaux au cours de la grande guerre, conduisait à une diminution drastique de l'incidence de la maladie du sommeil en Afrique : la trypanosomiase africaine. Carter et Fairlamb démontrèrent que son groupement triazine permettait d'améliorer sa spécificité trypanocide (Carter et Fairlamb, 1993).

BIBLIOTHÈQUE NANCY

De plus des études récentes ont montré que cet organoarsénié était plus actif que le trioxyde d'arsenic sur les leucémies myéloïdes et faisait l'objet d'un essai clinique dans le traitement de leucémies réfractaires (Soignet et coll., 1996; Warrell et coll., 1997). Ce composé très lipophile s'accumule fortement dans la moelle épinière, conduisant à de graves neurotoxicités et à des décès (Gherardi et coll., 1990); il est quasiment insoluble dans l'eau mais également dans les principaux solvants. Son administration par voie injectable requiert sa solubilisation dans du propylène glycol (Arsobal®), entraînant une intense sensation de brûlure, très mal tolérée par le patient. Malgré des résultats prometteurs, sa mauvaise tolérance neurologique a conduit à l'abandon de ce produit dans le traitement de leucémies. Actuellement, le mélarsoprol, malgré sa difficulté d'utilisation et une toxicité importante, reste encore le traitement de référence du stade cérébral de la maladie du sommeil (Bouteille et coll., 2003).

La synthèse d'analogues possédant la structure proche du mélarsoprol mais optimisés pour leurs propriétés antileucémiques était donc une approche logique. Ainsi, notre laboratoire a synthétisé d'autres dithiaarsanes dérivés du mélarsoprol dans le but d'obtenir des composés plus efficaces et moins toxiques (Astier et Gibaud, 2003). Ces dithiaarsanes ont montré une activité antileucémique nettement supérieure à celle de l'As_2O_3. Un des composés le plus intéressant semble être l'arsthinol (Balarsen®), médicament anciennement utilisé par voie orale dans les années 1950 dans le traitement des amibiases (Most et coll., 1954) et en dermatologie (Goldman et coll., 1956).

Une autre approche serait le ciblage médullaire du mélarsoprol par vectorisation, pour tenter de contrer le plus redoutable effet secondaire: l'encéphalopathie arsenicale. Parmi les vecteurs proposés, les nanoparticules biodégradables à base de polymère se sont montrées particulièrement intéressantes dans l'amélioration de l'index thérapeutique de nombreux médicaments en les incluant dans la matrice polymérique (nanosphères) ou en les encapsulant dans un cœur huileux entouré par le polymère (nanocapsules) (Couvreur et coll., 1990). Plusieurs travaux ont montré qu'après leur administration dans la circulation systémique, elles se concentrent au niveau des organes du Système des Phagocytes Mononuclées (SPM : foie, rate et moelle osseuse) (Grislain et coll., 1983; Gibaud et coll., 1996).

Pour les principes actifs peu solubles, une alternative prometteuse est la production des nanosuspensions (Müller et coll., 1998 ; Müller et coll., 2001); le médicament étant dispersé dans une solution aqueuse de surfactant par un processus d'homogénéisation à haute pression qui permet la désintégration des microparticules en particules ultrafines nommées nanosuspensions. Les travaux de Peters et coll. ont été réalisés dans le but d'améliorer la dissolution et la distribution de clofazimine après une administration intraveineuse de nanosuspensions de cet agent antibactérien chez la souris (Peters et coll., 2000). Ces formulations ont montré une efficacité comparable à celle des liposomes et sont concentrées au niveau du foie et la rate. D'autre part, des nanosuspensions d'atovaquone pour utilisation parentérale ont été produites afin de diminuer la dose administrée puisque cet agent antiparasitaire est faiblement absorbé après administration orale chez la souris: la dose administrée par voie intraveineuse 0,1-1 mg/kg est équivalente à 100 mg/kg par voie orale (Schöler et coll., 2001).

Une autre approche pour la formulation des principes actifs lipophiles serait l'utilisation des cyclodextrines. Ces oligosaccharides cycliques ont la propriété de former des complexes d'inclusion avec différentes molécules biologiquement actives, permettant ainsi d'améliorer leur solubilité et leur biodisponibilité (Challa et coll., 2005). Cette formulation permettrait de réaliser une solution aqueuse injectable de principe actif faiblement soluble dans l'eau.

Notre travail de recherche porte sur des phényldithiarsolanes qui ont été synthétisé au sein du laboratoire et plus particulièrement sur le mélarsoprol ainsi que l'arsthinol; le seul autre médicament de cette classe chimique qui a été utilisé en thérapeutique. Au début, nous avons jugé intéressant d'étudier la pharmacocinétique des deux composés chez la souris, et de développer une forme injectable de mélarsoprol à base de cyclodextrine. Ensuite, nous avons envisagé par vectorisation du mélarsoprol de réduire la toxicité au niveau cérébral chez la souris.

Les avantages recherchés par la vectorisation peuvent se résumer ainsi :

- prolongation de l'activité du mélarsoprol au niveau des cellules cibles myélomateuses dans le courant circulatoire ou par maintien d'une concentration au niveau médullaire après administration intraveineuse,
- forte réduction de la distribution du mélarsoprol dans les organes sensibles notamment au niveau du cerveau.

Dans l'étude bibliographique, nous ferons une présentation du mélarsoprol, ainsi que de son efficacité thérapeutique et des limitations de son utilisation. Puis, nous détaillerons quelques types de vecteurs utilisables en thérapeutique et ferons un rappel des avantages de chacun d'entre eux. Ensuite, nous préciserons quelques techniques utilisées dans la formulation des principes actifs peu solubles dans l'eau. Enfin, les différents mécanismes de passage des vecteurs à travers la barrière hémato-médullaire et la barrière hémato-encéphalique seront étudiés.

La présentation de notre travail expérimental est divisée en deux parties :

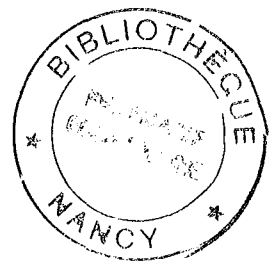
• une partie est consacrée à la mise au point des formes galéniques (nanoparticules polymériques, nanosuspensions) et à la réalisation des complexes mélarsoprol/cyclodextrines. Cette partie sera divisée en deux chapitres :

- le chapitre I présente la préparation des nanoparticules
- le chapitre II est consacré à la mise au point du complexe d'inclusion mélarsoprol/cyclodextrines, ainsi qu'aux méthodes physicochimiques permettant de caractériser et d'étudier l'interaction entre les deux molécules (Publication n°1).

• la deuxième partie concerne les travaux réalisés pour étudier la pharmacocinétique des différentes formulations de mélarsoprol (nanosuspensions, cyclodextrines) :

- le premier chapitre est consacré à une étude pharmacocinétique chez la souris du mélarsoprol et de l'arsthinol en solution organique (Publication n°2)
- le second chapitre a pour objectif de comparer la pharmacocinétique des différentes formulations galéniques de mélarsoprol : nanosuspensions (Ns/Mel) et complexe avec l'hydroxypropylβ-cyclodextrine (HPβ-CD/Mel), injectées par voie intraveineuse chez la souris (Publication n°3).

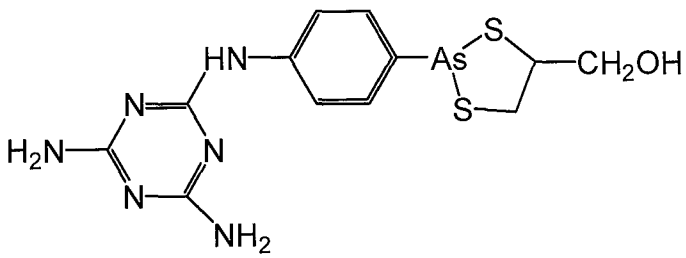
Rappels bibliographiques



I. Le mélarsoprol

1. Caractéristiques générales

Le mélarsoprol ({2-[4-(4,6-Diamino-[1,3,5]triazine-2-ylamino)-phényl]-[1,3,2]dithiarsolane-4-yl}-méthanol; Mel) (figure 1) est un dérivé organique trivalent de l'arsenic. Il s'agit d'une poudre faiblement colorée qui contient 18,5 % d'arsenic et qui est pratiquement insoluble dans l'eau (6 mg/l), l'éthanol, le méthanol et l'éther. Le mélarsoprol n'est que faiblement soluble dans le propylène glycol à froid et devient plus soluble dans ce même solvant à température ambiante. Il est commercialisé par Sanofi Aventis sous le nom d'Arsobal® en solution injectable à 3,6 % dans du propylène glycol. En 1972, l'équipe de Cristau a pu déterminer un coefficient de partage octanol/tampon à pH 7 s'élevant à 40, ce qui correspond à une lipophilie extrêmement importante (Cristau et coll., 1972).



$C_{12}H_{15}AsN_6OS_2$

M.M. :398,34

FIG. 1 — Structure chimique du mélarsoprol

Administré en injection intraveineuse stricte (solution à 3,6 % dans le propylène glycol), son indication thérapeutique est le traitement de la trypanosomiase africaine (causée par *Trypanosoma brucei gambiense et Trypanosoma brucei rhodesiense*) à la phase nerveuse exclusivement (stade II de la maladie). Son activité trypanocide est connue depuis de nombreuses années puisque le mélarsoprol est utilisé dans cette indication depuis 1947 (Doua et coll., 1994). Mais, du fait de sa haute toxicité, le mélarsoprol n'est administré en première intention (première phase de la maladie, stade non nerveux) qu'en absence totale d'alternative thérapeutique.

2. Synthèse du mélarsoprol et des phényldithiarsolanes

2.1. Historique

Les problèmes associés aux effets néfastes de l'arsenic dans le traitement de la trypanosomiase et la syphilis au cours des années 1900 ont conduit Paul Ehrlich à mettre au point des dérivés arsenicaux moins toxiques. C'est ainsi qu'il a développé en 1909 un traitement à base d'arsenic, appelé Salvarsan® ou 606 (606ème composé synthétisé), par la suite amélioré et renommé Neosalvarsan® ou 912. Mais ce produit n'avait pas une activité trypanocide aussi importante que celle du trioxyde d'arsenic (As_2O_3) mais fut considéré comme une découverte majeure pour le traitement de la syphilis avant l'arrivée de la pénicilline (Jolliffe, 1993). En 1938, Friedheim synthétise le mélarsène (tableau 1), composé organique comportant un groupement mélaminyl, qui augmente nettement l'activité trypanocide des organoarséniés trivalents, mais doté d'une très grande toxicité. La mise au point du BAL (British anti lewisite ou 2,3-dimercaptopropanol) en 1942 comme antidote de la lewisite, gaz de combat, a donné naissance aux phényldithiarsolanes : ces composés arsenicaux moins toxiques sont synthétisés par réaction chimique entre les arsènoxydes et les groupements thiols du BAL (Jennings et coll., 1996).

2.2. Méthode de synthèse

Le mélarsoprol, seul dithiarsolane utilisé de nos jours dans le traitement de la trypanosomiase africaine (Doua et coll., 1993), fût donc synthétisé par association du mélarsènoxyde (tableau 1) avec le BAL. La synthèse de ce principe actif ainsi que d'autres phényldithiarsolanes est réalisée par une méthode adaptée de celle de E.A.H Friedheim (Friedheim, 1942) (figure 2).

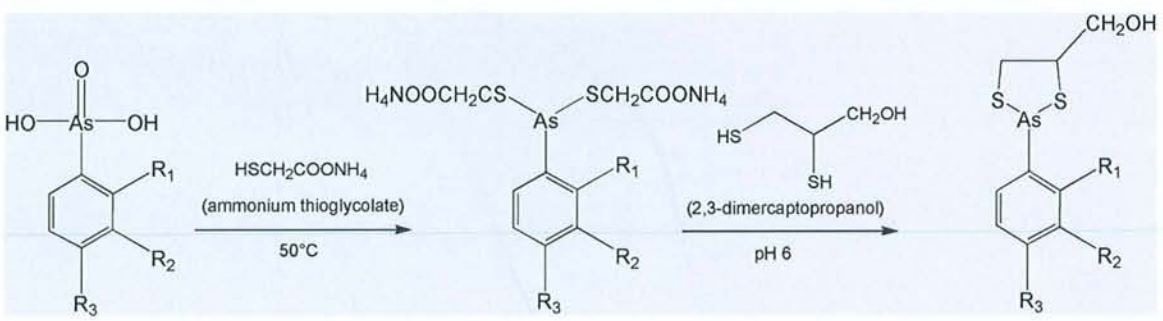


FIG. 2 — Schéma de synthèse des phényldithiarsolanes (Friedheim, 1942).

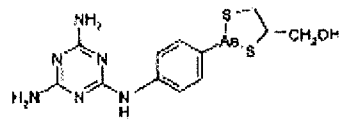
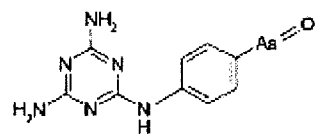
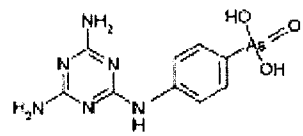
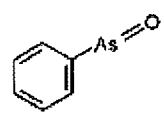
3. Efficacité thérapeutique

3.1. Sur la trypanosomiase africaine

3.1.1. Mode d'action antiparasitaire

Paul Ehrlich a montré que les acides arsoniques (As^{V}) devaient être réduits en arsènoxydes (As^{III}) pour être actifs sur les trypanosomes, et il a supposé que leur activité (tableau 1) résultait de l'interaction des arsènoxydes avec les groupements thiols des composés biologiques (Pépin et Milord, 1994). En particulier, la trypanothione réductase du parasite est susceptible d'être inhibée par le mélarsoprol ou son principal métabolite, le mélarsènoxyde (Bhargava et coll., 1983; Wang, 1995). En effet, quand les trypanosomes sont incubés en présence de l'un ou l'autre des produits, la trypanothione (métabolite principal des parasites) forme un complexe stable avec le composé organoarsénié (Fairlamb et coll., 1989). Ce complexe inhibe à son tour la trypanothione réductase, enzyme jouant un rôle clé dans la régulation de la balance d'oxydoréduction intracellulaire chez le parasite.

Tableau 1: L'activité *in vitro* du mélarsoprol et de certains composés arséniés sur les trypanosomes (Keiser et coll., 2000).

Nom	formule
Mélarsoprol CMI*=6,5 ng/ml	
Mélarsènoxyde CMI*=6,5 ng/ml	
Mélarsène CMI*=50 µg/ml	
Phénylarsènoxyde CMI*=1 ng/ml	
Trioxyde d'arsenic CMI*=111 ng/ml	As_2O_3

*CMI: concentration minimale inhibitrice des trypanosomes.

3.1.2. Principe de traitement antiparasitaire

Pour traiter un patient avec du mélarsoprol lors de la phase cérébrale, l'hospitalisation est indispensable (Pépin et Milord, 1994). Le patient doit être au repos, suivre un régime équilibré associant protéines et sels ferriques, et certains paramètres physiologiques doivent être suivis comme le nombre de parasites dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). La posologie est de 3,6 mg/kg d'Arsobal® avec un plafond à 200 mg/jour injecté en intraveineuse. Le protocole de traitement dépend du nombre de parasites dans le LCR :

- s'il y a moins de 20 cellules/µl, on réalise une injection par jour pendant 3 jours consécutifs,
- entre 20 et 100 cellules/µl, une injection pendant 3 jours à renouveler la semaine suivante,
- plus de 100 cellules/µl, une injection pendant 3 jours à renouveler les deux semaines suivantes.

En cas d'échec, une nouvelle injection pendant 3 jours à renouveler les trois semaines suivantes pourra être réalisée.

Cette thérapeutique comporte de nombreux risques immédiats (congestion, malaise, nausées, vertiges), et retardés toxiques (fièvre, névrite, érythème maculeux, purpura, hémorragie viscérale). L'accident réactionnel le plus grave est l'encéphalopathie. Elle apparaît après 6 à 14 jours de traitement. Le patient se plaint de nausées, vomissement, vertiges aigus. Puis, il entre dans le coma en quelques heures et subit des convulsions. Compte tenu de ces effets, le traitement par le mélarsoprol est redouté. Toutefois, il existe peu d'alternatives thérapeutiques en cas de trypanosomiase à *T. brucei rhodesiense* et le pronostic reste très sombre en l'absence de traitement. En conséquence, le rapport bénéfice/risque du traitement par le mélarsoprol est jugé favorable. Dans le cas de *T. brucei gambiense,* l'eflornitine (DFMO), légèrement moins toxique peut être utilisée en première intention.

3.2. Sur les hémopathies malignes

3.2.1. Activité antileucémique in vitro

Des études ont été entreprises en 1996 par l'équipe de Rivi et ont envisagé de cerner les potentialités du seul composé trivalent de l'arsenic organique actuellement commercialisé dans les pays occidentaux : le mélarsoprol. Les résultats permettent de conclure à l'efficacité de ce produit *in vitro* sur des lignées de leucémie aiguë promyélocytaire (LAP), à des doses inférieures à celles d'As_2O_3 (10^{-8} M pour le mélarsoprol vs 10^{-6} M pour l'As_2O_3) (Rivi et coll., 1996). Le mélarsoprol agirait par induction de l'apoptose sans activation de la différenciation. Par ailleurs, le mélarsoprol s'est montré également efficace sur d'autres types cellulaires tels que les lignées de leucémie lymphoïde aiguë (LAL), de leucémie myéloïde aiguë (LAM), et de leucémie myéloïde chronique (LMC) (Rivi et coll., 1996).

Des conclusions similaires ont été rapportées par König et coll. dans le cas des lignées cellulaires (JVM-2, 183-CLL, WSU-CLL) caractéristiques de désordres lymphoprolifératifs chroniques (König et coll., 1997). Ces auteurs ont montré que le mélarsoprol, à des doses allant de 10^{-7} à 10^{-9} mol/l, inhibe la survie et la croissance cellulaire de manière dose- et durée- dépendante. De plus, après 24 heures, avec une dose de 10^{-7} mol/l de mélarsoprol, les trois types cellulaires testés présentaient toutes les caractéristiques morphologiques de l'apoptose; un effet concentration- dépendant d'inhibition de la bcl-2 étant observé. A ces concentrations (10^{-7} à 10^{-9} mol/l), le trioxyde d'arsenic était totalement inefficace sur la survie et la croissance de ces cellules (ex : JVM-2, figure 3). Le mélarsoprol s'est donc révélé être un inhibiteur de la multiplication des cellules leucémiques lymphoïdes, alors que l'As_2O_3 n'apparaissait plus que comme un inducteur sélectif de l'apoptose des cellules de LAP (Rivi et coll., 1996). L'activité du mélarsoprol ayant été démontrée sur des lignées de leucémies promyélocytaires et sur des cellules lymphoïdes B.

Par la suite, l'activité des deux dérivés arsenicaux a été comparée *in vitro* sur des cellules provenant de patients atteints de myélome multiple (Rousselot et coll., 1997). En effet, Rousselot et coll. ont étudié les effets du mélarsoprol sur des cellules normales B et des cellules de myélome et ont comparé ces effets à ceux du trioxyde d'arsenic (Rousselot et coll., 1999).

A des concentrations de 10^{-8} à 10^{-6} mol/l, le trioxyde d'arsenic et le mélarsoprol induisent une inhibition de la croissance et une mortalité cellulaire dose- et temps- dépendante, sur les cellules myélomateuses similaires à celles observées sur les cellules de LAP. Dans les essais où les lignées normales B et celles de myélome ne sont pas séparées, le trioxyde d'arsenic et le mélarsoprol ciblent préférentiellement les cellules de myélome. A l'inverse du trioxyde d'arsenic, le mélarsoprol réduit légèrement la différenciation des cellules normales B dans le sang ce qui suggérerait que le mélarsoprol et le trioxyde d'arsenic agissent par des mécanismes différents (Rousselot et coll., 1999).

Il a donc été démontré que les dérivés de l'arsenic trivalent minéral et organique sont tous deux actifs sur la LAP. De plus, le mélarsoprol est efficace sur d'autres lignées cellulaires. Il est plus actif que l'As_2O_3 sur les cellules myélomateuses et sur les lignées lymphoïdes B, et il induit une apoptose des cellules de LAP à une dose 200 fois plus faible que celle du trioxyde d'arsenic.

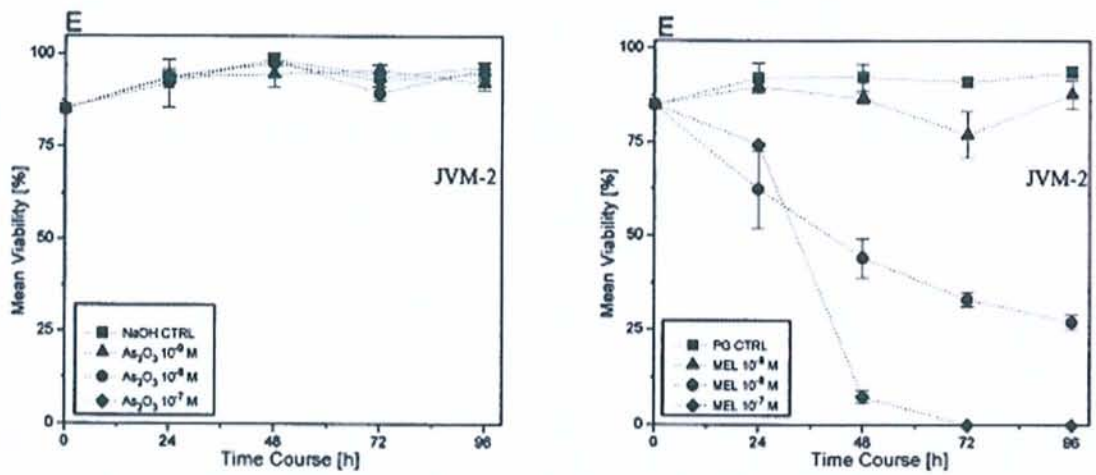


FIG. 3 — L'effet de l'As_2O_3 (à gauche) et du mélarsoprol (à droite) sur la viabilité de la lignée JVM-2 à différentes concentrations (10^{-7} à 10^{-9} M) pendant 96 heures. Les cellules témoins sont cultivées en présence de NaOH dans le cas de l'As_2O_3 (NaOH CTRL) et en présence de propylène glycol (PG) dans le cas du mélarsoprol (PG CTRL).

3.2.2. Activité antileucémique chez l'homme

A ce jour, une étude clinique a démontré l'efficacité clinique du mélarsoprol sur les leucémies (Soignet et coll., 1999): 6 patients étaient atteints de LAM, 1 de LMC et 1 de LLC (tableau 2). Cette étude pilote a consisté à administrer des doses progressives de 1 mg/kg à J1, 2 mg/kg à J2 puis 3,6 mg/kg à partir de J3 ; cette cure de 3 jours étant renouvelée au moins 2 fois. Le pic plasmatique était obtenu immédiatement après injection, la concentration maximale à J1 était de 1,2 µg/ml soit environ 3.10^{-6} M et les concentrations cytotoxiques étaient largement dépassées. La phase initiale de distribution était rapide tandis que la $t_{1/2\beta}$ suggérait un relarguage à partir d'un compartiment tissulaire. Une bonne tolérance globale a pu être notée. Un article qui décrivant la même étude clinique (Warrell et coll., 1997) permet toutefois de mieux cerner les effets secondaires apparus : irritation au site d'injection, neuropathie périphérique, accident vasculaire cérébral chez un patient avec antécédent. Du fait de l'apparition rapide d'une toxicité cérébrale, seulement 4 patients sur 8 ont pu suivre tout le protocole de traitement et aucun patient n'a obtenu de rémission partielle ou complète. Seul un patient atteint de LLC a bénéficié d'une réduction significative de la taille de ganglions de la marge costale, mais aucune amélioration au niveau de la formule sanguine n'a été observée. Les réactions néfastes qui sont apparues au cours de l'étude, sont des irritations locales au point d'injection et des nausées nécessitant l'hospitalisation d'un des patients. Le principal facteur limitant est la neurotoxicité : au cours de la seconde semaine de traitement, 3 patients avaient des convulsions nécessitant un traitement par phénytoïne et diazépam. Des vertiges et des paresthésies sont apparus chez deux des patients et un patient est décédé suite à une hémorragie pulmonaire. Dans cette étude, la posologie administrée était identique à la posologie utilisée dans le traitement de la trypanosomiase et les atteintes neurotoxiques étaient identiques.

Enfin, notons que l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris a lancé en octobre 1998 (Faber, 1998) un essai chez douze patients en rechute ou devenus résistants aux traitements usuels du myélome multiple. Il s'agit en fait des tous premiers essais sur l'arsenic administré en intraveineuse menés en Europe. Deux des patients traités ont reçu 1 mg/kg/jour d'Arsobal® à J1 et 2,2 mg/kg/jour les deux jours suivants. Ce traitement a été rapidement arrêté à cause des effets secondaires graves causés par la neurotoxicité du mélarsoprol. Les dix autres patients recevant le traitement par l'As_2O_3 n'ont présenté aucune rémission complète ou partielle (Rousselot et coll., 2004).

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques des patients traités par le mélarsoprol (Soignet et coll., 1999).

Nombre des patients traités	
Total	8
Hommes	6
Femmes	2
Age moyen (ans)	64,5
Diagnostic	
Leucémie aigue myéloïde	6[a]
Leucémie myéloïde chronique	1
Leucémie lymphoïde chronique	1

[a] deux de ces patients étaient atteints de LAP.

En conclusion, le mélarsoprol a une activité antileucémique très intéressante qui n'a pas pu être mise à profit à cause de sa toxicité neurologique. Le rapport bénéfice/risque qui était acceptable dans le traitement de la phase tardive de la trypanosomiase à *T. brucei rhodesiense* doit absolument être amélioré pour envisager un traitement antileucémique.

4. Propriétés pharmacocinétiques

4.1. Métabolisme :

Bien que le mélarsoprol ait été utilisé depuis plus que 50 ans, très peu d'études ont été réalisées sur son métabolisme (Bronner et coll., 1998; Keiser et coll., 2000).

Les travaux de Keiser et coll. (2000) ont montré que les concentrations sanguines de mélarsoprol sont divisées par deux en moins de 30 minutes après injection intraveineuse chez des patients atteints de trypanosomiase et que sa demi-vie déterminée par chromatographie liquide à haute performance est inférieure à une heure. Alors que la demi-vie de l'ensemble des métabolites déterminée par spectroscopie d'absorption atomique est de 35 heures (figure 4). Le principal métabolite détectable du mélarsoprol est l'oxyde du mélarsène et il constitue la forme active connue du mélarsoprol. Ce métabolite se forme rapidement, principalement par hydrolyse sans action enzymatique et atteint une concentration maximale au bout de 15 minutes. Sa demi-vie est d'environ 3,8 heures (Keiser et coll., 2000). Ce composé a été synthétisé par Friedheim en 1939 et fut utilisé pendant de nombreuses années. Mais, il a été abandonné après la découverte du BAL en faveur du mélarsoprol.

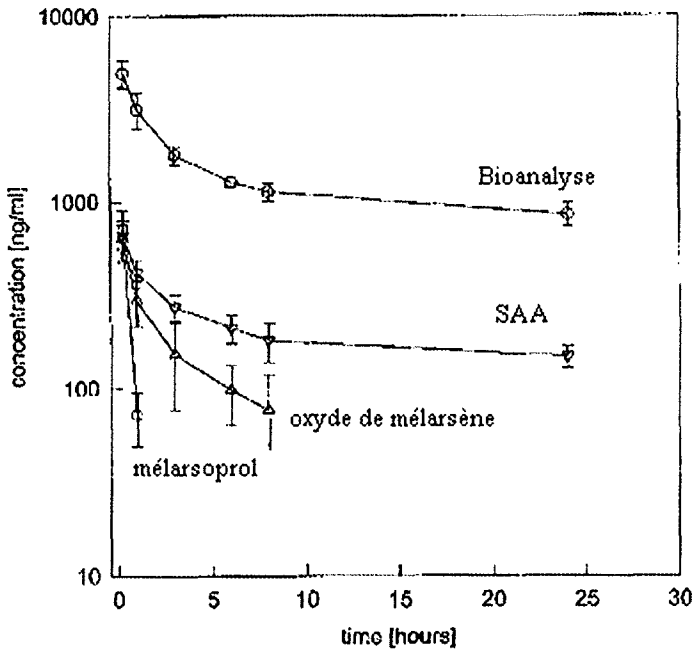


FIG. 4 — Concentrations sériques de l'oxyde de mélarsène et du mélarsoprol en fonction du temps déterminées par Chromatographie Liquide à Haute performance et comparées à celles de l'ensemble des dérivés de l'arsenic déterminées par bioanalyse et par spectroscopie d'absorption atomique (SAA) (Keiser et coll., 2000).

4.2. Paramètres pharmacocinétiques :

Une étude pharmacocinétique menée par Burri et coll. (1993) a permis d'estimer quelques paramètres pharmacocinétiques chez 19 patients atteints de trypanosomiase qui ont été traité par le mélarsoprol suivant le protocole recommandé par l'organisation mondiale de la santé (OMS) (tableau 3). Les taux sériques du mélarsoprol étaient entre 2 et 4 µg/ml, 24h après l'injection IV, tandis que les concentrations au niveau du liquide céphalorachidien (LCR) ne dépassaient pas 0,1 µg/ml. L'élimination du principe actif est biphasique avec une phase β prononcée; le $t_{1/2\beta}$ ~35 h. En effet, après injection IV du mélarsoprol, une partie de ce principe actif rejoint le LCR au bout d'une heure avec une élimination très lente (demi-vie ≈ 120 h) (Burri et coll., 1993), d'où son intérêt dans l'indication nerveuse de la trypanosomiase : il y exerce en effet son activité au niveau local, mais favorise aussi l'apparition d'encéphalopathies arsenicales (Blum et coll., 2001).

Toutefois, les concentrations déterminées au niveau du LCR restent plus faibles par rapport à la valeur nécessaire pour l'élimination de tous les trypanosomes. Enfin, le volume de distribution (V_d) est > à 100 l tandis que la clairance totale (Cl_t) est de 50 ml/min (Burri et coll., 1993).

Une autre étude pharmacocinétique a été menée par la même équipe sur des singes vervet[1] sains (Burri et coll., 1994). Le choix s'est porté sur des animaux non infectés afin d'éviter toute influence de la pathologie. Deux protocoles de traitement ont été testés, l'un était recommandé par l'OMS (tableau 3), l'autre était simulé par modélisation pharmacocinétique par Burri et coll., et qui consistait à réaliser dix injections consécutives de mélarsoprol à la dose de 2,2 mg/kg (Burri et coll., 1994). Les paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés pour les deux protocoles et aucune différence significative n'a été décelée dans les deux cas (tableau 4). Les concentrations au niveau du LCR restent globalement faibles. Enfin, les auteurs de cette étude suggèrent que les concentrations en mélarsoprol, ayant atteint le compartiment cérébral chez les singes, seraient également insuffisantes pour éliminer tous les trypanosomes dans le LCR, surtout durant les premières cures du traitement proposé par l'OMS.

4.3. Distribution :

Après administration, la fixation aux protéines plasmatiques a un impact significatif sur les caractéristiques pharmacologiques et pharmacocinétiques d'un médicament, puisque seulement la partie libre non fixée aux protéines est disponible pour la distribution tissulaire, l'élimination et l'activité pharmacologique. Ainsi, les travaux de Keiser et Burri ont pu montrer une liaison protéique de 79 % pour le mélarsoprol et de 72 % pour l'oxyde de mélarsène. Les deux composés sont essentiellement liés à l'albumine et à l'α 1-glycoprotéine. Le mécanisme de liaison covalente avec les groupements réactifs des protéines n'est pas connu, mais certains chercheurs supposent que la fixation se fait au niveau des groupements – SH (Keiser et Burri, 2000). Généralement, peu de travaux ont été réalisés sur la distribution tissulaire du mélarsoprol. Seule l'étude de Gherardi et coll. montre que cet organoarsénié a une affinité particulière pour la moelle épinière (Gherardi et coll., 1990).

---

[1] vervet : petit singe africain nommé singe vert (*Cercopithecus æthiops*).

Tableau 3 : Le protocole de traitement par le mélarsoprol recommandé par l'OMS (Burri et coll., 1993)

Jour de traitement	principe actif	dose
-3	pentamidine	4 mg/kg
-2	pentamidine	4 mg/kg
1	mélarsoprol	1,2 mg/kg
2	mélarsoprol	2,4 mg/kg
3	mélarsoprol	3,6 mg/kg
4	mélarsoprol	3,6 mg/kg
14	mélarsoprol	1,2 mg/kg
15	mélarsoprol	2,4 mg/kg
16	mélarsoprol	3,6 mg/kg
17	mélarsoprol	3,6 mg/kg
27	mélarsoprol	1,2 mg/kg
28	mélarsoprol	2,4 mg/kg
29	mélarsoprol	3,6 mg/kg
30	mélarsoprol	3,6 mg/kg

Tableau 4: Paramètres pharmacocinétiques du mélarsoprol dans le sérum après plusieurs administrations intraveineuses chez les singes vervet (Burri et coll., 1994).

Paramètre	protocole de l'OMS	protocole de Burri et coll.
V_d (l/kg)	3,8 ±0,5	3,4 ±0,4
Cl ($ml.min.kg^{-1}$)	2,8 ±1,7	3,5 ±0,5
MRT (h)	22,5 ±6,7	16,1 ±3,2
$T_{1/2}$ (h)	29,1 ±3,4	19,8 ±4,8

Concentration dans le LCR :

Après traitement des patientes atteintes de trypanosomiase avec du mélarsoprol, Gherardi et coll. ont observé des concentrations élevées de l'arsenic au niveau de la corde spinale. Ils ont observé également une dégénération des nerfs périphériques et des changements dans les ganglions dorsaux et la colonne vertébrale (Gherardi et coll., 1990). Ce travail vient confirmer la neuropathie arsenicale, causée par ce traitement. Il est probable que les concentrations mesurées dans les tissus nerveux essentiellement lipidiques soient plus importantes que celles qui sont habituellement mesurées dans le LCR essentiellement aqueux.

4.4. Elimination et excrétion :

L'élimination du mélarsoprol est biphasique (la phase β étant prédominante) et principalement biliaire (Burri et coll., 1993). En effet, chez le rat 20 % de la dose en arsenic sont d'abord excrétés dans les urines (Cristau et coll., 1972), puis les 80 % restants sont ensuite éliminés en quelques jours par voie biliaire (Cristau et Placidi, 1972)). Cristau et coll. ont également noté que chez l'homme et le cobaye, l'excrétion du mélarsoprol se fait préférentiellement par voie fécale (Cristau et coll., 1975) (tableau 5). Par ailleurs, d'autres auteurs ont montré que cette excrétion biliaire est principalement liée à une diminution du taux hépatique du glutathion (Gregus et coll., 2000). Cette étude a pu montrer que l'excrétion du mélarsoprol se fait par conjugaison au glutathion et à l'acide glucuronique et dépend essentiellement de la disponibilité du glutathion au niveau du foie.

Tableau 5 : Excrétion urinaire et biliaire de l'arsenic après administration IV de mélarsoprol chez le rat et le cobaye (dose d'arsenic injectée=1,25 mg/kg) (Cristau et coll., 1975).

	% excrété en 24h (rat) et en 8h (cobaye)			As biliaire/As total x100 (%)
	Bile	Urines	Total	
rats	34,35	9,5	43,8	78,4
cobayes	13,87	6,46	20,33	68,22

5. Limites de son utilisation thérapeutique

Outre des effets indésirables modérés (hyperthermie, urticaire céphalées, diarrhées, vomissement et phlébite au site d'injection), le mélarsoprol peut entraîner des complications plus sévères :

- Les réactions d'hypersensibilité sont rares, et se produisent généralement après la seconde cure. L'agranulocytose peu fréquente mais dangereuse, ainsi que des troubles fonctionnels hépatiques et rénaux peuvent être observés en fin de traitement.
- Des lésions myocardiques, une albuminurie et une hypertension sont des effets indésirables qui sont à la fois sérieux et relativement fréquents.
- L'effet indésirable le plus grave est indéniablement l'encéphalopathie arsenicale. Elle se caractérise par des céphalées, des tremblements, des convulsions (œdème cérébral), et aboutit au coma. Elle apparaît généralement dans les 3 à 10 jours après le début du traitement intraveineux. Si l'on se réfère à ce qui est connu chez les patients atteints de parasitose, les encéphalopathies peuvent se produire chez 5-10 % des patients traités (Martindale), et sont mortelles pour 1-5 % d'entre eux (Burri et coll., 1993). Certains auteurs ont d'ailleurs recommandé un étalement des doses afin d'essayer de prévenir les risques d'encéphalopathie (Doua et coll., 1994).

De plus, si l'origine de cette toxicité cérébrale demeure inconnue, il est couramment admis, depuis les travaux de Haller et coll. (1986) qu'un phénomène immunologique est impliqué dans cette réaction. L'utilisation concomitante de prednisolone, afin de limiter la composante inflammatoire lors de la survenue éventuelle d'encéphalopathie, a été préconisée par l'équipe de Pépin (Pépin et coll., 1995). Pourtant, son utilisation ne peut être envisagée que dans la mesure où sa toxicité nerveuse est réduite.

Pour tenter de contrer le plus redoutable effet secondaire du mélarsoprol : l'encéphalopathie par passage de la barrière hémato-encéphalique, le ciblage médullaire de ce principe actif peut être envisagé pour le traitement des hémopathies malignes réfractaires. Nous envisageons la réduction de la toxicité de ce produit au niveau cérébral et l'amélioration de la distribution au niveau de la moelle osseuse. Il serait important avant de procéder, d'améliorer la solubilité de ce principe actif très lipophile qui malgré utilisé depuis plus que 50 ans, aucune étude n'a été portée sur sa formulation galénique.

Dans le chapitre suivant, nous citerons les différents vecteurs qui peuvent être utilisés pour la formulation des principes actifs.

II. Vecteurs de médicaments

La vectorisation est une technique visant à moduler voire à totalement maîtriser la distribution d'une substance, en l'associant à un système approprié appelé vecteur (Puisieux et Roblot-Treupel, 1989). Ainsi, la distribution *in vivo* est rendue aussi indépendante que possible des propriétés de la substance elle-même, pour se soumettre à celles du vecteur.
Parmi les différents types de vecteurs qui peuvent être utilisés :

1. Les nanoparticules polymériques

Les nanoparticules polymériques sont des particules solides colloïdales (figure 5) constituées de polymères non biodégradables synthétiques ou de polymères biodégradables synthétiques, semi synthétiques ou naturels.

Ces vecteurs se différencient en :

- vecteurs type matrice (nanosphères) correspondent à des particules pleines, sans cavité ni paroi distinctes (Puisieux et Roblot-Treupel, 1989). Le principe actif étant dispersé dans la particule.

- vecteurs type réservoir (nanocapsules) formés d'une cavité liquide, où est dissous le principe actif et entourée d'une paroi de polymère. Les nanocapsules ont été développées dans le but d'augmenter l'efficacité d'encapsulation des principes actifs lipophiles contenus dans le cœur huileux central (Allemann et coll., 1993).

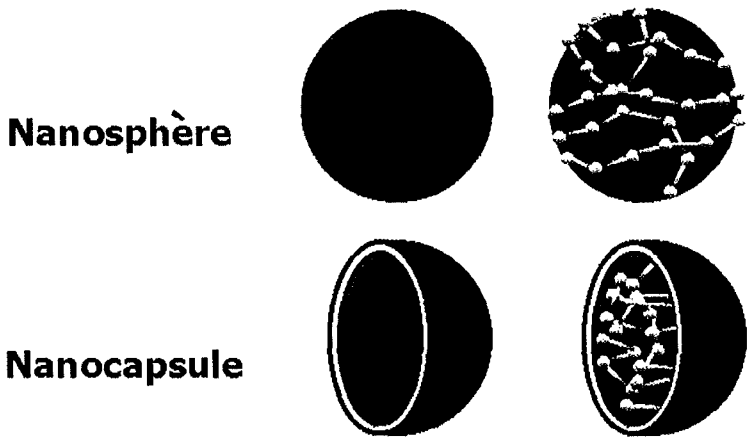


FIG. 5 — Structure schématisée des nanoparticules

Ces particules polymériques ont été développées pour la première fois par l'équipe de Speiser (Khanna et coll., 1969). Elles présentent des avantages par rapport aux autres formes (ex liposomes) : elles peuvent cibler des organes ou des tissus spécifiques et les caractéristiques de leur surface peuvent être variées par adsorption ou recouvrement avec différents matériaux (Kreuter, 1994). Historiquement, les premières nanoparticules utilisées en thérapeutique étaient à base de gélatine ou d'albumine (Scheffel et coll., 1972). Par la suite, ces nanoparticules ont été remplacées par des particules à base de polymères synthétiques biodégradables : poly (acide lactique), ou bien à partir de monomères durant leur polymérisation comme les alkylcyanoacrylates. Les deux techniques les plus utilisées sont les suivantes: la première technique consiste à dissoudre un polymère dans un solvant miscible à l'eau. Le mélange de cette phase organique à une phase aqueuse contenant un tensioactif conduit à la précipitation immédiate du polymère sous forme de nanoparticules (Fessi et coll., 1988). Quant à la technique de polymérisation anionique mise au point par P. Couvreur pour les alkylcyanoacrylates, elle consiste à ajouter le monomère dans une phase aqueuse contenant un tensioactif (Couvreur et coll., 1979).

Avec ces vecteurs, il est possible de faire varier la cinétique de libération du principe actif et les caractéristiques de surface des nanoparticules en fonction des polymères utilisés. Toutefois, la mise au point de ce type de vecteur nécessite une solubilisation minimale dans les principaux solvants utilisés pour la formulation (eau, huiles, solvants organiques).

2. Les nanosuspensions

La formulation galénique des médicaments très peu solubles dans l'eau reste un problème majeur qui intéresse beaucoup les scientifiques. En effet, plus de 40 % des nouveaux principes actifs sont faiblement solubles dans l'eau. Dans certains cas comme l'itraconazole et la carbamazepine, ils peuvent être peu solubles à la fois dans l'eau et dans les solvants organiques (Pouton, 2000). Les techniques traditionnelles, telles que la micronisation, l'utilisation des co-solvants, de solutions huileuses (Aungst, 1993) ou de surfactants (Aungst et coll., 1994) ont été limitées dans leur utilisation. Malgré le développement de formes nouvelles comme les liposomes (Schwendener et Schott, 1996), les

microémulsions (Lawrence et Rees, 2000) ou les complexes d'inclusion avec des cyclodextrines (Loftsson et Brewster, 1996; Stella et Rajewski, 1997; Akers, 2002), la mise en forme des principes actifs peu solubles reste parfois complexe et il n'existe pas d'approche universelle applicable à tous les principes actifs.

Face à tous ces problèmes de formulation, une nouvelle approche qui consiste à préparer des particules ultrafines de principe actif en suspension (nanosuspensions) a été envisagée.

La préparation des nanosuspensions repose sur deux principes différents selon la technologie choisie :

- Technique '**Nanocrystals**' **:** Cette technologie a été développée par Liversidge en 1992 (Liversidge et coll., 1992), achetée tout d'abord par la compagnie 'NanoSystems' mais récemment par 'Elan Drug Delivery'. Les nanosuspensions sont produites dans un système de moulin constitué d'une chambre de moletage, d'un tuyau et d'une chambre de recyclage (figure 6). Le principe de la technique consiste à obtenir des nanoparticules à partir des microparticules grâce à une grande énergie générée lors de la collision des particules de principe actif avec le milieu de moletage. Ce milieu peut être constitué de verre, d'oxyde de zirconium ou de résine de polystyrène.

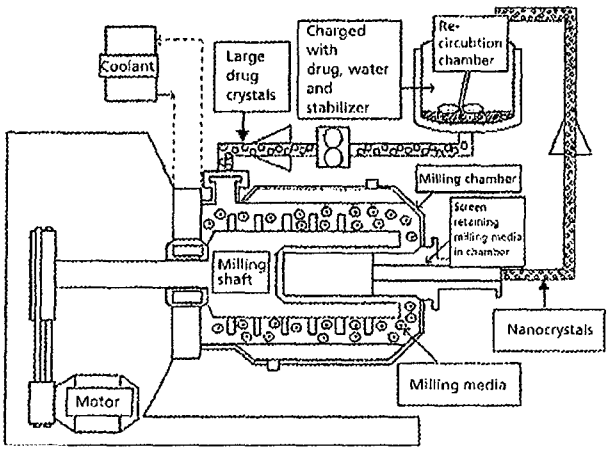


FIG.6 — Représentation schématique du procédé de préparation des nanosuspensions par la technique 'Nanocrystals' (Patravale et coll., 2004)

- Technique '**Disso Cubes**': Cette technologie a été développée par R.H. Müller (Müller et coll., 1998). Le brevet a été acheté par 'Drug Delivery Services' (DDS GmbH) puis par 'Skyepharma' actuellement. Le principe de préparation (figure 7) repose sur la génération par des homogénéisateurs à haute pression d'une pression très élevée à laquelle est soumise la suspension de médicament. Les particules du principe actif sont tout d'abord dispersées dans une solution de surfactant grâce à un homogénéisateur à vitesse élevée. Ensuite, la solution de microsuspensions est soumise à une grande pression allant jusqu'à 1500 bar à l'aide du piston d'un homogénéisateur à haute pression. Durant l'homogénéisation, il se produit des cavitations qui provoquent des collisions entre les particules aboutissant à une diminution de leur taille.

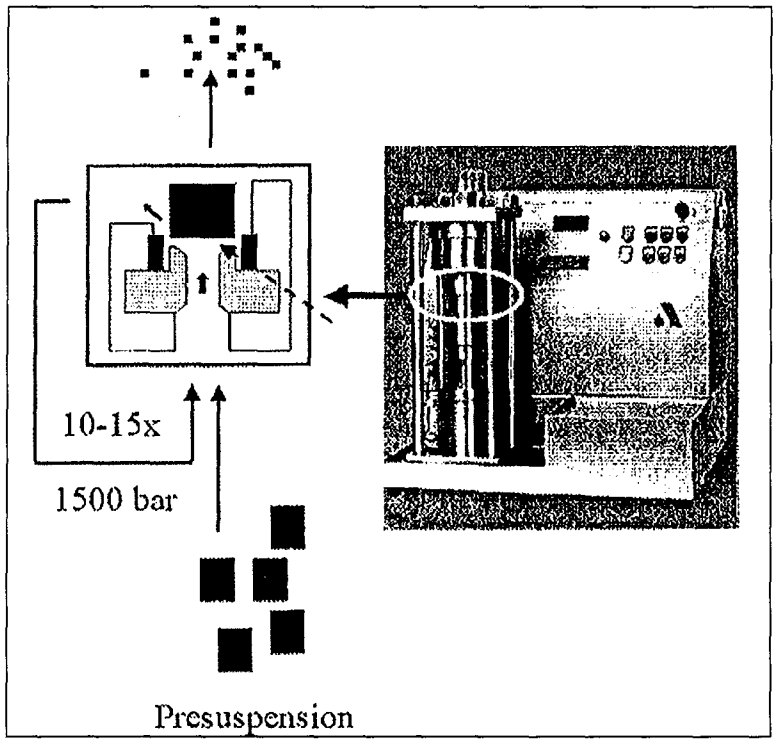


FIG.7 — Représentation schématique du principe de l'homogénéisation à haute pression (Technique 'Disso cubes') (Müller et coll., 2001)

3. Les cyclodextrines

3.1. Historique

Les cyclodextrines (CD) constituent une famille d'oligosaccharides cycliques composés de sous unités glucopyranose liées en α-(1,4). Ces produits naturels résultant de la dégradation enzymatique de l'amidon par une souche de microorganismes ont été découverts pour la première fois par Villiers en 1891 (Villiers, 1891). Vingt ans plus tard, Schardinger a identifié la souche microbienne responsable de la formation de ces cellulosines qu'il dénomme *Bacillus macerans* et il a décrit également le mode de préparation et de purification de ces oligosaccharides qui sont désignés aussi sous le nom des sucres de Schardinger (Schardinger et coll., 1903). Au début des années 30, l'équipe de Pringshein, bien qu'en se basant sur des études pouvant être discutées, découvre la capacité de ces dextrines à former des complexes avec divers composés organiques (Pringshein, 1932). Ce n'est qu'en 1938 que Freudenberg et son équipe ont contribué à la connaissance des CD, ont démontré que ces molécules sont constitués d'un enchaînement de n- unités α- D- glucopyranosidiques et postulent que ces produits sont cycliques (Freudenberg et coll., 1938). La propriété des cyclodextrines à former des complexes d'inclusion devient alors le sujet d'études intensives. C'est ainsi que le tout premier brevet est déposé concernant l'application des cyclodextrines pour la mise en forme d'un composé à activité biologique en 1953. A partir de ce moment, on observe une recrudescence de l'étude des cyclodextrines, tant de point de vue de leur fabrication industrielle, que de l'exploitation de leurs propriétés, de leurs modifications chimiques ou bien encore, de leurs domaines d'applications.

3.2. Structure des cyclodextrines

Les plus abondantes sont celles constituées de six (α-CD), sept (β-CD) (figure 8) et huit (γ-CD) unités glucose. La configuration moléculaire tridimensionnelle la plus stable pour les CD prend la forme d'un tronc de cône (figure 8b), délimitant une cavité en son centre. Cette cavité présentant un environnement carboné apolaire et plutôt hydrophobe (squelette carboné et oxygène en liaison éther), est capable d'accueillir des molécules peu hydrosolubles, tandis que l'extérieur de la CD présente de nombreux groupements hydroxyles, conduisant à une bonne solubilité. Les différents diamètres et volumes des cavités

reflètent le nombre de molécules de glucose (tableau 6). Grâce à leur cavité apolaire, les CD sont capables de former des complexes d'inclusion en milieu aqueux avec une grande variété de molécules hôtes hydrophobes (Saenger, 1984). Une ou plusieurs molécules peuvent être encapsulées dans une, deux ou trois cyclodextrines.

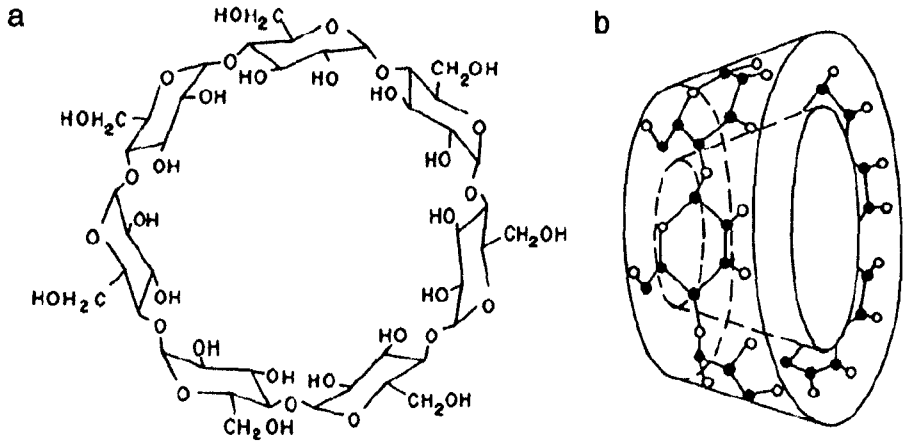


FIG. 8 — Représentation de monomères de la β-CD (a : structure développée, b : structure "tronc de cône") (Uekama et coll., 1998)

Tableau 6 : Propriétés des cyclodextrines naturelles (Frömming et Szejtli, 1994).

CDs	Poids moléculaire	Diamètre de la cavité (Å)	Volume de la cavité (Å^3)	solubilité [a] (% w/v)
α-CD	972	4,7 ~ 5,3	~ 174	14,5
β-CD	1135	6,0 ~ 6,5	~ 262	1,85
γ-CD	1297	7,5 ~ 8,3	~ 427	23,2

a) Solubilité dans l'eau à 25°C.

3.3. Profil pharmacocinétique des cyclodextrines après administration parentérale

Quand les CD sont injectées par voie IV à des rats, elles disparaissent rapidement du plasma et sont essentiellement excrétées dans les urines. La β-cyclodextrine (β-CD) et la 2-hydroxypropylβ-cyclodextrine (2-HPβ-CD) sont retrouvées intactes dans les urines à raison de plus de 95 % de la dose administrée, indiquant une quasi absence de métabolisme (Yamamoto et coll., 1991; Frijlink et coll., 1990). Le volume de distribution (V_d) de la β-CD et la 2- HPβ-CD chez le rat (Frijlink et coll., 1990; Monbaliu et coll., 1990), le lapin (Yamamoto et coll., 1990), le chien (Monbaliu et coll., 1990) et l'homme (Mesens et coll., 1991) correspond bien au volume du liquide extracellulaire de chaque espèce (Davies et Morris, 1993), suggérant qu'aucun compartiment profond n'est impliqué dans le stockage de ces CD. La clairance plasmatique totale (Cl_t) de l'HPβ-CD chez toutes les espèces testées (Mesens et coll., 1991; Frijlink et coll., 1990; Monbaliu et coll., 1990) est similaire à celle de l'inuline, polysaccharide rapidement distribué et excrété totalement par filtration glomérulaire.

3.4. Toxicité des cyclodextrines

Des études plus récentes ont été consacrées à la toxicité de deux CD (la β-CD et la 2-HPβ-CD) après administration intraveineuse ou intramusculaire à des rats (Uekama et coll., 1993). Les résultats suggèrent que ces molécules peuvent être utilisées sans risque dans des formulations parentérales.

Les CD sont capables de provoquer un changement de la forme des érythrocytes chez l'homme et une hémolyse à des doses très élevées. L'activité hémolytique des CD naturelles est reportée dans l'ordre β- > α- > γ-CD (Irie et coll., 1982; Ohtani et coll., 1989). Ces différences sont liées à la capacité de chaque CD à solubiliser les composants de la membrane cellulaire. Le processus de solubilisation se produit sans que la CD entre dans la membrane, contrairement aux détergents. Quand la CD est modifiée chimiquement, ses effets sur les membranes cellulaires peuvent être nettement changés et améliorés (Yoshida et coll., 1988; Yamamoto et coll., 1989). En effet, les dommages provoqués au niveau du tissu musculaire en raison de l'injection de CD ont été comparés à ceux provoqués par le mannitol ou par des

surfactants non ioniques chez le lapin. L'α-CD et la (2,6-di-O-méthyle)-β-CD ont montré une irritation relativement élevée équivalente à celle provoquée par le Tween 80. A l'inverse, la 2-HPβ-CD et les CD sulfatés ne provoquent aucune irritation apparente. Thompson a résumé que les deux meilleures CD pour une utilisation parentérale sont la 2- HPβ-CD et la sulfobutyl-β-CD. (Thompson, 1997). La 2- HPβ-CD est sans danger si elle est administrée par voie parentérale à des modèles animaux et aucun effet secondaire n'a été observé chez l'homme. Rajewski et coll. ont vérifié que la sulfobutyl-β-CD est sans risque, elle aussi quand elle est administrée par voie parentérale à des doses supérieures à 10 g/kg est sans aucun effet toxique chez la souris (Rajewski et coll., 1995). D'autre part, la nephrotoxicité de la β-CD naturelle à des doses élevées est peut être due à la cristallisation de cette CD (solubilité $_{(eau)}$ = 1,85 mg/ml) ou à la formation de complexe avec le cholestérol dans les tissus rénaux, contrairement à l'HPβ-CD à solubilité plus élevée (solubilité $_{(eau)}$ = 500 mg/ml) (Frank et coll., 1976).

3.5. Inclusion -Complexation

3.5.1. Caractérisation des complexes d'inclusion

Les CD sont connues pour leur capacité de former des complexes d'inclusion avec une variété de molécules invitées. La formation de complexes suppose une bonne adéquation entre la taille de la molécule à encapsuler et celle de la cavité de la cyclodextrine. (Arias-Blanco et coll., 1998; Ueda et coll., 1999; Akasaka et coll., 2000; Mura et coll., 1999; Lutka, 2002). L'intérieur de la cavité apporte un micro- environnement lipophile dans lequel peuvent se placer des molécules non polaires. La résultante de cette complexation est la solubilisation de molécules hydrophobes très insolubles dans la phase aqueuse. La principale force provoquant la formation de ces complexes est la stabilisation énergétique du système par le remplacement dans la cavité des molécules d'eau à haute enthalpie par des molécules hydrophobes qui créent des associations apolaires- apolaires. Ces molécules sont en équilibre dynamique entre leur état libre et complexé (Connors, 1997).

Les caractéristiques d'inclusion des CD naturelles sont remarquablement altérées par l'introduction de différents substituants sur les groupements hydroxyles (Szejtli, 1983; Uekama, 1985). En effet, l'inclusion par la diméthyle-β-CD est généralement meilleure que celle avec la β-CD. Cela est dû à l'augmentation de l'espace hydrophobe dans la cavité de la CD modifiée.

3.5.2. Intérêt de la complexation

Les CD jouent un rôle très important dans la formulation de médicaments faiblement solubles dans l'eau par amélioration de leur solubilité et/ou leur dissolution en formant des complexes d'inclusion. Elles peuvent être considérées comme des vecteurs hydrophiles qui facilitent l'accès du principe actif au récepteur naturel. Le taux de dissolution dépend de l'interaction entre la molécule de CD (molécule hôte) et le principe actif (molécule invitée), qui dépend elle-même de la cavité de la CD, de la stœchiométrie et la stabilité du complexe et enfin de l'hydrophobicité de la molécule invitée. Plusieurs travaux ont été réalisés dans ce domaine de recherche dont quelques exemples sont résumés par Challa et coll. (Challa et coll., 2005). Beaucoup de substances actives sont sensibles à la lumière, l'air, la température et le pH. Leur encapsulation dans des CD permet leur protection contre la déshydratation, l'hydrolyse, l'oxydation et la photo décomposition, et donc l'augmentation de leur stabilité (Loftsson et Brewester, 1996). Cette augmentation de stabilité peut être due à l'inhibition de la biotransformation de la molécule invitée *in vivo* dans le site d'absorption (Matsuda et Arima, 1999).

Après avoir cité quelques exemples de vecteurs qui peuvent être utilisés pour vectoriser des molécules thérapeutiques peu hydrosolubles, nous allons présenter les travaux qui ont été fait pour étudier leur distribution tissulaire. Notre recherche s'est limitée à ceux concernant la distribution au niveau de deux organes : la moelle osseuse et le cerveau. Nous avons jugé intéressant de présenter tout d'abord, quelques techniques utilisées actuellement pour la formulation galénique, afin de limiter la précipitation de principe actif dans la circulation systémique après une administration parentérale.

III. Techniques utilisées pour la formulation des principes actifs peu solubles

Pour développer une formulation intraveineuse, le principe actif doit idéalement être soluble dans le milieu aqueux. Dans le cas des principes actifs faiblement solubles, différentes formulations galéniques doivent être réalisées faisant appel aux approches suivantes :

1. Ajustement de pH

Si le principe actif comprend des groupements ionisables, l'ajustement du pH à des valeurs non physiologiques peut parfois augmenter la solubilité du médicament. L'inconvénient majeur de cette approche reste la précipitation de la molécule formulée une fois injectée dans le compartiment sanguin (Nuijen et coll., 2000). Davio et coll. ont étudié la précipitation intravasculaire de l'inhibiteur de la rénine, ditékirène (Pharmacia & Upjohn Co), chez le singe durant 28- 30 jours d'infusion au cours des expériences réalisées pour l'évaluation de la sécurité préclinique du médicament (Davio et coll., 1991). Pour développer la formulation intraveineuse de ce principe actif ainsi que les conditions d'infusion, différentes concentrations de ditékirène sont perfusées à différentes vitesses de perfusion dans une solution tamponnée de Sérum Albumine Bovine (SAB). A partir de cette étude *in vitro*, la dose et la posologie de cette nouvelle formulation intraveineuse ont pu être déterminées.

2. Solutions à base de solvants organiques

L'ajustement du pH des principes actifs faiblement solubles dans l'eau n'est souvent pas suffisant pour permettre une formulation à un pH et/ou à des concentrations appropriés. Dans cette situation, la formulation dans des solvants organiques miscibles à l'eau tels que le polyéthylène glycol (PEG), le propylène glycol (PG), l'éthanol, le diméthylsulfoxide (DMSO) ou le diméthylacetamide peut améliorer la solubilité. Cependant, la précipitation du composé administré dans cette formulation organique ne peut être évitée et doit être toujours prise en considération.

Portmann et Simmons ont décrit une technique microscopique pour déterminer la solubilité d'un médicament dans le plasma et le taux d'injection maximum pour éviter la précipitation des solutions à base de solvants (Portmann et Simmons, 1995). Le but de cette expérience *in vitro* est de prédire si la formulation causerait *in vivo* la précipitation du composé étudié dans le compartiment sanguin. A partir de cette étude, les paramètres qui sembleraient avoir un impact sur la précipitation sont : la solubilité dans le plasma, la dose et le débit plasmatique dans la veine utilisée pour l'injection. Ainsi, le temps d'infusion peut être calculé par l'équation suivante :

$$MIT\ (min) = TD\ (mg) / PS\ (mg/ml) \times VPFR\ (ml/min)$$

Où

MIT : Temps Maximum d'Infusion

TD : Dose Totale

PS : Solubilité dans le Plasma

VPFR : Taux du débit plasmatique veineux

En injectant le produit à des taux d'injection calculés, la précipitation ne peut avoir lieu. Généralement, les formulations à base de solvants organiques miscibles à l'eau doivent être administrées à des vitesses d'injection très faibles pour éviter d'une part la précipitation qui pourrait provoquer une phlébite au niveau du site d'injection. Une administration progressive permet également une fixation aux protéines plasmatiques sans altérer le profil pharmacocinétique intrinsèque du composé étudié (Flynn, 1984 ; Korttila et coll., 1976 ; Jusko et coll., 1973).

3. Utilisation des cyclodextrines

La complexation avec des cyclodextrines représente une alternative importante fréquemment utilisée pour la réalisation de solution injectable de principe actif faiblement soluble dans l'eau (Torres-Labandeira et coll., 1991). L'équipe de Doenicke a mis en évidence une meilleure tolérance de la formulation à base de cyclodextrine par rapport à celle à base de solvants organiques (Doenicke et coll., 1994). Chez des volontaires sains, ces auteurs ont comparé la pharmacocinétique, la pharmacodynamie et l'incidence des effets

secondaires d'un principe actif lipophile (etomidate; log P=2,99) dans deux formulations. L'une dans le PG (35 %) et l'autre dans l'HPβ-CD. La pharmacocinétique et la pharmacodynamie de l'étomidate sont statistiquement similaires pour les deux formulations. Par contre, la fréquence de la douleur et la thrombophlébite au site d'injection ainsi que d'autres effets secondaires après injection intraveineuse sont significativement importants chez le groupe traité par la solution de l'etomidate à base de PG.

En plus de l'amélioration de la tolérance, les cyclodextrines sont souvent qualifiées de meilleurs candidats pour l'amélioration de la biodisponibilité. La zidovudine est une molécule capable de franchir la barrière hémato-encéphalique pour le traitement d'encéphalopathies liées au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Brewster et coll., 1995). Une administration intraveineuse de ce principe actif sous forme de solution de cyclodextrine à des rats entraine une augmentation de sa teneur dans le cerveau par rapport à la solution à base de DMSO. Ces auteurs ont attribué cette différence à la précipitation du composé étudié durant l'injection dans la circulation systémique, un problème qui peut être évité par complexation avec les cyclodextrines.

4. Micro- et nanosuspensions

Récemment, des composés lipophiles ont été formulés en micro- et nanosuspensions (Merisko-Liversidge et coll., 1996 ; Müller et Peters, 1998). En comparaison avec les poudres non micronisées, le taux de dissolution est augmenté par l'homogénéisation et la réduction de la taille des particules de l'ordre de micromètre et de nanomètre (Hörter et Dressman, 1997). L'administration d'un principe actif sous forme de nanosuspensions est beaucoup plus pratique par rapport à celle de la formulation organique par exemple. En effet, dans le cas de formulation organique, le site de précipitation ainsi que la taille des précipités *in vivo* restent difficiles à prédire à partir des expériences *in vitro*. De plus, la formulation sous forme de suspensions est envisageable pour des composés qui sont à la fois peu solubles dans l'eau et dans les solvants organiques. Comme les autres formulations, elle doit être administrée à vitesse faible pour permettre la dissolution des particules dans le compartiment sanguin ainsi que leur distribution tissulaire.

IV. Distribution tissulaire des vecteurs

Après avoir cité les différentes techniques qui peuvent être utilisées pour la formulation galénique des principes peu solubles, nous allons faire une étude bibliographique sur les travaux réalisés préalablement par les chercheurs pour comprendre les mécanismes de passage de certains vecteurs à travers les barrières biologiques. Nous nous sommes contentés au passage à travers deux organes : la moelle osseuse et le cerveau, l'un constitue le site d'action du mélarsoprol dans le traitement des leucémies et l'autre son site d'action dans le traitement des trypanosomiases.

A. Distribution au niveau de la moelle osseuse

Le passage des molécules thérapeutiques est gouverné par la barrière qui existe entre la circulation sanguine et le parenchyme médullaire. Nous allons donc faire un rappel sur la physiologie de cette barrière et son rôle dans le contrôle du passage cellulaire vers la moelle osseuse.

1. La barrière hémato-médullaire (BHM)

1.1. Physiologie de la BHM

La moelle osseuse est composée de deux éléments principaux :

- les cellules sanguines,
- le parenchyme médullaire composé de cellules endothéliales, de cellules réticulaires phagocytaires ou non, de macrophages, de fibroblastes, d'adipocytes et d'éléments non cellulaires comme des fibres de collagène. L'ensemble forme un réseau dense (figure 9), favorable à la multiplication et à la différenciation des précurseurs hématopoïétiques (Shirota, 1994).

La circulation sanguine générale est séparée du compartiment médullaire extravasculaire par un endothélium. La structure de cet endothélium doit permettre le passage de cellules sanguines matures (globules rouges, granulocytes et plaquettes) à travers des sinus veineux, à partir de l'organe de l'hématopoïèse. Cet obstacle, appelé « barrière hémato-médullaire » était d'abord purement théorique (Tavassoli, 1979) et s'est vu confirmé notamment par les progrès de la biologie moléculaire (Shirota, 1994).

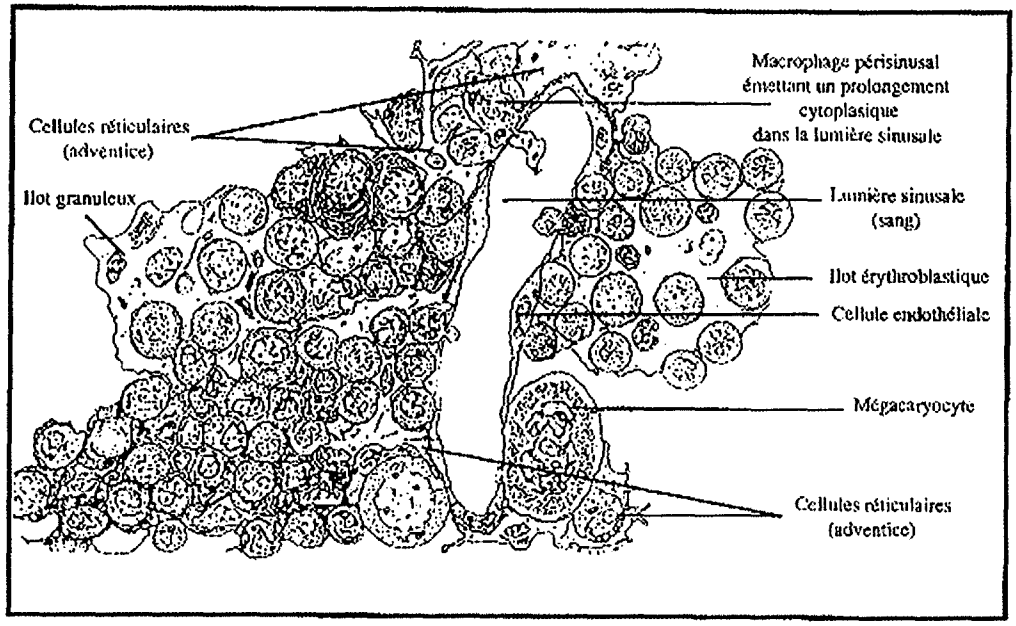


FIG. 9 — Schéma des différentes couches de la barrière hémato-encéphalique (BHM).
La BHM est constituée de trois couches distinctes : une monocouche de cellules endothéliales (côté luminal du sinus veineux), une monocouche discontinue de cellules réticulaires adventices (côté externe) et une membrane basale discontinue située entre les deux monocouches précédentes (Moghimi et coll., 1990).

1.2. Rôle de la BHM

L'un des rôles primordiaux de la barrière hémato-médullaire serait de prévenir le passage prématuré et anormal des précurseurs hématopoïétiques dans la circulation générale, avant leur maturation complète qui, outre une différenciation ultime, leur confère une mobilité et une déformabilité importante (Shirota, 1994). La barrière serait en quelque sorte un gardien du passage cellulaire de la moelle vers le sang et inversement (Moghimi, 1995). En conditions pathologiques, on observe une migration anormale des précurseurs vers le compartiment sanguin central, le plus souvent en conséquence :

- d'un dysfonctionnement de la barrière hémato-médullaire,
- d'une sécrétion excessive de molécules adhésives favorisant la migration.

La BHM ne constitue donc pas seulement un filtre passif à la dissémination des cellules, mais joue un rôle de contrôle par l'intermédiaire d'interleukines[2], de molécules de l'adhésion et de matrices constituées de protéoglycane, fibronectine, laminine et autres lectines ou glycoprotéines (Shirota, 1994). Si la migration de cellules de la moelle vers le sang est le phénomène le plus fréquent, la barrière est également susceptible de permettre le passage inverse du sang vers la moelle, par exemple :

- en conditions physiologiques : des précurseurs, des lymphocytes peuvent revenir dans le compartiment médullaire pour s'y différencier après un temps de passage dans le sang,
- en conditions pathologiques : cette migration « inverse » est retrouvée dans le cas des leucémies,
- en situation thérapeutique : les précurseurs injectés lors de greffes de cellules souches, après administration intraveineuse, viennent se localiser dans la moelle osseuse (Shirota, 1994).

Cette capture médullaire d'éléments de grande taille est une propriété potentiellement exploitable pour la capture médullaire des vecteurs colloïdaux (Moghimi et coll., 1990).

2. La vectorisation médullaire

2.1. Historique de la vectorisation médullaire

Dès 1963, Hudson et Yoffey étudient la capture de colloïdes par la moelle osseuse après administration intraveineuse de particules de charbon de 25 nm de diamètre chez le cochon d'Inde (Moghimi et coll., 1990). Les particules ont été retrouvées au niveau :

- du parenchyme après 15 minutes,
- des macrophages périsinusaux après 30 minutes,
- des macrophages des îlots érythroblastiques après 60 minutes.

[2]Interleukines : substances solubles de communication synthétisées par les cellules du système immunitaire.

Selon ces auteurs, la migration des particules a été rendue possible par passage transcellulaire (pores fenêtrés) et intracellulaire (formation de vésicules intraendothéliales créant ainsi un canal) (Moghimi et coll., 1990). En 1971, Huang démontre que le mécanisme de passage est fonction de la taille des particules (Moghimi et coll., 1990). Dans les années 1980, l'équipe de Yoshida met l'accent sur les différences quantitatives mais également qualitatives inter espèces concernant les cellules endothéliales. Elle montre par ailleurs, chez le rat, que les particules de diamètre inférieur à 110 nm sont capturées par la moelle, tandis que les autres sont complètement ignorées. Selon Moghimi, Le seuil de capture se situerait à 2,07 µm chez le lapin, les particules de taille inférieures à 300 nm étant séquestrées par endocytose, tandis que les plus grandes le seraient par formation de larges vésicules de pinocytose (Moghimi et coll., 1990).

Moghimi et son équipe précisent qu'il est important de noter que le débit sanguin médullaire peut subir d'énormes variations chez l'animal sain, notamment selon son âge. En conditions pathologiques, les caractéristiques de la moelle peuvent en outre être modifiées : une diminution du nombre de sinus, une altération de la couche endothéliale et une réduction du nombre de cellules adventices ont pu être observées chez le rat dans le modèle de leucémie aiguë myéloïde Shay (Moghimi et coll., 1990). Ainsi, les propriétés et donc le passage à travers la barrière hémato-médullaire peuvent être largement modifiées en situation pathologique.

2.2. Le ciblage médullaire par les nanoparticules

Il existe dans la nature des exemples de la capture médullaire spécifique : c'est le cas du passage transcellulaire physiologique de lymphocytes circulants ou de précurseurs hématopoïétiques (phénomène de « homing ») ou encore de la migration pathologique spécifique de cellules cancéreuses métastasiques (Moghimi et coll., 1990). Des stratégies de vectorisation auraient pu s'en inspirer. L'équipe de P. Couvreur a étudié la capture, la localisation et la rétention dans la moelle osseuse et dans la rate des nanoparticules de la dauxorubicine à base de poly (isohexylcyanoacrylate) ainsi que des nanoparticules fluorescentes, après administration intraveineuse chez la souris (Gibaud et coll., 1996).

Cette étude a montré que les nanoparticules après passage rapide à travers l'endothélium sont dispersées au niveau de la moelle osseuse et capturées par les cellules phagocytaires (cellules granuleuses matures et macrophages). Cette capture n'est pas restreinte à des zones particulières, ni à certains types de phagocytes. Au niveau de la rate, les nanoparticules sont surtout localisées dans les macrophages de la zone marginale des follicules lymphoïdes (Gibaud et coll., 1996).

2.2.1. Aspects pharmacocinétiques des vecteurs passifs

Après administration intraveineuse, les vecteurs passifs sont rapidement captés par les cellules du Système des Phagocytes mononuclées (SPM) (Allemann et coll., 1993; Puisieux et Roblot-Treupel, 1989; Kreuter, 1994) :

- Les macrophages du foie (cellules de Küpffer) sont responsables de la capture de 60 à 90% des vecteurs administrés. En effet, en raison du flux sanguin hépatique élevé, de la structure discontinue de son endothélium, de la forte proportion de cellules macrophagiques, le foie est l'organe de capture privilégié.
- Les macrophages de la rate sont responsables de 2 à 20 % de la capture.

Dans une moindre mesure, on retrouve également des cellules mononucléaires phagocytaires dans les poumons (taux de capture de 0,7 à 3 %) et dans la moelle osseuse où 0,05 à 1 % des vecteurs sont retrouvés. Seulement, 1 % de la dose injectée demeure généralement dans le compartiment sanguin après 15-30 minutes.

Par ailleurs, les vecteurs sont incapables de franchir la paroi des vaisseaux, sauf si ceux-ci sont pourvus d'un endothélium discontinu. L'accès *in vivo* des vecteurs semble donc limité essentiellement aux macrophages du SPM et à certains parenchymes. La distribution du vecteur est un préalable indispensable, mais il est important que le principe actif ne soit pas libéré avant d'atteindre son organe cible.

2.2.2. Modulation de la biodistribution en faveur d'une capture médullaire

Les recherches en matière de vectorisation se sont orientées vers deux approches afin de favoriser la capture par la moelle : diminution de la taille des vecteurs d'une part, et modifications physico-chimiques de la surface des ces vecteurs d'autre part (Moghimi et coll., 1990).

2.2.1.1. Modification de la taille des vecteurs

La première caractéristique qu'il est possible de moduler est la taille de vecteur : en dessous de 100 nm, la concentration médullaire est améliorée, sauf chez le lapin (Moghimi et coll., 1990). Dans le domaine des médicaments radio pharmaceutiques, certains auteurs ont même proposé des particules de 1 à 13 nm (Moghimi et coll., 1990). La diminution de la taille possède une certaine efficacité quant à la concentration dans le compartiment médullaire. Cependant, cette diminution de la taille engendre souvent un taux d'encapsulation limité.
De plus, on peut craindre une distribution intrahépatique dès 60 nm *in vivo*, voire une extravasation cutanée ou intestinale (Moghimi et coll., 1990).

2.2.1.2. Modification des propriétés de surface

De nombreux travaux montrent l'importance de la stabilisation stérique de surface. Dès 1987, Illum et Davis étudient l'influence des poloxamers (tableau 7) sur la capture médullaire des vecteurs chez le lapin. Des études *in vivo* ont montré que la présence de poloxamers 338 et 407 à la surface des particules réduisait leur accumulation hépatique (Illum et Davis, 1987). Cependant, le poloxamer 407 s'est révélé être plus efficace en terme de spécificité médullaire que le poloxamer 338 (Porter et coll., 1992b; Storm et coll., 1995). Le mécanisme de cette reconnaissance spécifique est encore mal connu. Il semblerait néanmoins que le poloxamer 407 entraîne une capture massive et sélective des vecteurs par les sinus endothéliaux (capture par les cellules endothéliales par endocytose), tandis que les autres zones endothéliales et les macrophages péri-sinusaux leur demeurent indifférents (Moghimi, 1995). Dès 1992, les études de Porter et ses coll. suggèrent que la barrière stérique créée empêcherait la phagocytose directe par les macrophages à partir de la circulation générale.

Aucune particule n'étant retrouvée dans le compartiment extravasculaire médullaire, le phénomène de reconnaissance par l'endothélium pourrait être dû à un composé plasmatique ou à un facteur endothélial sélectif et spécifique (Porter et coll., 1992b; Dunn et coll., 1997). Parallèlement, il a été montré qu'une augmentation significative de la capture médullaire pouvait être obtenue après injection de particules recouvertes de poloxamer 184 (Storm et coll., 1995). Il est important de noter que la distribution préférentielle vers la moelle serait dépendante du lot de poloxamer 407 utilisé ainsi que du fournisseur choisi et de l'espèce animale servant de modèle (Moghimi et coll., 1990; Porter et coll., 1992a; Storm et coll., 1995). L'équipe de Porter a évoqué l'influence d'une possible différence de poids moléculaire, donc d'épaisseur de la couche hydrophile.

Tableau 7: Poids moléculaire et balance hydrophilique/lipophilique (BHL) de quelques poloxamers et leur nomenclature Pluronic (Müller, 1991)

poloxamer®	Pluronic®	Poids moléculaire	Nombre des unités OE	Nombre des unités OP	BHL
108	F38	5000	46	16	30,5
188	F68	8350	75	30	29
338	F108	14000	128	54	27
407	F127	11500	98	67	22

Les poloxamers sont des résidus hydrophiles efficaces. Le recouvrement par les poloxamers met généralement en jeu une adsorption physique via la partie centrale hydrophobe de ses copolymères (OP). OP : oxyde de propylène, OE : oxyde d'éthylène

3. Rôle et place des cyclodextrines dans la distribution médullaire

A notre connaissance, il n'existe pas d'étude précise visant à apprécier les effets des cyclodextrines sur la distribution de médicaments au niveau de la moelle osseuse. Toutefois, il existe quelques exemples d'utilisation de cyclodextrines pour améliorer la biodistribution de certains agents antileucémiques utilisés pour le traitement de leucémie.

L'équipe de Lin a développé une formulation hydrosoluble à base d'un complexe l'HPβ-C/acide tout *trans*-rétinoïque (ATRA), dans le traitement de la leucémie promyélocytaire aigue (Lin et coll., 2000). Dans cette étude, la formulation a été testée sur des rats sains et a été comparée à la solution d'ATRA sodique. Il a été démontré qu'il n'y pas de différence significative de la pharmacocinétique entre les deux formulations. Ce phénomène a été expliqué par une faible affinité entre le principe actif et la CD étudiée (Montassier et coll., 1997). Une étude clinique a montré que la pharmacocinétique de l'itraconazole dans une solution de cyclodextrine était différente de celle obtenue après administration de gélules chez des volontaires. En effet, la concentration plasmatique maximale (Cmax) et l'aire sous la courbe (ASC) sont plus élevées quand l'itraconazole est injecté sous forme de complexe avec l'HPβ-CD.

B. Distribution au niveau du cerveau

Le passage des molécules thérapeutiques au niveau du système nerveux central est sous le contrôle d'une barrière qui existe entre le système vasculaire et le parenchyme cérébral appelée barrière hémato-encéphalique. Nous ferons un bref rappel de la physiologie et le rôle de cette barrière.

1. La barrière hémato-encéphalique (BHE)

1.1. Données historiques

La notion de la barrière hémato-encéphalique (BHE) a été évoquée pour la première fois par P. Ehrlich en 1885 qui après avoir observé, suite à une injection intraveineuse de colorants aniliques, une coloration de tous les organes à l'exception du système nerveux central. Il a alors supposé que cette différence était liée à des affinités de fixation différentes. L'existence d'une barrière au niveau des vaisseaux a été confirmée par Biedl et Kraus en 1898 et Lewandowsky en 1900. Ces auteurs ont constaté que l'acide cholique ou le ferrocyanure de sodium avaient des effets sur le système nerveux lorsque ces substances étaient administrées par injection intraventriculaire cérébrale alors qu'elles n'avaient aucun effet lors d'une injection intraveineuse. Enfin, l'existence d'une barrière entre le sang et le cerveau a également été étudiée par Goldmann en 1909 en reproduisant les expériences de Ehrlich avec du bleu de Trypan. Cet auteur a montré que seul le système nerveux central était coloré lors d'une injection sous-arachnoïdienne. Le terme de barrière hémato-encéphalique sera introduit en 1921 par Stern et Gaultier.

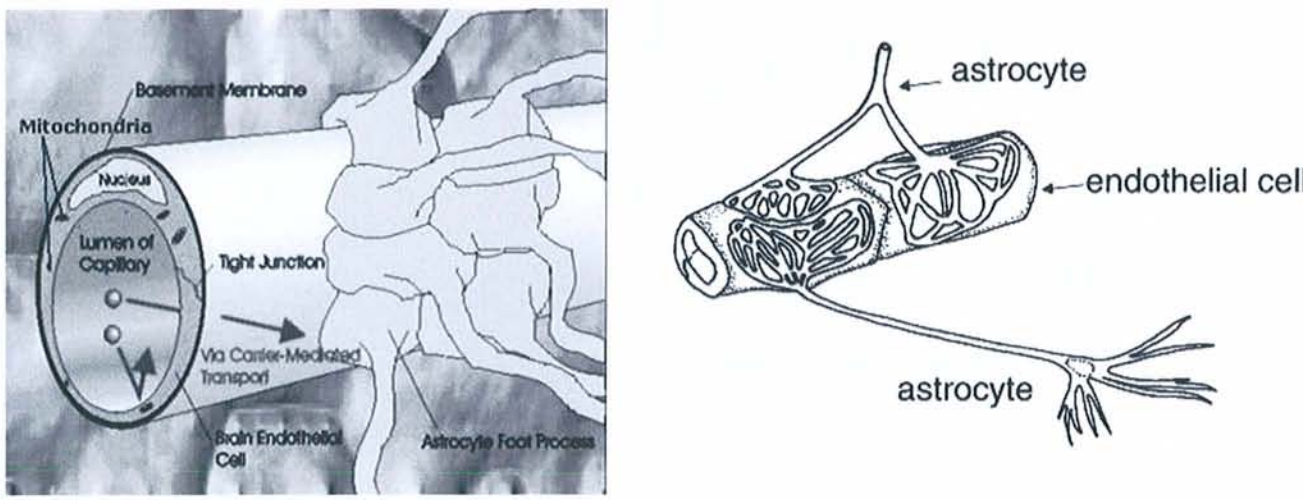
1.2. Propriétés de la BHE

1.2.1. Morphologie et anatomie de la BHE

Les capillaires représentent une interface privilégiée où s'effectuent les échanges rapides entre le sang et le liquide extracellulaire du parenchyme cérébral. Cette interface, nommée barrière hémato-encéphalique (figure 10), est un système biologique complexe

composé de cellules endothéliales, de péricytes et d'astrocytes qui déterminent les caractéristiques physiologiques et l'ultrastructure. Les péricytes, localisées sur la face abluminale des microvaisseaux, sont séparées des cellules endothéliales et des astrocytes par une membrane basale (Balabanov et Dore-Duffy, 1998). Elles projettent des extensions qui pénètrent cette membrane et recouvrent 20 à 30 % de la circonférence vasculaire (Frank et coll., 1987). Morphologiquement, le contact entre les péricytes et les cellules endothéliales est fait de prolongements membranaires provenant des deux types cellulaires (Wakui et coll., 1990). De plus, l'échange de molécules entre péricytes et cellules endothéliales est facilité par la présence de jonctions lacunaires entre les deux types cellulaires (Cuevas et coll., 1984). Les astrocytes, quant à eux, projettent également des extensions cytoplasmiques, appelées « pied », vers les cellules endothéliales. Une reconstitution tridimensionnelle des pieds terminaux astrocytaires montre qu'ils ont une structure caractéristique en rosette et qu'un seul astrocyte peut entrer en contact avec plusieurs cellules endothéliales ou qu'une seule cellule endothéliale peut être atteinte par plusieurs astrocytes (Kacem et coll., 1998). Finalement, les cellules endothéliales forment une monocouche continue autour de la lumière des capillaires. Ces cellules possèdent peu de vésicules d'endocytose, limitant ainsi le flux transcellulaire, et sont associées par des jonctions étanches qui diminuent considérablement le flux paracellulaire et transforment l'endothélium vasculaire en une interface unique entre le sang circulant et l'espace extracellulaire cérébral (Rubin et Staddon, 1999; Saunders et coll., 1999).

Enfin, la BHE joue un rôle primordial dans la protection du parenchyme cérébral, ainsi que dans le contrôle de l'homéostasie tissulaire, grâce à une perméabilité sélective aux nutriments et aux autres molécules apportées par le flux sanguin.



a) b)

FIG. 10 — La BHE. a) Représentation morphologique schématique de la BHE. La membrane des capillaires cérébraux se caractérisent notamment par la présence des jonctions serrées (tight junctions) entre les cellules endothéliales constituant la membrane du microvaisseau mais aussi par l'absence de fenestration dans cette membrane, ce qui limite drastiquement les échanges entre le sang et le cerveau. b) Représentation schématique du contact entre cellules endothéliales et astrocytes (@BBB).

1.2.2. Passage à travers la BHE

En conditions normales, la BHE assure au cerveau un environnement extracellulaire extrêmement contrôlé en limitant les voies de transport des molécules aux seuls passages à travers les cellules endothéliales. Le franchissement passif d'une molécule est dépendant de sa solubilité dans les lipides, de son poids moléculaire et de sa forme ionisée ou non. Ainsi, les molécules lipophiles pourraient diffuser librement (Saunders et coll., 1999). Au contraire les molécules de faible solubilité lipidique sont généralement exclues si elles excèdent un poids moléculaire de 5 kD. Enfin, les substances hydrophiles telles que les ions, les protéines et les glucides ne peuvent franchir la BHE par simple diffusion. Le cerveau a donc dû développer des systèmes de transport spécialisés pour assurer son approvisionnement en éléments nutritifs. Le passage des molécules à travers la BHE peut s'effectuer de 4 façons : par une diffusion passive, par une diffusion facilitée, par un transport actif ou par endocytose. Bien que certains systèmes permettent le transport de molécules contre un gradient de concentration (Na^+/K^+ ATPase), ils sont préférentiellement situés sur la face abluminale des microcapillaires cérébraux (Sanchez et coll., 1995). Les systèmes de transport situés sur la face luminale semblent être de préférence des systèmes de transport facilité.

2. Quelques stratégies pour faciliter le passage des médicaments à travers la BHE

Les propriétés de la BHE seraient responsables des difficultés rencontrées lors du traitement des maladies cérébrales. Le passage des médicaments à travers cette barrière est souvent un facteur qui limite l'action des agents thérapeutiques sur le système nerveux central. Le ciblage des médicaments représente donc un important défi pour le traitement des maladies neurodégénératives et des infections cérébrales. La limitation du ciblage cérébral est essentiellement due à deux propriétés fondamentales de la BHE :

- L'endothélium constitue une véritable barrière avec présence des jonctions serrées
- La présence d'une P-glycoprotéine (Pgp) est responsable de l'excrétion de nombreux médicaments hydrophobes hors du cytoplasme des cellules endothéliales.

La diffusion des agents thérapeutiques du compartiment sanguin vers le cerveau dépend de leur capacité à traverser les lipides de la membrane des cellules endothéliales. Cependant, beaucoup de principes actifs ne possèdent pas les caractéristiques physicochimiques adéquates, comme une liposolubilité élevée, une taille moléculaire faible et une charge positive. C'est la raison pour laquelle différentes stratégies ont été développées.

2.1. Utilisation des nanoparticules

Des études réalisées par Kreuter et coll. ont envisagé la fixation d'un peptide opioïde, la dalargine (Kreuter et coll., 1995 ; Schroeder et coll., 1998) et de lopéramide (Alyautdin et coll., 1997) sur des nanoparticules polymériques dans le but de cibler le cerveau. Ces deux principes actifs n'ont aucun effet thérapeutique s'ils sont administrés seuls par voie intraveineuse, car ils ne diffusent pas à travers la BHE. Quand les deux molécules sont adsorbées sur la surface des nanoparticules de poly (butylcyanoacrylate) (PBCA) préalablement recouvertes de Polysorbate 80, un effet analgésique important est obtenu avant 45 min au maximum après administration. Des expériences sur des souris ont clairement montré que l'effet analgésique de la dalargine est obtenu seulement quand le principe actif est adsorbé. Tandis qu'aucune réponse n'est obtenue avec le mélange de dalargine et de nanoparticules de (PBCA) non chargées. L'amélioration du transport de ce médicament à travers la BHE par les nanoparticules peut être expliquée par différents mécanismes :

- l'attachement des nanoparticules sur la couche endothéliale des capillaires cérébraux provoquerait un gradient de concentration du médicament qui faciliterait la diffusion passive (Kreuter et coll., 1995)
- la pénétration des nanoparticules chargées de médicament dans les cellules endothéliales cérébrales se ferait par endocytose ou transcytose (Kreuter et coll., 1995).

D'autres travaux ont montré que des apolipoprotéines (APO) seraient impliquées dans la pénétration des nanoparticules de PBCA recouvertes de polysorbate 80 dans le cerveau (Kreuter et coll., 2002). Cette étude a été réalisée en utilisant des nanoparticules de PBCA chargées de dalargine ou de loperamide et recouvertes d'APO-A, B, C, E ou J avec ou sans polysorbate 80. L'effet analgésique est mesuré par le réflexe de la souris suite à un pincement de la queue. Dans ces conditions, seulement les nanoparticules recouvertes de polysorbate 80 et/ ou des APO-B ou E sont capables de donner un effet analgésique. Cette réponse est significativement plus importante dans le cas de nanoparticules recouvertes en premier de polysorbate 80 et de APO-B ou APO-E en second. Les auteurs de cette étude n'ont observé aucun effet après injection des nanoparticules recouvertes des autres APO. Tous ces résultats montrent que le polysorbate 80 pourrait être considéré comme un point d'ancrage pour les APO-B et les APO-E à la surface des nanoparticules qui seraient capables d'interagir avec les récepteurs LDL[3], avant leur pénétration dans les cellules endothéliales par endocytose (Borchard et coll., 1994 ; Kreuter et coll., 1995 ; Alyaudtin et coll., 2001). Le médicament pourrait donc être libéré dans ces cellules et diffuserait dans le reste du cerveau.

2.2. Autres méthodes

L'ouverture transitoire de la BHE par injection intracarotidienne de solutions hypertoniques de mannitol ou d'arabinose a été envisagée (Rapoport, 2000). Ces solutions ont été employées avec succès dans le traitement de tumeurs et permettent la création de pores entre les cellules endothéliales de l'ordre de 200Å (Rapoport, 2000). Cette technique a été utilisée pour la première fois par Neuwelt chez l'homme depuis 1979 (Neuwelt et coll., 1979). L'utilisation de peptides chimériques est une seconde approche. Ces chimères correspondraient à l'association de molécule potentiellement active à un vecteur reconnu par les systèmes de transport de la BHE comme par exemple l'anticorps monoclonal OX26 qui reconnaît le récepteur de la transferrine (Bickel et coll., 2001). Une fois passée la BHE, l'accumulation des substances dans le parenchyme cérébral est toutefois limitée par leur diffusion passive dans le fluide cérébrospinal, leur dégradation enzymatique et leur extraction hors du cerveau par des transporteurs divers.

[3]Low Density Lipoprotein

3. Mécanismes impliqués dans le transport des nanoparticules

Il y a différentes possibilités qui permettent d'expliquer le mécanisme de ciblage des médicaments à travers la BHE (Kreuter, 2001 ; Kreuter, 2002) :

- Une rétention des nanoparticules dans les capillaires sanguins cérébraux combinée à l'adsorption de celles-ci sur la paroi des capillaires pourrait créer un gradient de concentration élevé et favoriser le transport à travers la couche des cellules endothéliales.
- Le surfactant pourrait permettre la solubilisation des lipides membranaires des cellules endothéliales et provoquerait une amélioration de la perméabilité de la BHE.
- Les nanoparticules peuvent provoquer une ouverture au niveau des jonctions serrées entre les cellules endothéliales. Le principe actif peut ensuite passer entre ces espaces soit sous forme libre ou encapsulé dans les nanoparticules.
- La libération du principe actif à l'intérieur des cellules endothéliales pourrait être assurée par endocytose des nanoparticules par ces cellules.
- Les nanoparticules pourraient passer à travers les cellules endothéliales par transcytose
- Le surfactant utilisé tel que le polysorbate 80 inhiberait la Pgp.

Toutes ces hypothèses soulèvent différentes constations :

- L'adsorption de l'APO E n'est pas spécifique pour les surfaces recouvertes par le polysorbate 80 car elle peut se fixer sur des nanoparticules PEG-PLA (Allemann et coll., 1997 ; Gref et coll., 2000).
- Les nanoparticules à base de poly (methylmethacrylate) recouvertes de polysorbate 80 ne sont pas distribuées au cerveau après injection intraveineuse (Lode et coll., 2001).
- Des nanoparticules de polystyrène recouvertes de polysorbate 80 ne permettent pas le ciblage cérébral de la dalargine (Olivier et coll., 1999).

- La pharmacocinétique des nanoparticules recouvertes de polysorbate 80 n'est pas favorable pour une distribution cérébrale suite à une accumulation dans le Système des Phagocytes Mononuclées (SPM) tels que le foie et la rate (Lode et coll., 2001).
- La compétition entre le polysorbate 80 et les protéines sériques ainsi que la dégradation rapide des nanoparticules à l'interface serum/plasma induisent la désorption des composés adsorbés à la surface des nanoparticules PBCA au bout de quelques minutes (Olivier et coll., 1999 ; Olivier et coll., 1996).

Ainsi, le passage à travers la BHE des nanoparticules serait un transport non spécifique vis-à-vis du polymère ou du surfactant utilisé (Olivier et coll., 1999). En effet, les faits cités au dessus indiquent que les particules à différentes propriétés de surface peuvent libérer le principe actif selon des mécanismes très variables.

En conclusion, différents mécanismes peuvent être impliqués dans l'interaction entre les nanoparticules et la BHE dépendant des propriétés de surface de ces formes galéniques. La fixation des protéines plasmatiques est influencée par la nature de tous les constituants de la surface des nanoparticules, y compris le principe actif lui même.

Le rôle de surfactant utilisé

Récemment, Petri et coll. (Petri et coll., 2007) ont montré que des nanoparticules PBCA de dauxorubicine recouvertes de poloxamer 188 (Pluronic® F68) ainsi que celles recouvertes de polysorbate 80 (Ps80) augmenteraient nettement l'effet antitumoral de la dauxorubicine contre le glioblastome intracrânien chez le rat. Le rôle de surfactant utilisé semble ambigu : d'autres auteurs (Ambruosi et coll., 2006) ont comparé l'effet antitumoral de nanoparticules PBCA chargées de dauxorubicine et recouvertes de Ps80, de poloxamine 908 ou de poloxamer 188. Le Ps80 est présumé être susceptible de faciliter le passage des nanoparticules à travers la BHE par phénomène d'endocytose (Steiniger et coll., 2004; Kreuter et coll., 2002; Ramge et coll., 2000; Alyautdin et coll., 2001), tandis que la poloxamine 908 est connue (Moghimi et Hunter, 2000) comme un agent furtif qui diminuerait la capture de ces particules par le foie et prolongerait leur circulation sanguine, ce qui permettrait d'atteindre le site tumoral. En même temps, le poloxamer 188 qui ne semble pas être un agent furtif (Moghimi, 1995) d'autant plus qu'un surfactant qui peut couvrir

efficacement les nanoparticules de PBCA chargées en dalargine, il a aucun effet sur le passage de ce principe actif à travers la BHE, tandis que le Ps80 se montre très efficace dans ce cas (Kreuter et coll., 1997).

L'équipe de Petri a souligné que l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface des nanoparticules PBCA de dauxorubicine recouvertes de Ps80 ou de F68 était similaire. Par contre, les nanoparticules non chargées recouvertes des mêmes surfactants présentaient à leur surface des protéines plasmatiques différentes par rapport à celles chargées (Petri et coll., 2007). Cette observation suggère que les propriétés de surface des nanoparticules peuvent être influencées non seulement par le type de surfactant adsorbé mais aussi par le principe actif présent à la surface. Cela rejoint les travaux de l'équipe de Kreuter concernant les nanoparticules de dalargine (Kreuter et coll., 1997). De plus, des nanoparticules PBCA de dauxorubicine stabilisées et recouvertes par les deux surfactants en même temps (Ps80 et F68) ont montré un effet négatif diminuant nettement l'activité antitumorale. Les propriétés de surface de ces particules se trouvent changées énormément altérant significativement l'interaction avec les protéines plasmatiques et par conséquent la distribution tissulaire.

4. Effet des cyclodextrines sur le transport à travers la BHE

L'équipe de Löscher (Löscher et coll., 1995) a montré qu'une formulation aqueuse injectable de carbamazepine (CBZ), médicament antiépileptique, par complexation avec l'HPβ-CD est très pratique et mieux tolérée que la formulation commercialisée à base de glycofurol chez le chien. Ces résultats ont mis l'accent sur le fait que la solution injectable de CBZ/HPβ-CD pourrait être idéalement utilisée et adaptée à l'administration parentérale de ce principe actif qui pénètre rapidement dans le cerveau. D'autre part, l'administration de zidovudine (médicament antirétroviral utilisé dans le traitement des encéphalopathies causées par le virus HIV) sous forme de formulation aqueuse à base de l'HPβ-CD, augmente sa pénétration et sa distribution dans le cerveau (Brewster et coll., 1997).

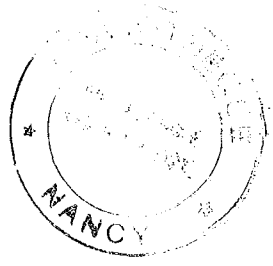
Cependant, l'effet des CD sur la biodistribution des agents thérapeutiques semble être différent d'un principe actif à l'autre. En effet, l'étude de l'influence de l'α, la β et la γ-CD sur l'effet hypnotique des acides barbituriques a montré que ces CD provoqueraient une diminution de la teneur de ces principes actifs au niveau du cerveau après administration intraveineuse et intra péritonéale chez le rat et la souris (Nagai et coll., 1983). Shirakura et ses collaborateurs (Shirakura et coll., 1984) ont mis en évidence le même effet de CD (β-CD) sur la biodistribution de l'hexobarbital et le phénobarbital après injection intraveineuse chez la souris.

Donc, l'effet des CD sur le transport et le passage des molécules thérapeutiques au niveau du cerveau semble dépendre essentiellement du principe actif encapsulé et son interaction avec la molécule de CD.

V. Conclusion

En conclusion, rappelons que le mélarsoprol est un trypanocide très lipophile qui est administré par voie intraveineuse sous forme de solution à 3,6 % de propylène glycol (Arsobal®). Ce médicament reste le seul traitement actuel de la trypanosomiase africaine, malgré ses effets secondaires importants dont le plus redoutable est l'encéphalopathie par passage de la barrière hémato-encéphalique. Les principaux travaux réalisés à son sujet ont permis de donner un autre intérêt à son application notamment pour le traitement des leucémies réfractaires et le myélome multiple. Il s'est montré plus efficace que le trioxyde d'arsenic qui est préconisé pour le traitement de leucémie promyélocytaire aigue depuis l'an 2000 (Trisenox®). Ce résultat prometteur a incité l'Assistance Publique de Paris à lancer un essai clinique qui a été aussitôt arrêté à cause de la toxicité cérébrale de cet antiparasitaire. Compte tenu du rapport efficacité/toxicité du mélarsoprol, la vectorisation médullaire de ce principe actif est vivement souhaitée pour le traitement des hémopathies malignes.

Dans le domaine de la vectorisation des principes actifs peu solubles, plusieurs vecteurs et techniques sont proposés pour l'amélioration et l'optimisation galénique. Parmi ces formulations, sont retenues celles qui empêcheraient la précipitation dans la circulation systémique après administration parentérale et qui permettraient le ciblage du site d'action. Un ciblage de la moelle osseuse et une diminution de la teneur du mélarsoprol dans le cerveau sont recherchées lors de ce travail.


NANCY

I. Formulation galénique

Chapitre I : Mise au point des nanosphères et des nanocapsules des phényldithiarsolanes synthétisés au sein du laboratoire

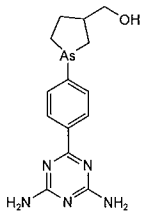
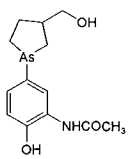
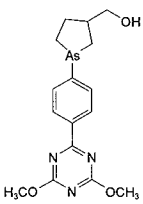
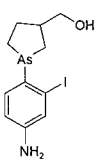
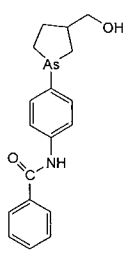
Le premier objectif de notre travail a été de mettre au point des nanoparticules polymériques chargées en mélarsoprol. En effet, il avait été démontré que des nanoparticules en poly (isohexylcyanoacrylate) permettaient de cibler de façon très significative la moelle osseuse (Gibaud et coll., 1996). Quelques essais de formulations avaient déjà été réalisés mais les nanoparticules de poly (alkylcyanoacrylate) obtenues avaient des taux de fixation relativement faibles (Goisnard, 1999). Parallèlement, notre équipe (EA 3452) a synthétisé une série de phényldithiarsolanes, dont certains étaient plus solubles que le mélarsoprol dans les principaux solvants organiques utilisés (acétone, éthanol, ..). Dans cette première partie, nous avons donc essayé de mettre au point des nanoparticules de phényldithiarsolanes avec différents polymères.

1. Matières premières

1.1. Phényldithiarsolanes

Le mélarsoprol a été synthétisé dans notre laboratoire selon le procédé décrit par Friedheim et coll. (Friedheim, 1947; Peters et coll., 1947). Dans le but de mettre au point une nouvelle classe d'organoarséniés (As^{III}) possédant une meilleure activité antileucémique et mieux tolérés que le mélarsoprol, une série de dérivés du 2-phényl-[1,3,2]dithiarsolane substitués en différentes positions a été synthétisée (tableau 1). Tous ces composés sont nommés par des codes $As_{(x)}$ et ont ensuite été analysés par Résonance Magnétique Nucléaire (400, 133 MHz ; 300K ; DMSO-d^6) (Astier et Gibaud, 2003).

Tableau 8 : Paramètres d'activité et de toxicité systémique de différents phényldithiarsolanes synthétisés au laboratoire.

Composé		CI_{50} (µmol/l)		DL_{50} (µmol/kg)	IT	
		K562	U937		K562	U937
	Mélarsoprol (Mel)	2,81	2,77	112	39,9	40,4
	Arsthinol (As_7)	1,44	2,86	402	279,2	140,6
	As_8	0,65	0,53	11	16,9	20,7
	As_{10}	0,44	0,34	60	136,4	176,5
	As_{13}	5,50	6,69	66	12,0	9,9

CI_{50}= concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire ; DL_{50} = dose induisant 50% de mortalité chez la souris ; IT = index thérapeutique DL_{50}/CI_{50}. K562 et U937 : lignées cellulaires leucémiques humaines.

1.2. Les polymères

Nous avons choisi deux polymères biodégradables de la famille des poly (hydroxy acides) :

1.2.1. La poly (ε-caprolactone) (PCL)

La poly (ε-caprolactone) (PCL) (Aldrich Chemical Company), est un polyester aliphatique biodégradable, de la famille des poly (ε-hydroxy acide) (figure 11). Il se présente sous la forme de pastilles de couleur blanche; sa masse moléculaire est de 42000.

$$H\text{-}[O\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CO]_n\text{-}OH$$

FIG. 11 — Formule chimique développée de la PCL

La PCL est un polymère semi cristallin (degré de cristallinité: 45-50 %), relativement rigide ; son point de fusion est de +63°C. En comparaison avec le poly (acide L-lactique) (PLA), la PCL est relativement peu hydrophile. Cette caractéristique devrait être favorable à l'incorporation des organoarséniés.

1.2.2. Le poly (acide L-lactique) (PLA)

Le poly (acide L-lactique) (PLA) (figure 12) fait partie de la famille des polyesters biocompatibles et résorbables en quelques semaines, en plusieurs mois, voire plusieurs années; il est utilisé avec succès depuis plus de 25 ans dans le domaine chirurgical, des implants intra-osseux, pour la régénération tissulaire guidée et la libération retardée de médicaments. Le PLA est résistant à l'humidité mais ne peut supporter des températures élevées (>60°C). Il est semi cristallin; son poids moléculaire est de 25000.

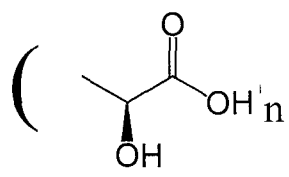


FIG.12 — Formule du poly (acide L-lactique)

1.3. Les agents tensioactifs

1.3.1. Le Pluronic® F68

Le Pluronic® F68 appartient à la famille des Pluriol® PE qui sont des agents tensioactifs non ioniques, peu moussants, obtenus par copolymérisation de l'oxyde de propylène et de l'oxyde d'éthylène. Ce sont des polymères séquencés dont la partie centrale de la molécule est constituée par du polyoxypropylène (figure 13). Le Pluronic® F68 est le Pluriol® PE 6800, appelé aussi poloxamer 188.

$$HO\text{-}(\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})_x\text{-}(\text{-}CH(CH_3)\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})_y\text{-}(\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})_z\text{-}H$$

FIG. 13 — Formule du Pluronic® F68

Le Pluronic® F68, de masse moléculaire moyenne 8500, contient 80 % de polyoxyéthylène et la masse moléculaire approximative de la séquence hydrophobe de polyoxypropylène est de 1750.

1.3.2. L'alcool polyvinylique (PVA)

C'est un polymère préparé à partir d'acétate polyvinylique par déplacement des groupes acétate par des groupes hydroxyles. L'alcool polyvinylique est soluble dans l'eau et utilisé comme agent 'viscosifiant' et tensioactif pour la préparation des nanosphères. Sa masse moléculaire est comprise entre 30000 et 70000.

2. Méthode de préparation des nanosphères et des nanocapsules

2.1. Préparation des nanosphères de poly (ε-caprolactone) et de poly (acide L-lactique)

Le principe de préparation des nanosphères repose sur la méthode de nanoprécipitation de Fessi et coll. (Fessi et coll., 1988) :

Préparation d'une phase organique contenant le polymère et le principe actif

Le PLA ou la PCL sont dissous dans l'acétone (25 mg/ml). Le principe actif (1 mg/ml) est ensuite dissous dans cette phase organique. Dans le cas du mélarsoprol, 50 µl/ml de DMSO sont également ajoutés à la phase organique afin d'obtenir une dissolution totale du principe actif.

Préparation de la phase aqueuse

La phase aqueuse est constituée d'une solution de Pluronic® F68 1 % ou de PVA 0,1 %

Nanoprécipitation

La phase organique est ensuite incorporée goutte à goutte dans la phase aqueuse sous agitation magnétique (550 tours/minutes) (agitateur électronique LMC, Merk, Nogent sur Marne, France). Le polymère, insoluble dans la phase aqueuse, précipite sous forme de nanosphères. La suspension est ensuite concentrée par élimination de l'acétone et d'une partie d'eau dans un évaporateur rotatif (Heidolph® 94200, Bioblock Scientific, Illkirch, France) (figure 14) sous vide. Enfin, la solution est filtrée à travers un filtre en microfibres de verre, afin d'éliminer les gros agrégats.

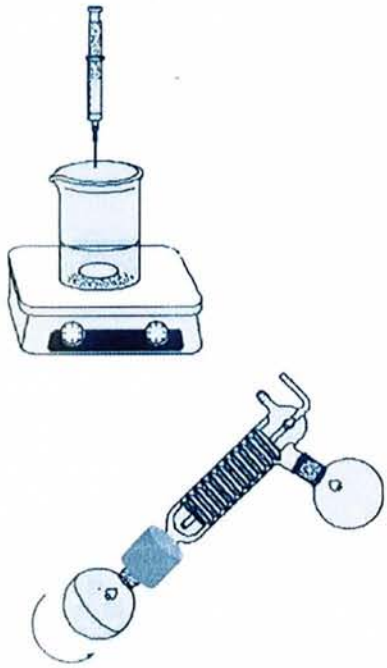


FIG.14 —Représentation schématique des deux étapes de la technique de la nanoprécipitation. En haut : ajout de la phase organique contenant le polymère et le principe actif, à la phase aqueuse contenant le surfactant. En bas : évaporation du solvant (acétone) dans l'évaporateur rotatif.

2.2. Préparation des nanocapsules de poly (ε-caprolactone) et de poly (acide L-lactique)

La méthode consiste à solubiliser le principe actif, le polymère (PLA ou PCL), une substance huileuse (benzylbenzoate, triéthylcitrate,..) et un agent tensioactif (lécithine d'œuf) dans une phase organique. Ce mélange est ajouté sous agitation magnétique à une phase aqueuse. Les nanocapsules se forment par précipitation interfaciale du polymère autour d'une phase huileuse dans laquelle se trouve le principe actif. L'acétone est ensuite éliminée par évaporation sous vide (évaporateur rotatif Heidolph® 94200, Bioblock Scientific, Illkirch, France).

3. Purification des nanoparticules

Les nanosphères et les nanocapsules ont ensuite été passées à travers une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Ultrogel® ACA 54, LKB), reliée à une pompe ayant un débit de 1 ml/min. Les fractions qui contiennent les nanoparticules sont ensuite rassemblées.

4. Contrôle des nanoparticules

De nombreuses techniques peuvent être utilisées pour la caractérisation des nanoparticules. La taille du vecteur ainsi que l'état physique du polymère sont des paramètres importants qui agissent sur les propriétés d'encapsulation du principe actif et sur sa libération. Par ailleurs, les propriétés de surface des nanoparticules ont une influence sur leur interaction avec l'environnement biologique après leur administration *in vivo*, et donc sur leur distribution.

4.1. Mesure de la taille des nanoparticules

La taille des nanoparticules est déterminée à l'aide d'un Zétamaster® (Malvern Instruments, Orsay, France).

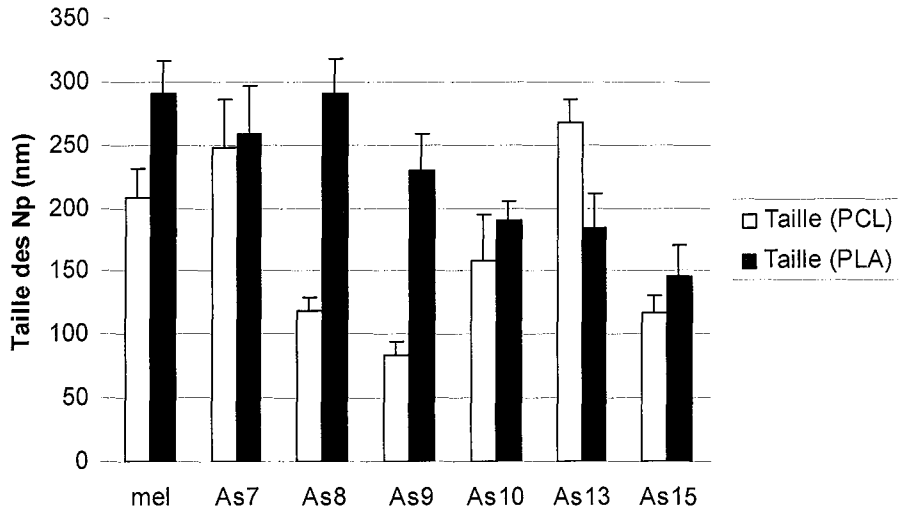
4.2. Dosage du principe actif incorporé

Le dosage a été fait par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) après dissolution des nanoparticules dans l'acétonitrile. La séparation a été faite sur colonne CC250/4,6 Nucléosil 100-5 C18 (Machery Nagel) et la phase mobile était constituée d'un mélange d'acide acétique 0,6 % et d'acétonitrile (45/55 ou 55/45 selon les composés).
La détection a été faite à 286 nm pour le mélarsoprol et 254 nm pour les autres organoarséniés. Les suspensions nanoparticulaires ont été dosées avant et après purification afin de déterminer la teneur en principe actif incorporé. Ainsi, le taux de fixation par le polymère est déterminé par l'équation suivante :

Poids de principe actif incorporé (mg) / Poids des nanoparticules (mg) x100

5. Résultats et discussion

Les tailles des nanosphères de PLA et de PCL (figure 15) sont d'environ 300 nm; il s'agit de tailles obtenues en utilisant le procédé par nanoprécipitation décrit par Fessi et coll. (1988). Les premiers lots qui ont été réalisés en utilisant le mélarsoprol (Mel) et l'arsthinol (As_7), n'ont malheureusement pas permis d'obtenir des taux de fixation suffisamment élevés (maximum pour le Mel: 12,63 % avec le PLA, pour l'As_7 : 4,68 % avec le PCL). Layre et coll. (2005) ont étudié l'influence de différentes formulations sur l'incorporation de principe actif lipophile dans des nanoparticules et ont mis l'accent sur l'importance de la nature du milieu de dispersion de l'acétone (éthanol, KCl, H_2O et Na_2SO_4). Ils ont attribué la différence d'encapsulation de principe actif à sa solubilité dans ce milieu et non à sa solubilité dans le polymère. Lors de cette étude, les meilleurs taux d'encapsulation ont été obtenus avec une solution à 0,1 M de sulfate de sodium (Na_2SO_4) comme milieu de dispersion. En effet, le taux d'encapsulation a augmenté quand la solubilité du principe actif a diminué dans le milieu de dispersion avant évaporation de l'acétone sauf dans celui de Na_2SO_4. Ces auteurs ont proposé un mécanisme de déplacement du principe actif durant le processus de nanoprécipitation (figure 16). Pour préparer des nanoparticules de Mel et d'As_7, le polymère et le principe actif contenus dans l'acétone sont mélangé avec le milieu de dispersion aqueux. L'acétone, solvant miscible à l'eau, diffuse dans le mélange entrainant le principe actif avec lui. Quand cette diffusion est achevée, les nanoparticules se forment et restent en suspension dans le mélange (acétone-milieu de dispersion aqueux). Lors de l'élimination de l'acétone par évaporation, la solubilité du principe actif dans le mélange diminue drastiquement provoquant la formation des cristaux. Ces cristaux sont éliminés par l'étape de purification des nanoparticules mais ceci entraine bien sûr une diminution considérable des taux de fixation.



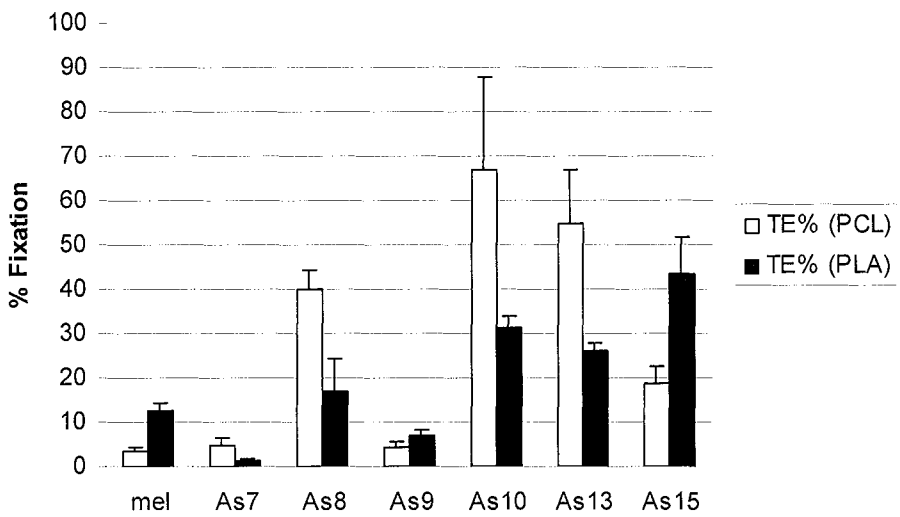
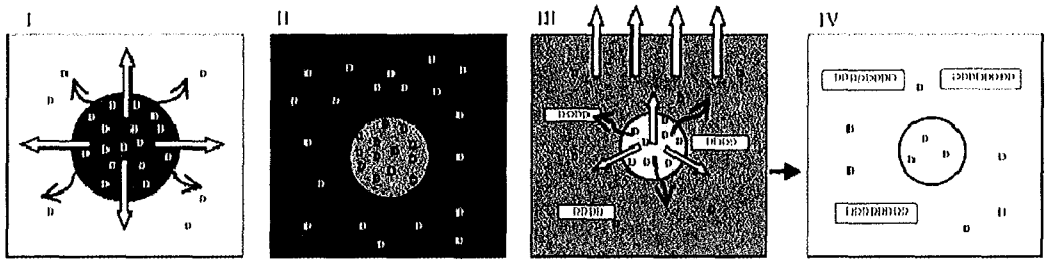


FIG. 15 — La taille (nm) et le taux d'encapsulation (TE %) des nanosphères des organoarséniés préparées à base de la polycaprolacone (PCL) et de l'acide polylactique (PLA). (Quantité d'organoarsénié utilisée = 40 mg/g polymère).



(I) Dispersion de la phase organique (polymère-acétone) dans la phase aqueuse, diffusion de l'acétone (flèches vides) et du principe actif (flèches pleines). (II) formation de nanoparticules. (III) Evaporation de l'acétone. (IV) formation de cristaux ( )

FIG. 16 — Représentation schématique du mécanisme de déplacement d'un principe actif lipophile durant le processus de nanoprécipitation; hypothèse selon Layre et coll (Layre et coll., 2005).

6. Conclusion

Lors de cette étude, nous avons réussi de mettre au point des nanoparticules des organoarséniés synthétisés au laboratoire. Ces formulations dont la taille ne dépassait pas les 300 nm étaient adaptées à une administration intraveineuse. Cependant, elles étaient insuffisamment concentrées pour faire des études *in vivo*. Toutefois, ces formulations ont permis comme même de faire des essais *in vitro* sur des cellules leucémiques humaines (ces essais ne seront pas présentés dans ce mémoire). Certains autres composés organoarséniés (cf. tableau 8) ont permis de préparer des nanoparticules avec des taux d'encapsulation légèrement meilleurs sans que ces concentrations soient suffisantes pour une utilisation thérapeutique. Puisqu'ils ont présenté une toxicité plus élevée que celle du mélarsoprol, il serait sans intérêt d'administrer ces composés sous forme de nanoparticules. Nous avons donc jugé intéressant de développer d'autres formulations galéniques comme les nanosuspensions et des solutions injectables à base de cyclodextrines. La méthode de préparation de ces nouvelles formes sera présentée en détail dans la publication n°3 de ce travail. La caractérisation de solution à base de cyclodextrine sera étudiée dans le chapitre suivant.

Chapitre II : Etude et caractérisation du complexe d'inclusion mélarsoprol-cyclodextrine

Dans le chapitre précédant, nous avons tenté de mettre au point des systèmes nanoparticulaires susceptibles de cibler la moelle osseuse. Ce chapitre sera consacré à la réalisation d'une solution aqueuse de complexe mélarsoprol/cyclodextrine. Cette formulation devrait permettre d'éviter l'utilisation d'un solvant organique et pourra être comparée aux formes nanoparticulaires que nous avons réalisées.

Nous avons vu dans la partie bibliographique que les cyclodextrines jouent un rôle très important dans la formulation de médicaments faiblement solubles dans l'eau par amélioration de leur solubilité et/ou leur dissolution en formant des complexes d'inclusion. En effet, l'intérieur de la cavité apporte un micro- environnement lipophile dans lequel peuvent se placer des molécules non polaires comme le mélarsoprol. Ainsi, la formation de complexes mélarsoprol/cyclodextrines (Mel/CD) suppose une bonne adéquation entre la taille de la molécule à encapsuler et celle de la cavité de la cyclodextrine. La caractérisation et la mise en évidence de complexe de Mel nécessite des techniques physicochimiques comme la méthode d'Higuchi et Connors et des techniques spectroscopiques comme la spectrophotométrie ultraviolet et la diffraction des rayons x. Ainsi, la stœchiométrie et la constante de stabilité, deux paramètres renseignant sur le rapport molaire et la stabilité entre les deux molécules mises en contact, peuvent être déterminées.

La connaissance de la structure et la géométrie de ces complexes est sans aucun doute une donnée fondamentale pour confirmer la nature de réaction entre les deux molécules. Cette géométrie peut être déterminée par Résonnance Magnétique Nucléaire. Enfin, il serait important de vérifier l'activité cytotoxique du Mel complexé pour pouvoir juger de l'utilité de la complexation dans la formulation de ce principe actif.

Résumé de la publication n°1

Le but de ce travail est de mettre au point des complexes entre le mélarsoprol et différentes cyclodextrines afin d'améliorer la mise en forme de ce principe actif lipophile. Les diagrammes de solubilité du mélarsoprol obtenus avec la β-cyclodextrine (β-CD), la méthyl-β-CD (RAMEβ-CD) et l'hydroxypropyl-β-CD (HPβ-CD) sont de type A_L selon la méthode d'Higuchi et Connors. Ce type de diagramme laisse suggérer la formation de complexe de stœchiométrie 1:1. La solubilité du mélarsoprol a été améliorée d'un facteur de 7,2 x 10^3 avec les deux cyclodextrines modifiées (RAMEβ-CD et HPβ-CD), tandis qu'elle reste limitée avec la cyclodextrine non modifiée (β-CD) à cause de la faible solubilité de cette cyclodextrine. D'autre part, La stœchiométrie 1:1 a été confirmée en analysant les solutions au spectrophotomètre UV (méthode de « Job's plot »). La constante de stabilité apparente $K_{1:1}$ est calculée par titration molaire par la méthode de Benesi et Hildebrand ($K_{1:1}$= 57 143 ±4 425 M^{-1} pour la RAMEβ-CD vs 50 761 ±5 070 M^{-1} pour l'HPβ-CD). A partir de ces résultats, une complexation par inclusion peut être suggérée. En effet, les constantes de stabilité des deux complexes étudiés sont assez élevées et statistiquement similaires pour les deux méthodes (méthode de solubilité et spectrophotométrie UV) ainsi que pour les deux cyclodextrines.

Les spectres de Résonnance Magnétique Nucléaire (^{1}H-RMN) en solution peuvent confirmer cette hypothèse. En effet, les résultats de l'analyse des complexes (Mel/RAMEβ-CD) par la ^{1}H-RMN et par la méthode ROESY mettent en évidence une complexation du mélarsoprol par inclusion dans la cavité de la cyclodextrine étudiée. Ainsi, nous avons déterminé la géométrie du complexe Mel/RAMEβ-CD avec une inclusion du cycle aromatique et d'une partie du cycle dithiarsolane à l'intérieur de la cavité. Cette géométrie peut expliquer l'augmentation de la résistance du Mel à l'hydrolyse une fois complexé avec la CD. En outre, la vitesse de dissolution du Mel a été améliorée par complexation avec la RAMEβ-CD (à 10 min, taux de dissolution de Mel = 24,6 % vs 96,7 % en présence de la RAMEβ-CD). De plus, son activité antileucémique sur des cellules leucémiques humaines (K652 et U937) a été conservée lors de sa complexation.

La réalisation d'un complexe Mel/HPβ-CD nous semble donc tout à fait adaptée à la réalisation d'une formulation injectable.

Publication n°1 : Melarsoprol-cyclodextrins inclusion complexes

International Journal of Pharmaceutics

(Mise en ligne le 25 octobre 2005)

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT
International Journal of Pharmaceutics 306 (2005) 107–121
international journal of pharmaceutics
www.elsevier.com/locate/ijpharm

Melarsoprol–cyclodextrins inclusion complexes

Stéphane Gibaud[a,*], Siham Ben Zirar[a], Pierre Mutzenhardt[b], Isabelle Fries[a], Alain Astier[b]

[a] *Laboratoire de Pharmacie Clinique, EA 3452, Faculté de Pharmacie, 5 Rue Albert Lebrun, 54000 Nancy, France*
[b] *Laboratoire SRMSC UHP-CNRS 7565, Groupe de Méthodologie RMN, Université Henri Poincaré, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France*

Received 1 July 2005; received in revised form 30 August 2005; accepted 3 September 2005
Available online 25 October 2005

Abstract

Melarsoprol, a water-insoluble drug, is mainly used in the treatment of trypanosomiasis and has demonstrated an in vitro activity on myeloid and lymphoid leukemia derived cell lines. It is marketed as a very poorly tolerated non-aqueous solution (Arsobal®). The aim of our work was to develop melarsoprol–cyclodextrin complexes in order to improve the tolerability and the bioavailability of melarsoprol. Phase-solubility analysis showed A_L-type diagrams with β-cyclodextrin (βCD), randomly methylated β-cyclodextrin (RAMEβCD) and hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD), which suggested the formation of 1:1 inclusion complexes. The solubility enhancement factor of melarsoprol (solubility in 250 mM of cyclodextrin/solubility in water) was about 7.2×10^3 with both β-cyclodextrin derivatives. The 1:1 stoichiometry was confirmed in the aqueous solutions by the UV spectrophotometer using Job's plot method. The apparent stability constants $K_{1:1}$, calculated from mole–ratio titration plots, were 57 143 ± 4 425 M^{-1} for RAMEβCD and 50 761 ± 5 070 M^{-1} for HPβCD. Data from ^{1}H-NMR and ROESY experiments provided a clear evidence of inclusion complexation of melarsoprol with its dithiaarsane extremity inserted into the wide rim of the cyclodextrin torus. Moreover, RAMEβCD had a pronounced effect on the drug hydrolysis and the dissolution rate of melarsoprol. However, the cytotoxic properties of melarsoprol on K562 and U937 human leukemia cell lines was not modified by complexation.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Melarsoprol; Methylated-β-cyclodextrin; Hydroxypropyl-β-cyclodextrin; Complexation; Nuclear magnetic resonance; Cytotoxicity

1. Introduction

The human African trypanosomiasis (sleeping sickness), transmitted by the tsetse flies, is a daily threat to more than 60 million people in 36 countries of sub-Saharan Africa. The estimated number of persons thought to be affected by the disease is between 300,000

* Corresponding author at: Laboratoire de Pharmacie Clinique, EA 3452, 5 Rue Albert Lebrun, BP 403, 54001 Nancy Cedex, France. Tel.: +33 3 83 68 23 10; fax: +33 3 83 68 23 07.
E-mail address: stephane.gibaud@pharma.uhp-nancy.fr (S. Gibaud).

0378-5173/$ – see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijpharm.2005.09.003

and 500.000, which creates a major health problem. The trypanosomiasis is considered as one of the most neglected diseases by the World Health Organization, which urges to increase the research efforts and considers that optimizing the efficacy, the safety, and the simplicity of drug regimens administration should be favored, including the reformulation of old, but effective, drugs (WHO, 2002).

Until now, the only effective drug available for the late-stage treatment of trypanosomiasis is the trypanocidal melarsoprol (Mel), an As^{III} organoarsenic drug, which was introduced in the 50's by Freidhem (Friedheim, 1949). Moreover, recent studies showed that Mel is also very effective in the treatment of several refractory leukaemia (Rivi et al., 1996; Konig et al., 1997; Soignet et al., 1999) and could be an attractive alternative to the arsenious oxide, which has recently been approved for the treatment of these severe blood disorders.

Mel, a very poorly water-soluble drug, was dissolved in propylene glycol at 3.6% to develop the only commercially available solution (Arsobal®, Aventis Pharma). In addition to the severe systemic toxicities caused by the drug substance, this non-aqueous solution exhibits a local intolerability (severe pains, burns, and necrosis) and must always be administered by slow intravenous injection thus, requiring a professional hospital care. Therefore, this treatment remains very difficult to use in emerging countries, particularly in the field, which restricts its availability. Furthermore, no oral forms of this drug were ever developed.

For several years, the modified CDs have been used as solubilizing agents. Among the industrially produced β-cyclodextrin derivatives, the most important ones are the highly water-soluble methylated β-cyclodextrin and hydroxypropylated-β-cyclodextrin. Randomly methylated-β-cyclodextrin (RAMEβCD) is marketed in non-parenteral formulations (e.g. Aerodiol®, 17β-estradiol, Servier, France and Clorocil®, chloramphenicol, Oftalder, Portugal). Nevertheless, RAMEβCD cannot be used in parenteral formulations; because of its affinity to cholesterol is so strong that it extracts cholesterol from the blood cell membranes, resulting in hemolysis in around 1 mg/ml. On the contrary, hydroxypropyl β-cyclodextrin (HPβCD) was marketed in oral (e.g. Sporanox®, Itraconazole, Janssen, USA) and i.v. formulations (MitoExtra®, mitomycin, Novartis, Switzerland).

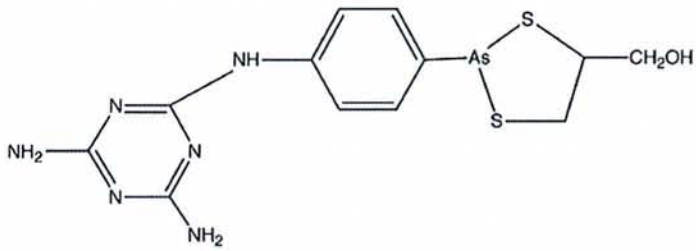
Recently, one modified CD (sulfobutylether-β-cyclodextrin, Captisol®) was used as a solubilizing agent to obtain parenteral formulations of two newly approved drugs: the antifungal voriconazole (Donnelly and De Pauw, 2004) and the anti-schizophrenia agent, ziprasidone (Kim et al., 1998).

The most interesting property of cyclodextrins (CDs) is their ability to form inclusion complexes with a large variety of apolar and hydrophobic molecules. Their use was extensively exploited to improve the pharmaceutical properties of numerous drugs such as water solubility, stability, physicochemical incompatibilities, oral absorption or to modulate biological activity (Frömming and Szejtli, 1994; Al-Omar et al., 1999; Garcia-Rodriguez et al., 2001). Thus, we have studied the advantages of employing the CDs to develop an oral form and a parenteral aqueous solution of Mel, which could improve the tolerability and the safety of the drug.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Melarsoprol ({2-[4-(4,6-diamino-[1,3,5]triazin-2-ylamino)-phenyl]-[1,3,2]dithiarsolan-4-yl}-methanol; Mel) was synthesized according to the method described by Friedheim (Friedheim, 1942, 1947a, 1947b, 1985). Its chemical structure is presented in Fig. 1. The organoarsenic purity was greater than 99% confirmed by the HPLC analysis and its structure was ascertained by ^{1}H- and ^{13}C-NMR. The arsenic percentage, determined by titration with bromate after mineralization, was 18.77% (theoretically: 18.81%). The cyclodextrins [α-cyclodextrin (α-CD), β-cyclodextrin (βCD), hydroxypropyl-β-cyclodextrin (substitution degree = 4.4; HPβCD), randomly methylated-β-cyclodextrin (1.6–2.0 methyl unit per anhydroglucose unit; RAMEβCD) and dimethy-β-cyclodextrin (DMβCD)] were purchased from Sigma–Aldrich (St. Quentin, France). In all experiments, the water content of the CDs was determined by coulometeric Karl–Fisher method, and then the weighed mass of the CDs was adjusted accordingly. All other reagents were of analytical grade from either Merck Eurolab (Fontenay-sous-Bois, France) or Acros organics (Noisy-le-Grand, France) and were used as received.



$C_{12}H_{15}ASN_6OS_2$
Mol. Wt.: 398,34

Fig. 1. The chemical structure of melarsoprol.

2.2. Melarsoprol assays

Determinations of the included Mel were carried out by the high performance liquid chromatography (HPLC) or the ultra-violet spectrophotometer (UV) after dissociation by an initial dilution with pure dimethylsulfoxide (DMSO); the appropriate final adjustments were performed with distilled water.

For HPLC determinations, 50 μl sample was injected onto a C_{18} column (5 μm, 4.6 × 25 cm, Macherey-Nagel, Eckbolsheim, France) using an autosampler (WISP 712, Waters). The mobile phase was a mixture of acetonitrile and 6% acetic acid in water (23/77, v/v) at a flow rate of 1.5 ml/min (SP8800 pump, Spectra Physics, TSP, CA). Detection was performed by UV spectrophotometer at 286 nm (Waters 490 E detector) using a SP-800 integrator (Spectra Physics). The method was linear up to 500 μg/ml with a detection limit <0.1 μg/ml. As previously described, chromatograms and ^{1}H-NMR spectra showed that Mel contains two isomers (ratio 3:1) as a result of the slow inversion of the trivalent arsenic pyramidal configuration (Ericsson et al., 1997).

For UV determinations, after suitable dilutions, the samples were measured in a 1-cm cell using a Carry 50 spectrophotometer (Varian, les Ulis, France). Standard curves were constructed under identical conditions.

2.3. Phase solubility studies of melarsoprol complexation with αCD, βCD, RAMEβCD and HPβCD

Mel complexation with various cyclodextrins was evaluated using the phase-solubility method (Higuchi and Connors, 1965). A suspension of a large excess of Mel (30 mg) in 2 ml of aqueous solutions of the appropriate CD (concentrations ranging from 10 to 250 mM, pH adjusted to 7) was stirred in screw-capped amber vials during 24 h on a rock-and-roller agitator at 25 °C. Under these conditions, the solution mostly contained the non-ionized Mel [pK_a 4.8, (Keiser and Burri, 2000)] and no significant degradation of the drug was observed. Preliminary "time-dependence" experiments showed that the equilibrium was reached after this stirring period. Each suspension was then centrifuged at 9000 × g for 5 min, diluted from 1/200 to 1/500 with DMSO and water (final DMSO concentration: 10^{-2} to 10^{-3}, v/v) and the amount of dissolved Mel was assessed by HPLC or UV at 280 nm.

The apparent solubility of the substrate ($[Mel]_{tot}$) was determined as a function of the added ligand concentration ($[CD]_{tot}$) (Frömming and Szejtli, 1994). Since the phase solubility diagrams were of A_L-type and assuming a 1:1 complex, the apparent stability (or formation) constant K_a was calculated for each CD using the slope from the linear regression analysis of the phase-solubility isotherm using the following equation:

$$K_a = \frac{\text{slope}}{S_0(1 - \text{slope})} \quad (1)$$

The inherent solubility of Mel (S_0) was determined in pure water under identical conditions. The determinations were performed in triplicate and the constants were expressed as the mean ± S.D.

2.4. Characterization of Mel complexes

The phase solubility studies allowed us to select two βCD derivatives (RAMEβCD and HPβCD) for further experiments.

2.4.1. Liquid phase analysis of RAMEβCD/Mel and HPβCD/Mel

2.4.1.1. Continuous variation (Job's plot) method. Stock solutions of Mel were prepared at 2.5×10^{-5} M in 0.1% (v/v) and 1% (v/v) DMSO/water mixtures and at 1.25×10^{-5} M in water. The complex Mel/CD was formed at a constant volume by adding various concentrations of either CD dissolved in the respective solvent at several molar ratios $r = [\text{Mel}]/([\text{Mel}] + [\text{CD}])$, varying from 0.1 to 0.9 to reach a final total molarity of 2.5×10^{-5} M or 1.25×10^{-5} M. The absorbance of the solution was monitored at 280 and 286.6 nm. The absorbance difference $\Delta A = A_0 - A$ was determined by measuring the absorbance of Mel with (A) and without (A_0) cyclodextrin at each wavelength in a 1-cm path length cell thermostated at 25 ± 1 °C. The product $\Delta A \times [\text{Mel}]$ versus r was then plotted to determine the stoichiometry of the complex which was 1:1 when $\Delta A \times [\text{Mel}]$ reached its maximum for $r = 0.5$.

As melarsoprol is insoluble in pure water, this experiment was previously performed with 0.1% (v/v) and 1% (v/v) DMSO/water mixtures to ascertain the negligible influence of DMSO at low concentrations.

2.4.1.2. Spectroscopic determination of binding constants. The mole–ratio titration method was used to confirm the values of K_a estimated by the phase-solubility isotherms (Yoe and Jones, 1944; Benesi and Hildebrand, 1949; Dotsikas et al., 2000). Various amounts of RAMEβCD or HPβCD solutions were added in fixed aliquots to a Mel solution (2.5×10^{-5} M in 1% (v/v) DMSO/water mixture), leading to Mel/CD ratio varying from 1/5 to 1/100. In preliminary experiments, the absorbance of each vial was measured, time-dependently, up to 10 min to assess the kinetics of the complex. At each time, the total absorbance A_t in a 1-cm cell was given by

$$A_t = \varepsilon_{\text{Mel}} \times [\text{Mel}]_t + \varepsilon_{\text{CD}} \times [\text{CD}]_t + \varepsilon_{\text{Mel:CD}} \times [\text{Mel/CD}]_t \quad (2)$$

where $[\text{Mel}]_t$, $[\text{CD}]_t$ and $[\text{Mel/CD}]_t$ are the respective concentrations of the species at time t, ε_{Mel}, ε_{CD} and $\varepsilon_{\text{Mel:CD}}$ are the molar absorptivities with units of $\text{mol}^{-1}\,\text{cm}^{-1}$ and $\Delta\varepsilon_{1:1} = \varepsilon_{\text{Mel:CD}} - \varepsilon_{\text{Mel}} - \varepsilon_{\text{CD}}$. Since $[\text{Mel}]_{\text{tot}} = [\text{Mel}]_t + [\text{Mel/CD}]_t$, a combination of Eq. (2) with the definition of the binding constant of the 1:1 inclusion complex ($K_{1:1} = [\text{Mel/CD}]_t/[\text{Mel}]_t[\text{CD}]_t$) results in the following equation:

$$\Delta A = \frac{[\text{Mel}]_{\text{tot}} K_{1:1} \Delta\varepsilon_{1:1} [\text{CD}]_t}{1 + K_{1:1}[\text{CD}]_t} \quad (3)$$

where $\Delta A = A_t - A_0$. The binding constants were obtained from the titration curve data (ΔA as a function of $[\text{CD}]_t$) fitted by non-linear regression (Eq. (3), Graph Pad Software, Synergy Inc, Pasadena).

2.4.2. Solid phase analysis of Mel/RAMEβCD and Mel/HPβCD

The solid phase analysis of the complexes was performed on lyophilized samples. Mel (30 mg; 7.5×10^{-5} mol) was stirred (25 °C; 24 h) in 10 ml of distilled water containing RAMEβCD or HPβCD and filtered through a 0.22 μm membrane filter (Millipore HA, 0.22 μm). The filtrate was freeze dried and stored at +4 °C until use.

2.4.2.1. X-ray diffraction (XRD). Powder X-ray diffraction patterns were obtained with D500 Siemens diffractometer system with Co Kα radiation ($\lambda = 1.78897$ Å) over the interval 10–45°/2θ. The measurement conditions were as follows: target, Co; filter, Fe; voltage 35 kV; current 20 mA.

2.4.2.2. Differential scanning calorimeter (DSC). The DSC thermograms were obtained on a scanning calorimeter (Pyris, Perkin-Elmer Instruments, St. Quentin, France). The instrument was calibrated using indium as a standard. Samples (5 mg) were heated in sealed aluminium pans under nitrogen using the following program: hold for 10 min at 40.0 °C; heat from 40.0 to 250.0 °C at a scanning rate of 10 °C/min.

2.4.3. Determination of the complex structure by ^{1}H-NMR measurements

All experiments were performed on a Bruker Avance DRX-NMR spectrometer operating at 9.4 T (proton frequency: 400.133 MHz) and at a sample temperature of 300 K. The 2D-ROESY experiments were

recorded with the following parameters: mixing times 300 ms with a radiofrequency field of 8 kHz, acquisition map 2 K × 256, number of scans 16. Final 2D-map after FT: 1 K × 1 K.

The lyophilized Mel/RAMEβCD and Mel/HPβCD complexes, obtained as previously described, were dissolved in D_2O. For solubility reasons, the spectrum of free Mel was obtained in d_6-DMSO. Chemical shifts were given in part per million (ppm) relative to the solvent signal (HOD at 4.84 ppm). Since the commercial RAMEβCD used in all experiments contained 1.6–2.0 methyl unit per anhydroglucose and does not have a defined composition, ^{1}H-NMR spectra were carried out using a complex obtained with pure heptakis (2,6-di-O-methyl)- β-cyclodextrin (DMβCD) substituted at the primary (O-6) and at the secondary (O-2) hydroxyl groups.

2.4.4. Pharmaceutical properties of Mel/RAMEβCD complex

2.4.4.1. Dissolution kinetics. In order to investigate the relative dissolution kinetics, the dispersed amount method was used. One mg of free melarsoprol or an equivalent amount of the lyophilized Mel/RAMEβCD complex powder was suspended in a mixture of 70 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.40) and 30 ml of propylene glycol preheated to 37 °C. The suspensions were incubated, at 37 °C, in a shaking-bath, 200 strokes/min (Heito, France). One ml aliquots were taken at various intervals up to 24 h and centrifuged (7200 × *g*, 5 min, Denver Instruments, MA). The supernatants were then analyzed by HPLC in order to assess their drug contents. The results are presented as mean ± S.D. of triplicate experiments. The resulting dissolution curves were analyzed in terms of the dissolved drug percentage (DP_t) and the dissolution efficiency (DE_t) according to the equation

$$DE_t = \frac{\int_0^t D\,dt}{D_{100}t} \times 100 \quad (4)$$

where D is the percentage of the dissolved drug at time t and $D_{100}t$ is the area of the rectangle corresponding to a total dissolution (100%) at the same time (Khan, 1975; Buchi Naidu et al., 2004).

2.4.4.2. Stability studies. Pure Mel or Mel/RAMEβCD complex were suspended in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.0 to obtain 4 μg/ml solutions (expressed in Mel), poured into screw-capped vials and incubated at 25, 37 or 60 °C (±1 °C) in a shaking-bath, 200 strokes/min (Heito, France). At various intervals ranging from 1 to 72 h, 50 μl of the solution were set apart and analyzed by HPLC. The first-order rate constant for the degradation of the drug is the weight average of two rate constants, where (K_f) and (K_c) are the pseudo-first order rate degradation constants for the hydrolysis of free or totally included melarsoprol, respectively. F_f is the fraction of free drug in solution and $[Mel]_t$ is the free drug concentration at time t (Loftsson and Loukas, 1996; Dotsikas and Brewster, 2002)

$$\frac{d[Mel]_t}{d_t} = -K_{obs}[Mel]_t \quad (5)$$

and

$$K_{obs} = K_f F_f + K_c[1 - F_f] \quad (6)$$

The constants were determined kinetically by non-linear regression from the plots of the percentage of the remaining drug ($\%_{Mel}$) as a function of time (t), according to $\%_{Mel} = 100 \times e^{-Kt}$. The respective activation energies for the degradation were obtained from the Arrhenius plots [$\ln K_f = f(1/T)$ or $\ln K_c = f(1/T)$].

2.4.4.3. In vitro cytotoxicity on K 562 and U937 cell lines. The cytotoxic activity of Mel and Mel/RAMEβCD complex was performed on K562 and U937 human leukemia cell lines. Briefly, exponential growing cells were seeded into a 12-well plate at a density of 0.2×10^6/well. Triplicate wells contained Mel or Mel/RAMEβCD at concentrations ranging from 1.25 to 50 μM. The cells were incubated for 2 or 3 days at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Cell densities were determined by a duplicate cell count using a haemocytometer. Cells that excluded trypan blue dye (L; living cells) were counted and compared to those of the control culture (C) in order to assess the growth inhibition percentage using (L/C) × 100. Cells that did not exclude the dye (D; dead cells) were also counted and compared to the total number of cells in the well (T) to assess the mortality percentage calculated by (D/T) × 100. Cellular viability was also estimated by the lysosomial coloration method using neutral red dye (Borenfreund and Puerner, 1984). For each concentration tested, 4 wells were used, then the mean value was

calculated. For each parameter (growth inhibition and mortality percentage), the corresponding EC_{50} (effective concentration for 50% of the maximum response A_{max}) was calculated by non-linear fitting of the experimental data using a sigmoidal dose response model according to the equation

$$A_C = \frac{A_{max}}{1 + 10^{(\log EC_{50} - \log C)}} \quad (7)$$

where A_C is the response for the concentration C (GraphPad, Prism Software).

3. Results and discussion

Since the complexes obtained with RAMEβCD (Mel/RAMEβCD) and HPβCD (Mel/HPβCD) gathered the best solubility enhancement factor, their physicochemical properties were investigated in details. The hypothesis of 1:1 stoichiometry of the inclusion complexes was confirmed by the continuous variation method (Job's plot) and their respective apparent stability constants in solution were studied by the mole–ratio titration method using the UV spectrophotometer. The formation of a true inclusion complex between Mel and RAMEβCD was also demonstrated by the differential scanning calorimeter (DSC) and the X-ray diffractometer (XRD) in the solid state after freeze-drying. Furthermore, ^{1}H-NMR spectra, two-dimensional rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy (2D-ROESY) experiments were carried out to confirm the hypothesized inclusion mode of Mel/RAMEβCD.

Finally, additional properties of Mel/RAMEβCD complex such as drug stability, dissolution profiles and efficacy were studied to demonstrate the suitability of the complexation to develop acceptable pharmaceutical forms.

3.1. Phase solubility of melarsoprol with αCD, βCD, RAMEβCD and HPβCD

Mel is a lipophilic compound ($\log P = 2.53$), which is very poorly soluble in water: $S_0 = 6\,mg\,l^{-1}$ at 25 °C (1.25×10^{-5} M). αCD did not significantly improve the solubility of Mel; this is probably due to the lack of incorporation of the Mel in the small cavity of αCD (internal diameter: 0.57 nm). On the opposite, βCD and its modified derivatives, which have an internal diameter of 0.68 nm, showed a better solubilization of Mel. The parent molecule βCD exhibited a steeply linear phase-solubility diagram (Fig. 2, inset) but the amounts of dissolved Mel were rapidly limited by the poor solubility of the complex, which precipitated after about 2 mM of added CD. Thus, a B-type phase-solubility diagram, according to Higuchi and Connors classification, was obtained.

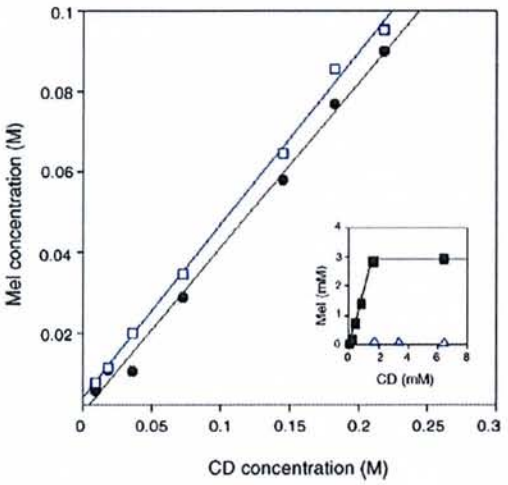


Fig. 2. Phase solubility diagrams of melarsoprol in the presence of RAMEβCD (●), HPβCD (□), βCD (■) and αCD (△) in distilled water at 25 °C. Inset: expansion of the initial part of the curves.

The Mel/RAMEβCD and Mel/HPβCD isotherms (Fig. 2) were linear within the CD concentration range studied, corresponding to an A_L-type profile with a slope less than 1 and indicating that the inclusion complexes could be of the first order with respect to the CDs (1:1 stoichiometry). The apparent stability constants K_a were $56\,077 \pm 4\,205\,M^{-1}$ for Mel/RAMEβCD and $54\,168 \pm 5\,350\,M^{-1}$ for Mel/ HPβCD.

These close values of binding constants suggest that the solubilization process is identical between these βCD derivatives, regardless of the substitution of the external hydroxyl groups of the toroidal shape. However, it was demonstrated that the slope of the phase-solubility diagram in a drug/cyclodextrin system could be linear in spite of the enhanced solubility occurring through both inclusion and non-inclusion processes such as complex aggregates or micellar forma-

tion (Loftsson et al., 2002). Thus, an A_L-type isotherm does not necessarily demonstrate the formation of an inclusion complex and other experiments are required to ascertain the process. Nevertheless, the complexation efficiency of these CDs, as defined by the product $S_0K_{1:1}$ (Loftsson et al., 1999; Loftsson et al., 2002), was about 0.67. The solubility enhancement factor, as defined by the ratio of the solubility of Mel in 250 mM solution of CD to its inherent solubility S_0, was about 7.2×10^3 for both CDs. This interesting finding is coherent with the well-admitted principle claiming that the less the aqueous solubility of the pure drug, the greater the relative solubility enhancement by the CD complexation (Loftsson and Brewster, 1996). Sharma et al. (1995) showed that the enhancement factor for the highly lipophilic anticancer drug paclitaxel varied from 2.3×10^3 for HPβCD to 9.9×10^4 for DMβCD. Interestingly, despite the fact that the HPβCDs are generally considered as less effective solubilizers than the randomly methylated derivatives, the enhancement factor is similar for both CDs in our case.

Considering the excellent solubilizing properties of RAMEβCD and HPβCD for Mel, which led to the formation of complexes with apparent stability constants in the range considered as optimal for pharmaceutical uses (Loftsson and Brewster, 1996), we decided to profoundly investigate the physicochemical and pharmaceutical properties of these complexes.

3.2. Stoichiometry and binding constant of Mel/RAMEβCD and Mel/HPβCD

In aqueous or 1% (v/v) aqueous DMSO solution, Mel exhibited a maximum absorbance at 280 nm mainly due to the conjugation of the 3,5-diamino triazine ring with the benzene nucleus (molar absorption coefficient $\varepsilon_{mel} = 10\,916 \pm 105\ M^{-1}\ cm^{-1}$; $n = 5$). The titration of Mel with increasing concentrations of RAMEβCD and HPβCD (up to a ratio CD/Mel = 100) showed a concentration-dependant bathochromic effect leading to a maximum shift to 286.6 nm, a CD-dependent increase of absorbance at this wavelength (hyperchromic shift) and an isosbestic point at 277 nm are in good accordance with the supposed complexation, by inclusion, process (Fig. 3). However, when the chromophore part of a guest molecule is inserted into a CD cavity, an opposite behavior is more frequently observed (hypsochromic and hypochromic shifts). Thus, the bathochromic and hyperchromic shifts could suggest that the 4,6-diamino triazine ring is not inserted into the cavity. Furthermore, these shifts could be linked to an extended conjugation of the respective π electrons of both aromatic rings due to a stabilizing interaction between the triazine ring and the outside part of the CD core.

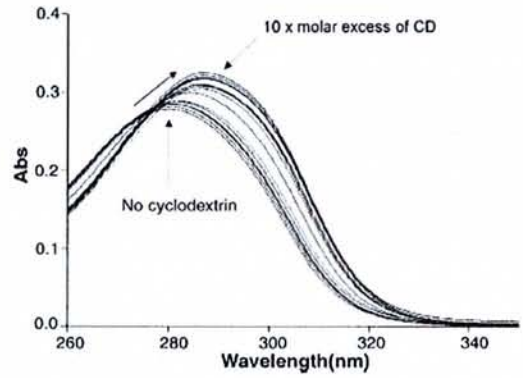


Fig. 3. Effect of RAMEβCD addition on the UV spectra of melarsoprol (2.5×10^{-5} M in 0.1% (v/v) DMSO/water). The figure shows a concentration-dependent bathochromic shift (280–286.6 nm) and a corresponding hyperchromic effect. The solid line arrow indicates the displacement of the curves corresponding to the increasing amounts of CD.

Time-dependent experiments showed a rapid stabilization of absorbance (<2 min) after the addition of CDs indicating a rapid in solution complexation (data not shown). Moreover, the absorbance remained stable for several hours.

The continuous variation method (Job's plot) was used to confirm the inclusion process and the 1:1 stoichiometry as suggested from solubility experiments. The difference ΔA was measured at 280 and 286.6 nm for mixtures of Mel and both CDs in water and 0.1% (v/v) DMSO/water mixture with the total molarity remaining constant. Fig. 4 represents the 2nd order-polynomial fitted curves of $\Delta A \times$ [Mel] as a function of r = [Mel]/([Mel] + [CD]) ($r > 0.999$; $n = 3$). Thus, these Job's plots demonstrate that, since $\Delta A \times$ [Mel] is maximum at r value of 0.5, both complexes have a 1:1 stoichiometry. Identical results were obtained for both wavelengths and regardless of the solvent. However, a better correlation coefficient and reproducibility were noticed when we used 0.1% (v/v) DMSO in water.

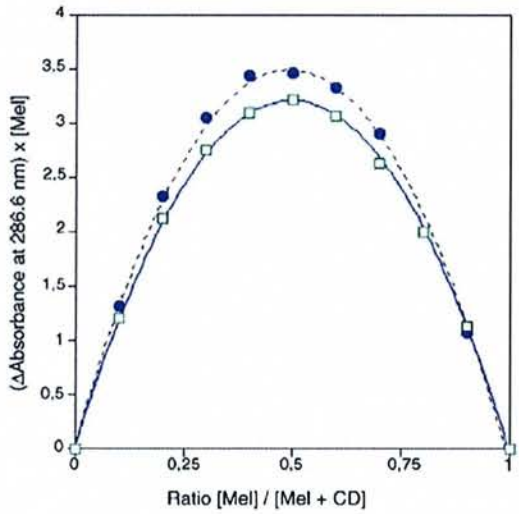


Fig. 4. Continuous variation plot (Job's plot) for the complexation of melarsoprol (Mel; 2.5×10^{-5} M in 0.1% (v/v) DMSO/water) by RAMEβCD (●) and HPβCD (□). ΔA = difference of absorbance at 286.6 nm with (A) and without (A_0) cyclodextrin; r = [Mel]/([Mel] + [CD]).

The stability constants $K_{1:1}$, were also calculated from the molar–ratio titration plots by non-linear regression (Fig. 5) and were $57\,143 \pm 4\,425\,M^{-1}$ for RAMEβCD and $50\,761 \pm 5\,070\,M^{-1}$ for HPβCD

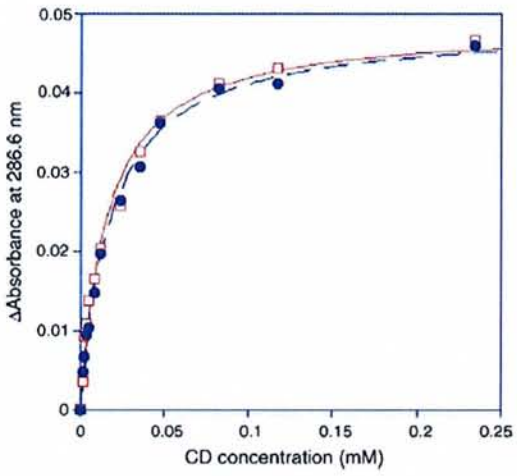


Fig. 5. Mole–ratio titration plots of melarsoprol (2.5×10^{-5} M in 1% (v/v) DMSO/water) by RAMEβCD (●) and HPβCD (□). The formation of the complex was monitored at 286.6 nm.

($n = 3$). These values were very close to those obtained from phase-solubility experiments. Thus, these results suggest the formation of a soluble 1:1 inclusion complex, though the presence of adsorbed molecules, which kept their spectral characteristics, could not be excluded.

It was demonstrated that the relative error of the Benesi–Hildebrand method (i.e., double reciprocal treatment of titration data) in measuring the association constants of CD complexations is often poorly reliable except for the K values $<1000\,M^{-1}$ (Salvatierra et al., 1997; Yang et al., 2000). Since the complexation of Mel was strong, a non-linear regression estimation of the binding constants was chosen. For all experiments, the estimation error of binding constants, determined as the midpoint of the hyperbolic fitting of an individual set of experimental data, was less than 10%.

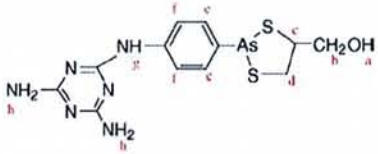
3.3. Characterization of solid Mel/RAMEβCD and HPβCD complexes

The DSC and the XRD are widely used to study the complexation by CDs in the solid state. Therefore, these analytical methods were used to ascertain the inclusion process in solid complexes obtained by freeze-drying.

The DSC profile of RAMEβCD exhibited a large endothermic event from 90 to 140 °C, attributed to the evaporation of the absorbed water, followed by an endothermic peak at 181 °C corresponding to its melting point whereas the melting point of Mel occurred at 221 °C. The DSC profile of the two raw materials, compared to the thermogram of the Mel/RAMEβCD, confirms that there was a real inclusion of the Mel into the RAMEβCD. In fact, the formation of an inclusion complex is suggested by the absence of both melting endotherms in the DSC thermogram of the complex, as previously described for other drugs such as β-blockers (Ficarra et al., 2000) or zolpidem (Trapani et al., 2000). The DSC profile of Mel/HPβCD was very similar to this of Mel/RAMEβCD.

The XRD also demonstrated the formation of an amorphous inclusion complex between RAMEβCD and Mel. The diffractogram of pure Mel exhibited numerous peak characteristics of its crystalline form, while RAMEβCD showed only a broad amorphous band. The diffraction pattern of the freeze-dried complex showed that the drug had lost its crystalline state,

Table 1
^{1}H-NMR chemical shifts (δ) of free and complexed melarsoprol (Mel):



Proton type	Melarsoprol		Mel/DMβCD			
	Major	Minor	Major		Minor	
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	$\Delta\delta$	δ (ppm)	$\Delta\delta$
a[a]	5.158	5.158	[a]	–	[a]	–
b	2.840	2.791	2.602	−0.238	n.r.	–
c	3.788	3.672	N.r.	–	n.r.	–
d	2.506	2.506	2.153	−0.353	2.153	−0.353
e	7.821	7.838	7.676	−0.145	7.631	−0.207
f	7.490	7.538	7.472	−0.018	7.529	−0.009
g[a]	8.991	8.991	[a]	–	[a]	–
h[a]	6.320	6.320	[a]	–	[a]	–

$\Delta\delta = \delta$ (complex) $- \delta$ (free); major and minor denotes isomers of melarsoprol (Mel); n.r.: peak non-resolved. DMβCD = (2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrin.
[a] Signal disappearing with trace of H_2O.

and the small residual peaks were attributed to minute amounts of non-included Mel.

3.4. Determination of complexes geometry by NMR determinations

NMR spectroscopy is known to be one of the most useful methods to obtain information about the geometry of inclusion complexes (Djedaini et al., 1990; Ganza-Gonzalez et al., 1994; Kim et al., 2004). The ^{1}H-NMR peak assignments for free and complex Mel are reported in Table 1, where the corresponding shifts are $\Delta\delta = \delta$(complex) $- \delta$(free). According to the previously published study by Ericsson et al. (1997), the two diastereoisomeric forms of Mel, due to the slow inversion of the pyramidal structure of the trivalent arsenic, were observed at the expected 3:1 ratio. These isomers can be clearly identified by the different chemical shifts of the respective aromatic AA'BB' coupling system (Figs. 6 and 7). It has been suggested that the orientation of the CH_2OH group of the dithiaarsane ring is pseudoaxial, the major isomer A has R in pseudoequatorial (*trans*) position and the minor B isomer has R in pseudoaxial (*cis*) position (Fig. 7).

In the presence of CDs, most of the Mel protons were strongly upfield shifted (Table 1). No new peaks were observed in the spectrum, indicating a dynamic exchange process between the free and the included state during the NMR time scale (Loukas et al., 1997). Both conformational isomers were similarly shifted;

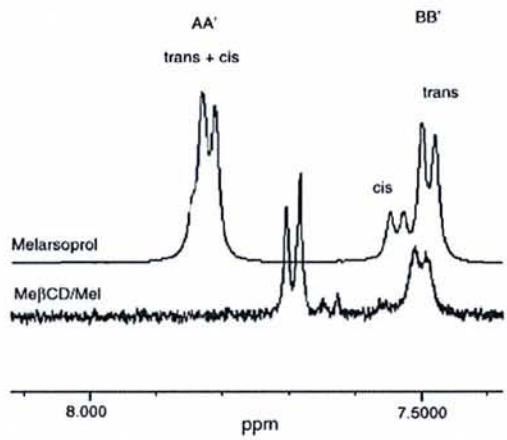


Fig. 6. Partial plot of the ^{1}H-NMR spectra of free and complexed melarsoprol (Mel) with methyl β-cyclodextrin at 1:5 molar ratio (Mel/RAMEβCD), corresponding to the benzene ring area. AA' and BB' denote the aromatic coupling system corresponding to the H-e and H-f protons. Mel was dissolved in d_6-DMSO and Mel/RAMEβCD in D_2O.

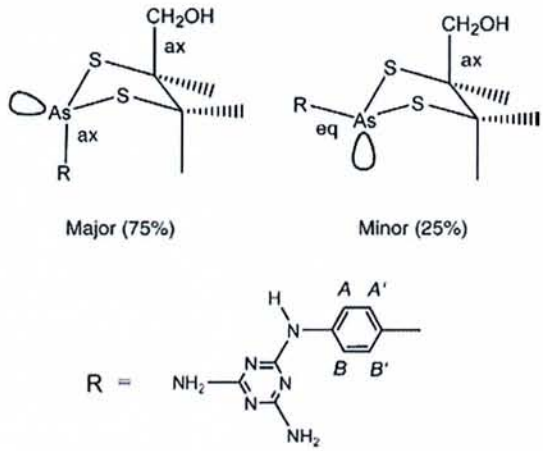


Fig. 7. Conformation of the melarsoprol isomers at the dithiaarsane ring. Major isomer: CH_2OH_{axial} and R_{axial} (*trans*); minor isomer: CH_2OH_{axial} and $R_{equatorial}$ (*cis*).

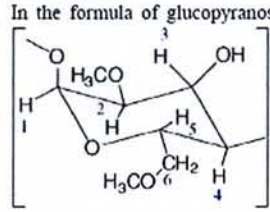
however, the isomeric ratio was strongly modified by the complexation since the minor isomer, which represented 25% in free Mel, was decreased to about 5%, as estimated by integration (Fig. 6). This fact could suggest a preferential inclusion of the major *trans* isomer and thus, a shift of the inversion equilibrium toward the *trans* isomer. The largest upfield shifts were observed for H-d and H-b protons indicating that the dithiaarsane ring undergo a significant perturbation upon complexation. Moreover, the H-e benzene protons, located near the Ar–As bond, were also strongly shifted whereas the H-f protons were only slightly perturbed. These facts strongly suggest that the complexation process involves the dithiaarsane extremity of the molecule. As Ganza-Gonzalez et al. (1994) previously described, these upfield shifts of the Mel protons could be due to an interaction with the π electrons of the oxygen atoms of the CD.

The ^{1}H chemical shifts of DMβCD in the absence and the presence of Mel are shown in Table 2. The peak assignments obtained with the DMβCD used throughout the experiments were in good agreement with those previously reported. As expected, the H-3 and H-5 protons located inside the cavity and the protons from the external H-6 group at the narrower extremity were significantly shifted. These findings proved the existence of an interaction between the guest molecule and the interior of the CD cavity, confirming our hypothesis of the inclusion mode. The H-1 protons located at the

Table 2
^{1}H-NMR chemical shifts (δ) of MeβCD and Mel/DMβCD complex in D_2O

Proton type	Chemical shift (ppm)		Δδ
	DMβCD	Mel/DMβCD	
H-1	5.172	5.128	−0.044
H-2	n.r.	n.r.	n.d.
H-3	3.944	3.874	−0.070
H-4	3.531	3.508	−0.023
H-5	3.845	3.851	+0.006
H-6	3.721	3.658	−0.063
6-OCH_3	3.344	3.326	−0.018
2-OCH_3	3.548	3.522	−0.026

In the formula of glucopyranose unit, R represents H or OCH_3:



. Solutions were made in D_2O. Chemical shifts are given in ppm relative to HOD signal at 4.840 ppm. $\Delta\delta = \delta$ (complex) − δ (free); n.r.: not resolved; n.d.: not determined; Mel = melarsoprol; DMβCD = (2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrin.

exterior of the torus were also affected suggesting a possible adsorption of melarsoprol on the outside surface of the cyclodextrin.

Mel/RAMEβCD and Mel/DMβCD ROESY experiments (Fig. 8) showed an intense correlation between the internal H-3 and H-5 protons of the CD, which could suggest that the aromatic ring is deeply inserted into the CD (Fig. 9). However, the H-2 and H-4 of these CDs were also correlated with the aromatic ring of the Mel and it was assumed that some Mel molecules were adsorbed, contributing to the solubility increase. These CDs contain substituted methyl groups, thus became more hydrophobic and therefore adsorb, more effectively, the melarsoprol.

3.5. Melarsoprol stability in Mel/RAMEβCD

The formation of an inclusion complex between Mel and RAMEβCD has a pronounced stabilizing effect on the drug decomposition. Actually, It has been previously shown that Mel is not a stable compound and samples stored for long periods of time should be kept at −70 °C and protected from humidity (Ericsson et al., 1997). The main degradation process is a general

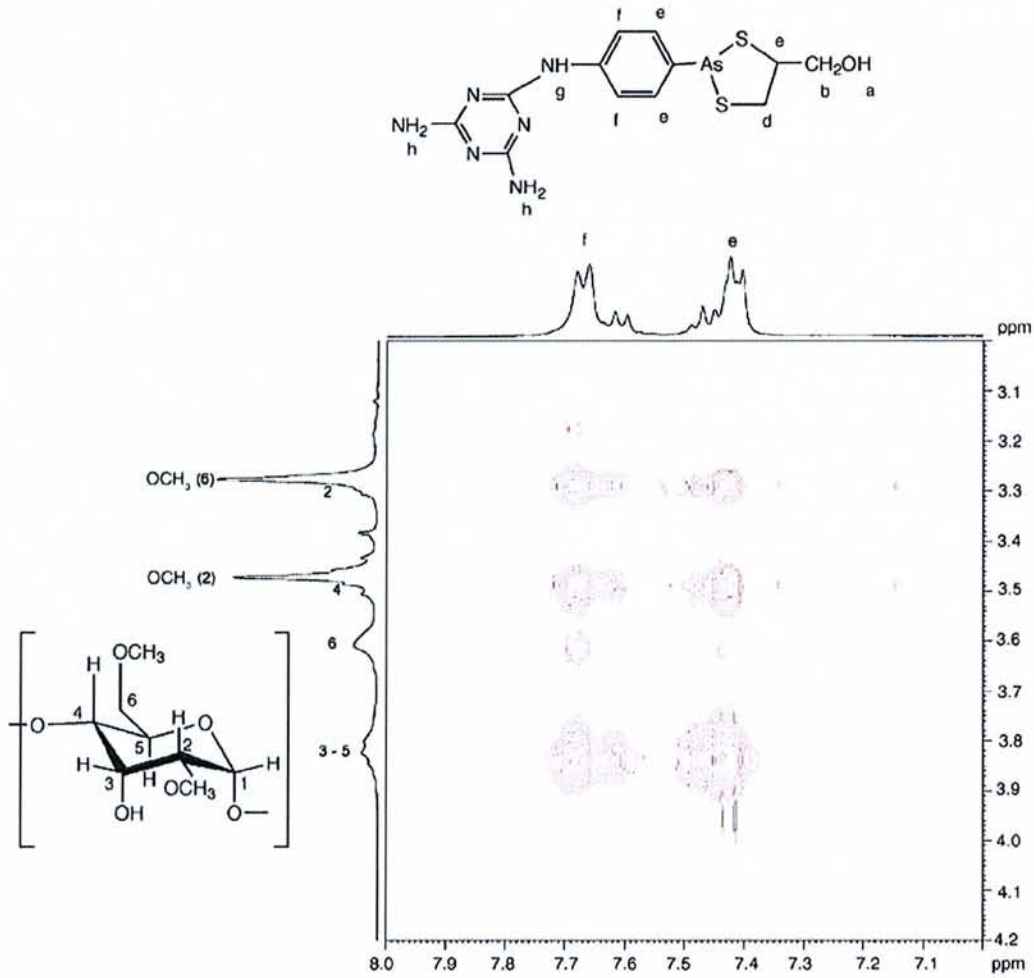


Fig. 8. Partial contour plot of the two-dimensional ROESY spectrum of melarsoprol (Mel) in the presence of (2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrin (DMβCD) in D_2O.

acid–base catalyzed hydrolysis leading to an opening of the dithiaarsane ring with the formation of melarsenoxide (Berger and Fairlamb, 1994; Loiseau et al., 2000). Thus, the influence of the complexation by cyclodextrins on the stability of Mel was studied using the Mel/RAMEβCD complex. The degradation kinetics of Mel and the complex were performed at 25, 37 and 60 °C and the quantification of Mel degradation was carried out from the data obtained by HPLC. This degradation follows a temperature-dependant first order process and was significantly lower for the included Mel than for the free drug since the stability's half-life was doubled as showed by the respective pseudo-first-order constants K_f and K_c (Table 3).

The Arrhenius plot in the presence of RAMEβCD was parallel to that in its absence, indicating that the degradation mechanism remained essentially the same (data not shown). The mean activation energy Ea for Mel degradation was 77.87 kJ M^{-1} and, after complexation, it increased to 80.80 kJ M^{-1} leading to a difference of +3.07 kJ M^{-1} ($P < 0.01$). A similar increase of Ea was previously described in the protection of insulin hydrolytic deamidation by complexation with RAMEβCD (Dotsikas and Loukas, 2002).

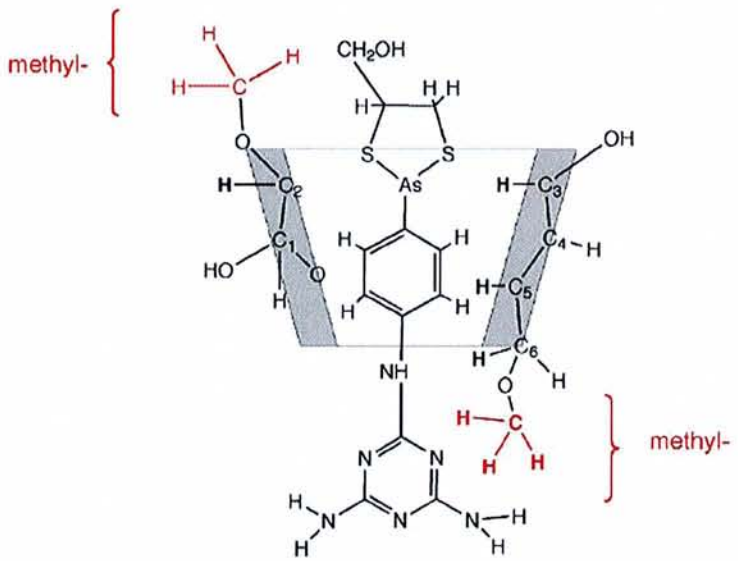


Fig. 9. Molecular models of Mel/DMβCD derived from 2D ROESY experiments.

Our results demonstrate a protecting effect of CD on the Mel degradation. Sure enough, it is well known that the complexation of hydrolysis-sensitive drugs by the CDs might affect their stability by retardation or acceleration of the degradation process, depending on the inclusion mode. (Loftsson and Brewster, 1996). Our results were also coherent with the geometry of the complex postulated from the NMR experiments. Indeed, the insertion of the dithiaarsane ring into the hydrophobic cavity of the CD limits the access of water molecules and, thus, decreases the hydrolysis rate.

3.6. Dissolution study of Mel/RAMEβCD complex

One of the aims of this work was to develop an oral form of Mel using the formation of an inclusion complex with RAMEβCD. Therefore, the dissolution profile was a key pharmaceutical parameter to investigate. Fig. 10 illustrates the dissolution profile obtained with pure Mel and Mel/RAMEβCD. Since the inherent solubility of melarsoprol was too low to respect sink conditions in an aqueous solution, the dissolution study was performed in a mixture of phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4 (70 ml) and propylene glycol (30 ml). Even in these conditions, which strongly favor the dissolution of the drug alone, the dissolution rate of the complex was significantly higher than this of the free Mel. The respective dissolution parameters are presented in Table 4. As compared to free Mel, a very rapid and total dissolution of the complex was observed. The dissolution efficiency after 10 min DE_{10} was 24.6 ± 2.0 for the free drug and 96.7 ± 2.5 for the included drug

Table 3
Pseudo-order degradation rate constants and corresponding half-life values for free melarsoprol (Mel) and complexed with methyl β-cyclodextrin (Mel/RAMEβCD) at three different temperatures (mean ± S.E.; $n = 3$)

T (°C)	Mel		Mel/RAMEβCD	
	K_f (h^{-1})	$T_{1/2}$ (h)	K_c (h^{-1})	$T_{1/2}$ (h)
25	0.017 ± 0.009	65.1 ± 20.8	0.007 ± 0.001	111.5 ± 20.2*
37	0.023 ± 0.006	33.5 ± 7.5	0.012 ± 0.005	87.5 ± 40.5
60	0.378 ± 0.080	2.0 ± 0.3	0.133 ± 0.044	5.6 ± 0.9*

* $P < 0.05$ (t-test).

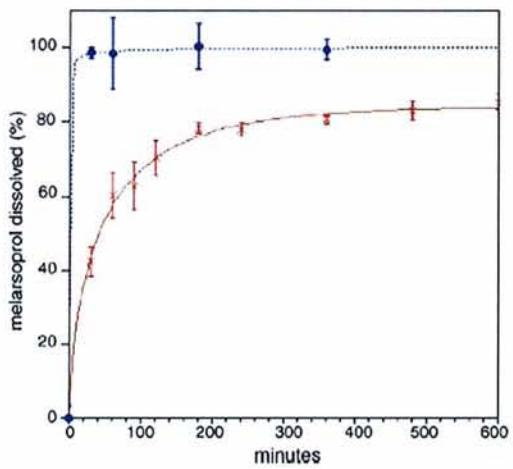


Fig. 10. Dissolution profile of free melarsoprol (×) and complexed with methyl β-cyclodextrin (●) in a 7:3 mixture of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and propylene glycol at 37 °C (mean ± S.D.; $n = 3$).

Table 4
Dissolution parameters of free melarsoprol (Mel) and complexed with methyl β-cyclodextrin (Mel/RAMEβCD) at 37 °C (mean ± S.D., $n = 3$)

Solubility parameter	Mel	Mel/RAMEßCD
Dissolution efficiency (%)		
DE_{10}	24.6 ± 2.0	96.7 ± 2.5*
DE_{30}	42.3 ± 4.0	98.7 ± 1.5*
Dissolution (%)		
DP_{60}	60.3 ± 6.1	98.6 ± 9.6*
DP_{120}	70.3 ± 4.7	99.2 ± 6.1*
DP_{600}	85.3 ± 2.1	99.7 ± 8.2*

The solubility parameters DE and DP are defined in the experimental section.
* $P < 0.001$ vs. free Mel (*t*-test).

($P < 0.0001$). The dissolution was total for the complex after 60 min whereas only 60.3 ± 6.1% of the free Mel was dissolved. These results demonstrate that the solubility properties of Mel are dramatically improved by its complexation with RAMEβCD.

3.7. *In vitro cytotoxicity of Mel/RAMEβCD on K562 and U937 cell lines*

The growth inhibition of cells exposed to Mel/RAMEβCD was similar to that of free Mel as estimated by the trypan blue dye exclusion method (Table 5). However, the mortality rates after 2 days exposure to Mel/RAMEβCD were less than those obtained with free Mel ($TM_{50} = 20.87\ \mu M$ versus $5.25 \pm 0.38\ \mu M$; $P < 0.01$), but became equivalent in the third day of incubation. In U937 cell line, the growth inhibition was slightly reduced at $T + 72$ h ($3.16 \pm 0.07\ \mu M$ versus $2.40 \pm 0.02\ \mu M$; $P < 0.01$), but was not different for K562 cells. Similar values were obtained using the neutral red dye test to assess the viability (data not shown).

These results could be explained by the protection of Mel from hydrolysis by its complexation and the consequent slower transformation to melarsenoxide, formed by simple hydrolysis, which represents the active metabolite of melarsoprol (Cristau and Placidi, 1972; Cristau et al., 1972). Melarsenoxide was synthesized by Friedheim in 1939, used for several years (Friedheim, 1948) and then abandoned because of its toxicity. Recently, Keiser et al. (2000) showed that melarsenoxide undergoes further transformation into one or more active compounds that still contain the arsenic moiety. However, the toxicity of melarsoprol has not been differentiated from the toxicity of melarsenoxide and is probably considerably less active. Indeed, the mechanism of the covalent binding and

Table 5
Cytotoxicity parameters of free melarsoprol (Mel) and complexed with methyl β-cyclodextrin (Mel/RAMEβCD) on human cancer cell line U-937 and K562 (Trypan blue exclusion method; mean ± S.D. $n = 3$)

Cytotoxicity parameter	Mel		Mel/RAMEβCD	
	48 h	72 h	48 h	72 h
IC_{50} (μM)	2.09 ± 0.08	2.40 ± 0.02	2.38 ± 0.44	3.16 ± 0.07*
MC_{50} (μM)	5.25 ± 0.38	4.25 ± 0.16	17.89 ± 4.84*	4.45 ± 0.58

IC_{50}: concentration inducing half-maximal inhibition; MC_{50}: concentration inducing half-maximal mortality.
* $P < 0.01$ vs. free melarsoprol (Mel).

the reactive groups of the proteins are unknown but the formation of a Schiff base with the parasitic trypanothione (Fairlamb, 1990) was proposed as well as the formation of covalent links with cysteinyl residues of proteins (Van Schaftingen et al., 1987). However, after 3 days of incubation, most of Mel was totally hydrolyzed to melarsenoxide, which explains why the cytotoxicity difference became insignificant. Nevertheless, our results suggest that the complexation of Mel by RAMEβCD or HPβCD do not impair its pharmacological activity.

4. Conclusion

Our results demonstrate that the very poorly soluble drug melarsoprol forms 1:1 inclusion complexes with βCD and its derivatives, especially RAMEβCD and HPβCD. The solubilization enhancement factor by βCD is limited but could be multiplied by a factor of about 7.2×10^3 using RAMEβCD and HPβCD. The stability constants determined by the solubility method and the UV spectrophotometer are high and in good agreement for both methods, suggesting that inclusion was the essential mode of complexation. Their values are also closely related for both CDs suggesting a similar inclusion process. This solubility enhancement is interesting especially with the low-toxic derivative HPβCD and could be considered in a possible development of a suitable aqueous-based i.v. formulation.

When compared to the pure drug, the dissolution profile of the Mel/RAMEβCD complex is dramatically improved, which proved its suitability to develop an oral form. ^{1}H-NMR experiments in solution also confirmed the formation of the complexes and demonstrated an insertion of the *trans* isomer of Mel with its dithiaarsane extremity into the wide rim of the CD cavity. This geometry might explain the increased resistance of Mel to hydrolysis in its complexed form. However, as demonstrated by in vitro experiments on a model of human cancer cell lines, the cytotoxic efficacy of the drug is not modified by the complexation. Further works are in progress to study the oral bioavailability of Mel/RAMEβCD on animal models and to assess the expected improvement of local tolerability of a potential newly HPβCD-based i.v. form of this drug.

Acknowledgments

This work was supported by a generous grant from the French National Institute for Medical Research (INSERM, CreS n° 4CR04F) and by the University Henri Poincaré, Nancy, under grant BQR 2003. We thank Dr. N. Razzouq for his fruitful linguistic assistance.

References

Al-Omar, A., Abdou, S., De Robertis, L., Marsura, A., Finance, C., 1999. Complexation study and anticellular activity enhancement by doxorubicin–cyclodextrin complexes on a multidrug-resistant adenocarcinoma cell line. Bioorg. Med. Chem. Lett. 9, 1115–1120.

Benesi, H.A., Hildebrand, J.H., 1949. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. J. Am. Chem. Soc. 71, 2703–2707.

Berger, B.J., Fairlamb, A.H., 1994. Properties of melarsamine hydrochloride (cymelarsan) in aqueous solution. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1298–1302.

Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). J. Tissue Cult. Methods 9, 7–9.

Buchi Naidu, N., Chowdary, K.P.R., Murthy, K.V.R., Satyanarayana, V., Hayman, A.R., Becket, G., 2004. Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam-cyclodextrin binary systems. J. Pharm. Biomed. Anal. 35, 75–86.

Cristau, B., Placidi, M., 1972. Routes and kinetics of arsenic elimination in rats after administration of organoarsenic drugs. IV. Biliary excretion of melarsoprol, melarsonyl and related compounds. Med. Trop. (Mars) 32, 477–482.

Cristau, B., Placidi, M., Audibert, P., 1972. Routes and kinetics of arsenic elimination in rats after administration of organoarsenic drugs. 3. Study of amino-4-benzene arsenic acid and melarsen. Med. Trop. (Mars) 32, 467–476.

Djedaini, F., Lin, S.Z., Perly, B., Wouessidjewe, D., 1990. High-field nuclear magnetic resonance techniques for the investigation of a beta-cyclodextrin: indomethacin inclusion complex. J. Pharm. Sci. 79, 643–646.

Donnelly, J.P., De Pauw, B.E., 2004. Voriconazole a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity. Clin. Microbiol. Infect. 10, 107–117.

Dotsikas, Y., Kontopanou, E., Allagiannis, C., Loukas, Y.L., 2000. Interaction of 6-p-toluidinylnaphthalene-2-sulphonate with beta-cyclodextrin. J. Pharm. Biomed. Anal. 23, 997–1003.

Dotsikas, Y., Loukas, Y.L., 2002. Kinetic degradation study of insulin complexed with methyl-beta cyclodextrin. Confirmation of complexation with electrospray mass spectrometry and ^{1}H-NMR. J. Pharm. Biomed. Anal. 29, 487–494.

Ericsson, O., Schweda, E.K., Bronner, U., Rombo, L., Friden, M., Gustafsson, L.L., 1997. Determination of melarsoprol in biological fluids by high-performance liquid chromatography and

characterization of two stereoisomers by nuclear magnetic resonance spectroscopy. J. Chromatogr. B 690, 243–251.
Fairlamb, A.H., 1990. Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis. 1. Novel approaches to the chemotherapy of trypanosomiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 613–617.
Ficarra, R., Ficarra, P., Di Bella, M.R., Raneri, D., Tommasini, S., Calabro, M.L., Gamberini, M.C., Rustichelli, C., 2000. Study of beta-blockers/beta-cyclodextrins inclusion complex by NMR, DSC X-ray and SEM investigation. J. Pharm. Biomed. Anal. 23, 33–40.
Friedheim, E.A.H., 1942. Substituted [1,3,5,-triazinyl-(6)]-aminophenyl-arsonic acids and process for manufacture of same, US patent 2,295,574, 15 September.
Friedheim, E.A.H., 1947a. Organometallic compounds containing 1,3,5-triazine ring, UK patent GB 585,678, 19 February.
Friedheim, E.A.H., 1947b. Substituted 1,3,5-triazyl-(6)-aminophenyl-arsenic compounds, US patent 2,422,724, 24 June.
Friedheim, E.A.H., 1948. Melarsen oxide in the treatment of human african trypanosomiasis. Ann. Trop. Med. 42, 357–363.
Friedheim, E.A.H., 1949. Mel B in the treatment of human trypasonomiasis. Am. J. Trop. Med. 29, 173–180.
Friedheim, E.A.H., 1985. Melaminylthioarsenites, US patent 4,514,390, 30 April.
Frömming, K.H., Szejtli, J., 1994. Cyclodextrin in pharmacy. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
Ganza-Gonzalez, A., Vila-Jato, J.L., Anguiano-Igea, S., Otero-Espinar, F.J., Blanco-Mendez, J., 1994. A proton nuclear magnetic resonance study of the inclusion complex of naproxen with [beta]-cyclodextrin. Int. J. Pharm. 106, 179–185.
Garcia-Rodriguez, J.J., Torrado, J., Bolas, F., 2001. Improving bioavailability and anthelmintic activity of albendazole by preparing albendazole-cyclodextrin complexes. Parasite 8, S188–S190.
Higuchi, T., Connors, K.A., 1965. Phase-solubility techniques. In: Reilley, C.N. (Ed.), Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation, vol. 4. Willey-Interscience, New York, pp. 117–212.
Khan, K.A., 1975. The concept of dissolution efficiency. J. Pharm. Pharmacol. 27, 48–49.
Keiser, J., Burri, C., 2000. Physico-chemical properties of the trypanocidal drug melarsoprol. Acta. Trop. 74, 101–104.
Keiser, J., Ericsson, O., Burri, C., 2000. Investigations of the metabolites of the trypanocidal drug melarsoprol. Clin. Pharmacol. Ther. 67, 478–488.
Kim, J.H., Lee, S.K., Ki, M.H., Choi, W.K., Ahn, S.K., Shin, H.J., Hong, C.I., 2004. Development of parenteral formulation for a novel angiogenesis inhibitor CKD-732 through complexation with hydroxypropyl-[beta]-cyclodextrin. Int. J. Pharm. 272, 79–89.
Kim, Y., Oksanen, D.A., Massefski Jr., W., Blake, J.F., Duffy, E.M., Chrunyk, B., 1998. Inclusion complexation of ziprasidone mesylate with beta-cyclodextrin sulfobutyl ether. J. Pharm. Sci. 87, 1560–1567.
Konig, A., Wrazel, L., Warrell Jr., R.P., Rivi, R., Pandolfi, P.P., Jakubowski, A., Gabrilove, J.L., 1997. Comparative activity of melarsoprol and arsenic trioxide in chronic B-cell leukemia lines. Blood 90, 562–570.
Loftsson, T., Brewster, M.E., 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. J. Pharm. Sci. 85, 1017–1025.
Loftsson, T., Magnusdottir, A., Masson, M., Sigurjonsdottir, J.F., 2002. Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs. J. Pharm. Sci. 91, 2307–2316.
Loftsson, T., Masson, M., Sigurjonsdottir, J.F., 1999. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins. S.T.P. Pharma. Sci. 9, 237–242.
Loiseau, P.M., Lubert, P., Wolf, J.G., 2000. Contribution of dithiol ligands to in vitro and in vivo trypanocidal activities of dithiaarsanes and investigation of ligand exchange in an aqueous solution. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 2954–2961.
Loukas, Y.L., Vraka, V., Gregoriadis, G., 1997. Novel non-acidic formulations of haloperidol complexed with beta-cyclodextrin derivatives. J. Pharm. Biomed. Anal. 16, 263–268.
Rivi, R., Calleja, E., Konig, A., Lai, L., Gambacorti-Passerini, C., Scheinberg, D., Gabrilove, J.L., Warrell, R.P., Pandolfi, P.P., 1996. Organic arsenical melarsoprol shows growth suppressive activity via programmed cell death on apl and other myeloid and lymphoid leukemia derived cell lines. Blood 88, 68a.
Salvatierra, D., Diez, C., Jaime, C., 1997. Host/guest interactions and NMR spectroscopy. A computer program for association constant determination. J. Incl. Phenom. 27, 215–231.
Sharma, U.S., Balasubramanian, S.V., Straubinger, R.M., 1995. Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (Taxol) complexes with cyclodextrins. J. Pharm. Sci. 84, 1223–1230.
Soignet, S.L., Tong, W.P., Hirschfeld, S., Warrell Jr., R.P., 1999. Clinical study of an organic arsenical, melarsoprol, in patients with advanced leukemia. Cancer Chemother. Pharmacol. 44, 417–421.
Trapani, G., Latrofa, A., Franco, M., Pantaleo, M.R., Sanna, E., Massa, F., Tuveri, F., Liso, G., 2000. Complexation of zolpidem with 2-hydroxypropyl-beta-, methyl-beta-, and 2-hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin: Effect on aqueous solubility, dissolution rate, and ataxic activity in rat. J. Pharm. Sci. 89, 1443–1451.
Van Schaftingen, E., Opperdoes, F.R., Hers, H.G., 1987. Effects of various metabolic conditions and of the trivalent arsenical melarsen oxide on the intracellular levels of fructose 2,6-bisphosphate and of glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*. Eur. J. Biochem. 166, 653–661.
WHO, 2002. Human african trypanosomiasis: Treatment and drug resistance network for sleeping sickness, Report of the Sixth Steering Committee Meeting.
Yang, C., Liu, L., Mu, T.W., Guo, Q.X., 2000. The performance of the Benesi–Hildebrand method in measuring the binding constants of the cyclodextrin complexation. Anal. Sci. 16, 537–539.
Yoe, J.H., Jones, A.L., 1944. Colorimetric determination of Fe with disodium 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 16, 111–115.

II. Etude pharmacocinétique

Chapitre I : Etude de la pharmacocinétique du mélarsoprol et d'arsthinol chez la souris

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, peu de travaux ont été réalisés sur la distribution tissulaire du mélarsoprol. Seuls les travaux de Gherardi et coll. semblent montrer que ce médicament trypanocide a une affinité particulière pour les organes lipophiles et notamment pour la moelle épinière.

Nous devons également souligner que les concentrations cérébrales n'ont jamais été évaluées précisément et souvent assimilées aux concentrations dans le liquide céphalo-rachidien.

La deuxième partie de notre travail expérimental a donc eu pour objectif d'étudier la pharmacocinétique du mélarsoprol. Nous allons tout d'abord commencer par évaluer les concentrations de ce principe actif dans le cerveau (principal site de toxicité) et dans la moelle osseuse (site en lien avec l'activité antileucémique). Nous avons donc réalisé une étude pharmacocinétique complète chez la souris, après injection IV du mélarsoprol ou d'arsthinol. Ce dernier est utilisé à titre comparatif, compte tenu de sa bonne activité antileucémique *in vitro* et sa meilleure tolérance *in vivo*.

Résumé de la publication n°2

Lors de cette étude, nous avons déterminé le taux en arsenic dans chaque organe de souris (sang, foie, moelle osseuse et cerveau) après administration intraveineuse du mélarsoprol (0,056 mmol/kg) et de l'arsthinol (0,2 mmol/kg).

L'administration intraveineuse à des souris, du mélarsoprol et de l'arsthinol permet d'obtenir des concentrations élevées en arsenic dans la moelle osseuse, jusqu'à 35,2 µmol d'As/g de moelle/ µmol de mélarsoprol/g poids corporel. En effet, les taux en arsenic obtenus dans cet organe hématopoïétique sont nettement plus élevés que ceux trouvés dans les autres organes. Ces taux dépendent essentiellement de la lipophilie du principe actif injecté : l'arsthinol étant plus hydrophile s'est moins accumulé dans la moelle osseuse que le mélarsoprol. Cette exposition importante de la moelle osseuse à l'arsenic pourrait être un point positif dans le traitement des leucémies réfractaires bien que l'efficacité cytotoxique ne semble pas être entièrement liée à la concentration en arsenic.

Dans le cerveau, les taux en arsenic se sont révélés moins élevés que ceux obtenus dans la moelle osseuse. Toutefois, les concentrations restent importantes et peuvent confirmer la toxicité des dithiaarsanes sur le système nerveux central.

Après injection IV des deux principes actifs, ils disparaissent rapidement du compartiment sanguin et restent détectables par Chromatographie Liquide à Haute Performance jusqu'à 15 min seulement. A l'inverse, l'arsenic reste détectable pendant 20 h. De nombreux métabolites arséniés fixés ou non aux protéines plasmatiques sont présents dans le plasma.

A partir de la courbe des concentrations totales en arsenic dans le sang en fonction du temps, nous avons pu estimer la fixation aux protéines plasmatiques de l'arsthinol ou de ses métabolites à 74 %. La fixation du mélarsoprol aux protéines plasmatiques étant déjà connue est ~79 % (cf. étude bibliographique, chapitre I, paragraphe 4.3).

La distribution de l'arsenic dans le foie montre deux pics, le premier étant observé vers 30 min après injection du mélarsoprol et d'arsthinol et le second vers 5 h et 15 h respectivement. Ce comportement peut être expliqué par recyclage entéro-hépatique des conjugués des deux composés dont l'élimination est essentiellement biliaire. De plus, le premier passage hépatique du mélarsoprol (plus lipophile) est plus important que celui de l'arsthinol (plus hydrophile).

Enfin, ce travail complète les études *in vitro* qui avaient été réalisées sur l'activité antileucémiques de ces composés et nous permet de comprendre les différences de toxicité cérébrale qui a été observée (Gibaud et coll., 2006). Cette étude devra être complétée par une étude de métabolisme plus approfondie.

Publication n°2: Pharmacokinetics and tissue distribution of the antileukaemic organoarsenicals arsthinol and melarsoprol in mice

Journal of Organometallic Chemistry
(Mise en ligne le 24 octobre 2006)

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Journal of Organometallic Chemistry 692 (2007) 1348–1352
Journal of Organometallic Chemistry
www.elsevier.com/locate/jorganchem

Pharmacokinetics and tissue distribution of the antileukaemic organoarsenicals arsthinol and melarsoprol in mice

Siham Ben Zirar, Stéphane Gibaud *, Alexandra Camut, Alain Astier

Laboratoire de Pharmacie Clinique – EA 3452 Mise en forme et évaluation de matériaux d'intérêt biologique, Université Henri Poincaré – Nancy Université, 5, rue Albert Lebrun, 54000 Nancy, France

Received 5 September 2006; received in revised form 17 October 2006; accepted 17 October 2006
Available online 24 October 2006

Abstract

Melarsoprol and arsthinol have been shown to be effective on various leukaemia cell lines. Nevertheless, the tissue distribution of these compounds remains a key point since the bone marrow is considered as the site of action and the central nervous system as the site of the main toxicity. In this study, we have determined the exposure of each organ (blood, liver, bone marrow and brain) to arsenic, irrespectively of the exact nature of arsenic species contained by the organ.

In the bone marrow, arsenic concentrations were very high, especially that of melarsoprol. However, the lower ability of arsthinol to concentrate in the bone marrow could be compensated by its higher antileukaemic activity.

The brain concentrations were high, although lower than in the bone marrow; this fact is in very good accordance with the observation that the brain is mainly involved in the acute toxicity of trivalent organoarsenicals.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Arsthinol; Melarsoprol; Arsenic; Pharmacokinetics; Leukaemia

1. Introduction

Beside their well-known toxic effects, organic and inorganic arsenical compounds, that are found in nature [1,2] or synthesized, exhibit important biological activities. In particular, arsenic trioxide is used as an antileukaemic drug [3] and the organic derivative melarsoprol (Fig. 1a) is still used as a typanocide [4,5]. Moreover, melarsoprol has been shown to be very effective on various leukaemia cell lines but its human use has been hampered by severe encephalopathy [4,5]. Recently, we synthesized new derivatives of (2-phenyl-[1,3,2]dithiarsolan-4-yl)-methanol which exhibited an increased cytotoxic activity on U937 and K562 human cell lines, as compared to As_2O_3 and melarsoprol [6]. The tissue distribution of these compounds remains a key point since the bone marrow is considered as the site of action and the central nervous system (CNS) as the site of the main toxicity. Arsthinol (Fig. 1b), also known as Balarsen®, was first time synthesized more than 50 years ago [7], and it has been shown to have amoebicidal [8] and bactericidal [9,10] activities. Moreover, we have previously demonstrated that this drug exhibited also an antileukaemic activity with a best therapeutic index than arsenic trioxide and melarsoprol, as estimated by the ratio LD_{50}/IC_{50} [6]. Thus, this promising compound was chosen for further experiments and this work has compared the blood kinetics and the tissue distribution of melarsoprol and arsthinol in the liver, bone marrow and brain, after IV injection to mouse.

2. Results and discussion

The non-transformed compounds were detected by HPLC only during the first minutes after injection. This proves to be due to a rapid hydrolysis of the dithiarsolanes into the corresponding arsenoxides [11,12]. As it was previously shown for melarsoprol by Keiser et al. [11,13], the half

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 23 10; fax: +33 3 83 68 23 07.
E-mail address: stephane.gibaud@pharma.uhp-nancy.fr (S. Gibaud).

0022-328X/$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jorganchem.2006.10.034

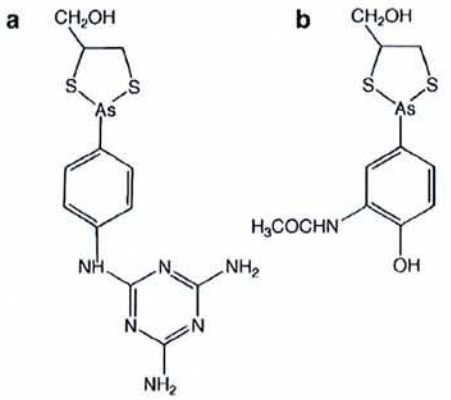


Fig. 1. Chemical structure of melarsoprol (a) and arsthinol (b).

life of the dithiarsolane derivative arsthinol is very short (about 5 min; Fig. 2, inset), while the arsenic concentrations remain high since detectable levels were observed until 20 h after administration (Fig. 2). The total arsenic concentration curve showed a typical bi-exponential shape corresponding to a two-compartment open model described by the equation $C = A \times e^{-k_1 \cdot t} + B \times e^{-k_2 t}$ [14]. Thus, considering the sensitivity of the dithiarsolane ring to hydrolysis leading to the corresponding arsenoxide which avidly bind to sulfhydryl-rich proteins, it was supposed that this second compartment was due to the binding of hydrolyzed arsthinol by plasma proteins. Consequently, the derived pharmacokinetics parameters allow us to estimate this protein binding at 74% using the formula $A/(A + B)$. Finally, the observed binding percentage obtained by *in vitro* experiments was very similar ($77.6 \pm 1.6\%$), confirming the hypothesis.

The total exposure of organs to arsenic following administration of melarsoprol and arsthinol was estimated by the respective area under the concentration–time curves (AUC_{organs}). In order to compare the distribution of both compounds, the total arsenic concentrations (in μmol/g of fresh tissue) were normalized by the amount of drug administered (in μmol/g of body weight). The normalized AUC_{organs} was calculated by the trapezoidal rule and used as exposure index (EI) of each organ to arsenic, irrespectively of the exact nature of arsenic species contained by the organ. Thus, the EI could be considered as representative of the organ/body partition ratio for arsenic [15].

Melarsoprol is known to be rapidly excreted in bile, especially as diglutathione and glucuronide conjugates [16]. As shown in Fig. 3, an initial peak was observed in the liver at 30 min after administration of melarsoprol or arsthinol. However, retarded peaks were also observed at 5 h and 15 h. For melarsoprol, this secondary peak was higher (1.17 ± 0.13 μmol/g per μmol/g of melarsoprol) than the initial peak (0.74 ± 0.13 μmol/g per μmol/g of melarsoprol). Moreover, the curves fit well with the model described by Wajima et al. [17] where the transfer from the bile compartment to the central compartment occurs periodically, and a sine function can be used to represent these periodical changes ($k_b \times \sin(2\pi(t + \phi)/\omega)$). Thus, this behavior could be explained by an entero-hepatic recycling of the conjugates. A similar pattern, albeit less pronounced, was observed for arsthinol. The total liver exposure was higher after administration of melarsoprol than after administra-

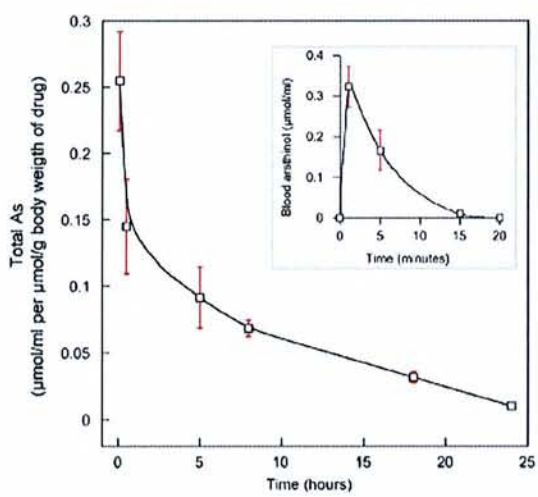


Fig. 2. Blood total arsenic concentrations versus time profiles after injection of arsthinol (0.2 μmol/kg; □). Insert: Concentration of arsthinol after injection (obtained by HPLC). Concentrations were normalized by the injected dose. Symbols represent the means ± SEM of three mice.

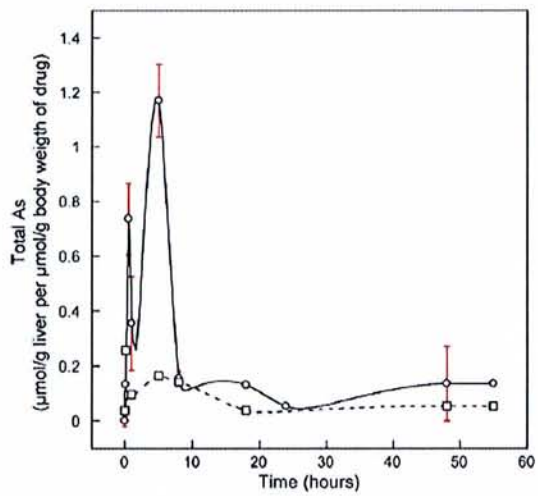


Fig. 3. Liver total arsenic concentrations versus time profiles after injection of melarsoprol (0.056 μmol/g, ○) or arsthinol (0.2 μmol/g; □). Concentrations were normalized by the injected dose. Symbols represent the means ± SEM of three mice.

Table 1
Accumulation of total As in several organs after IV administration of arsthinol and melarsoprol to mice

Organ	Exposure index	
	Melarsoprol	Arsthinol
Blood	ND	1.49 ± 0.26
Liver	10.68 ± 2.90	3.76 ± 0.19
Brain	24.07 ± 6.20	6.79 ± 1.42
Bone marrow	757.44 ± 151.44	51.35 ± 9.17

Isotoxic doses ($LD_{50}/2$) were injected (melarsoprol: 0.056 μmol/g body weight; arsthinol: 0.2 μmol/g body weight). The normalized AUC, expressed in μmol/g organ per μmol/g body weight of administered drug. h, was used as the exposure index to arsenic of each organ. Results are expressed as means ± SE ($n = 3$).

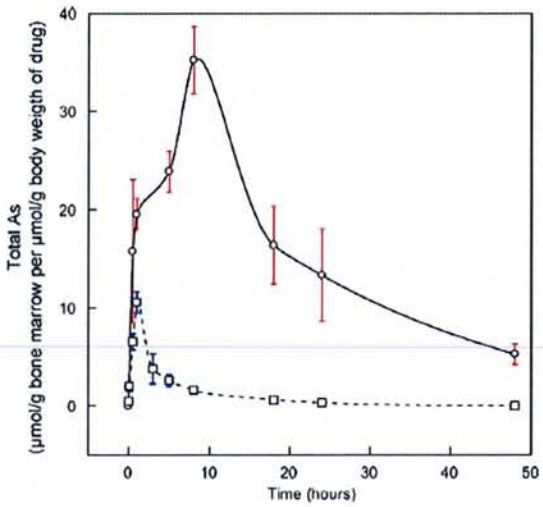


Fig. 4. Bone marrow total arsenic concentrations versus time profiles after injection of melarsoprol (0.056 μmol/g; ○) or arsthinol (0.2 μmol/g; □). Concentrations were normalized by the injected dose. Symbols represent the means ± SEM of three mice.

tion of arsthinol (EI = 10.68 ± 2.90 vs 3.76 ± 0.19, respectively; Table 1). These facts suggest a stronger hepatic first-pass effect for the lipophilic melarsoprol than for the more hydrophilic arsthinol. It could be also postulated that the metabolites or conjugates secreted by the bile were not hydrolyzed and returned to the liver by the portal route without reaching the systemic circulation.

The concentration pattern of arsenic in the lipophilic organs (i.e. bone marrow and brain; Figs. 4 and 5) exhibited a more complex pattern.

In the bone marrow and after injection of arsthinol, the maximal concentration was obtained 1 h after injection followed by a rapid decrease whereas the pharmacokinetics of melarsoprol showed a progressive increase of As concentrations which peak at 8 h ($C_{max} = 35.2 \pm 3.4$ μmol/g of bone marrow per μmol/g of administered melarsoprol)

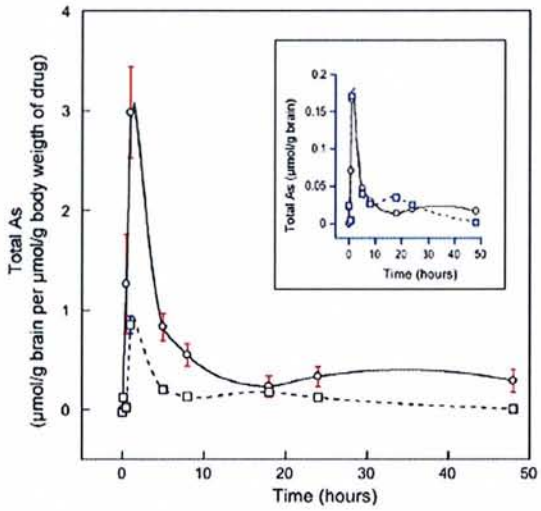


Fig. 5. Brain total arsenic concentrations versus time profiles after injection of melarsoprol (0.056 μmol/g; ○) or arsthinol (0.2 μmol/g; □). Inset: Non-normalized profiles showing identical brain exposure at isotoxic doses of both compounds. Symbols represent the means ± SEM of three mice.

and a more prolonged elimination since the As level at 48 h remained high. The exposure index was very high for both compounds as compared to liver, especially that of melarsoprol (754.44 ± 151.44 vs 51.35 ± 9.17; $p < 0.001$, Fig. 4). This fact is of a crucial importance to explain the excellent activity of As^{III} organic derivatives against leukaemia cells located into the bone marrow. However, the lower ability of arsthinol than melarsoprol to accumulate into bone marrow could be compensated by its higher antileukaemic activity, as we demonstrated on two human cancer cells lines [6]. Actually, the total arsenic level into bone marrow does not entirely reflect the antileukaemic activity of the organoarsenicals.

In the brain, the maximum arsenic peak was obtained after 1 h, both for arsthinol and melarsoprol. As for liver and bone marrow, a higher accumulation was observed for melarsoprol than for arsthinol (EI = 24.07 ± 6.20 vs 6.79 ± 1.42, respectively; $p < 0.001$, Fig. 5). However, when the As levels were expressed in absolute amounts without normalization and considering that isotoxic doses were administered (i.e. half of the respective LD_{50}), the distribution patterns were quite identical (Fig. 5 inset; EI: 1.34 ± 0.60 for melarsoprol vs 1.37 ± 0.49 for arsthinol; *NS*). This fact is in very good accordance with the observation that the brain is mainly involved in the acute toxicity of trivalent organoarsenicals characterized by a major encephalopathy [18,19]. Thus, the modest brain exposure after arsthinol administration could explain its lower acute toxicity as compared to melarsoprol.

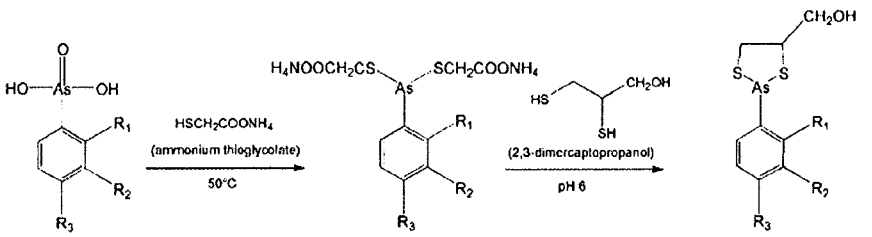


Fig. 6. Typical synthesis pathway for (2-phenyl-[1,3,2]dithiarsolan-4-yl)-methanol derivatives.

Finally, these results demonstrate that bone marrow is more exposed to arsenic than the others organs, especially for melarsoprol.

3. Conclusion

This work is a first step to understand the differences of antileukaemic activity and brain toxicity between several (2-phenyl-[1,2,3]dithiarsolan-4-yl)methanol derivatives. Both melarsoprol and arsthinol lead to very high arsenic levels in the bone marrow, depending of their relative lipophilicity. This strong exposure could be a positive point for a better treatment of refractory leukaemias albeit the antitumor efficacy seems not entirely explained by the bone marrow arsenic content. However, the acute toxicity appears better correlated with the brain arsenic levels. Nevertheless, more complete metabolic studies are required, especially for arsthinol that exhibits one of the most favorable activity/toxicity ratio.

4. Experimental

4.1. Synthesis of (2-phenyl-[1,3,2]dithiarsolan-4-yl)-methanol derivatives

The synthesis of (2-phenyl-[1,3,2]dithiarsolan-4-yl)-methanol derivatives was performed following the method previously described (Fig. 6) [6].

4.2. Animal experimentation

The isotoxic injected dose (i.e. $LD_{50}/2$) was 0.2 mmol/kg for arsthinol and 0.056 mmol/kg for melarsoprol (volume of 0.01 ml/g). These poorly soluble compounds had to be dissolved in a mixture of DMSO/propylene glycol/0.9% NaCl (33/33/33, v/v/v).

Groups of three mice (Female CD1; 20–22 g; Charles Rivers Laboratories, France) were used. At each time point after injection in the caudal vein (5 min, 30 min, 1 h, 5 h, 8 h, 18 h, 24 h and 48 h), blood samples (0.5–1 ml) were collected into heparinized tubes by cardiac puncture under anesthesia (halothane). All sera were frozen at −20 °C until analysis.

Tissue samples (i.e. liver, brain and femurs) were also collected. The bone marrow was extracted from femurs with a syringe (1 ml) of NaCl 0.9%. Then, tissue samples were weighted and stored at −20 °C until analysis.

4.3. Arsenic determination

4.3.1. Quantification of arsenic in the tissues

The tissue concentrations of arsenic were determined using a colorimetric method [20] after digestion with nitric acid (HNO_3; 65%) and hydrogen peroxide (H_2O_2; 3%). In brief, each tissue or blood sample was weighted and placed in a digestion tube with 5 ml of HNO_3(65%) and 5 ml of H_2O_2 (3%). The tubes were heated with a digester apparatus DK-20 (Velp Scientifica), by slowly increasing the temperature from 100 °C to 200 °C. The clear solution was evaporated to dryness, the residue was taken up with 10 ml of HCl (2 N) and introduced into an arsine generator apparatus. The reaction was initiated by zinc powder after reduction to As^{III} with tin chloride ($SnCl_2$; 40%) and potassium iodide (KI; 15%). After 30 min, the pentavalent arsenic (As^V) was completely reduced to arsine (AsH_3) and the gas bubbled through a solution of the silver salt of diethyldithiocarbamate in pyridine. The absorbance of the brown complex was measured at 525 nm. A calibration curve was obtained with increasing amounts of arsenic (As_2O_3, 0–10 μg).

4.3.2. Analysis by HPLC

In the sera, the arsthinol concentrations were also determined by HPLC using a CC250/4.6 Nucleosil 100-5 C18 Column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile/acetic acid 0.6% (55/45), the flow rate was 1 ml/min and the wavelength was 254 nm. Proteins were precipitated by 2 vol of cold acetonitrile. After centrifugation (3000 rpm, 5 min), 20 μl of the supernatant was then injected into the chromatographic system.

4.4. Protein binding study

A solution of bovine serum albumin (BSA, MW: 66,000; 60 μM) was prepared, as well as a solution of arsthinol (10 μM) in a mixture of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and propylene glycol (80:20). Both solutions were mixed gently at a ratio of 1:1 and incubated at 37 °C. Samples were taken up after 1, 2, 4, 8 and 10 min. Finally, the precipitation of proteins and the quantification of arsthinol

were performed by HPLC at 254 nm as previously described. Protein binding assays were performed in triplicate.

4.5. Statistics

Data were analyzed by t-test with $p < 0.05$ as the level of significance.

Acknowledgement

S. Ben Zirar was supported by a Thesis Grant (BQR 2003–2006) from the University Henri Poincaré, Nancy.

References

[1] V.M. Dembitsky, T. Rezanka, Plant Sci. 165 (2003) 1177.
[2] V.M. Dembitsky, D.O. Levitsky, Prog. Lipid Res. 43 (2004) 403.
[3] S. Lehmann, S. Bengtzen, A. Paul, B. Christensson, C. Paul, Eur. J. Haematol. 66 (2001) 357.
[4] J. Pepin, F. Milord, A.N. Khonde, T. Niyonsenga, L. Loko, B. Mpia, P. De Wals, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 89 (1995) 92.
[5] J.O. Arroz, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81 (1987) 192.
[6] S. Gibaud, R. Alfonsi, P. Mutzenhardt, I. Fries, A. Astier, J. Organomet. Chem. 691 (2006) 1081.
[7] E.A.H. Friedheim, US Patent 2,664,432, 1953.
[8] C.H. Brown, W.F. Gebhart, A. Reich, J. Am. Med. Assoc. 160 (1956) 360.
[9] B.H. Kuhn, WV Med. J. 52 (1956) 48.
[10] L. Goldman, R.H. Preston, M. Meister, Dermatologica 113 (1956) 369.
[11] J. Keiser, C. Burri, Acta Trop. 74 (2000) 101.
[12] C.F. Hiskey, F.F. Cantwell, J. Pharm. Sci. 57 (1968) 2105.
[13] J. Keiser, O. Eriesson, C. Burri, Clin. Pharmacol. Ther. 67 (2000) 478.
[14] C. Burri, J. Keiser, Trop. Med. Int. Health 6 (2001) 412.
[15] L. Shargel, A.B.C. Yu, Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics, Appleton & Lange, Norwalk Conn, 1993.
[16] Z. Gregus, A. Gyurasics, Biochem. Pharmacol. 59 (2000) 1375.
[17] T. Wajima, Y. Yano, T. Oguma, J. Pharm. Pharmacol. 54 (2002) 929.
[18] R.K. Gherardi, P. Chariot, M. Vanderstigel, D. Malapert, J. Verroust, A. Astier, C. Brun-Buisson, A. Schaeffer, Muscle Nerve 13 (1990) 637.
[19] L. Haller, H. Adams, F. Merouze, A. Dago, Am. J. Trop. Med. Hyg. 35 (1986) 94.
[20] S.C. Elliot, B.R. Loper, Anal. Chem. 46 (1974) 2256.

Chapitre II : Comparaison de la pharmacocinétique des nouvelles formulations galéniques du mélarsoprol

Dans la première partie de ce travail, nous avons vu que les nanoparticules à base de polycaprolactone ou à base d'acide polylactique n'étaient pas assez chargées en mélarsoprol pour envisager des expériences chez l'animal. Ce taux d'encapsulation faible se traduit par sa faible solubilité dans l'eau. De plus, et au cours des expériences préliminaires de solubilité, ce principe actif était très peu solubles dans plusieurs huiles (benzylbenzoate, triéthylcitrate...). Donc, nous n'avons pas réussi à développer des nanocapsules chargées de mélarsoprol (résultats non présentés). Dans l'objectif d'une vectorisation médullaire, il était raisonnable à ce stade de développer une autre forme galénique comme les nanosuspensions. Ces dernières étant les plus utilisées pour des principes actifs à la fois peu solubles dans l'eau et dans les solvants, et peuvent être utilisées pour un ciblage du Système des Phagocytes Mononuclées; SPM (foie, rate et molle osseuse).

Les nanosuspensions chargées de mélarsoprol sont alors développées et comparées au complexe avec l'HPβ-CD, préalablement mis en évidence, de point de vue de la distribution tissulaire chez la souris. Toutefois, il reste à prouver une réelle vectorisation de principe actif par ces nouvelles formulations.

Résumé de la publication n°3

Ce travail est consacré à l'étude de la pharmacocinétique et la distribution tissulaire du mélarsoprol injecté sous forme de complexe (HPβ-CD/Mel) et sous forme de nanosuspensions (Ns/Mel) chez la souris.

Deux polymères tensioactifs ont été utilisés pour la mise au point des nanosuspensions, le poloxamer 188 et le poloxamer 407, pour tester l'hypothèse d'une vectorisation médullaire favorisée par le poloxamer 407. L'efficacité de ces nanosuspensions a d'abord été prouvée *in vitro*. L'étude *in vivo* a été réalisée en injectant les différentes formulations à des souris femelles CD1 (dose injectée=15 mg/kg en As). Les résultats de cette étude montrent que les nanosuspensions à base de poloxamer 188 (taille= 239 nm) et de poloxamer 407 (taille= 175 nm) sont respectivement 9 à 5 fois plus concentrées dans le foie par rapport au Mel libre, confirmant ainsi une forte capture par le SPM. Toutefois, dans la moelle osseuse, les concentrations obtenues après injection de ces formulations restent comparables à celles obtenues après injection du Mel libre, confirmant une absence de ciblage médullaire. L'avantage considérable qu'elles pourraient apporter est en lien avec la concentration que nous avons mesurée au niveau du cerveau. Ce résultat était lié à une toxicité aigue plus faible de ces nanosuspensions par rapport à celle qui avait été mesurée après injection du mélarsoprol en solution organique (DL_{50}=0,25 mmol/kg vs 0,11 mmol/kg).

Après injection de Mel/HPβ-CD, les paramètres pharmacocinétiques du Mel sont significativement modifiés et les concentrations en arsenic se sont montrées généralement plus élevées dans le cas du complexe. Ce résultat peut être utilisé pour appuyer l'hypothèse mise auparavant. En effet, les cyclodextrines sont considérées comme vecteurs qui sont capables de mieux présenter les principes actifs aux membranes biologiques. Contrairement à la forme libre du Mel (solution dans les solvants), nous avons suspecté une précipitation de cette solution injectée dans le compartiment sanguin, limitant ainsi la distribution de ce principe actif. Dans cette partie d'expérience, nous avons étudié également l'influence de l'HPβ-CD sur la fixation du Mel aux protéines plasmatiques. Ainsi, une compétition entre la cyclodextrine étudiée et les protéines plasmatiques pour fixer le Mel a été mise en évidence par la technique d'ultrafiltration.

Enfin, les deux formulations sont aqueuses et possèdent des avantages complémentaires par rapport à la formulation commercialisée du Mel. Ce dernier jusqu'à présent a été toujours administré sous forme de solution à 3,6 % de propylène glycol, provoquant des douleurs intenses chez les trypanosomés. D'autre part, L'administration de la formulation des nanosuspensions de Mel pourrait limiter l'accès au système nerveux central et donc de diminuer la toxicité de ce composé organoarsénié à visée antileucémique. Tandis que l'utilisation du complexe Mel/HPβ-CD pourrait être une approche pour concentrer ce composé trypanocide dans le cerveau, pour le traitement de la trypanosomiase africaine (indication thérapeutique actuelle).

Publication n°3: Comparison of nanosuspensions and hydroxypropyl-ß-cyclodextrin complex of melarsoprol: pharmacokinetics and tissue distribution in mice.

(Soumise le 3 juillet 2007 dans *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*)

Siham Ben Zirar, Alain Astier, Marc Muchow, Stéphane Gibaud

Laboratoire de Pharmacie Clinique - EA 3452 "Mise en forme et évaluation de matériaux d'intérêt biologique" - Nancy Université - 5, rue Albert Lebrun - 54000 Nancy - France

Abstract

Melarsoprol is the main treatment of the late-stage sleeping sickness and its activity on refractory leukemias has led to a renew of interest. Nevertheless, this compound has to be dissolved in propylene glycol to give the only commercially available solution (Arsobal®, Sanofi Aventis). This formulation exhibits a local intolerability (severe pains, burns and necrosis) after iv injection. Moreover, the treatment is hampered by severe arsenical encephalopathies that limit its use. Until now, it is the only organic solvent with a good solubility level and proposed to be used intravenously.

The aim of this work was to develop aqueous formulations (nanosuspensions and cyclodextrin-inclusion complexes), better tolerated and with improved distribution characteristics. The concentrations in the organs have been assessed on a mouse model and special emphasis has been put on the bone marrow and in the brain.

The hydroxypropyl-ß-cyclodextrin was found to concentrate in the brain, making this formulation suitable for the treatment of late stage cerebral African trypanosomiasis. On the contrary, nanosuspensions can lower the cerebral concentration and maintain high bone marrow concentrations appropriate for the treatment of leukemias.

1. Introduction

Human African Trypanosomiasis is a slowly progressing fatal disease. In the late stage, the central nervous system is invaded by the parasites, leading, if untreated, to lethal neurological complications [1]. Patients are often treated by melarsoprol (Mel B), which is the only drug commonly available that crosses the blood-brain barrier. The treatment is long and complicated, and is hampered by severe arsenical encephalopathies that limit its use [2]. This organoarsenical compound is also very poorly soluble in water and was dissolved in propylene glycol in the only commercially available solution (Arsobal®, Sanofi Aventis) that exhibits a local intolerability after i.v. injection (severe pains, burns and necrosis). Until now, it is the only organic solvent with a good solubility level and occasionally used intravenously [3].

In 1996, Mel B has also demonstrated an antileukaemic activity [4] on a variety of leukemia cell lines [5] leading to a renew of interest for organoarsenical As^{III} drugs. Recently, other dithiaarsanes (i.e. arsthinol), have also proved to be effective on K562 and U937 leukemia cell lines [6, 7]. Although these compounds are very promising, the lack of solubility remains a major drawback for a final development among modern antileukemic cancer protocols [8].

A lot of research has been going on during the last two decades to develop adequate drug delivery systems for challenging drug candidates which belong to the classes II and IV of the biopharmaceutical classification system [9]. These works gave birth to other techniques used to resolve solubility problems associated with poorly soluble drugs [10]. Among them, cyclodextrins, nanoparticles and nanosuspensions have probably attracted the major interest.

On the one hand, cyclodextrins are cyclic oligosaccharides produced from starch bioconversion and have been extensively studied to improve the solubility of lipophilic drugs [11]. We have previously shown that the solubility of melarsoprol was increased $7.2.10^3$-fold after complexation with randomly methylated β-cyclodextrin (RAMEßCD) or hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPßCD) [12].

Moreover, the complexation had a pronounced effect on the drug hydrolysis and the dissolution rate of Mel B. However, cyclodextrins should not be considered as simple solubility enhancers, since the formation of inclusion complex might also affect the pharmacokinetics of several drugs and thereby therapeutic response [13-15].

On the other hand, nano-sized carriers (i.e. nanoparticles, nanocapsules, nanosuspensions, nanoemulsions) can readily allow a targeting of the Reticulo-Endothelial System (RES) [16]. In the treatment of leukemias by organoarsenic compounds, this can be considered as a double-advantage since polymeric nanoparticles have been shown to target the bone marrow [17-19] and hardly diffuse through the blood-brain barrier (BBB) [20] which could possibly limits the risk of encephalopathy. Nevertheless, this could be a drawback in the treatment of the cerebral stage of African trypanosomiasis.

In this work, we try to investigate whether cyclodextrins and nanosuspensions can modify the pharmacokinetics of Mel B. Special emphasis has been put on the bone marrow and on the brain, respectively responsible for the antileukemic activity and for the trypanocidal activity on the cerebral stage of African trypanosomiasis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Melarsoprol (Mel B) was synthesized according to the method described by Friedheim [7, 21, 22]. The hydroxypropyl-ß-cyclodextrin (HPßCD, 4.4 hydroxyl units per anhydroglucose unit) was purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin, France). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. HPLC assays for melarsoprol determination

Determination of Mel B was carried out by the high performance liquid chromatography (HPLC). Fifty µl sample was injected onto a C18 column (Nucleosil® AB, 5 µm, 0.46 x 25 cm, Macherey-Nagel, Eckbolsheim, France) using an autosampler (WISP 712, Waters). The mobile phase was a mixture of acetonitrile and 0.6 % acetic acid in water (45/55, v/v) at a flow rate of 1 ml/min (Spectra Physics P1000XR, Thermo Electron S.A., France). Detection was performed by UV spectrophotometry at 286 nm (Spectra Physics, UV 100). In these analytical conditions, the retention time for Mel B was about 4 min.

2.3. Nanosuspensions preparation

In order to produce the nanosuspensions, the method proposed by Müller et al. [23] was applied. Briefly, melarsoprol powder (0.1 to 1%) was dispersed in an aqueous solution containing 1 or 2 % Pluronic F-68® (poloxamer 188) or Pluronic F-127® (poloxamer 407) and 0.5 % mannitol by using an Ultra Turrax stirrer T25® (Janke and Kunkel, IKA®-Labortechnik) for 1 min at 9500 rpm. The resulting pre-dispersion was then homogenized by an Avestin EmulsiFlex-B3 (B3) (Avestin, Canada): 2 cycles at 2. 10^4 KPa and 2 cycles at 5. 10^4 KPa were applied as pre-milling. Then, 15 to 30 cycles at 15. 10^4 KPa were added to obtain nanosuspensions. As these nanosuspensions were intended for intravenous administration, there was a need to verify and exclude all particles larger than 5 µm by centrifugation (1000 x g for 10 min). Thus, the pellet was discarded and the nanosuspensions (NS-Mel B) were freeze dried for conservation.

2.4. Size determination

Particle size analysis was performed by photon correlation spectroscopy (PCS; Malvern Zeta master ZEM5000, Malvern instruments, UK). This analysis yields the mean diameter (z-average, measuring range: 20-1000 nm) and a polydispersity index (PI) as measure for the extent of the distribution. Additionally, laser diffractometry (LD) was used to detect the larger particles in NS-Mel B formulations (Zetasizer 3000 $HS_{A,}$ Malvern instruments, UK). The diameters were calculated using the volume size distribution.

2.5. Preparation of the Mel B/HPßCD complex

The melarsoprol/hydroxypropyl-β-cyclodextrin complex (Mel B/HPβCD) was prepared and assessed as previously described [12]. Mel B (1 mmol) was incubated during 14 h in an aqueous solution (8 ml) of HPßCD (2 mmol) under magnetic stirring. Subsequently, the solution was filtered through a 0.22 µm filter and freeze-dried.

2.6. Plasma protein binding

Mel B or Mel B/HPßCD (0.1 mg/ml) was incubated in mouse plasma under magnetic stirring (23 and 37°C). The protein binding was assessed after ultrafiltration using a Solvent-Resistant Stirred Cell (Millipore) and a cellulose membrane (Sartorius, 10,000 Da). The free drug concentrations were determined in the ultrafiltrate by HPLC.

The effect of HPßCD on the plasma binding was also assessed by adding Mel B (0.1 mg/ml) in mouse plasma and increasing amounts of HPßCD (1 ; 2 ; 5 and 10 mg/ml).

2.7. In vitro antileukemic activity (K562 and U937 cell lines)

The cytotoxic activity of each formulation was estimated using K562 erythroleukemia and U937 myelomonocytic leukemia cell lines. Briefly, exponential growing cells were seeded into a 96-well plate at a final density of 4.10^4/well using different concentrations of Mel B (0.01 µM to 1 mM). Cells were incubated for 2 or 3 days at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Cell viabilities were determined using the classical MTT test [24].

2.8. Animal studies

Animals use procedures studies were in accordance with the recommendations of the EEC (86/609/CEE) and French National Committee (décret 86/848) for the care and use of laboratories animals.

Mel B was dissolved in a mixture of propylene glycol, sodium chloride and DMSO (33:33:33; v/v/v) and Mel B/HPßCD was dissolved in a solution of sodium chloride (0.9%). These intravenous formulations were freshly prepared and injected in the caudal vein to mice, (female CD1, 24-28 g, Charles River Laboratories, France).

2.8.1. Determination of LD_{50}

To determine the lethal dose (LD_{50}) of Mel B, Mel B/HPßCD and NS-Mel B, seven groups of five mice (female CD1, Charles River, Saint Germain sur l'Arbresle), were housed in cages and observed throughout the quarantine-period experiments. Animals were injected intravenously using doses ranging from 0.042 to 0.45mmol/kg and the mortality was assessed at the 96^{th} hour after injecting 0.25 ml of the respective formulation.

2.8.2. Pharmacokinetics studies

Groups of three CD1 female mice were used. Mel B, Mel B/HPßCD and NS-Mel B were given as a single bolus at a dose of 15 mg/kg expressed in Mel B (0.25 ml). At scheduled time-points (0.5, 30 min, 1, 5, 8, 18, 24 and 48h), heparinized blood samples were collected from anaesthetized mice via cardiac puncture. Liver, kidneys and brain were removed, weighted and stored at – 20°C until analysis. Bone marrow was flushed from femur shafts with NaCl 0.9 %.

2.9. Quantification of arsenic in the tissues

The tissue concentrations of arsenic were determined using a colorimetric method [25] after digestion with nitric acid (HNO_3; 65 %) and hydrogen peroxide (H_2O_2; 3 %). In brief, each tissue or blood sample was weighted and placed in a digestion tube with 5 ml of HNO_3 (65 %) and 5 ml of H_2O_2 (3%). The tubes were heated with a digester apparatus DK-20 (Velp Scientifica), by slowly increasing the temperature from 100°C to 200°C. The clear solution was then evaporated to dryness, the residue was taken up with 10 ml of HCl (2N) and introduced into an arsine generator apparatus (European Pharmacopeia). The reaction was initiated by zinc powder after reduction to As^{III} with tin chloride ($SnCl_2$; 40 %) and potassium iodide (KI; 15 %). After 30 min, the pentavalent arsenic (As^V) was completely reduced to arsine (AsH_3) and the gas bubbled through a solution of silver salt of diethyldithiocarbamate in pyridine (0,5 g/100 ml). The absorbance of the brown complex was measured at 525 nm (Cary-50 spectrophotometer, Varian). A calibration curve was obtained with increasing amounts of arsenic (As_2O_3, 0-10 µg). Results were expressed as weight of total arsenic per gram of fresh tissue ± SD. The Mann and Whitney test was used, at the level of $p < 0.05$, to compare assay groups.

2.10. Data analysis

Arsenic concentration plasma and organs profiles were analyzed with Kaleidagraph 4.0 (Synergy software). The total areas under concentration-time curves (AUC) were obtained from integrated areas. The pharmacokinetics parameters including clearance, terminal elimination half-life t1/2 (ß), constant of elimination and volume of distribution were calculated subsequently.

3. Results and discussion

The pharmacokinetics of Mel B has been first studied by Cristau et al. [26] on rodent models. These authors have verified by quantitative determination of arsenic in bile, the hypothesis previously expressed about the privilege bilary elimination of some organoarsenic drugs: melarsoprol and melarsonyl. More recently, Brun and Burri have demonstrated that the elimination in human serum was biphasic, with a pronounced beta 1 phase [27]. The mean terminal elimination half-life of Mel B was about 35 h, the volume of distribution was about 100 l and the total clearance was about 50 ml/min.

We have previously demonstrated that non transformed Mel B is detected by HPLC only during the first minutes after injection [28]. This behaviour is due to a rapid hydrolysis of the dithiarsolane into the melarsen oxide [29, 30]. Subsequently, in the trypanosoma, melarsen oxide forms a stable adduct with the trypanothione [31], leading to a competitive inhibition of the flavoprotein trypanothione reductase [32] in the glycolysis pathways. Besides, the antileukemic activity is mainly due to the fixation of arsenic metabolites on numerous proteins, especially apoptosis proteins [33]. The plasmatic binding of melarsoprol was first studied by Keiser et al. [29] and a total serum protein binding of 79% was found.

Overall, Mel B is very lipophilic (log P= 2.53) and its accumulation in the nervous system has been attested. Indeed, very high concentrations of arsenic were found in the spinal cord, contrasting with undetectable levels in peripheral nerves in a patient who died after melarsoprol overdose [34]. In our experiments, the brain concentrations (C_{max} = 7.0 µg/g of brain, Fig. 1b) were higher than that of the liver (C_{max} = 2,9 µg/g of liver, Fig. 1c). Nevertheless, the major affinity has to be attributed to the bone marrow (C_{max} = 132 µg/g of bone marrow, Fig. 1a).

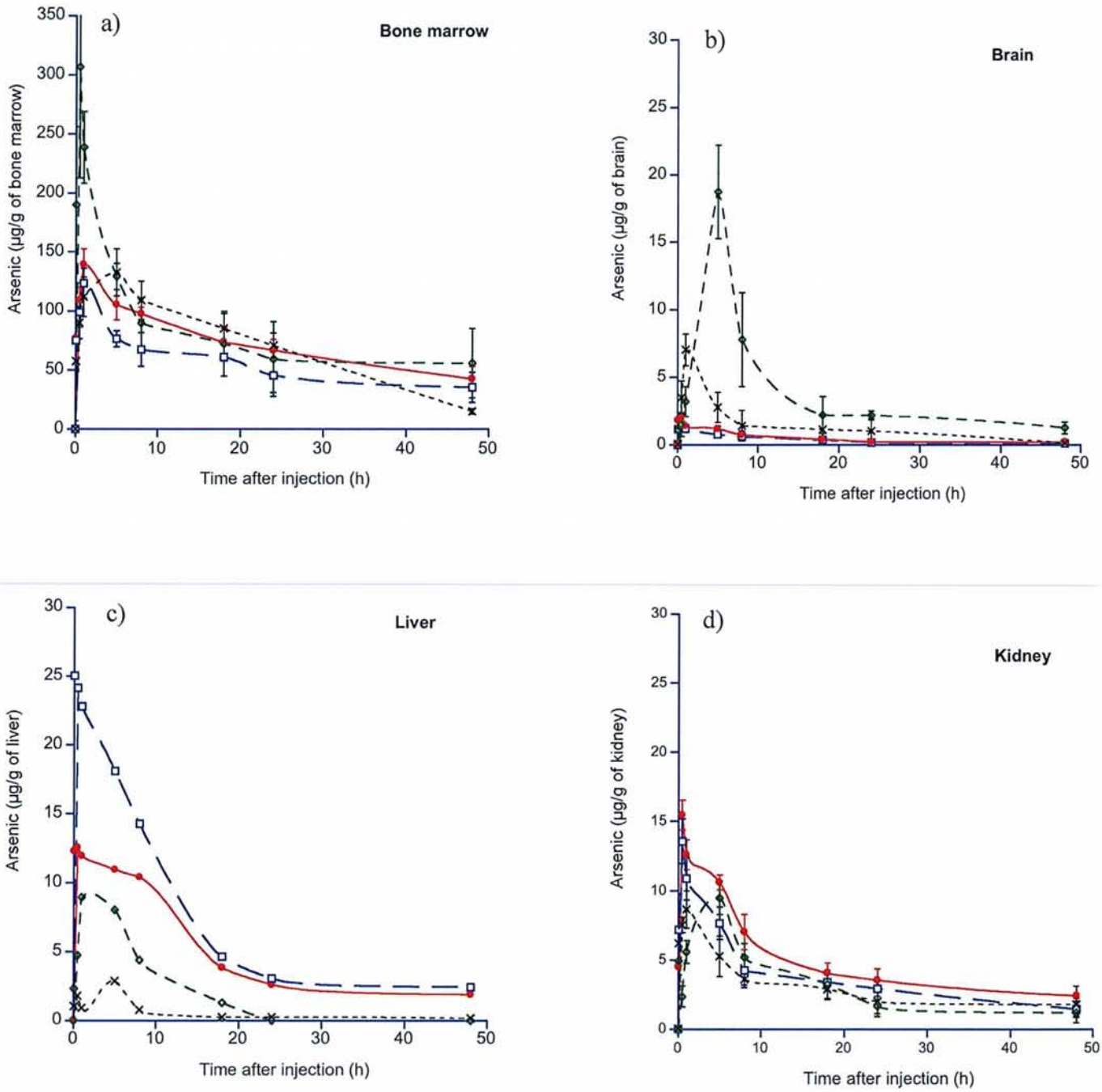


Fig.1 — Changes of concentration of melarsoprol (Mel B) as a function of time following i.v. administration of 15 mg/kg (expressed in Mel) of Mel B (-X-), Mel B/HPβCD (-◊-), Ns-Mel B (poloxamer 188; -□-) and Ns-Mel B (poloxamer 407; -●-). Each data point represents the mean ± SD of the concentrations of total arsenic contained in the organs of three mice, as expressed in µg/g of fresh tissue: a) bone marrow, b) brain, c) liver, d) kidney

Nanosuspensions of Mel B were obtained using the milling technique, adapted from R.H. Müller [23]. In our conditions, no further decrease of size was obtained after 30 cycles at 15. 10^4 KPa (size ranging from 324 to 663 nm; Table 1). The sizes of the particles prepared with poloxamer 188 increased significantly as a function of the Mel B concentrations. Selected batches (poloxamer 188 - 1 % / Mel B - 0.2 % and poloxamer 407 - 1% / Mel B - 1%) gave respectively 324 and 427 nm. After lyophilisation the size was reduced to 175 - 239 nm.

In vitro, as compared with Mel B, the significant albeit slight reduction of cytotoxicity after 48 h-exposure of K562 cell line to NS-Mel B could be explained by a slow release of Mel B in the incubation medium, leading to a delayed formation of the active metabolite, melarsenoxide (Table 2). However, after 72 h-incubation, the IC_{50} were not different for K562 cells but remained higher for U937 cells despite both cell lines responded similarly to free Mel B. Therefore, these contradictory behaviors between both cell lines remain to be more deeply investigated.

In vivo, the ability of solid particles to reach specific tissue sites is severely limited by rapid clearance from the circulation by phagocytic cells of the RES. Indeed, as previously described, nanoparticles were rapidly cleared from the blood stream after intravenous administration and were concentrated mainly in the RES [16]. Moreover, nanosuspensions of clofazimine have shown a tendency to accumulate to higher concentrations in the liver than the corresponding liposomal formulation [35].

The figure 1c shows that the concentrations observed after injection of NS-Mel B were 5 to 9-fold higher than after injection of the free drug, confirming the liver targeting.

Table 1

Sizes of various formulations of nanosuspensions prepared with poloxamer 188 or poloxamer 407

Mel B	**Sizes (nm)**		
concentration	Poloxamer 188 -1%	Poloxamer 188 - 2%	Poloxamer 407 - 1%
0.1%	380 ± 42 nm	337 ± 38 nm	ND
0.2%	427 ± 45 nm	447 ± 56 nm	329 ± 9 nm
0.5%	648 ± 174 nm	663 ± 129 nm	ND
1%	564 ± 182 nm	560 ± 32 nm	324 nm ± 88

Table 2

Cytotoxicity parameters of free melarsoprol (Mel B), melarsoprol nanosuspensions (NS-Mel B) and a melarsoprol-cyclodextrin inclusion complex (Mel B/HPßCD) on human cancer cell lines K562 and U937 (MTT method, mean ± S.D. n=3)

	Mel B		NS-Mel B		Mel B/HPßCD	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
IC_{50} (µM) K562	2.24 ± 0,08	2.65 ±0,05	3.34 ± 0,33 *	2.73 ± 0,13	16.6 ± 1.2 *	9.3 ± 1.2 *
IC_{50} (µM) U937	2.09 ± 0,08	2.40 ± 0,02	2.72 ± 0,40	3.33 ± 0,89 *	11.6 ± 3.0 *	8.9 ± 7.2 *

* $P < 0.01$ *vs.* free melarsoprol (Mel B)

It has been previously shown that colloidal particulates (150 nm and below in diameter) could be redirected specifically to the bone marrow by coating their surface with the block co-polymer poloxamer 407 [36]. Among three different commercially available batches of poloxamer 407, only one was found to be capable of directing polystyrene particles (60 - 150 nm) to sinus wall [37]. This homing process is apparently exclusive to rabbit, as bone marrow targeting cannot be demonstrated in other species such as mice.

The arsenic concentrations observed in the bone marrow after injection of the free drug were very high (C_{max} =132 µg/g; bone marrow Fig. 1a). The figure 1a shows that, after injection of nanosuspensions, the maximum concentration (C_{max}) of arsenic was reached after about 1 h. Surprisingly enough, the C_{max} of NS-Mel B was similar to that of the free drug in solution. Hence, no improvement in bone marrow targeting was obtained by the use of nanosuspensions.

The size of our smallest nanosuspension formulations ranged from 175 to 239 nm (after lyophilisation), slightly beyond the limit proposed by Potter et al. to redirect nanoparticles towards the bone marrow with a rabbit model. Nevertheless, nanoparticles sizing about 200 nm have been shown to concentrate significantly in the mouse bone marrow [19].

Due to their too large size (> 50 nm) nanoparticulate systems are known to be unable to diffuse through the blood-brain barrier. Nevertheless, polysorbate 80-coated polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles were successfully used for the *in vivo* administration of drugs targeted to the brain [38]. As the mechanism of action, it was first hypothesized that the polysorbate-coated nanoparticles were transported across the BBB via endocytosis by the brain capillary endothelial cells [39]. An alternative explanation was in favor of a nanoparticle-induced nonspecific permeabilization [40].

The chemical structure of the overcoating surfactant is of paramount importance, because only polysorbates, not poloxamers (184, 188, 388 or 407), poloxamine 908, cremophors (EZ or RH) or polyoxyethylene (23)-laurylether, led to a CNS pharmacological effect of dalargin [41]. The figure 1b shows that, after injection of NS-Mel B, the brain concentrations were 3 to 5-fold lower than after injection of the solution. These results confirm the assumption that poloxamers do not target the brain. As generally observed for colloidal systems [42], NS-Mel B less accumulates in the kidney and the concentrations remain low (Fig. 1d).

The lower concentrations in the brain were well correlated with a lower acute toxicity (i.e. higher LD_{50}; 0.25 mmol/kg), as compared to Mel B (i.e. lower LD_{50} ; 0.11 mmol/kg), confirming that the major cause of animal deaths is due to the arsenical encephalopathy.

Cyclodextrins-melarsoprol inclusion complexes have been previously developed in our laboratory to obtain an aqueous solution of melarsoprol, more convenient in clinical use [12]. Both methyl-ß-cyclodextrin (Mel B/RAMEßCD) and hydroxypropyl-ß-cyclodextrin (Mel B/HPßCD) have exhibited very good apparent stabilities (50 761 ± 5 070 M^{-1} and 57 143 ± 4 425 M^{-1} respectively) and the solubility enhancement factor was about 7.2 x 10^3. In this previous work, we demonstrated that complexation of Mel B by RAMEßCD did not impaired its cytotoxic properties [12]. In this study, the *in vitro* activity of cyclodextrin-melarsoprol inclusion complexes was confirmed with Mel B/HPßCD. The slight reduction of activity was explained by the protection of Mel B from hydrolysis by its complexation and the consequent slower transformation in its active metabolite, melarsenoxide.

The formation of a drug-cyclodextrin inclusion complex may affect the drug-protein interactions [43] and consequently its pharmacokinetics. In this study, the influence of the cyclodextrin on the protein binding was first evaluated by incubating Mel B or Mel B/HPßCD in mouse plasma (Table 3) at 23°C and 37°C. The temperature was proved to increase the protein binding. This observation has been attributed to the acceleration of two simultaneously occurring processes. The first is the dissociation of the complex and the second process is the hydrolysis of the Mel B. The freed reactive group (As=O) of melarsenoxide can, afterwards, bind the protein sulfhydryl groups. The competition between the HPßCD and the proteins to bind the drug [14] was subsequently confirmed by adding increasing amounts of HPßCD in mouse plasma with 0.1 mg/ml of Mel B (Table 4).

After injection of Mel/HPßCD, the pharmacokinetic parameters were significantly modified (Table 5) and the concentrations in all the organs (Fig. 1) were higher than after injection of the free drug. This result was similar to that described for flurbipropfen complexed with HPßCD [14]. The higher concentration in the lipophilic tissues (i.e. brain and bone marrow) that we observed might seem illogical if HPßCD is considered as a simple hydrophilic drug. In fact, as suggested by Frijlink et al., the cyclodextrins have to be regarded as a drug carrier which are able to deliver the drug to biological membranes in a more efficient way than the plasma proteins. Consequently, the tissues were described as a «sink» causing dissociation of the complex based on simple mass action principle [44].

On the contrary, the free drug, dissolved in organic solvents, could be suspected to precipitate in the bloodstream after injection by simple dilution process, causing thrombophlebilis and likely limiting contact between the drug and the biological membranes. The use of cyclodextrins may be most relevant for poorly soluble drug administered at a site where dilution is not sufficient to avoid a precipitation.

Table 3

Protein binding of melarsoprol (Mel B) after 30 min and 5 h of incubation of Mel B and Mel B/HPßCD in mouse plasma

	Mel B		**Mel B/HPßCD**	
	30 min	**5 h**	**30 min**	**5 h**
23°C	72%	82%	61%	78%
37°C	81%	92%	75%	89%

Table 4

Effect of hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPßCD) on the plasma protein binding of melarsoprol (Mel B) - Melarsoprol total concentration : 0.1 mg/ml - Mean values (n = 3)

HPßCD concentrations (mg/ml)	Unbound fraction of Mel B
-	32 %
1	50 %
2	60 %
5	63 %
10	63 %

Finally and as a consequence of the pharmacokinetic behaviour, the acute toxicity of the Mel/HPßCD, strongly related to its cerebral toxicity, is higher (LD_{50} = 0.056 mmol/kg) than that of the free drug (LD_{50} = 0.11 mmol/kg). Nevertheless, this could be considered as a positive point for late stage trypanosomiasis treatments.

4. Conclusion

Both formulation are aqueous and thus, suitable for clinical use. The pains and necrosis occurring after i.v. injection of Arsobal®, mostly related to the propylene glycol, should be suppressed by using improved, non-solvent containing formulations such as nanosuspensions or cyclodextrin-inclusion complexes.

Additionally, our result demonstrate that both aqueous formulations of Mel B can have complementary albeit opposed advantages. The administration of nanosuspension formulation of Mel B could limit access to the central nervous system, and thus, decrease the acute toxicity of this organoarsenical compound. On the opposite, the administration of cyclodextrin complexes of Mel B could concentrate the drug in the brain.

Therefore, it could be proposed to use Mel B/HPßCD, as a better tolerated and optimized treatment of the cerebral African trypanosomiasis whereas NS-Mel B could be more adapted for the treatment of refractory leukemias. This latter indication could be extended to other cancer disease, since melarsoprol is known to be efficient on numerous cell lines [45]. Unfortunately, until now, its use has been limited by its cerebral toxicity. Works are planned in our laboratory to compare the efficacy and the tolerance of NS-Mel B *vs* free Mel B on tumors-bearing animals.

Acknowledgments

This work was supported by a generous grant from the French national Institute for Medical Research (INSERM, CreS n°4CR04F).

References bibliographiques

[1] P.G.E. Kennedy, M. Murray, F. Jennings, J. Rodgers, Vitamin B12 deficiency, The Lancet. 359 (2002) 1695-1696.

[2] J. Pepin, F. Milord, C. Guern, B. Mpia, L. Ethier, D. Mansinsa, Trial of prednisolone for prevention of melarsoprol-induced encephalopathy in gambiense sleeping sickness, Lancet. 1 (1989) 1246-1250.

[3] E.A.H. Friedheim, Propylene glycol solution of arsenic medicaments, US Patent 2,593,493 (1952).

[4] F.W. Jennings, G.M. Urquhart, P.K. Murray, B.M. Miller, The use of 2-substituted 5-nitroimidazoles in the treatment of chronic murine trypanosoma brucei infections with central nervous system involvement, Z Parasitenkd. 70 (1984) 691-697.

[5] S.L. Soignet, W.P. Tong, S. Hirschfeld, R.P. Warrell, Jr., Clinical study of an organic arsenical, melarsoprol, in patients with advanced leukemia, Cancer Chemother. Pharmacol. 44 (1999) 417-421.

[6] A. Astier, S. Gibaud, Use of organoarsenic or organoantimony derivatives for their anticancer activities, WO Patent 2005/034935 A1 (2005).

[7] S. Gibaud, R. Alfonsi, P. Mutzenhardt, I. Fries, A. Astier, (2-phenyl-[1,3,2]dithiarsolan-4-yl)-methanol derivatives show in vitro antileukemic activity, J Organometallic Chem. 691 (2006) 1081-1084.

[8] S. Gibaud, A. Astier, Organoarsenicals derived from 2-phenyl-[1,3,2]dithiarsolan-4-yl)-methanol (AsIII) with antileukaemic properties: From trypanosomicides to anticancer drugs., Ann Pharm Fr. 65 (2007) 162-168.

[9] G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, Pharm Res. 12 (1995) 413-420.

[10] B. Bittner, R.J. Mountfield, Intravenous administration of poorly soluble new drug entities in early drug discovery: The potential impact of formulation on pharmacokinetic parameters, Curr Opin Drug Discov Devel. 5 (2002) 59-71.

[11] J. Szejtli, Cyclodextrin technology, Kluwer Academic, Dordrecht, Boston, 1988.

[12] S. Gibaud, S. Ben Zirar, P. Mutzenhardt, I. Fries, A. Astier, Melarsoprol-cyclodextrins inclusion complexes, Int J Pharm. 306 (2005) 107-121.

[13] O. Shirakura, N. Nambu, T. Nagai, Effect of beta-cyclodextrin on disposition of hexobarbital and phenobarbital in mice, Journal of Inclusion Phenomena. 2 (1984) 613-621.

[14] H.W. Frijlink, E.J. Franssen, A.C. Eissens, R. Oosting, C.F. Lerk, D.K. Meijer, The effects of cyclodextrins on the disposition of intravenously injected drugs in the rat, Pharm Res. 8 (1991) 380-384.

[15] T. Nagai, O. Shirakura, N. Nambu, Hypnotic potency, and the plasma and the brain concentration of hexobarbital in the presence of cyclodextrins, Proceedings of the 3rd Int. Conf. Pharm. Technol. Vol V, Paris, 31 May/ 2 june 1983, pp. 253-262.

[16] L. Grislain, P. Couvreur, V. Lenaerts, M. Roland, D. Deprez-Decampeneere, P. Speiser, Pharmacokinetics and distribution of biodegradable drug-carriers, International Journal of Pharmaceutics. 15 (1983) 335-345.

[17] S. Gibaud, C. Weingarten, J.P. Andreux, P. Couvreur, Ciblage de la moelle osseuse à l'aide de nanoparticules de polyalkylcyanoacrylate, Ann Pharm Fr. 57 (1999) 324-331.

[18] S. Gibaud, M. Demoy, J.P. Andreux, C. Weingarten, B. Gouritin, P. Couvreur, Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs, J Pharm Sci. 85 (1996) 944-950.

[19] S. Gibaud, J.P. Andreux, C. Weingarten, M. Renard, P. Couvreur, Increased bone marrow toxicity of doxorubicin bound to nanoparticles, Eur J Cancer. 6 (1994) 820-826.

[20] J.C. Olivier, Drug transport to brain with targeted nanoparticles, NeuroRx. 2 (2005) 108-119.

[21] E.A.H. Friedheim, Substituted [1,3,5,-triazinyl-(6)]-aminophenyl-arsonic acids and process for manufacture of same, US Patent 2,295,574 (1942).

[22] E.A.H. Friedheim, Triazine organometallic compounds and process for preparing same, US Patent 2,659,723 (1953).

[23] R.H. Müller, R. Becker, B. Kruss, K. Peters, Pharmaceutical nanosuspensions for medicament administration as systems with increased saturation solubility and rate of solution, US Patent 5,858,410 (1999).

[24] M.B. Hansen, S.E. Nielsen, K. Berg, Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill, J. Immunol. Methods. 119 (1989) 203-210.

[25] S.C. Elliot, B.R. Loper, Improved absorption tube for arsenic determinations, Anal Chem. 46 (1974) 2256 - 2257.

[26] B. Cristau, M. Placidi, Routes and kinetics of arsenic elimination in rats after administration of organoarsenic drugs. IV. Biliary excretion of melarsoprol, melarsonyl and related compounds, Med Trop (Mars). 32 (1972) 477-482.

[27] C. Burri, T. Baltz, C. Giroud, F. Doua, H.A. Welker, R. Brun, Pharmacokinetic properties of the trypanocidal drug melarsoprol, Chemotherapy. 39 (1993) 225-234.

[28] S. Ben Zirar, S. Gibaud, A. Camut, A. Astier, Pharmacokinetics and tissue distribution of the antileukemic organoarsenicals arsthinol and melarsoprol in mice, J Organometallic Chem. 692 (2007) 1348-1352.

[29] J. Keiser, C. Burri, Physico-chemical properties of the trypanocidal drug melarsoprol, Acta Trop. 74 (2000) 101-104.

[30] C.F. Hiskey, F.F. Cantwell, Ultraviolet spectrum correlations with the conjugate acid-base species of acetarsone and arsthinol, J Pharm Sci. 57 (1968) 2105-2111.

[31] A.H. Fairlamb, G.B. Henderson, A. Cerami, Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against african trypanosomes, Proc Natl Acad Sci U S A. 86 (1989) 2607-2611.

[32] M.L. Cunningham, M.J. Zvelebil, A.H. Fairlamb, Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals, Eur J Biochem. 221 (1994) 285-295.

[33] Y. Akao, H. Mizoguchi, S. Kojima, T. Naoe, N. Ohishi, K. Yagi, Arsenic induces apoptosis in B-cell leukaemic cell lines in vitro: Activation of caspases and down-regulation of bcl-2 protein, Br. J. Haematol. 102 (1998) 1055-1060.

[34] R.K. Gherardi, P. Chariot, M. Vanderstigel, D. Malapert, J. Verroust, A. Astier, C. Brun-Buisson, A. Schaeffer, Organic arsenic-induced guillain-barre-like syndrome due to melarsoprol: A clinical, electrophysiological, and pathological study, Muscle Nerve. 13 (1990) 637-645.

[35] K. Peters, S. Leitzke, J.E. Diederichs, K. Borner, H. Hahn, R.H. Muller, S. Ehlers, Preparation of a clofazimine nanosuspension for intravenous use and evaluation of its therapeutic efficacy in murine mycobacterium avium infection, J Antimicrob Chemother. 45 (2000) 77-83.

[36] C.J. Porter, S.M. Moghimi, L. Illum, S.S. Davis, The polyoxyethylene/polyoxypropylene block co-polymer poloxamer-407 selectively redirects intravenously injected microspheres to sinusoidal endothelial cells of rabbit bone marrow, FEBS Lett. 305 (1992) 62-66.

[37] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray, Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice, Pharmacol. Rev. 53 (2001) 283-318.

[38] J. Kreuter, R.N. Alyautdin, D.A. Kharkevich, A.A. Ivanov, Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles), Brain Res. 674 (1995) 171-174.

[39] J. Kreuter, Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs, Adv Drug Deliv Rev. 47 (2001) 65-81.

[40] J.C. Olivier, L. Fenart, R. Chauvet, C. Pariat, R. Cecchelli, W. Couet, Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity, Pharm Res. 16 (1999) 1836-1842.

[41] J. Kreuter, V.E. Petrov, D.A. Kharkevich, R.N. Alyautdin, Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood-brain barrier using surfactant-coated nanoparticles, Journal of Controlled Release. 49 (1997) 81-87.

[42] Y. Xi-Xiao, C. Jan-Hai, L. Shi-Ting, G. Dan, Z. Xv-Xin, Polybutylcyanoacrylate nanoparticles as a carrier for mitomycin c in rabbits bearing vx2-liver tumor, Regul Toxicol Pharmacol. 46 (2006) 211-217.

[43] E.E. Sideris, M.A. Koupparis, P.E. Macheras, Effect of cyclodextrins on protein binding of drugs: The diflunisal/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin model case, Pharm Res. 11 (1994) 90-95.

[44] V.J. Stella, V.M. Rao, E.A. Zannou, V.V. Zia, Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes, Adv Drug Deliv Rev. 36 (1999) 3-16.

[45] K. Koshiuka, E. Elstner, E. Williamson, J.W. Said, Y. Tada, H.P. Koeffler, Novel therapeutic approach: Organic arsenical melarsoprol) alone or with all-trans-retinoic acid markedly inhibit growth of human breast and prostate cancer cells in vitro and in vivo, Br J Cancer. 82 (2000) 452-458.

Le mélarsoprol, médicament antiparasitaire préconisé dans le traitement de la trypanosomiase africaine, présente une lipophilie extrêmement importante. Cette propriété physico-chimique favorise ainsi la distribution de ce principe actif dans les tissus riches en lipides, et donc son passage à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) conduisant au plus redoutable effet secondaire; l'encéphalopathie arsenicale. Ce traitement peut entrainer 5 à 10 % d'encéphalopathie (Martindale) dont 1 à 5 % d'entre elles provoquent une mortalité (Burri et coll., 1993). Son administration intraveineuse requiert sa solubilisation dans du propylène glycol qui provoque des nécroses au site d'injection entrainant des douleurs intenses pour le patient. Cependant, il reste encore le seul médicament comme traitement de référence du stade cérébral de la maladie du sommeil (Bouteille et coll., 2003). En traitement alternatif, le DFMO (eflornithine) s'est montré efficace et a suscité beaucoup d'espoirs dans les années 1980 (Kennedy, 2006). Toutefois, en 1999, cette molécule a été abandonnée par le groupe Aventis qui évoquait sa non-rentabilité. A la suite de nombreux témoignages de 'Médecins Sans Frontières' qui tendaient à présenter l'eflornithine comme « médicament miracle », l'OMS a signé avec Aventis un accord pour relancer la production. Les travaux qui suivirent ont montré que l'eflornithine pouvait effectivement traiter efficacement les trypanosomiases à *Trypanosoma brucei gambiense* d'Afrique de l'Ouest. A l'inverse, en Afrique de l'Est, *Trypanosoma brucei rhodesiense* se montre souvent résistante et le mélarsoprol reste actuellement le traitement de choix (Clerinx, 1998). Aucune réelle alternative thérapeutique n'a donc permis d'abandonner totalement le mélarsoprol mais de nombreux travaux sont toutefois en cours afin d'améliorer les traitements actuels. L'absence de trypanocide idéal et peu toxique a conduit plusieurs équipes à étudier les possibilités d'accroitre le passage à travers la BHE pour les médicaments existants (Kennedy, 2006). Cet objectif doit bien sûr être relativisé dans le cas du mélarsoprol compte tenu des risques d'encéphalopathie.

Parallèlement, ce principe actif s'est montré efficace sur les leucémies et le myélome multiple (Rivi et coll., 1996; König et coll., 1997; Rousselot et coll., 1999). Son utilisation dans cette thérapeutique est prometteuse mais reste freinée par ses effets secondaires importants.

Quelque soit l'indication, le mélarsoprol nécessite donc une optimisation pharmacocinétique que nous avons tenté de réaliser par des méthodes galéniques :

Dans le cas du traitement trypanocide

Une formulation aqueuse qui cible le système nerveux central ne peut s'envisager que pour réduire les doses injectées et éviter les risques de veinites et de nécroses. Comme nous l'avons déjà vu dans l'étude bibliographique, les solutions à base de cyclodextrines (CD) peuvent être envisageables dans cet objectif. En effet, Brewster et coll. (1997) ont mis en évidence l'augmentation de la teneur de la zidovudine dans le cerveau, après administration parentérale sous forme de solution aqueuse de CD. De plus, la fréquence de la douleur et la thrombophlébite au site d'injection ainsi que d'autres effets secondaires sont significativement réduits chez des patients traités par l'etomidate (principe actif lipophile) sous forme de solution de CD (Doenicke et coll., 1994).

Donc, une formulation de mélarsoprol à base de CD ne pourrait que réduire les douleurs provoquées au site d'injection et les doses administrées puisque cette nouvelle forme galénique permettrait une meilleure disponibilité. Toutefois, nous serons limités par la toxicité nerveuse du médicament; une nouvelle posologie et un nouveau protocole de traitement devraient être mis en place.

Dans le cas des traitements antileucémiques

Les formes nanoparticulaires (nanoparticules, nanosuspensions) pourraient présenter un double avantage :

- Elles sont abondamment captées par la moelle osseuse, un des organes du SPM, riche en macrophages (Gibaud, 1997; Müller et coll., 2001)
- Elles passent difficilement la BHE et pourraient permettre de diminuer les risques d'encéphalopathie, si elles possèdent des propriétés de surface qui empêcheraient la fixation des composants sanguins reconnus par les récepteurs cérébraux (Olivier et coll., 1999).

La mise au point et l'évaluation de ces différentes formulations constituent l'objectif de cette thèse. Nous présentons d'abord les formulations galéniques qui ont été mises au point : les nanoparticules polymériques et les nanosuspensions, ainsi que les complexes avec les cyclodextrines. Ensuite, nous discuterons les études pharmacocinétiques que nous avons réalisées ainsi que les innovations cliniques qui pourraient être réalisées à la suite de ce travail.

1. Mise au point de systèmes nanoparticulaires polymériques

Les premiers essais qui avaient été réalisés pour mettre au point des nanoparticules de mélarsoprol, ont commencé en 1999 (Goisnard, 1999). Ce travail avait pour objectif de mettre au point des nanoparticules à base de poly (isohexylcyanoacrylate) et chargées en mélarsoprol. Ce dernier s'est avéré relativement difficile à encapsuler.

Nous avons essayé dans un premier temps de réaliser des nanoparticules à base d'autres polymères comme la polycaprolactone (PCL) et l'acide polylactique (PLA) (cf. chapitre 1 de la première partie expérimentale). A la suite de ce travail, nous avons obtenu également des taux de fixation faibles. La solubilité des composés lipophiles dans différents polymères a été étudiée par Layre et coll. (2005). Ces auteurs ont attribué la faible encapsulation à la diffusion importante de ces principes actifs dans le milieu de dispersion lors de la préparation des nanoparticules. La solubilité dans les polymères utilisés ne peut pas à elle seule renseigner sur le taux d'encapsulation. Ce travail a plutôt mis l'accent sur l'importance de l'affinité du polymère vis-à-vis du principe actif. Une meilleure affinité du polymère et une faible solubilité dans le milieu de dispersion permettrait une meilleure encapsulation du principe actif peu soluble. Dans notre cas, le résultat obtenu peut être expliqué par une faible affinité du mélarsoprol vis-à-vis de la PCL et du PLA et une diffusion massive vers la phase externe du mélange acétone-eau. La formation de cristaux lors de l'évaporation de l'acétone confirme la faible fixation du mélarsoprol par le polymère.

Parallèlement, la réalisation de nanocapsules a été également étudiée. La faible solubilité du mélarsoprol dans différentes huiles a été révélée lors des expériences préliminaires de solubilité. Toutefois, le mélarsoprol s'est montré particulièrement soluble dans le DMSO (> 200 mg/ml) et les essais de fabrication des nanocapsules ont été réalisés avec des mélanges de DMSO et d'huile (ex: benzoate de benzyle). Même ces essais n'ont pas permis d'encapsuler suffisamment le mélarsoprol (TE ~1 %), sans doute par une fuite du DMSO dans le milieu aqueux entrainant avec lui le mélarsoprol préalablement soluble (Hapca, 2002).

Enfin, la mise au point des nanoparticules polymériques du mélarsoprol est restée limitée par sa faible solubilité dans les huiles utilisées d'une part, et par sa faible affinité vis-à-vis des polymères testés d'autre part. Une alternative prometteuse pour la formulation de ce principe actif serait la mise au point des nanosuspensions.

2. Mise au point des nanosuspensions

Des nanosuspensions de mélarsoprol ont été réalisées selon la technique de Müller et coll. (1998). Elles présentent, comme nous l'avons détaillé dans la partie bibliographique, deux avantages majeurs : elles peuvent être préparées à partir de principes actifs peu solubles à la fois dans l'eau et dans les solvants organiques (Müller et coll., 2001), et leur préparation est relativement simple (Müller et coll., 1998). Elles peuvent être produites par deux techniques (cf. étude bibliographique, chapitre II, paragraphe 2). Nous avons choisi la méthode 'Disso Cubes' qui a été brevetée par R.H. Müller et mise en œuvre à l'aide d'un EmulsiFlex® de type B3 présenté dans la figure 17.

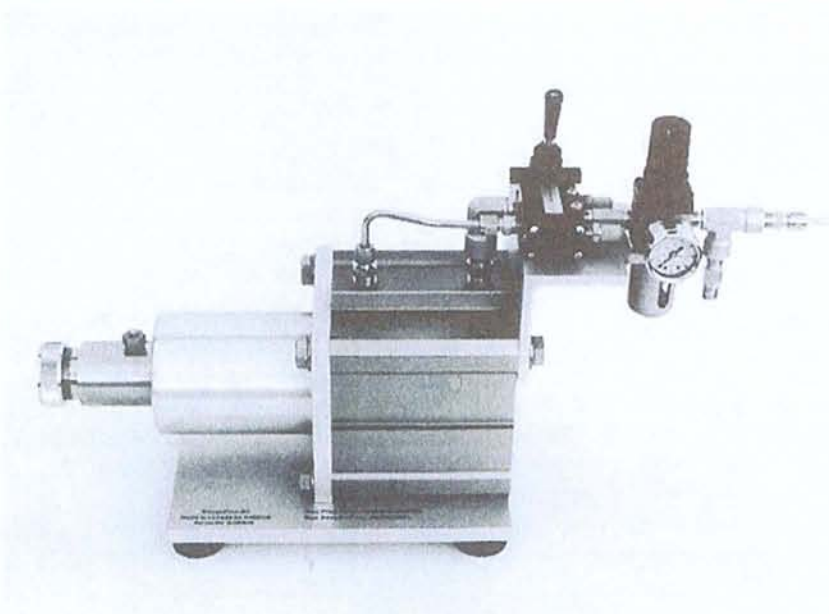


FIG. 17 — Image de l'appareil EmulsiFlex® - B3 (Avestin, Inc. Canada).

L'objectif de notre travail était de cibler la moelle osseuse avec des systèmes nanoparticulaires. Ce ciblage ne peut être obtenu qu'en modifiant les caractéristiques de surface ou la stabilité des vecteurs. En effet, les vecteurs passifs ne pouvant accéder à la moelle osseuse en quantité suffisante compte tenu de la capture hépatique et splénique (60 à 90 % de capture par le foie et 2 à 20 % par la rate). L'obtention de temps de rémanence sanguine élevé pourrait favoriser une biodistribution médullaire. Les travaux d'Illum et Davis (1987) ont montré que la présence de poloxamers à la surface des particules réduisait leur capture hépatique. Si de nombreux travaux ont été réalisés pour limiter la capture des liposomes ou des nanoparticules polymériques par le Système Réticulo-Endothélial SRE (greffage de polyéthylène glycol, polysaccharides, acide sialique,...), les possibilités de modifier les caractéristiques de surface des nanosuspensions sont beaucoup plus limitées. En effet, aucun greffage covalent ne peut être envisagé à la surface de particules constituées exclusivement du principe actif. Toutefois, l'utilisation de différents tensioactifs (poloxamers, poloxamines,...) lors de la préparation permet d'envisager un recouvrement de la surface par ces polymères selon leur affinité (Müller et coll., 2001).

La modification de la taille des nanoparticules nous laisse également envisager un ciblage médullaire. En effet, il existe une valeur seuil semblant correspondre à une taille de l'ordre de 100 nm (Jani et coll., 1990). En dessous de cette taille, le vecteur est peu opsonisé; il demeure dans le compartiment sanguin et est redistribué au niveau tissulaire pour des tailles de l'ordre de 50 nm. De plus, Moghimi et coll. (1990) ont montré que des tailles au dessous de 100 nm pourraient favoriser une capture médullaire, sauf chez le lapin. Au dessus de la valeur seuil, le vecteur est majoritairement capturé par le premier organe du SPM (le foie). Cependant, des nanoparticules de poly (alkylcyanoacrylate) de taille d'environ 200 nm se sont retrouvées dans la moelle osseuse (Gibaud et coll., 1994).

Au cours de la mise au point des nanosuspensions de mélarsoprol, nous n'avons pas pu obtenir des tailles inférieures à 175 nm sachant que nous avons optimisé les conditions de préparation au préalable (pression d'homogénéisation, nombre de cycles appliqués, type et teneur en tensioactif, teneur en principe actif). Avec des nanosuspensions de poloxamer 188 (taille=239 nm), nous avons envisagé de réduire la distribution au niveau du cerveau en favorisant la capture par le SRE. Avec des nanosuspensions de poloxamer 407, le résultat attendu est beaucoup plus intéressant puisque ce type de polymère s'est révélé être plus efficace en terme de spécificité médullaire (Porter et coll., 1992b; Storm et coll., 1995).

* **Efficacité des nanosuspensions de mélarsoprol (Ns/Mel) *in vitro***

La cytotoxicité du Mel sous forme de Ns/Mel vis-à-vis des cellules leucémiques humaines (K562 et U937) a été conservée. Toutefois, nous avons noté une faible réduction de l'activité dans les deux premiers jours d'incubation avec des cellules K562. Cela peut être expliqué par une lente transformation du mélarsoprol en ses métabolites actifs (ex : oxyde de mélarsène) suite à une faible libération dans le milieu d'incubation. La cytotoxicité importante mesurée à 72 h montre que le principe actif est en grande partie libéré au bout de 3 jours.

3. La mise au point des complexes

Depuis les travaux de Friedheim en 1952 (Friedheim, 1952), le seul solvant utilisé en thérapeutique pour l'administration du mélarsoprol est le propylène glycol. Ce solvant provoque une douleur importante au moment de l'injection et entraine de nombreuses veinites. De plus, nous suspectons une précipitation du principe actif après injection intraveineuse comme cela a été démontré pour plusieurs principes actifs peu solubles (Brewster et coll., 1995). La mise au point d'une forme soluble aqueuse et indolore est souhaitée par de nombreux praticiens. La caractérisation des complexes Mel/RAMEβ-CD et Mel/HPβ-CD a été réalisée selon des techniques courantes :

- L'étude de la 'solubilité de phase' réalisée selon la méthode d'Higuchi et Connors (courbe de type A_L avec un coefficient directeur < 1) était en faveur d'un complexe équimoléculaire (1:1) et a montré une amélioration considérable de la solubilité, d'un facteur égal à 7,2. 10^3 pour les deux types de cyclodextrines.
- La stœchiométrie (1:1) a été confirmée en phase aqueuse par spectrophotométrie UV (Job's plot).
- La constante de stabilité ($K_{1:1}$) a été déterminée par titration selon la méthode décrite par Benesi et Hildebrand.
- Enfin, l'étude du spectre ^{1}H-RMN a permis de montrer précisément l'insertion du mélarsoprol dans la cavité au niveau du cycle aromatique central et d'une partie du cycle dithiarsolane.

Sur le plan pharmacologique, il a été montré que le complexe permettrait de protéger le site d'hydrolyse de la molécule augmentant ainsi sa stabilité et conservant son activité antileucémique.

a. Etude de la stabilité du Mel sous forme de complexe Mel/RAMEβ-CD

La formation de complexe d'inclusion entre le Mel et la RAMEβ-CD a montré un effet protecteur sur le Mel. D'autres travaux se sont intéressés à la stabilité du Mel et ont montré que ce composé n'est pas stable et doit être conservé à sec à – 70°C (Ericsson et coll., 1997). Le processus de dégradation se fait essentiellement par hydrolyse par ouverture du cycle dithiarsolane pour donner des arsènoxydes (Berger et Fairlamb, 1994; Loiseau et coll., 2000).

Dans notre étude, la dégradation du Mel s'est révélée significativement faible quand ce composé est inclus dans la RAMEβ-CD, puisque la demi-vie de la stabilité a doublé dans la solution du complexe. A partir de ces résultats, nous pouvons conclure à l'effet protecteur de la CD contre la dégradation du Mel et confirmer la géométrie du complexe qui a été déterminée par les expériences RMN. Ainsi, le Mel est inclus dans la cavité de la RAMEβ-CD par une partie de son cycle dithiarsolane limitant ainsi sa dégradation par hydrolyse en arsènoxydes.

b. Etude de l'activité antileucémique du Mel sous forme de complexe Mel/RAMEβ-CD

Nous avons obtenu une inhibition de la croissance des cellules leucémiques (K562 et U937) exposées au complexe Mel/RAMEβ-CD similaire à celle qui avait été obtenue en présence du Mel seul. Cependant, le taux de mortalité de ces cellules après deux jours d'exposition était plus faible. Ces résultats peuvent être expliqués par une protection du Mel par la CD utilisée. Ainsi, le Mel est libéré lentement dans le milieu d'incubation. Cette protection entraine un ralentissement de sa transformation en métabolites actifs qui se forment par simple hydrolyse du Mel (Cristau et Placidi, 1972; Cristau et coll., 1972). Keiser et coll. (2000) ont montré que l'oxyde de mélarsène (principal métabolite du Mel) peut se former à partir d'un ou de plusieurs composés arséniés. Enfin, notre étude nous a permis de conclure à l'efficacité et l'opérabilité de la complexation.

4. L'étude pharmacocinétique

Après injection intraveineuse, un principe actif se distribue dans l'organisme en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques (log P, pKa, masse moléculaire,...). Les médicaments hydrosolubles séjournent préférentiellement en phase aqueuse alors que les médicaments liposolubles peuvent diffuser plus facilement d'un compartiment à l'autre et être stockés de manière prolongée dans des secteurs constituant un compartiment profond tel que la masse adipeuse. D'autres facteurs, comme la fixation aux protéines plasmatiques, peuvent également influencer significativement la distribution des principes actifs. Le devenir d'un principe actif après injection intraveineuse dépend aussi des différents ingrédients de la formulation. Certains travaux ont montré que des principes actifs très peu solubles et injectés par voie intraveineuse sous forme de solution non aqueuse (ex : propylène glycol (PG)) peuvent précipiter immédiatement après injection. L'équipe de Doenicke a mis en évidence une thrombophlébite au site d'injection chez des volontaires sains, après administration IV de l'etomidate sous forme de solution dans le PG (35 %) (Doenicke et coll., 1994).

Pour toutes les raisons citées ci-dessus, nous avons réalisé une étude pharmacocinétique du mélarsoprol dans différentes formulations : solution organique (DMSO/PG/NaCl) et solutions aqueuses à base de nanoparticules et de cyclodextrine. La fixation aux protéines plasmatiques ainsi que la distribution tissulaire seront discutées pour chaque formulation. Enfin, la pharmacocinétique du mélarsoprol sous forme de solution organique a été comparée à celle de l'arsthinol, qui a l'avantage de présenter un meilleur index thérapeutique (Gibaud et coll., 2006).

3.1. Pharmacocinétique du mélarsoprol en solution organique à base de DMSO/PG/NaCl

La pharmacocinétique du mélarsoprol a d'abord été étudiée par Cristau et coll. dans les années 1970 (Cristau et coll., 1972) et des études plus précises ont été réalisées au début des années 1990. L'ensemble de ces travaux a permis d'estimer les taux sériques du mélarsoprol ainsi que les concentrations au niveau du liquide céphalorachidien (LCR) chez des patients atteints de trypanosomiase. L'élimination est biphasique avec une phase β prononcée ($t_{1/2\beta}$ ~35 h). Généralement, peu de travaux ont été réalisés sur la distribution tissulaire du mélarsoprol. Seule l'étude de Gherardi et coll. qui a montré une affinité particulière pour la moelle épinière (Gherardi et coll., 1990).

Dans nos travaux, la pharmacocinétique de l'arsenic dans le cerveau après injection IV du mélarsoprol montre des concentrations assez élevées, avec une phase d'élimination prolongée, confirmant les résultats des travaux précédents. Ainsi, une toxicité par accumulation de ce principe actif dans le tissu cérébral peut être prononcée. Plusieurs hypothèses peuvent être émises à propos de son passage à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) (figure 18). En effet, le mélarsoprol ayant une lipophilie extrêmement importante pourrait passer facilement à travers cette barrière. Le passage pourrait se faire soit sous sa forme libre circulante, soit sous sa forme fixée aux protéines plasmatiques. Les travaux de Keiser et Burri (2000) ont estimé une fixation protéique de mélarsoprol à 79 %. Cette forme fixée pourrait passer la BHE par un mécanisme de transcytose généralement emprunté par les protéines circulantes (ex: l'albumine).

D'après les travaux de Bronner et coll. (1998), le mélarsoprol est en partie métabolisé en arsènoxydes au bout de 15 min. Le principal métabolite, l'oxyde de mélarsène (Keiser et coll., 2000) pourrait constituer une forme de passage à travers la BHE soit également sous forme libre ou fixée aux protéines plasmatiques (72 % de fixation selon Keiser et Burri, 2000). Ce produit a été synthétisé par Friedheim en 1939 et fut utilisé pendant de nombreuses années comme trypanocide. Mais, il a été abandonné à cause de sa toxicité. Certains auteurs ont supposé que l'oxyde de mélarsène est plus toxique que le mélarsoprol (Bronner et coll., 1998). A partir de ces travaux, nous pouvons également postuler que la toxicité cérébrale du mélarsoprol pourrait être due au passage d'oxyde de mélarsène à travers la BHE. Cette forme serait majoritaire. Néanmoins, beaucoup de travaux doivent être envisagés pour étudier le métabolisme du mélarsoprol.

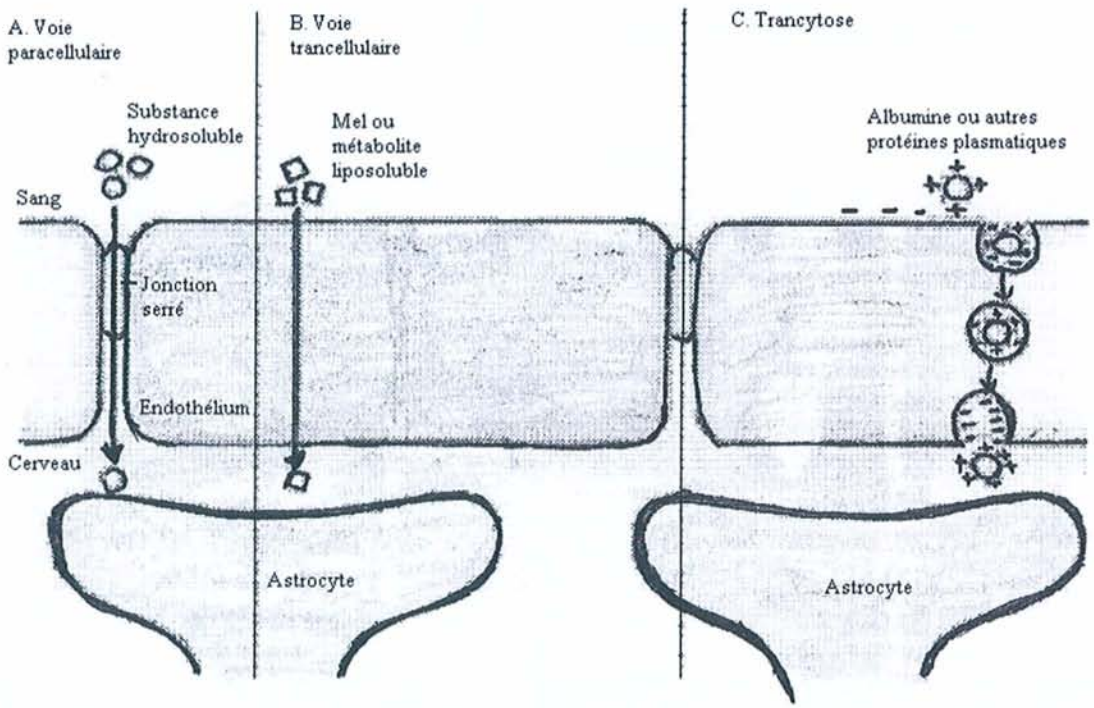


FIG. 18 — Représentation schématique du passage à travers la BHE de substance hydrophile par voie paracellulaire (A), de mélarsoprol (Mel) et/ou ses métabolites lipophiles par voie transcellulaire (B) et de protéines plasmatiques qui peuvent se fixer au Mel et/ou aux métabolites par transcytose (C).

Lors de l'étude de la pharmacocinétique au niveau de la moelle osseuse, nous supposons que le mélarsoprol passerait cette barrière sous forme métabolisée, puisque la concentration maximale en arsenic est atteinte au bout de 5h. A cette durée, le mélarsoprol serait transformé en totalité. Ainsi, nous ne pouvons pas avancer d'hypothèse à propos du mécanisme de passage des métabolites de mélarsoprol, sachant que nous manquons de données nous renseignant sur leur nature.

3.2. Pharmacocinétique des systèmes nanoparticulaires

La mise au point de nanoparticules polymériques permettant de cibler la moelle osseuse était notre premier objectif. Le ciblage médullaire de ces formulations est déjà bien connu. Comme nous l'avons expliqué dans la partie de la mise au point galénique, nous n'avons pas réussi à réaliser des nanoparticules polymériques mais plutôt des nanosuspensions. Toutefois, le ciblage médullaire des nanosuspensions a été très peu étudié.

Lors de notre étude, nous avons pu remarquer que les nanosuspensions de mélarsoprol (Ns/Mel) sont beaucoup plus concentrées dans le foie que dans d'autres organes, confirmant l'hypothèse d'un ciblage vers le foie. Nous ne pouvons donc pas exclure la limitation de la distribution de ces particules par la capture au niveau du SPM. Peters et coll. (2000) ont observé que les nanosuspensions de clofazimine sont plus concentrées dans le foie par rapport aux liposomes.

A l'inverse, nous ne pouvons démontrer la réalité d'un ciblage médullaire avec les nanosuspensions de mélarsoprol puisque les concentrations médullaires étaient comparables à celles de la forme libre du mélarsoprol. En effet, le poloxamer 407 connu pour faciliter le passage des nanoparticules à travers la barrière hémato-médullaire, ne correspond pas ici au lot utilisé auparavant (Porter et coll., 1992; Moghimi et coll., 2001). De plus, le modèle animal sur lequel a été testé était différent du nôtre (le lapin).

Au niveau du cerveau, les nanosuspensions ont été moins concentrées confirmant l'hypothèse selon laquelle les poloxamers ne peuvent pas cibler le cerveau. En effet, les polysorbates et non les poloxamers ont permis l'augmentation de l'effet pharmacologique de dalargine au niveau du système nerveux central (Kreuter et coll., 1997). D'ailleurs, cela explique notre choix.

Pour éclairer ces résultats, plusieurs explications seront proposées :

Après injection intraveineuse de médicament sous forme de particules, ces vecteurs généralement hydrophobes sont reconnus comme substances étrangères et sont rapidement éliminés de la circulation sanguine par les macrophages du SPM. Ces particules, une fois dans le compartiment sanguin, vont être « décorées » d'une série de protéines dont certaines sont les opsonines. Ces dernières vont pouvoir guider les nanoparticules vers des récepteurs spécifiques qui sont localisés à la surface des cellules de Kuppfer du foie (macrophages ayant des récepteurs spécifiques qui reconnaissent des opsonines plasmatiques) et les macrophages de la zone marginale de la rate. Après avoir interagi avec le récepteur macrophagique, les vecteurs sont internalisés par la voie de l'endocytose et ils finiront dans des lysosomes où ils pourront éventuellement être dégradés par les enzymes lysosomiales (Couvreur et coll., 1977). La composition biochimique et l'hydrophobicité de la surface des particules déterminent son interaction avec les composants sanguins. En effet, l'adsorption de fibronectine à la surface des particules de Latex à partir de la solution de fibrinogène et du plasma humain frais a été notée par l'équipe d'O'Mullane (O'Mullane et coll., 1988). La modification de la surface de ces particules par un polymère hydrophile et non ionique comme le poloxamer 338 (cf. tableau 7) qui s'adsorbe et couvre toute la surface hydrophobe, aurait ainsi diminué l'adsorption de la fibronectine et donc l'interaction des particules avec le SPM (Illum et Davis., 1984). En général, les surfaces hydrophiles montrent une faible adsorption des protéines plasmatiques par rapport aux surfaces hydrophobes (Muller, 1991). Cette adsorption protéique dépendrait de la nature du polymère hydrophile à la surface des particules (figure 19); ce qui explique dans notre cas une différence dans la distribution des nanosuspensions recouvertes de poloxamer 188 et de poloxamer 407.

D'autres travaux indiquent que l'interaction entre les nanoparticules et le tissu ciblé dépend essentiellement des propriétés de surface de ces formes galéniques et également de la nature de tous les constituants de la surface, y compris le principe actif lui-même (Olivier et coll., 1999). Dans notre cas, les nanosuspensions du mélarsoprol recouvertes par le poloxamer 188 ou par le poloxamer 407 possèderaient des propriétés de surface non spécifiques au compartiment médullaire et de ce fait elles sont plus concentrées au niveau du foie.

La quantité qui atteint la moelle osseuse étant insuffisante. Au niveau du cerveau, elles sont moins concentrées. Cela est peut être du à la capture massive par le foie ou à la présence de poloxamers à la surface, ou les deux.

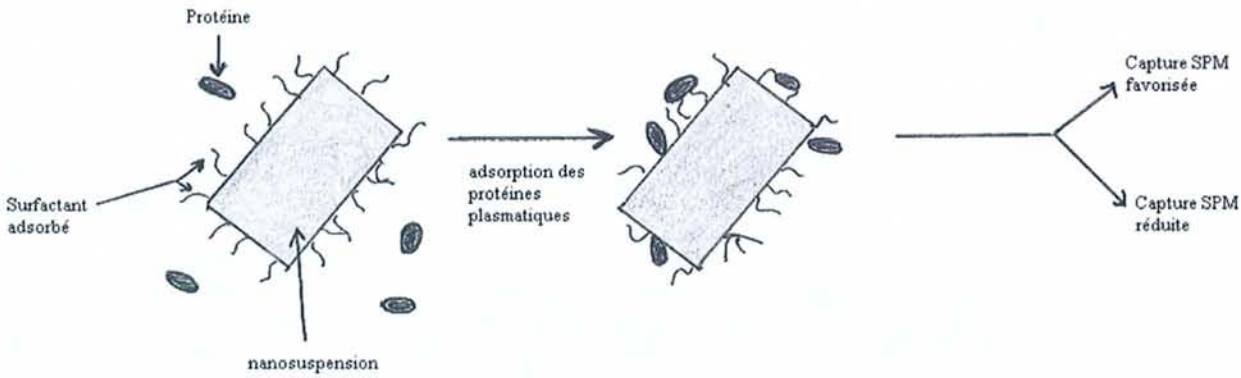


FIG.19 — Schéma de particule de nanosuspensions recouverte par le surfactant. L'adsorption des protéines plasmatiques dans le sang est en fonction des propriétés de la couche de surfactant à la surface de la particule (ex : charge, hydrophobicité). La capture par le SPM se trouve favorisée ou non, selon la nature des protéines adsorbées (opsonines).

D'autres méthodes doivent être envisagées pour déterminer la composition de la surface en protéines adsorbées à partir de la circulation systémique (analyse des protéines par électrophorèse sur gel) afin de comprendre les mécanismes de reconnaissance de ces nanosuspensions par les récepteurs hépatiques, médullaires et cérébraux.

3.3. Pharmacocinétique du mélarsoprol complexé à l'HPβ-CD

Les paramètres pharmacocinétiques du Mel sont significativement modifiés en présence de l'HPβ-CD. Les concentrations dans tous les organes sont également différentes et généralement plus élevées après injection du complexe. Par ailleurs, des résultats similaires ont été obtenus. En effet, l'administration parentérale de flurbiprofène à des rats, sous forme complexé avec l'HPβ-CD ou dans une solution de plasma, a mis en évidence une différence significative entre les deux formulations concernant la teneur du médicament dans les organes (foie, cerveau, rate et reins) au bout des dix premières minutes (Frijlink et coll., 1991). Les auteurs ont noté des teneurs plus élevées après injection du médicament dans la solution de cyclodextrine. Nous pourrions donc expliquer nos résultats par une amélioration de la présentation du mélarsoprol aux membranes biologiques en présence de l'HPβ-CD. Il est en effet bien démontré que l'effet pharmacologique d'un médicament après fixation sur son récepteur au niveau des tissus extravasculaires dépend essentiellement de la fraction non liée dans le plasma. De ce fait, L'HPβCD doit être capable d'atteindre l'endothélium vasculaire et de libérer le principe actif dans l'espace interstitiel (Sideris et coll., 1994). La libération de principe actif dépendrait de la constante de stabilité du complexe et de la constante d'association avec les protéines plasmatiques. En effet, d'autres travaux ont montré qu'après administration parentérale, la force majeure qui gouverne la dissociation de complexe à faible constante de stabilité ($\sim 10^2\ M^{-1}$) semble être essentiellement la dilution dans le compartiment sanguin. Pour des molécules fortement liées (constante de stabilité de l'ordre de $10^4\ M^{-1}$ ou plus), un déplacement compétitif par des substances endogènes, la fixation aux composants plasmatiques et tissulaire et l'élimination rapide de la cyclodextrine, peuvent contribuer à la libération de l'agent thérapeutique (Stella et coll., 1999). Ainsi, le mélarsoprol se libèrerait de la cavité de l'HPβ-CD en présence d'agent compétiteur (figure 20). Le nouveau complexe ainsi formé devrait avoir une constante de stabilité (K_{st}) supérieure à celle du complexe Mel/HPβ-CD ($K_{1:1} \sim 5.10^4\ M^{-1}$). Une libération incomplète du médicament *in vivo* à partir de la cavité de la CD peut être critique pour l'effet pharmacologique puisque seulement la forme non liée peut interagir avec le récepteur correspondant.

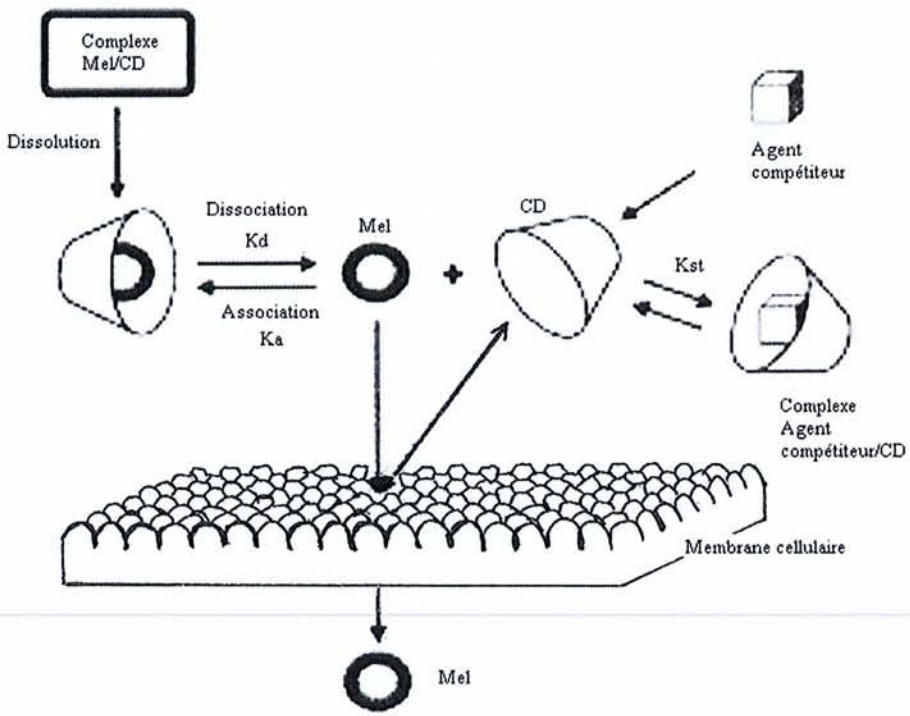


FIG. 20 — Représentation schématique du passage du mélarsoprol (Mel) à travers la membrane cellulaire, à partir de son complexe avec la cyclodextrine (CD), en présence d'un agent compétiteur (ex : cholestérol). K_d : constante de dissociation du Mel/CD, Ka : constante d'association du Mel/CD, Kst : constante de stabilité du complexe agent compétiteur/CD.

L'étude *in vitro* de la fixation du mélarsoprol aux protéines plasmatiques en présence de l'HPβ-CD a été également réalisée. Les résultats témoignent que cette fixation devient de plus en plus faible avec l'augmentation de la concentration de l'HPβ-CD. Cela pourrait être dû à la compétition entre la molécule de cyclodextrine et les protéines plasmatiques pour complexer le mélarsoprol. Frijlink et coll. ont étudié l'effet de cette CD sur la fixation aux protéines plasmatiques de naproxène et flurbiprofène *in vitro* et ont montré que cette fixation diminue également avec l'augmentation de la concentration en cyclodextrine (Frijlink et coll., 1991).

A partir de la comparaison des résultats de la pharmacocinétique, nous avons suspecté une précipitation de mélarsoprol dans le compartiment sanguin après injection de celui-ci sous forme de solution organique (DMSO/PG/NaCl). Cela peut expliquer la différence significative qui a pu être mise en évidence entre cette formulation organique et les autres formulations aqueuses, de point de vue de la distribution tissulaire. Une formulation de Mel à base de cyclodextrine pourrait ainsi être utilement proposée comme alternative de la forme commerciale.

3.4. Pharmacocinétique de l'arsthinol

La détermination des concentrations de l'arsenic dans différents organes après administration intraveineuse de l'arsthinol, a montré que la distribution de ce principe actif reste globalement comparable à celle du Mel avec quelques différences à préciser :

- Au niveau du foie, les concentrations élevées de l'arsenic après injection du Mel par rapport à celle trouvées dans le cas de l'arsthinol peuvent être expliquées par le fait que le premier passage hépatique du mélarsoprol; composé lipophile, serait plus important que celui de l'arsthinol; composé moins lipophile. Nous pouvons aussi postuler l'hypothèse selon laquelle des métabolites secrétés par la bile ne seraient pas hydrolysés et pourraient retourner vers le foie sans atteindre la circulation systémique. Ce phénomène serait beaucoup plus important dans le cas du Mel que dans le cas de l'arsthinol.
- Au niveau de la moelle osseuse, le taux de l'arsenic est également moins élevé après administration de l'arsthinol. Cette faible accumulation dans cet organe pourrait être compensée par l'activité antileucémique importante de ce composé.
- Au niveau du cerveau, la concentration de l'arsenic était faible par comparaison à celle obtenue après administration de Mel. Ceci est bien corrélé avec la faible toxicité de l'arsthinol précédemment démontrée (Gibaud et coll., 2006).

L'arsthinol a été détecté par Chromatographie Liquide à Haute Performance dans le sang, uniquement dans les premières minutes après l'injection. A l'inverse, les concentrations de l'arsenic déterminées par la méthode colorimétrique détaillée dans la publication n°3, restent élevées et détectables jusqu'à 20 h. Ce résultat rejoint celui de l'étude menée par Keiser et Burri (2000) qui a postulé une hydrolyse rapide des dithiarsolanes en leurs arsènoxydes. La pharmacocinétique sanguine de l'arsenic montre une forme bi-exponentielle correspondant au modèle à deux compartiments décrit par Burri et Keiser (2001). En effet, la première partie de la courbe correspond à l'élimination de la fraction libre. La seconde phase de la courbe correspondrait à l'élimination de la partie fixée aux protéines plasmatiques (74 %).

Les travaux présentés dans ce document, s'inscrivent dans le cadre des recherches menées sur l'optimisation galénique d'un antiparasitaire; le mélarsoprol, au sein du laboratoire de pharmacie clinique à la faculté de pharmacie de Nancy. L'objectif de ces travaux était de mettre au point des systèmes nanoparticulaires pour des traitements à visée antileucémique et également des solutions injectables pour le traitement trypanocide actuel. Le but recherché par ces nouvelles formulations galéniques est d'améliorer l'index thérapeutique et la maniabilité de ce médicament ainsi que la qualité de vie des patients.

Sur le plan oncologique, il a été démontré par plusieurs recherches que le mélarsoprol est efficace sur plusieurs types de leucémies et sur le myélome multiple dont le pronostic est pessimiste (médiane de survie sous traitement est de 3 ans). Les résultats très prometteurs ont encouragé l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris à lancer en 1998 un essai clinique qui a malheureusement abouti à l'échec à cause de la sévère toxicité du médicament.

Pour toutes ces raisons, l'optimisation galénique du mélarsoprol est vivement souhaitée en vue de réduire sa toxicité cérébrale et les douleurs provoquées par son injection.

La spécificité de notre démarche et apports essentiels :

Les potentialités thérapeutiques de ce travail sont particulièrement intéressantes car des modifications de la formulation galénique du mélarsoprol pourraient intéresser plusieurs domaines de la thérapeutique.

Dans le domaine de la cancérologie, des nanosuspensions de mélarsoprol, bien qu'aucune vectorisation médullaire ne soit assurée, permettraient de réduire sa concentration au niveau cérébral et donc sa toxicité. En revanche, le ciblage au niveau de la moelle osseuse pourrait être favorisé par modification de la surface de ces particules en greffant notamment des ligands spécifiques aux récepteurs médullaires. L'index thérapeutique du mélarsoprol vectorisé à visée antileucémique en serait donc amélioré.

Dans le domaine de la parasitologie (trypanosomiase), les résultats obtenus pourraient être également intéressants. En effet, à partir d'une méthode de solubilisation et de complexation avec les cyclodextrines, nous avons pu obtenir une formulation aqueuse de mélarsoprol évitant ainsi l'utilisation de solvants non-aqueux. Cette solution qui n'induit pas de douleur notable pour l'animal lors de l'injection contrairement au mélarsoprol commercial, permettrait ainsi d'améliorer la tolérance et l'acceptabilité du traitement mais au prix d'une toxicité neurologique centrale accrue du fait d'une plus forte diffusion cérébrale. Cependant, ce point doit être relativisé du fait d'une possible réduction des doses compte tenu de la meilleure disponibilité de la forme cyclodextrine. Toutefois, la marge thérapeutique du mélarsoprol reste étroite et aucune étude de dose n'a été conduite permettant de définir un schéma thérapeutique permettant l'éradication parasitaire avec minimisation des effets toxiques. Des études expérimentales sur les modèles animaux infestés en utilisant notre complexe Mel-CD seraient certainement à conduire dans ce sens.

Liste des figures

FIG. 1 : Structure chimique du mélarsoprol.

FIG. 2 : Schéma de synthèse des phényldithiarsolanes.

FIG. 3 : L'effet de l'As_2O_3 (à gauche) et du mélarsoprol (à droite) sur la viabilité de la lignée JVM-2 à différentes concentrations (10^{-7} à 10^{-9} M) pendant 96 heures. Les cellules témoins sont cultivées en présence de NaOH dans le cas de l'As_2O_3 (NaOH CTRL) et en présence de propylène glycol (PG) dans le cas du mélarsoprol (PG CTRL).

FIG. 4 : Concentrations sériques de l'oxyde de mélarsène et du mélarsoprol en fonction du temps déterminées par Chromatographie Liquide à Haute performance et comparées à celles de l'ensemble des dérivés de l'arsenic déterminées par bioanalyse et par spectroscopie d'absorption atomique (SAA).

FIG. 5 : Structure schématisée des nanoparticules.

FIG. 6 : Représentation schématique du procédé de préparation des nanosuspensions par la technique 'Nanocrystals'.

FIG.7 : Représentation schématique du principe de l'homogénéisation à haute pression.

FIG. 8 : Représentation de monomères de la β-CD (a : structure développée, b : structure "tronc de cône").

FIG. 9 : Schéma des différentes couches de la barrière hémato-encéphalique (BHM).
La BHM est constituée de trois couches distinctes : une monocouche de cellules endothéliales (côté luminal du sinus veineux), une monocouche discontinue de cellules réticulaires adventices (côté externe) et une membrane basale discontinue située entre les deux monocouches précédentes.

FIG. 10 : La BHE. a) Représentation morphologique schématique de la BHE. La membrane des capillaires cérébraux se caractérisent notamment par la présence des jonctions serrées (tight junctions) entre les cellules endothéliales constituant la membrane du microvaisseau mais aussi par l'absence de fenestration dans cette membrane, ce qui limite drastiquement les échanges entre le sang et le cerveau. b) Représentation schématique du contact entre cellules endothéliales et astrocytes.

FIG. 11 : Formule chimique développée de la PCL.

FIG.12 : Formule du poly (acide L-lactique).

FIG. 13 : Formule du Pluronic® F68.

FIG.14 : Représentation schématique des deux étapes de la technique de la nanoprécipitation. En haut : ajout de la phase organique contenant le polymère et le principe actif, à la phase aqueuse contenant le surfactant. En bas : évaporation du solvant (acétone) dans l'évaporateur rotatif.

FIG. 15 : La taille (nm) et le taux d'encapsulation (TE %) des nanosphères des organoarséniés préparées à base de la polycaprolacone (PCL) et de l'acide polylactique (PLA).

FIG. 16 : Représentation schématique du mécanisme de déplacement d'un principe actif lipophile durant le processus de nanoprécipitation; hypothèse selon Layre et coll.
(I) Dispersion de la phase organique (polymère-acétone) dans la phase aqueuse, diffusion de l'acétone (flèches vides) et du principe actif (flèches pleines). (II) formation de nanoparticules. (III) Evaporation de l'acétone. (IV) formation de cristaux ( ).

FIG. 17 : Image de l'appareil EmulsiFlex® - B3 (Avestin, Inc. Canada).

FIG. 18 : Représentation schématique du passage à travers la BHE de substance hydrophile par voie paracellulaire (A), de mélarsoprol (Mel) et/ou ses métabolites lipophiles par voie transcellulaire (B) et de protéines plasmatiques qui peuvent se fixer au Mel et/ou aux métabolites par transcytose (C).

FIG.19 : Schéma de particule de nanosuspensions recouverte par le surfactant. L'adsorption des protéines plasmatiques dans le sang est en fonction des propriétés de la couche de surfactant à la surface de la particule (ex : charge, hydrophobicité). La capture par le SPM se trouve favorisée ou non, selon la nature des protéines adsorbées (opsonines).

FIG. 20 : Représentation schématique du passage du mélarsoprol (Mel) à travers la membrane cellulaire, à partir de son complexe avec la cyclodextrine (CD), en présence d'un agent compétiteur (ex : cholestérol). K_d : constante de dissociation du Mel/CD, Ka : constante d'association du Mel/CD, Kst : constante de stabilité du complexe agent compétiteur/CD.

Liste des Tableaux

Tableau 1: L'activité *in vitro* du mélarsoprol et de certains composés arséniés sur les trypanosomes.

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques des patients traités par le mélarsoprol.

Tableau 3 : Le protocole de traitement par le mélarsoprol recommandé par l'OMS.

Tableau 4: Paramètres pharmacocinétiques du mélarsoprol dans le sérum après plusieurs administrations intraveineuses chez les singes vervet.

Tableau 5 : Excrétion urinaire et biliaire de l'arsenic après administration IV de mélarsoprol chez le rat et le cobaye (dose d'arsenic injectée=1,25 mg/kg).

Tableau 6 : Propriétés des cyclodextrines naturelles.

Tableau 7 : Poids moléculaire et balance hydrophilique/lipophilique (BHL) de quelques poloxamers et leur nomenclature Pluronic.

Tableau 8 : Paramètres d'activité et de toxicité systémique de différents phényldithiarsolanes synthétisés au laboratoire.

Références bibliographiques

Akasaka H., Endo T., Nagase H., Ueda H., Kobayashi S. Complex formation of cyclomaltononaose delta-cyclodextrin (delta-CD) with macrocyclic compounds. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2000. 48(12): 1986-1989.

Akers M.J. Excipient-drug interactions in parenteral formulations. J. Pharm. Sci., 2002. 91: 2283-2300.

Allemann E., Gurny R., Doelker E. Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting tissues. Review. Eur. J. Biopharm., 1993. 39(5): 173-191.

Allemann E., Gravel P., Leroux J.C., Balant L., Gurny R. Kinetics of blood component adsorption on poly (D,L-lactic acid) nanoparticles : evidence of complement C3 component involvement. J Biomed Mater Res, 1997. 37: 229-234.

Alyautdin R.N., Petrov V.E., Langer K., Berthold A., Kharkevich D.A., Kreuter J. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. Pharm. Res, 1997. 14 (3): 325-328.

Alyautdin R.N., Reichel A., Lobenberg R., Ramge P., Kreuter J., Begley D.J. Interaction of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles with the blood-brain barrier in vivo and in vitro. J Drug Target, 2001. 9: 209-211.

Ambruosi A., Gelperina S., khalansky A., Tanski S., Theisen A., Kreuter J. Antitumor effect of doxorubicin loaded in poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles in rat glioma model: influence of formulation parameters. J Microencapsulation., 2006. 23: 582-592.

Arias-Blanco M.J.A., Moyano J.R., Martinez J.I.P., Gines J.M. Study of inclusion complex of gliclazide in α-cyclodextrin. J Pharm Biomed Anal., 1998. 18: 275-279.

Astier A. and Gibaud S. Utilisation de dérivés organoarséniés ou organostibiques pour leur propriétés anticancéreuses, 2003. France.

BIBLIOTHÈQUE NANCY

Aungst B.J. Novel formulation strategies for improving oral bioavailability of drugs with poor membrane permeation or presystemic metabolism. J. Pharm. Sci., 1993. 82: 979-986.

Aungst B.J., Nguyen N., Rogers N.J., Rowe S., Hussain M., Shum L., White S. Improved oral bioavailability of an HIV protease inhibitor using Gelucire 44/14 and Labrasol vehicles. B.T. Gattefosse., 1994. 87: 49-54.

Balabanov R., Dore-Duffy P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. J Neurosci Res, 1998. 53: 637-644.

Berger B.J., Fairlamb A.H. Properties of melarsamine hydrochloride (Cymelarsan) in aqueous solution. Antimicrob. Agents. Chemother., 1994. 38: 1298–1302.

Bhargava K.K., Le Trang N., Cerami A., Eaton J.W. Effect of arsenical drugs on glutathione metabolism of Litomosoides Carinii. Molecular and Biochemical Parasitology, 1983. 9(1): 29-35.

Bickel U., Yoshikawa T., Pardridge W.M. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. Adv. Drug. Deliv. Rev., 2001. 46: 247-279.

Blum J., Nkunku S., Burri C. Clinical description of encephalopathic syndromes and risk factors for their occurrence and outcome during melarsoprol treatment of Human African Trypanosomiasis. *Trop. Med. Int. Health.*, 2001. 6(5): 390-400.

Borchard G., Audus K.L., Shi F., Kreuter J. Uptake of surfactant-coated poly (methyl methacrylate)-nanoparticles by bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *Int. J. Pharm.*, 1994. 110: 29-35.

Bouteille B., Oukem O., Bisser S., Dumas M. Treatment perspectives for Human African Trypanosomiasis. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2003. 17: 171-181.

Brainbridge WS. The cancer problem. *New York, NY. Macmillan*, 1914. Pp: 271.

Brewster M. E., Estes K. S., Bodor N. An intravenous toxicity study of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, a useful drug solubilizer, in rats and monkeys. *Int. J. Pharm.*, 1990. 59(3): 231-243.

Brewster M.E., Loftsson T., Amselem S., Friedmand D., Yogev A., Anderson W.R., Helton D.O., Dinculescu A., Bodor N., Pop E. Formulation development for a zidovudine chemical delivery system. 1. Parenteral dosage forms. *Int. J. Pharm.*, 1995. 125: 17-30.

Brewster M.E., Anderson W.R., Webb A.I., Pablo L.M., Meinsma D., Moreno D., Derendorf H., Bodor N., Pop E. Evaluation of a brain targeting zidovudine chemical delivery system in dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997. 41: 122-128.

Bronner U., Brun R., Doua F., Ericsson O., Burri C., Keiser J., Miézan T.W., Boa Y.F., Rombo L., Gustafsson L.L. Discrepancy in plasma melarsoprol concentrations between HPLC and bioassay methods in patients with T. gambiense sleeping sickness indicates that melarsoprol is metabolized. *Trop. Med. Int. Health.*, 1998. 3: 913-917.

Burri C., Baltz T., Giroud C., Doua F., Welker H.A., Brun R. Pharmaokinetic properties of the trypanocidal drug melarsoprol. *Chemotherapy*, 1993. 39: 225-234.

Burri C., Onyango J.D., Auma J.E., Burudi E.M.E., Bru R. Pharmacokinetics of melarsoprol in uninfected vervet monkeys. *Acta. Trop.*, 1994. 58: 35-49.

Burri C, Keiser J. Pharmacokinetic investigations in patients from northern Angola refractory to melarsoprol treatment. *Trop. Med. Int. Health.*, 2001. 6(5): 412-20.

Castaigne S., Chomienne C., Daniel MT., Ballerini P., Berger R., Fenaux P., Degos L. All-Trans Retinoic Acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukaemia. I. Clinical results. *Blood*, 1990. 76(9): 1704-1709.

Castaigne S., Lefebvre P., Chomienne C., Suc E., Rigal-Huguet F., Gardin C., Delmer A., Archimbaud E., Tilly H., Janvier M., Isnard F., Travade P., Montfort L., Delannoy A., Rapp MJ., Christian B., Montastruc M., Weh H., Fenaux P., Dombret H., Gourmel B., Degos L. Effectiveness and pharmacokinetics of low dose All-Trans Retinoic Acid (25 mg/m^2) in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1993. 82(12): 3560-3563.

Carter N.S, Fairlamb A.H. Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature,* 1993. 14: 173-6.

Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. AAPS PharmSciTech., 2005. 6(2): 329-357.

Clerinx J., Taelman H., Bogaerts J., Vervoort T. Treatment of late stage rhodesiense trypanosomiasis using suramin and eflornithine: report of six cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998. 92: 449-450.

Connors K.A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev.*, 1997. 97(5): 1325-1358.

Couvreur P., Tulkens P., Roland M., Trouet A., Speiser P. FEBS Letters, 1977. 84 :323.

Couvreur P., Kante B., Roland M. Polycyanoacrylate nanocapsules as potentiel lysosomotropic carries: preparation, morphological and sorptive properties. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1979. 31: 331-332.

Couvreur P., Roblot-Treupel L., Poupon M.F., Brasseur F., Puisieux F. Nanoparticles as microcarriers for anticancer drugs. *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, 1990. 5: 209-230.

Cristau B., Placidi M., Audibert P. Voies et cinétiques d'élimination de l'arsenic chez le rat après administration de médicaments organoarséniés. II. Etude du mélarsoprol et du mélarsonyl potassique. *Med. Trop.*, 1972. 32(3): 275-283.

Cristau B., Placidi M. Voies et cinétiques d'élimination de l'arsenic chez le rat après administration de médicaments organoarséniés. IV- Excrétion biliaire du mélarsoprol, du mélarsonyl et de composés apparentés. *Med. Trop.*, 1972. 32(4): 477-482.

Cristau B., Placidi M., Legait J.P. Etude de l'excrétion de l'arsenic chez le trypanosome traité au mélarsoprol (Arsobal®). *Med. Trop.*, 1975. 35(5):389-401.

Cuevas P., Gutierrez-Diaz J.A., Reimers D., Dujovny M., Diaz F.G., Ausman J.I. Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. *Anat. Embryol.*, 1984. 170: 155-159.

Davies B., Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.*, 1993. 10: 1093-1095.

Davio S.R., McShane M.M., Kakuk T.J., Zaya R.M., Cole S.L. Precipitation of the renin inhibitor ditekiren upon iv infusion; in vitro studies and their relationship to in vivo precipitation in the cynomolgus monkey. *Pharm. Res.*, 1991. 8: 80-83.

Doenicke A., Roizen M.F., Nebauer A.E., Kugler A., Hoernecke R., Beger-Hintzen H. A comparison of two formulations for etomidate, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPCD) and propylene glycol. *Anesth. Analg.*, 1994. 79: 933-939.

Doua F., Yapo F.B. Human Trypanosomiasis in the Ivory Coast: therapy and problems. *Acta. Trop.*, 1993. 54(3-4): 163-168.

Doua F., Yapo F.B. Actualités thérapeutiques de la trypanosomiase. *Bull. Soc. Path. Ex.*, 1994. 87(5): 337-340.

Dunn S.E., Coombes A.G.A. Garnett M.C., Davis S.S., Davies M.C., Illum L. In vitro cell interaction and in vivo distribution of poly (d, l lactide co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers. *J. Controlled. Release.*, 1997. 44: 65-76.

Ericsson O, Schweda EK, Bronner U, Rombo L, Fridén M, Gustafsson LL. Determination of melarsoprol in biological fluids by high-performance liquid chromatography and characterisation of two stereoisomers by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 1997. 690(1-2): 243-51.

Faber C. Leucémies : les premiers essais français de l'arsenic ont commencé. *Le quotidien du medecin,* 24/11/1998. n° 6385, pp 13.

Fairlamb A.H., Henderson G.B., Cerami A. Trypanothione is the primary target for the arsenical drugs against African trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989. 86(8): 2607-2611.

Fessi H., Devissaguet JP., Puisieux F., Thies C. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanoparticules. *Brevet français*, 1988; FR 2 608 988.

Flynn G.L. Solubility concepts and their application to the formulation of pharmaceutical systems. Part I. Theoretical foundations. *J. Parenter. Sci. Technol.*, 1984. 38: 202-209.

Frank D.W., gray J.E., Weaver R.N. Cyclodextrin nephrosis in the rat. *Am. J. Pathol.,* 1976. 83(2): 367-382.

Frank R.N., Dutta S., Mancini M.A. Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1987. 28: 1086-1091.

Freudenberg K., Meyer-Deluis M., *Deutsch Ber. Chem. Ges.*, 1938. 71: 1596-1600.

Friedheim E.A.H., Substituted [1,3,5,-triazinyl-(6)]-aminophenyl-arsonic acids and process for manufacture of same, 1942. *US Patent* 2,295,574.

Friedheim E.A.H. Organometallic compounds containing 1,3,5-triazine rings, 1947: 15319.

Friedheim E.A.H. Melarsen oxide in the treatment of human African trypanosomiasis. *Ann. Trop. Med.*, 1948. 42: 357-63.

Friedheim E.A.H. Propylene glycol solution of arsenic medicaments, 1952. *US Patent* 2,593,493.

Frijlink H.W., Visser J., Hefting N. R., Oosting R., Meijer D. F. K., Lerk C. F. The pharmacokinetics of beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in the rat. *Pharm. Res.*, 1990. 7(12): 1248-52.

Frijlink H.W., Franssen E.J.F., Eissens A.C., Oosting R., Lerk C.F., Meijer D.K.F. The effects of cyclodextrins on the disposition of intravenously injected drugs in the rat. *Pharm. Res.*, 1991. 8: 380-384.

Frömming K.H., Szejtli J. Cyclodextrin inclusion complexes, cyclodextrins in pharmacy, Klumer Academic Publischers, Dodrecht/ Boston/ London, 1994.

Gherardi RK., Chariot P., Vanderstigel M., Malapert D., Verroust J, Astier A et al. Organic arsenic-induced Guillain-Barre-like syndrome due to melarsoprol: a clinical, electrophysiological, and pathological study. *Muscle Nerve,* 1990. 13: 637-645.

Gibaud S., Andreux JP., Weingarten C., Renard M., Couvreur P. Increased bone marrow toxicity of doxorubicin bound to nanoparticles. *Eur. J. Cancer.*, 1994. 6: 820-826.

Gibaud S., Demoy M., Andreux J.P., Weingarten C., Gouritin B., Couvreur P. Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs. *J. Pharm. Sci.*, 1996. 85 (9): 944-950.

Gibaud S. Etude du ciblage des organes hématopoïétiques à l'aide de nanoparticules: application à la doxorubicine et au G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) vectorisés à l'aide de nanoparticules de polyalkylcyanoacrylates. *Thèse d'université de Paris XI*, 1997.

Gibaud S., Alfonsi R., Mutzenhardt P., Fries I., Astier A. (2-phenyl-[1,3,2]dithiarsolan-4-yl)-methanol derivatives show in vitro antileukemic activity. *J. Organometallic. Chem.*, 2006. 691: 1081-1084.

Goisnard P. Recours au mélarsoprol dans le traitement des myélomes multiples : apport de la vectorisation médullaire. *Mémoire de DEA*, 1999.

Goldman L., Preston R.H., Meister M. Dermatologica, 1956. 113: 369.

Gref R., Lück M., Quellec P., Marchand M., Dellacherie E., Harnisch S. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 2000. 18: 301-313.

Gregus Z., Gyurasics A. Role of glutathione in the biliary excretion of the arsenical drugs trimelarsan and melarsoprol. *Biochemical Pharmacology*, 2000. 59: 1375-1385.

Grislain L., Couvreur P., Lenaerts V., Roland M., Deprez-Decampeneere D., Speiser P. Pharmacokinetics and distribution of biodegradable drug-carriers. *Int. J. Pharm.*, 1983. 15: 335-345.

Haller L., Adams H., Merouze F., Dago A. Clinical and pathological aspects of Human African Trypanosomiasis (T. b. gambiense) with particular reference to reactive arsenical encephalopathy. *Am. J. Med. Hyg.*, 1986. 35: 94-99.

Hapca A. Mise au point de nanocapsules de mélarsoprol et évaluation de leur cytotoxicité *in vitro*. *Mémoire de DEA*, 2002.

Higuchi T., Connors K. A. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.,* 1965. 4: 117-212.

Hörter D., Dressman J.B. Influence of physicochemical properties n dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 1997. 25: 3-14.

Illum L., Davis S.S. The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Poloxamer 338). *FEBS Letters*, 1984. 167: 79.

Illum L., Davis S.S. Targeting of colloidal particles to the bone marrow. *Life Sci.*, 1987. 40(16): 1553-1560.

Irie T., Sunada M., Otagiri M., Uekama K., Ohtani Y., Yamada Y., Sugiyama Y. Cyclodextrin-induced hemolysis and shape changes of human erythrocytes in vitro. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 1982. 5(9): 741-744.

Jani P., Halbert G.W., Langridge J., Florence A.T. Nanoparticles uptake by the rat gastrointestinal mucosa : quantification and particle size dependency. J. Pharma. Pharmacol. 42 (12), 821-826, 1990.

Jennings FW., Atouguia JM., and Murray M. The importance of 2,3-dimercaptopropinol (British anti-lewisite, BAL) in the trypanocidal activity of topical melarsoprol. *Acta. Trop.*, 1996. 62(2): 83-89.

Jolliffe D.M. A history of the use of arsenicals in man. *J. R. Soc. Med.*, 1993. 86(5): 287-289.

Jusko W.J., Gretch M., Gassett R. Precipitation of diazepam from intravenous preparations. *J. Am. Med. Assoc.*, 1973. 225: 176.

Kacem K., Lacombe P., Seylaz J., Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter : a confocal microscopystudy. *Glia*, 1998. 23: 1-10.

Khanna S.C., Speiser P. Epoxy resin beads as a pharmaceutical dosage form. I: Methods of preparation. *J. Pharm. Sc.*, 1969. 58: 1114-1117.

Keiser J., Burri C. Physico-chemical properties of the trypanocidal drug melarsoprol. *Acta. Trop.*, 2000. 74(1): 101-104.

Keiser J., Ericsson O., Burri C. Investigations of the metabolites of the trypanocidal drug melarsoprol. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2000. 67(5): 478-488.

Kennedy P.G.E. Human African trypanosomiasis - neurological aspects. *J. Neurol.*, 2006. 253: 411-416.

König A., Wrazel L., Warrell RP Jr., Rivi R., Pandolfi PP., Jakubowski A., Gabrilove JL. Comparative activity of melarsoprol and arsenic trioxide in chronic B-cell leukemia lines. *Blood*, 1997. 90: 562-570.

Korttila K., Sothman A., Andersson P. Polyethylene glycol as a solvent for diazepam: Bioavailability and clinical effects after intramuscular administration, comparison of oral, intramuscular and rectal administration, and precipitation from intravenous solutions. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 1976. 39: 104-117.

Kreuter J. Drug targeting with nanoparticles. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.*, 1994. 19(3): 253-256.

Kreuter J., Alyautdin R.N., Kharkevich D.A., Ivanov A.A. Passage of peptides through the blood brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain. Res.*, 1995. 674(1): 171-174.

Kreuter J., Petrov V.E., Kharkevich D.A., Alyautdin R.N. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood-brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. *J. Control. Release.*, 1997. 49:81-87.

Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2001. 47: 65-81.

Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *Curr. Med. Chem-CNS. Agents.*, 2002. 2: 241-249.

Kreuter J., Shamenkov D., Petrov V., Ramge P., Cychutek K., Koch-Brandt C., Alyautdin R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J. Drug. Target.*, 2002. 10: 317-325.

Kwong YL., Todd D. Delicious poison: Arsenic Trioxide for the treatment of leukaemia. *Blood*, 1997. 89(9): 3487-3488.

Lawrence M.J., Rees G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 2000. 45, 89-121.

Layre A.M., Gref R., Richard J., Requier D., Chacun H., Appel M., Domb A.J., Couvreur P. Nanoencapsulation of a cristalline drug. *Int. J. Pharm.*, 2005. 298: 323-327.

Lin H.S., Chan S.Y., Yang Low K.S., Shoon M.L., Ho P.C. Kinetic study of a 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin-based formulation of all-trans-Retinoic Acid in Sprague-Dawley rats after oral or intravenous administration. *J. Pharm. Sci.*, 2000. 89 (2): 260-267.

Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer. Chemother. Pharmacol.*, 1997. 40: S3-8.

Liversidge G.G., Cundy K.C., Bishop J.F., Czekai D.A. Surface modified drug nanoparticles. *US Patent*, 1992. 5,145,684.

Lode J., Fichtner I., Kreuter J., Berndt A., Diederichs J.E., Reszka R. Influence of surface-modifying surfactants on the pharmacokinetic behaviour of ^{14}C-poly(methylmethacrylate) nanoparticles in experimental tumor models. *Pharm. Res*, 2001. 18: 1613-1619.

Loftsson T., Brewester M. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilisation and stabilization. *J. Pharm. Sci.,* 1996. 85(10): 1017-1025.

Loiseau P.M., Lubert P., Wolf J.G. Contribution of dithiol ligands to in vitro and in vivo trypanocidal activities of dithiarsanes and investigation of ligand exchange in an aqueous solution. *Antimicrob. Agents. Chemother.,* 2000. 44: 2954-2961.

Löscher W., Hönack D., Richter A., Schulz H.U., Schürer M., Düsing R., Brewster M.E. New injectable aqueous carbamazepine solution through complexing with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin: tolerability and pharmacokinetics after intravenous injection in comparison to a glycofurol based formulation. *Epilepsia*, 1995. 36(3): 255-261.

Lutka A. Investigation of interaction of promethazine with cyclodextrins in aqueous solution. *Acta. Pol. Pharm.*, 2002. 59(1): 45-51.

Martindale - The extra pharmacopoeia, 30ème edition. *The Pharmaceutical Press.*

Matsuda H., Arima H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 1999. 36(1): 81-99.

Merisko-Liversidge E., Sarpotdar P., Bruno J., Haij S., Wie L., Peltier N., Rake J., Shaw J.M., Pugh S., Polin L., Jones J., Corbett T., Cooper E., Liversidge G.G. Formulation and antitumor activity evaluation of nanocrystalline suspensions of poorly soluble anticancer drugs. *Pharm. Res.,* 1996. 13: 272-278.

Mesens JL., Putteman P., Verheyen P. In new Trends in cyclodextrins and derivatives. *Duchêne, D., Ed.*; *Editions de santé: Paris*, 1991. Pp: 369-407.

Moghimi S.M., Illum L., Davis S.S. Physiopathological and physiochemical considerations in targeting of colloids and drug carriers to the bone marrow. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.,* 1990. 7 (3): 187-209.

Moghimi S.M. Exploiting bone marrow microvascular structure for drug delivery and future therapies. *Advanced drug delivery reviews,* 1995. 17(1): 61-73.

Moghimi S.M. Mechanisms regulating body distribution of nanospheres conditioned with pluronic and tetronic block co-polymers. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 1995. 16: 183-193.

Moghimi S.M., Hunter A.C. Poloxamers and poloxamines in nanoparticles engineering and experimental medicine. *Trends. Biotechnol.*, 2000. 18: 412-420.

Monbaliu J., Beijsterveldt L.V., Meuldermans W., Szathmary S., Heykants J. Mins 5th Int. Symp. Cyclodextrins. *Duchêne, D., Ed., Editions de santé: Paris*, 1990. Pp: 514-517.

Montassier P., Duchene D., Poelman M.C. inclusion complexes of tretinoin with cyclodextrins. *Int. J. Pharm.*, 1997. 153-199.

Most H., Van Assendelft F., Miller J., Milberg MB., Rossman EB. Arsthinol (balarsen), a new trivalent arsenical for the treatment of intestinal amebiasis and other intestinal protozoa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* 1954. 3: 262-265.

Müller R.H. Colloidal carriers for controlled drug delivery and targeting: modification, characterization and in vivo distribution. *Stuttgart: Wiss. Verl. –Ges.,* 1991.

Müller R.H. Becker R., Kruss B., Peters K. Pharmaceutical nanosuspensions for medicament administration as system of increased saturation solubility and rate of solution. *US Patent*, 1998. N° 5,858,410.

Müller R.H., Peters K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs. I. Preparation by a size-reduction technique. *Int. J. Pharm.*, 1998. 160: 229-237.

Müller RH., Böhm BHL. Nanosuspensions. In : Müller RH., Benita S., Böhm BHL. (eds) Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs. *Medpharm Scientific Publischers Stuttgart,* 1998. pp 149-174.

Müller R.H., Jacobs C., Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy rationale for development and what we can expect for the future. Adv. Drug. Deliv. Rev., 2001. 47: 3-19.

Mura P., Adragna E., Rabasco A.M., Moyano J.R., Pérez-Martinez J.I., Arias M.J., Ginés J.M. Effects of the host cavity size and the preparation method on the physicochemical properties of ibuproxam- cyclodextrin systems. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 1999. 25(3): 279-287.

Nagai N., Shirakura O., Nambu N. Hypnotic potency, and the plasma and the brain concentration of hexobarbital in the presence of cyclodextrins. *Proceedings of the 3rd Int. Conf. Pharm. Technol. Vol V, Paris, 31 May/ 2 june*, 1983. Pp: 253-262.

Neuwelt E.A., Maravilla K.R., Frenkel E.P., Rapaport S.I., Hill S.A., Barnett P.A. Osmotic blood-brain barrier disruption Computerized tomographic monitoring of chemotherapeutic agent delivery. *J. Clin. Invest.*, 1979. 64: 684-688.

Nuijen B., Bouma M., Henrar REC., Brauns U., Bette P., Bult A., Beijnen J.H. In vitro biocompatibility studies with the experimental anticancer agent BIBX1382BS. *Int. J. Pharm.*, 2000. 194: 261-267.

Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K., Pitha J. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem,* 1989. 186(1-2): 17-22.

Oldendorf WH., Cornford ME., Brown WJ. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann. Neurol.*, 1977. 1: 409-417.

Olivier J.C.; Vauthier C., Taverna M., Puisieux F., Ferrier D., Couvreur P. Stability of orosomucoid-coated polyisobuthylcyanoacrylate nanoparticles in the presence of serum. *J. Control. Release.*, 1996. 40: 157-168.

Olivier J.C., Fenart L., Chauvet R., Pariat C., Cecchelli R., Couet W. Indirect evidence that drug brain targeting using Polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity. *Pharm. Res.*, 1999. 16:1836-1842.

O'Mullane J.E., Davison C.J., Petrak K., Tomlinson E. Adsorption of fibrinogen onto polystyrene latex coated with the non-ionic surfactant, poloxamer 338. *Biomaterials.*, 1988. 9: 203-204.

Patravale V.B., Date A.A., Kulkarni R.M. nanosuspensions : a promising drug delivery strategy. *J.P.P.,* 2004. 56: 827-840.

Pépin, J., Milord, F. The treatment of Human African Trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.,* 1994. 33: 1–47.

Pépin J., Milord F., Khonde AN., Niyonsenga T., Loko L., Mpia B., De Wals P. Risk factors for encephalopathy and mortality during melarsoprol treatment of Trypanosoma brucei gambiense. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1995. 89: 92-97

Peters R.A., Stocken L.A., Thompson R.H.S., Woodward F.N., AF M., Gasson E.J. Organic thiol antitoxic agents, Dec.16, 1947.

Peters K., Leitzke S., Diederichs J.E., Borner K., Hahn H., Müller R.H., Ehlers S. Preparation of a clofazimine nanosuspension for intravenous use and evaluation of its therapeutic efficacy in murine *Mycobacterium avium* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000. 45: 77-83.

Petri B., Bootz A., Khalansky A., Hekmatara T., Müller R., Uhl R., Kreuter J., Gelperina S. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Revisiting the role of surfactants. *J. Contr. Realease.*, 2007. 117: 51-58.

Porter C.J.H., Moghimi S.M., Davies M.C., Davis S.S., Illum L. Differences in the molecular weight profile of poloxamer 407 affect its ability to redirect intravenously administrated colloids to the bone marrow. *Int. J. Pharm.*, 1992a. 83: 273-76.

Porter C.J.H, Moghimi S.M., Illum L., Davis S.S. The polyoxyethylene/polyoxypropylene block co-polymer poloxamer-407 selectively redirects intravenously injected microspheres to sinusoidal endothelial cells of rabbit bone marrow. *FEBS Lett.*, 1992b. 305 (1): 62-66.

Portmann G.A., Simmons D.M. Microscopic determination of drug solubility in plasma and calculation of injection rates with a plasma circulatory model to prevent precipitation on intravenous injection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995. 13: 1189-1193.

Pouton C.W. Lipid formulations for oral administration of drugs : non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-micro-emulsifying' drug delivery systems. *Eur. J. pharm. Sci.*, 2000. 11: S93-S98.

Pringshein H. Chemistry of the saccharides. *Ed Mcgraw-Hill, New York*, 1932.

Puisieux F., Roblot-Treupel L. Vectorisation et vecteurs de médicaments. S.T.P. *Pharma. Sciences.*, 1989. 5(2): 107-113.

Rajewski R. A., Traiger G., Bresnahan P., Jaberaboansari P., Stella V. J., Thompson D.O. Preliminary safety evaluation of parenterally administered sulfoalkyl ether beta-cyclodextrin derivatives. *J. Pharm. Sci.,* 1995. 84(8): 927-932.

Ramge P., Unger R.E., Oltrogge J.B., Zenker D., Begley D.J., Kreuter J., von Briesen H. Polysorbate 80-coating enhances uptake of polybutyl-cyanoacrylate (PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells. *Eur. J. Neurosci.*, 2000. 12: 1931-1940.

Rapaport S.I. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2000. 20: 217-230.

Rivi R., Calleja E., Konig A., Lai L., Gambacorti-Passerini C., Scheinberg D., Gabrilove J.L., Warrell R.P., Pandolfi P.P. Organic arsenical melarsoprol shows growth suppressive activity via programmed cell death on APL and other myeloid and lymphoid leukaemia derived cell lines. *Blood*, 1996. 88(10), Suppl 1.

Rousselot P., Labaume S., Larghero J., Noguera M.E., Brouet J.C. Fermand J.P. Arsenic trioxyde (As_2O_3) and melarsoprol induce myeloma cell apoptosis *in vitro* with a preferential effect on tumoral cells in patients' bone marrow. *Blood*, 1997. 90(10), suppl 1.

Rousselot P., Labaume S., Marolleau JP., Larghero J., Noguera MH., Brouet JC., Fermand JP. Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients. *Cancer. Res.*, 1999. 59(5): 1041-8.

Rousselot P., Larghero J., Arnulf B., Poupon J., Royer B., Tibi A., Chambrin I.M, Cimerman P., Chevret S., Hermine O., Dombret H., Brouet J.C., Fermand J.P. A clinical and pharmacological study of arsenic trioxide in advanced multiple myeloma patients. *Leukemia*, 2004. 18: 1518-1521.

Rubin L.L., Staddon J.M. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1999. 22: 11-28.

Saenger W. Inclusion compounds. *Atwood Ed J.L, J.E., Davies D., Macnicol D.D. Academic press, London*, 1984. 2: 231-259.

Sanchez del Pino M.M., Hawkins R.A., Peterson D.R. Biochemical discrimination between luminal and abluminal enzyme and transport activities of the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.*, 1995. 270: 14907-14912.

Saunders N.R., Habgood M.D., Dziegielewska K.M. Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1999. 26: 11-19.

Schardinger H. *Untersuch Z., Nahr. Genusmm.*, 1903. 6: 865.

Scheffel U., Rhodes B.A., Natarajan T.K., Wagner H.N. Albumin microspheres for the study of the reticuloendothelial systems. *J. Nucl. Med.*, 1972. 13: 498-503.

Schöler N., Krause K., Kayser O., Müller R.H., Borner K., Hahn H., Liesenfeld O. Atovaquone nanosuspensions show excellent therapeutic effect in a new murine model of reactivated toxoplasmosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001. 45: 1771-1779.

Schroeder U., Sommerfeld P., Sabel B.A. Efficacy of oral dalargin-loaded nanoparticle delivery across the blood-brain barrier. *Peptides*, 1998. 19: 777-780.

Schwendener R.A., Schott H. Lipophilic 1-beta-D-arabinofuranosyl cytosine derivatives in liposomal formulations for oral and parenteral antileukemic therapy in the murine L1210 leukemia model. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, 1996. 122: 723-726.

Shirakura O., Nambu N., Nagai T. Effect of beta-cyclodextrin on disposition of hexobarbital and phenobarbital in mice. *Journal of Inclusion Phenomena*, 1984. 2: 613-621.

Shirota T. Review: Physiology and pathology of the blood-marrow barrier. *The cancer J.*, 1994. 7 (5), 188-191.

Soignet S., Tong W.P., Gabrilove J., Scheinberg D.A., Pandolfi P.P., Warrell R.P. Initial clinical study of a novel organic arsenical, melarsoprol, in patients with advanced leukaemia. *Blood*, 1996. 88(10), suppl 1.

Soignet S.L., Tong WP., Hirschfeld S., Warrell RP. Clinical study of an organic arsenical, melarsoprol, in patients with advanced leukaemia. *Cancer. Chemother. Pharmacol.*, 1999. 44(5): 417-421.

Steiniger S.C., Kreuter J., Khalansky A.S., Skidan I.N., Bobruskin A.I., Smirnova Z.S., Severin S.E., Uhl R., Kock M., Geiger K.D., Gelperina S.E. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int. J. Cancer.*, 2004. 109: 759-767.

Stella V.J., Rajewski R.A. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Res.*, 1997. 14: 556-567.

Stella V.J., Rao V.M., Zannou E.A., Zia V. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1999. 36: 3-16.

Storm G., Belliot S.O., Daemen T., Lasic D.D. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Advanced drug delivery reviews,* 1995. 17(1): 31-48.

Szejtli J. Dimethyl-β-cyclodextrin as parenteral drug carrier. *J. Incl. Phenom.,* 1983. 1(2): 135-150.

Tavassoli M. The marrow-blood barrier. *Brit. J. Haematol.*, 1979. 41(3): 297-302.

Thompson D.O. Cyclodextrins--enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. *CRC. Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.,* 1997. 14(1): 1-104.

Torres-Labandeira J.J., Davignon P., Pitha J. Oversaturated solutions of drug in hydroxypropylcyclodextrins : parenteral preparation of pancratistatin. *J. Pharm. Sci.*, 1991. 80: 384-386.

Ueda H., Wakamiya T., Endo H., Nagase H., Tomono K., Nagai T. Interaction of cyclomaltononaose (delta-CD) with several drugs. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 1999. 25(8): 951-954.

Uekama K. Pharmaceutical applications of methylated cyclodextrins. *Pharm. Int.*, 1985. 6: 61.

Uekama K., Otagiri M. Cyclodextrins in drug carrier systems. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*, 1987. 3(1):1-40.

Uekama K., Hirayama F., Irie T. In Drug Targeting Delivery. *Boer, A. G., Ed.; Harwood Publishers: Amsterdam*, 1993. 3: 411.

Uekama K., Hirayama F., Irie T. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem. Rev.*, 1998. 98: 2045-2076.

Villiers A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique, *C.R. Acad. sci.* paris, 1891. 112: 536.

Wakui S., Furusato M., Tanaka M., Allsbrook W.C., Kano Y., Ushigome S. Endothelium and pericyte interdigitation: pathway for epidermal growth factor ? *Microvasc. Res.*, 1990. 40: 285-291.

Wang C.C. Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African Trypanosomiasis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1995. 35: 93-127.

Warrell R.P., Soignet S., Rivi R., Konig A., Tong W.P., Gabrilove J., Pandolfi P.P. Clinical and laboratory studies of an organic arsenical, melarsoprol, in leukaemia. *Abstracts of the 7th International Conference on Differential Therapy, Versailles- France*, 5-8 octobre 1997.

Yamamoto M., Yoshida A., Hirayama F., Uekama, K. Some physicochemical properties of branched β-cyclodextrins and their inclusion characteristics. *Int. J. Pharm.,* 1989. 49(2): pp: 163-171.

Yamamoto M., Aritomi H., Irie T., Hirayama F., Uekama K. *In Mins, 5th Int. Symp. Cyclodextrins; Duchêne, D., Ed., Editions de santé : Paris*, 1990. Pp : 541-544.

Yamamoto M., Aritomi H., Irie T., Hirayama F., Uekama K. Biopharmaceutical evaluation of maltosyl β-cyclodextrin as a parenteral drug carrier. *S.T.P. Pharma. Sci.,* 1991, 1(6): 397-402.

Yoshida A., Arima H., Uekama K., Pitha J. Pharmaceutical evaluation of hydroxyalkyl ethers of β-cyclodextrins. *Int. J. Pharm.,* 1988. 46(3): 217-222.

BIBLIOTHEQUE
NANCY

Résumé :

Le mélarsoprol est un composé organoarsénié qui s'est montré particulièrement efficace sur un large éventail de lignées cellulaires leucémiques. Ce médicament est déjà préconisé dans le traitement de la trypanosomiase africaine à la phase nerveuse exclusivement. Il est très lipophile et quasiment insolubles dans les principaux solvants organiques. Sa présentation injectable sous forme de solution du propylène glycol est très douloureuse à l'injection et entraine des veinites. De plus, sa lipophilie conduit à une distribution préférentielle au niveau des lipides et favorise le risque d'encéphalopathie arsenicale. Les objectifs de ce travail sont donc de réaliser une formulation aqueuse à base de cyclodextrine adaptée à l'injection intraveineuse et de limiter la distribution du mélarsoprol au niveau du système nerveux central par la réalisation des vecteurs nanoparticulaires.

Cette étude décrit la mise au point et la caractérisation de nanosuspensions et de complexe mélarsoprol/cyclodextrine, testés ensuite sur un modèle murin. Une étude préliminaire a permis de démontrer une activité cytotoxique du mélarsoprol sur des cellules leucémiques humaines (U937 et K562). Cette activité antileucémique a été conservée dans les deux formulations mises au point (nanosuspensions et complexes de cyclodextrines). Les résultats nous ont incités à tester ces nouvelles formulations galéniques de mélarsoprol *in vivo*. Ainsi, les nanosuspensions de mélarsoprol ont permis de réduire sa concentration au niveau cérébral. Cet avantage considérable est confirmé par une toxicité aigue plus faible que celle du mélarsoprol en solution organique (DL_{50}=0,25 mmol/kg vs 0,11 mmol/kg). A l'inverse, le complexe hydroxypropyl-β-cyclodextrine/mélarsoprol a conduit à une augmentation considérable des concentrations cérébrales qui pourrait être mise à profit dans le traitement de la phase cérébrale de la trypanosomiase africaine.

Mots clés :

Mélarsoprol- Cyclodextrines- Nanosuspensions- Moelle Osseuse- Barrière hémato-encéphalique- Trypanosomiase africaine- Leucémies.

Laboratoire de rattachement :

Laboratoire de pharmacie clinique et biotechnique- EA 3452.

GROUPE DE FORMATION DOCTORALE : Biologie-Santé-Environnement

UNIVERSITE HENRI POINCARE

FACULTE DE PHARMACIE

5, rue Albert Lebrun

54001 Nancy Cedex 01.