

Université de Montréal

Des aptamères pour améliorer l'encapsulation et la libération contrôlée des liposomes

Par: Kevin Plourde

Faculté de Pharmacie

**Mémoire présenté à la faculté des études supérieures et post-doctorales en vue de
l'obtention du grade de M. Sc. en sciences pharmaceutiques,
option technologie pharmaceutique**

Décembre 2015

©, Kevin Plourde, 2015

Résumé en français

Hypothèse : L'incorporation dans des liposomes d'aptamères spécifiques à un principe actif permet d'obtenir une encapsulation active du principe actif et de modifier les profils de libération sans diminuer l'efficacité thérapeutique.

Méthode : Une série d'aptamères d'affinité variable a été incorporée dans la préparation de liposomes cationiques. Ces lipoplexes ainsi formés ont été caractérisés en taille par diffusion dynamique de la lumière et par la mesure du potentiel de surface zêta. Ils ont été optimisés en matière de complexation maximale des aptamères, puis incubés avec la doxorubicine, choisie comme principe actif modèle. L'efficacité d'encapsulation de la doxorubicine a été comparée avec et sans aptamères, et contre la méthode d'encapsulation active offerte commercialement. Les meilleures formulations ont été étudiées sur le plan de la cinétique de libération et l'efficacité de celles-ci a été évaluée pour leur cytotoxicité sur des cellules cancéreuses de type HeLa.

Résultats : Les vecteurs cationiques optimisés permettent la complexation d'au moins 94% des aptamères. Trois des quatre aptamères ont démontré de l'encapsulation active de la doxorubicine, avec des efficacités d'encapsulation allant jusqu'à 85%. De ces trois formulations, différents profils de libération ont été obtenus, permettant tous une libération plus importante qu'une formulation ressemblant aux liposomes commerciaux de doxorubicine (Doxil®). L'efficacité des trois formulations testées sur les cellules HeLa s'est avérée équivalente ou supérieure au standard similaire du Doxil®

Mots-clés : liposome, aptamère, doxorubicine, efficacité d'encapsulation, libération contrôlée, encapsulation active, système de livraison

Résumé en Anglais

Hypothesis : Incorporation in some liposomes of specific aptamers for a drug allowed the obtaining of active encapsulation of that drug and allowed the modification of their drug release profiles, without negatively impacting its therapeutic efficacy.

Methods : A series of aptamers of various affinity were incorporated in the preparation of cationic liposomes. The resulting lipoplexes were characterized for their size by dynamic light scattering method and their surface potential were analysed by zeta potential measurement. Lipoplexes were optimized in terms of highest aptamer complexation and they were incubated with doxorubicin, a model drug that was chosen. The encapsulation efficiency of doxorubicin was compared with and without the presence of aptamers, and with the commercially available active loading method. The best formulations were studied for their doxorubicin's release kinetic, with the different aptamers, and they were tested for their cytotoxicity on HeLa cancer cells.

Results : Cationic liposomes were optimized to allow a minimum aptamer complexation of 94%. Three out of the four tested aptamers were able to demonstrate active loading capabilities, with up to 85% encapsulation efficiencies. Out of these three formulations, very different release profiles were found, all allowing more initial content release of the commercially-like available doxorubicin's liposomes (Doxil®). The efficacy of those three formulations on HeLa cancer cells demonstrated equivalent or higher cytotoxicity than the similar standard of Doxil®.

Keywords : liposome, aptamers, doxorubicin, encapsulation efficiency, controlled release, active loading, drug delivery

Table des matières

Résumé en français	ii
Résumé en Anglais	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations.....	x
Dédicace.....	xii
Remerciements.....	xiii
Contribution des auteurs	xv
L'avant-propos.....	xvi
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1. La vectorisation de médicament.....	1
1.2. Les liposomes.....	2
1.2.1 Définitions de termes utilisés.....	5
1.2.1.1 Efficacité d'encapsulation	5
1.2.1.2 Capacité de chargement.....	5
1.2.1.3 Encapsulation passive.....	6
1.2.1.4 Encapsulation active	6

1.2.2	Composition lipidique.....	6
1.2.3	Liposomes approuvés pour commercialisation.....	11
1.2.4	Méthodes de préparation.....	12
1.2.4.1	Réhydratation d'un film lipidique – encapsulation passive.....	12
1.2.4.2	Autres méthodes – Encapsulation passive.....	14
1.2.4.3	Méthode gradient de pH/ions – encapsulation active.....	15
1.2.5	Ciblage des liposomes.....	18
1.2.6	Profils de libération et déclencheurs de libération.....	20
1.3.	La doxorubicine.....	22
1.3.1	Quantification de la doxorubicine.....	23
1.3.1.1	CLHP-Fluo	23
1.3.1.2	Spectrophotomètre Fluo	24
1.4	Caractérisation des liposomes	25
1.4.1	Mesure de taille.....	25
1.4.2	Mesure de la charge de surface.....	26
1.4.3	Mesure de la complexation avec l'ADN.....	27
1.4.4	Mesure de l'encapsulation de la molécule active	28
1.5.	Les aptamères.....	29
1.5.1	Description et méthode de préparation	29
1.5.2	Rôle des aptamères	32

1.5.3	Utilisations courantes en vectorisation du médicament.....	33
1.5.4	Design et caractérisation des aptamères	35
1.5.5	Mesure de l’affinité aptamère-ligand.....	36
1.5.6	Quantification de l’ADN.....	37
1.5.7	Mesure de la teneur en ADN	38
1.6.	Objectif de recherche	38
1.6.1	Hypothèse de recherche	39
1.6.2	Objectifs spécifiques.....	39
Chapitre 2 : Article pour le Journal of Controlled Release.....		40
2.1	Résumé en français.....	40
2.2.	Article.....	41
Chapitre 3: Discussion et Conclusion.....		72
3.1.	L’efficacité d’encapsulation améliorée	72
3.2.	La cinétique de libération.....	73
3.3.	Les aptamères.....	74
Chapitre 4 : Travaux futurs et perspectives		75
4.1	Le milieu salin et les aptamères	75
4.2	Constructions d’aptamères	75
4.3	Autres molécules actives.....	76
Bibliographie.....		76

Liste des tableaux

Table 2.1: Summary characteristics of optimized formulation in term of N/P ratio and doxorubicin/ aptamer ratio that provided highest encapsulation efficiencies.....	59
Table 2.2: IC50 values of doxorubicin loaded liposome on HeLa cells and cytotoxicity of blank aptamer liposomes.....	62

Liste des figures

Figure 1.1 : Représentation d'un liposome et de ses différentes composantes structurales et applications.....	4
Figure 1.2 : Illustration de l'organisation des lipides dans les bicouches liposomales.....	8
Figure 1.3 : Organisation des membranes de lipoplexes complexées avec des acides nucléiques.....	11
Figure 1.4 : Schéma de préparation des liposomes selon la méthode « Bangham ».....	13
Figure 1.5 : Mécanisme d'encapsulation de la doxorubicine dans des liposomes par le gradient transmembranaire d'ammonium sulfate.....	15
Figure 1.6 : Illustration de l'effet « EPR » et du ciblage actif par le liposome aux sites tumorale.....	18
Figure 1.7 : Structure de la molécule doxorubicine.....	22
Figure 1.8 : Schématisation d'un système CLHP.....	23
Figure 1.9 : illustration du principe de la mesure de taille par technique de diffusion dynamique de la lumière.....	26
Figure 1.10 : Méthode de quantification du taux de complexation des aptamères avec les liposomes.....	28
Figure 1.11 : Illustration du processus SELEX.....	30
Figure 1.12 : Illustration des applications possibles des aptamères en biologie et en analytique.....	32
Figure 1.13 : Illustration d'un liposome fonctionnalisé avec des aptamères pour ciblage actif.....	33
Figure 1.14 : Structure des différents aptamères à la doxorubicine.....	35
Figure 1.15 : Atténuation du signal de fluorescence de la doxorubicine avec l'augmentation de la concentration d'aptamère (de haut en bas).....	36
Figure 1.16 : Illustration du principe des spectrophotomètres U.V. (haut) et à fluorescence (bas).....	38

Figure 2.1: Graphical representation of the increased encapsulation capacity by the mean of aptamer incorporation into cationic liposomes, compared with common passive encapsulation methods.....	44
Figure 2.2: Smoothed emission spectra of doxorubicin with increasing concentration of Poly-Doxapt (from top to bottom).....	53
Figure 2.3: Structure and affinity calculated of all DNA/aptamer sequences tested in this experiment.....	54
Figure 2.4: Measurements of the average size (A), polydispersity index (A) and zeta potential (B) of the cationic liposomes used to encapsulate DNA sequences.....	55
Figure 2.5: Encapsulation efficiency of all DNA sequences with the cationic liposome (n=3).....	56
Figure 2.6: Encapsulation efficiencies of doxorubicin inside Doxapt-30 lipoplexes at different ratios of doxorubicin/aptamer.....	57
Figure 2.7: Encapsulation efficiency of doxorubicin inside cationic liposomes that encapsulate different aptamers (n=3).....	58
Figure 2.8: Release of doxorubicin from loaded liposomes, incorporating different aptamer sequences.....	60
Figure 2.9: Release speed of doxorubicin from different formulations expressed in half-life constant (in hour).....	61

Liste des abréviations

RNA/ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

DNA/ADN : Acide désoxyribonucléique

DOTAP : 1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium-propane

DPBS : Dulbeccos's phosphate-buffered saline

DSPC : 1,2-distéaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

DSPE-PEG₂₀₀₀ : 1,2-distéaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-[amino(polyéthylène glycol)-2000]

EE : Efficacité d'encapsulation

EPR : Enhanced Permeability and Retention effect

FDA : Food and Drug administration (U.S.)

HSPC : L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy)

K_D : Constante de dissociation

LUV : Vésicule unilamellaire large (large unilamellar vesicle)

MLV : Vésicule liposome multilamellaire

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PEG : Poly(éthylène) glycol

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

SUV : Vésicule unilamellaire petite (small unilamellar vésicle)

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Dédicace

Je dédie ces années de travail et son résultat final, ce mémoire, à mes parents et mon petit frère qui m'ont soutenu durant tout mon parcours universitaire. J'ai eu la chance d'avoir des parents qui m'ont énormément aidé moralement et monétairement pour me permettre de me concentrer essentiellement sur mes études, sans avoir eu l'obligation d'obtenir un emploi partiel durant mes études.

Je tiens également à dédier ce mémoire à ma femme Marie-Ève qui m'a appuyé et enduré pendant ces longues années, tout en ayant fait preuve d'une patience d'or concernant nos projets d'avenir.

Finalement, mais non les moindres, je tiens à dédier ce mémoire à ma famille immédiate, à mes grands-parents, oncles/tantes, cousins/cousines qui ont toujours été emballés, fiers et heureux à mon égard dans mon périple aux études supérieures. Un merci tout spécial à mes grands-parents et à mon défunt parrain qui s'est bien battu, mais qui n'aura malheureusement pas eu le temps « de m'appeler son *maître* Kevin ».

Remerciements

J'aimerais évidemment remercier ma directrice Jeanne Leblond-Chain, qui a accepté de m'encadrer et de m'accueillir dans son laboratoire. Elle a su être disponible et aidante, et ce même durant son absence pour un congé de maternité. Également, un merci pour l'offre de prolongation de maîtrise dans le but d'aboutir mes travaux et, bien sûr, pour le soutien durant ce dernier trimestre, qui n'a pas été très facile pour moi. Par le fait même, je ne pourrais oublier de mentionner la contribution de Valérie Gaëlle Roullin qui m'a accueilli à bras ouverts dans son laboratoire durant l'absence de ma directrice. Je tiens à remercier son implication, son temps, sa disponibilité immédiate et ses conversations scientifiques de qualité qui m'ont énormément aidé durant cette période où j'étais plus seul au labo.

Je voudrais aussi remercier mes stagiaires Céline Dubath et Jennifer Jean-Louis pour leur travail, leur implication et leur support moral dans mes derniers mois de travail en laboratoire. Sans elles, je n'aurais certainement pas réussi à finir à temps!

Je tiens à remercier les organismes Hydro-Québec et le réseau québécois de recherche sur le médicament (RPMQ), ainsi que la faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, pour le l'octroi de bourses d'études durant ma maîtrise.

Un merci tout spécial à ma collègue et amie Isabelle St-Jean, qui suit hasardeusement exactement le même parcours que moi depuis le cégep. Nos échanges de musiques (heavy metal), de fous rires et de conversations de toute sorte ont été d'un support incontournable à cette réussite. Merci! Et nous continuons au même emploi! Incroyable!

Je remercie également Alexandre Melkoumov, Warren Viricel, Mihaela Friciu, Mirza Akram Hossain, Pierre-Luc Latreille et Sarra Zaraa pour leur support technique et humoristique durant ces années.

Merci également à tout le personnel, professeur, étudiant et stagiaire du 4^e étage de l'axe formulation et analyse du médicament (et ses amis, bien sûr!), vous avez su créer une dynamique de travail et de fête (post-travail) inoubliable, unique et plus que motivante. Je dois notamment remercier Grégoire Leclair avec qui tout a débuté, en m'offrant un stage à l'été 2012, bien que je n'aie pas eu les résultats académiques nécessaires à l'obtention de bourses. C'est grâce à ta confiance et à ton coup d'envoi que j'ai pu m'épanouir en recherche.

Finalement, mais non les moindres, merci à Alexis Vallée-Bélisle et ses étudiants Stéphanie Bissonnette, Arnaud Desrosiers et Carl Prévost Tremblay, dans leur implication sur le volet aptamère du projet de recherche.

Encore une fois merci, vous êtes tout simplement géniaux!

Contribution des auteurs

Ce mémoire se base sur un article rédigé et en voie de publication. Le manuscrit en entier est présenté au cœur de ce mémoire.

Chapitre 2: Improving encapsulation efficiency and drug release kinetic from liposome using aptamers.

Kevin Plourde, Céline Dubath, Alexis Vallée-Bélisle, Jeanne Leblond

Le travail de design des séquences d'aptamère est le travail du Pr Vallée-Bélisle et de ses étudiants. L'exécution des tests de cinétique de libération et d'évaluation des formulations optimales en termes d'encapsulation représente le travail de l'étudiante et stagiaire Céline Dubath. La recherche des formulations optimales, l'évaluation de l'affinité des aptamères, l'essai de la performance in vitro des formulations et du développement et validation des diverses méthodes de quantification et caractérisation est le travail de Kevin Plourde. Le manuscrit a été préparé par Kevin Plourde, avec la précieuse aide de Jeanne Leblond Chain et des commentaires du Pr Vallée-Bélisle.

L'avant-propos

Ce travail de recherche a été réalisé à la faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal, dans le laboratoire du Pr Jeanne Leblond Chain. Une partie du travail a également été accompli au laboratoire de Biosenseurs & Nanomachines, au département de chimie, dirigé par le Pr Alexis Vallée-Bélisle. L'idée du projet s'est dessinée sur plusieurs mois, dans une tentative de combiner les expertises du Pr Leblond Chain et du Pr Vallée-Bélisle. En fin de compte, il a été tenté de répondre aux limitations rencontrées lorsqu'une formulation de liposome est développée. Concrètement, avec les liposomes il est très difficile d'obtenir un contrôle sur la libération des médicaments et des efficacités d'encapsulation très faible sont couramment obtenues. Les solutions disponibles sont peu nombreuses et peu polyvalentes, mais la preuve de concept d'une méthode utilisant le génie et la polyvalence des aptamères intégrés aux liposomes a été démontrée. Le projet s'est donc divisé en quatre volets différents, soit 1) le choix des aptamères et du médicament modèle, 2) le développement de la formulation par l'étude de son efficacité d'encapsulation, 3) l'étude de son profil de libération et finalement 4) l'étude de l'efficacité in vitro des formulations développées. Ce projet est un excellent exemple des bonnes idées qui peuvent naître de la collaboration de deux experts dans leur domaine respectif.

Chapitre 1 : Introduction

1.1. La vectorisation de médicament

Une molécule à potentiel thérapeutique exerce ses bienfaits en atteignant un organe, un tissu ou un type cellulaire cible. Dans son interaction avec cette cible, cette molécule permet de moduler, bloquer ou activer des phénomènes physiologiques ou pathologiques exercés par ces cibles, dans le but de retrouver un phénotype «normal». Quelle qu'en soit la voie d'administration, la molécule active sera en contact avec différents tissus de l'organisme en plus de sa propre cible. Dans un tel scénario, des problèmes peuvent apparaître à deux niveaux: l'apparition d'effets secondaires et/ou un manque d'efficacité. Premièrement, l'apparition des effets secondaires, à différents niveaux de sévérité, est généralement due à l'interaction d'une molécule médicamenteuse avec une cible secondaire non spécifique. Le meilleur exemple de cette affirmation réside dans la thérapie anticancéreuse, où des effets secondaires tels que l'anémie, la déplétion du système immunitaire, la perte de cheveux et des vomissements peuvent apparaître. Pourtant, ces agents anticancéreux ont pour objectif de tuer les cellules cancéreuses et non d'agir sur les tissus sains du corps humain. Dépendamment du niveau de sévérité de l'effet indésirable et du bénéfice qui peut être perçu avec un traitement, de plus faibles doses médicamenteuses peuvent être administrées pour réduire les effets indésirables. Deuxièmement, le manque d'efficacité parfois rencontré peut être justement dû à l'utilisation de doses trop faibles pour atteindre les concentrations dans la fenêtre thérapeutique. Également, si la biodistribution n'est pas favorable, ou que l'actif est dégradé prématurément, l'efficacité et les chances de succès thérapeutiques deviennent limitées. Depuis quelques décennies, des efforts de recherche considérables ont été déployés sur le

développement de systèmes de livraison, dans un but ultime d'améliorer les performances d'efficacité et d'innocuité des traitements. Dans un monde idéal, un système de livraison intraveineux, par exemple, incorporerait ou encapsulerait la totalité d'une molécule active pour en prohiber tout contact avec l'ensemble de l'organisme et ainsi en empêcher les effets non sélectifs. Puis, ces systèmes devraient pouvoir activement s'accumuler dans le tissu pathologique et permettre le relâchement de la totalité de leur chargement à ce tissu cible. De nombreux travaux de recherche sur la vectorisation sont parvenus à démontrer des améliorations sur le profil d'innocuité et parfois même sur l'efficacité de molécules médicamenteuses. De nos jours, les systèmes de livraison sont majoritairement axés sur des particules avec des tailles de l'ordre du nanomètre, tel que les liposomes, et permettent d'encapsuler des ingrédients actifs, de circuler plusieurs jours dans le système sanguin, de traverser les barrières physiologiques des vaisseaux sanguins et de protéger le corps humain contre l'exposition systémique de molécules chimiques. Les technologies d'encapsulation peuvent permettre non seulement de protéger l'hôte contre un agent chimique, mais aussi de préserver ces agents actifs parfois fragiles de dégradation précoce. De plus, la surface de ces nanoparticules peut être fonctionnalisée avec des marqueurs, tels que des anticorps, dans un but ultime de reconnaissance et de ciblage cellulaire. Bien qu'elle présente divers défis, la nanovectorisation offre une solution pour l'amélioration du profil d'innocuité et pour l'augmentation de l'efficacité thérapeutique.

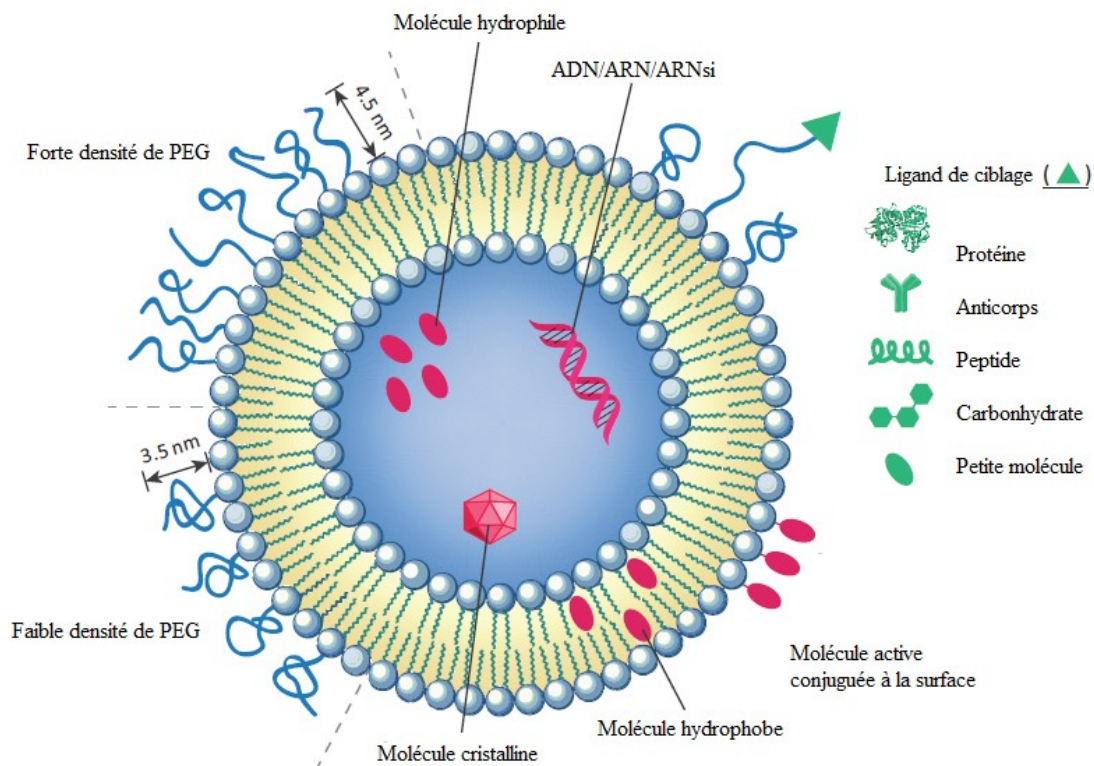
1.2. Les liposomes

De tous les types de vecteurs ayant été étudiés, tel que les nanoparticules à base de polymères ou de dendrimères, les micelles polymériques, et autres, ce sont les nanoparticules lipidiques qui retiennent le plus l'attention. Plus précisément, les liposomes semblent être des plus

prometteurs lorsqu'il s'agit de véhiculer un principe actif à une cible. Ce type de nanoparticule a fait l'objet d'étude de milliers de publications [1]. Ils proposent tout simplement une multitude d'avantages et une biocompatibilité intéressante pour l'utilisation *in vivo*. Ce sont des vésicules sphériques composées de bicouches lipidiques et d'un cœur aqueux, qui font souvent l'objet de réservoir de molécules actives. Ils sont efficaces pour encapsuler de petites molécules hydrophiles et des molécules hydrophobes, en plus de pouvoir être adaptés pour permettre l'encapsulation ou la complexation avec de plus grosses molécules (peptides, protéines, ARNsi, plasmides ADN, etc.). Dans le cas d'entités lipophiles, elles auront plus tendance à s'accumuler au centre de la bicouche lipidique plutôt que dans le cœur aqueux d'un liposome (Figure 1.1). De plus, comme ils sont essentiellement composés de lipides, ils ne présentent généralement pas de toxicité et sont souvent considérés comme des systèmes biocompatibles. Néanmoins, l'utilisation de hautes doses de lipides ou de lipides synthétiques peut occasionner des toxicités cellulaires. Les liposomes peuvent être préparés par de multiples méthodes, qui seront brièvement présentées plus loin. Il est aussi possible de varier leur composition lipidique, leur milieu interne et ils peuvent être couronnés au besoin de divers ligands et molécules pour répondre aux diverses demandes thérapeutiques (Figure 1.1). Aussi, il est connu que la composition lipidique d'un liposome peut impacter la morphologie de ceux-ci, leur capacité de chargement, leur stabilité dans des fluides physiologiques et leur cinétique de libération en principes actifs [2].

Les premières générations de liposomes, présentant des tailles de l'ordre du micron, avaient déjà réussi à modifier les profils de biodistribution de molécules actives, ainsi qu'à améliorer leur activité biologique [3]. La préparation de ces tout premiers liposomes présentait cependant plusieurs problèmes, notamment au niveau de la faible rétention des molécules

actives dans les liposomes lors du contact avec les protéines sériques. Une seconde génération a vu le jour, avec des changements de composition lipidique, des nouvelles méthodes de préparation et le greffage de polymères hydrophiles à la surface des liposomes. Ces changements ont permis l'obtention de membranes plus étanches et ont permis de conserver leur matériel encapsulé sur de plus longues périodes de temps. Aussi, le greffage de poly(éthylène glycol) a permis l'obtention de liposome furtif pouvant circuler plusieurs journées et de diamètres inférieurs à 100 nm, qui ont amélioré la pénétration tissulaire et le profil de biodistribution. En somme, toutes ces caractéristiques font du liposome un outil polyvalent pour la vectorisation du médicament et elles ont mené à l'acceptation par la



Adaptée de Noble et coll. [4]

Figure 1.1 : Représentation d'un liposome et de ses différentes composantes structurales et applications

FDA en 1995 de la première formulation liposomale; un liposome de doxorubicine, une anthracycline utilisée notamment dans le traitement de cancer tel que le syndrome de Kaposi [5]. Suite à ce succès, plus de 12 formulations de liposomes ont atteint le marché et plus de 25 formulations ont rejoint les phases cliniques avancées [3]. Encore à ce jour, ce type de vecteur est un premier choix intéressant pour vectorisation dans le développement d'un médicament à administration intraveineuse. Dans un souci d'optimisation de l'efficacité des thérapies, les chercheurs ont mis au point une troisième génération de liposome centrée principalement sur la fonctionnalisation des liposomes par des agents de ciblage et sur la libération déclenchée par stimulus. L'objectif ultime est de réussir à se rapprocher d'une formulation stable, permettant d'amener les vecteurs vers des cibles spécifiques de l'organisme et d'en faire relâcher leur contenu uniquement au moment et à l'endroit opportuns.

1.2.1 Définitions de termes utilisés

1.2.1.1 *Efficacité d'encapsulation*

En vectorisation du médicament, ce concept se traduit par un taux ou un rendement calculé pour chiffrer la performance d'une méthode à encapsuler les molécules désirées. Cette valeur est donnée en pourcentage du ratio de nombre de moles de molécules réellement encapsulées sur la quantité totale incluse dans la préparation de la formulation.

1.2.1.2 *Capacité de chargement*

Cette mesure est bien différente de l'efficacité d'encapsulation, puisque la capacité de chargement prend en compte un ratio de molécules encapsulées sur la quantité de matériel et d'excipients requis pour effectuer cette encapsulation. La maximisation de cette valeur se

traduit par un grand nombre de molécules encapsulées pour une petite quantité d'excipients utilisés.

1.2.1.3 Encapsulation passive

Se traduit par la formation de vecteur dans un milieu aqueux ou organique, où la molécule active à encapsuler est solubilisée. La concentration de molécules actives dans le milieu intérieur du vecteur ne peut dépasser la concentration de ce même milieu à l'extérieur du vecteur, ce qui limite généralement l'efficacité d'encapsulation atteignable puisque le volume intra-liposome est généralement très inférieur à celui du milieu externe.

1.2.1.4 Encapsulation active

L'encapsulation active consiste en une méthode qui utilise une énergie ou un moyen quelconque pour permettre de concentrer les molécules actives à l'intérieur des vecteurs. L'encapsulation active tente de déplacer l'équilibre de concentration en molécules actives de l'intérieur et de l'extérieur du liposome. Cette force motrice permet généralement de concentrer la molécule active au cœur du vecteur liposomal.

1.2.2 Composition lipidique

Les liposomes sont généralement composés de phospholipides. Il s'agit de molécules amphiphiles avec une tête polaire phosphatée et de deux chaînes alkyles qui peuvent être de différentes longueurs (typiquement de 14 à 18 carbones). Les longueurs de chaîne carbonée plus élevées permettent d'obtenir des interactions hydrophobes plus fortes entre les bicouches, et de ce fait des liposomes plus stables. En fait, cette stabilité de la bicouche se traduit souvent par la température de fusion des lipides utilisés, qui reflète leur point de transition de phase. À titre d'exemple, les liposomes de 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC)

possèdent un lipide qui détient une température de transition de 55 °C. Lorsque des liposomes de DSPC se situent à des températures en dessous de leur point de transition, comme à température physiologique (37 °C), les membranes s'organisent en phase « gel ». Ce type d'organisation se traduit par l'empilage des chaînes alkyles de manière très serrée, donnant un caractère rigide à la membrane. Les liposomes qui en découlent sont reconnus pour conserver leur matériel encapsulé et puis pour rester intacts et imperméables plus longtemps en conditions physiologiques. Dans un cas contraire, par exemple avec l'utilisation du 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), qui possède une température de transition de -2°C, les liposomes présentent à température ambiante et physiologique des membranes dites en phase «liquide cristalline». Cette dernière conformation témoigne généralement d'une plus grande fluidité dans les membranes lipidiques, ce qui en fait des candidats potentiellement moins intéressants pour l'encapsulation prolongée de principes actifs. Dans le choix des lipides, la longueur des chaînes alkyles aura un impact sur la température de transition de ceux-ci, bien que la structure de la tête polaire ait aussi un rôle à jouer [6]. Pour refléter ce lien de causalité entre la longueur des chaînes de carbones et la température de transition observée, comme il a été mentionné ci-haut, le DSPC possède un point de fusion à 55 °C avec ses deux chaînes carbonées de 18 unités, alors qu'un autre lipide de la même famille des phosphatidylcholine, le 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), possède une température de transition de 41 °C avec ses deux chaînes de 16 carbones. De plus courtes chaînes équivalent à des interactions hydrophobes moins importantes et à une diminution de leur température de transition. Outre la longueur des chaînes de carbone, la présence d'un ou de plusieurs niveaux d'insaturations dans ces chaînes de carbones affecte la stabilité et le point de transition de phase du liposome. En effet, une ou

plusieurs insaturations occasionne des défauts dans l'empilage des chaînes alkyles (Figure 1.2), causant une augmentation de la fluidité des membranes. Le choix et la nature du lipide revêtent donc une importance capitale pour l'obtention d'un équilibre entre stabilité liposomale et possibilité de libération du principe actif.

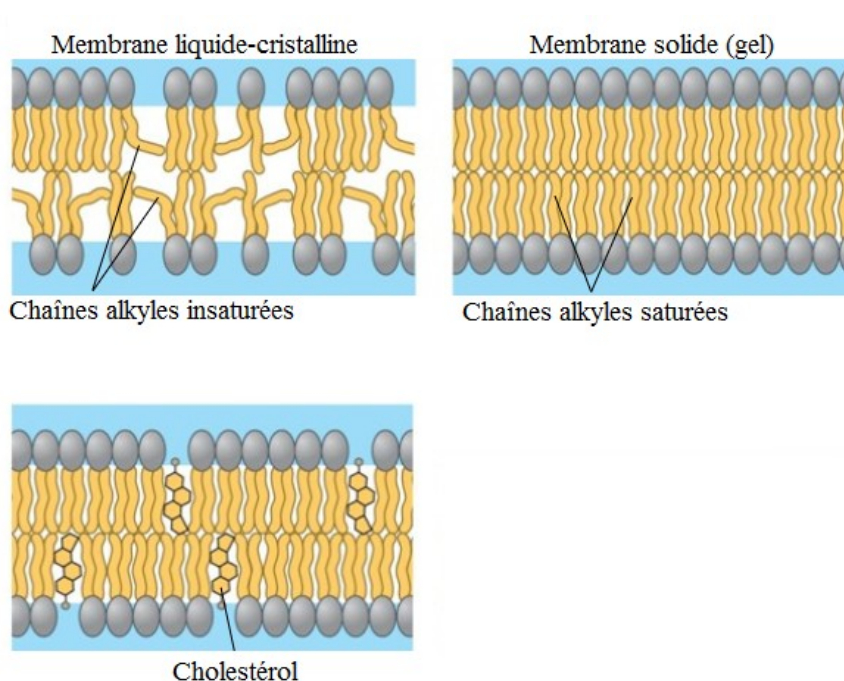


Figure 1.2 : Illustration de l'organisation des lipides dans les bicouches liposomales

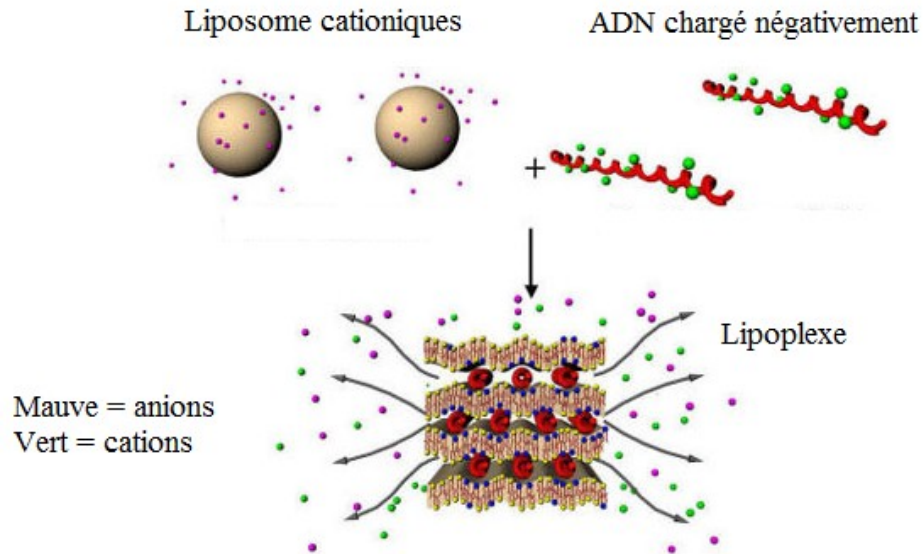
Un ingrédient majeur dans la plupart des formulations de liposome est le cholestérol. Celui-ci est souvent ajouté en proportion molaire jusqu'à 50% mol/mol [7] et son rôle dépend du co-lipide avec lequel il est utilisé [6]. Dans des liposomes faits essentiellement de lipides insaturés, le cholestérol agit comme un agent de « remplissage » permettant de boucher les trous causés par la présence de chaînes alkyles non linéaires. Son addition est donc essentielle dans ce cas pour augmenter la stabilité du vecteur et permettre une plus longue rétention du principe actif dans leur cœur. Il est d'ailleurs largement utilisé dans un but d'augmentation de la rigidité et d'imperméabilisation de la membrane lipidique. Cependant, il a été démontré

qu'inversement le cholestérol peut permettre à des liposomes trop stables d'abaisser leur température de transition et ainsi faciliter les échanges à travers leurs membranes. Il peut permettre d'espacer les interactions hydrophobes entre de longues chaînes alkyles dans des membranes en phase gel avec des lipides à très haute température de transition, pour en augmenter ainsi la fluidité.

Ensuite, les premières versions de liposomes n'ont généralement pas un temps de demi-vie très long dans la circulation systémique. En effet, ces derniers sont fréquemment vulnérables contre le système immunitaire de l'hôte. L'adhérence de protéines d'opsonisation et le recrutement de cellules immunitaires entraînent alors la phagocytose et l'élimination [1]. En bref, les liposomes, surtout les premières générations développées, ne circulent que quelques heures dans la circulation systémique. Puis, une nouvelle technologie des liposomes marqua l'arrivée des vecteurs de seconde génération, augmentant ainsi leur durée de circulation. L'idée consistait en le greffage de macromolécules hydrophiles à la surface des liposomes. La plus populaire de ces macromolécules sont des chaînes de polymère hydrophile de poly(éthylène glycol) (PEG) (Figure 1.1). Ces nanovecteurs couronnés et « furtifs » ont vu non seulement leur temps de circulation passer de quelques heures à plusieurs journées, mais également leur stabilité colloïdale intrinsèque largement améliorée. Le mécanisme le plus plausible expliquant ce phénomène repose sur un encombrement stérique et un masquage de la charge nette à la surface des vecteurs, ce qui empêcherait l'adhésion de protéines d'opsonisation et l'amorce des phénomènes de phagocytose. Bien que les mécanismes par lesquels le PEG permet une protection des liposomes ne soient pas entièrement élucidés à ce jour, les résultats sont significatifs et expliquent la grande popularité du PEG dans la composition du liposome. Le PEG ne cause également pas de problème de biocompatibilité et

est reconnu en tant que matériel sécuritaire, biodégradable et accepté par la FDA pour son utilisation *in vivo* [8].

Le développement de thérapies géniques a longtemps suscité beaucoup d'espoirs dans la population pour la mise au point de traitements curatifs à des pathologies héréditaires [9]. L'idée simple de pouvoir redonner à un type cellulaire une fonction absente ou perdue en lui redonnant le matériel génétique nécessaire s'est avérée plus complexe que prévu. La limitation première dans cette sphère de recherche réside dans la livraison ciblée du matériel génétique dans l'organisme, en le protégeant de la dégradation dans la circulation sanguine. Les liposomes ont été longuement étudiés pour remplir ce rôle de livraison [10, 11]. Il est largement connu maintenant que les liposomes peuvent être composés de lipides cationiques (chargés positivement) pour permettre de très hauts taux de complexation des acides nucléiques (chargés négativement), tels que les plasmides, les ARNsi, etc. (Figure 1.3). Le 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane (DOTAP) est un lipide cationique très utilisé à cette fin, combiné à d'autres composants lipidiques tels que le cholestérol, les phospholipides neutres, le PEG et autres. Néanmoins, les lipides cationiques présentent tout de même des toxicités chez l'homme en raison de leurs charges nettes qui alerte le système immunitaire humain [12].



Adaptée de Harries et coll. [13]

Figure 1.3 : Organisation des membranes de lipoplexes complexées avec des acides nucléiques

1.2.3 Liposomes approuvés pour commercialisation

Tel qu'il a été mentionné un peu plus haut, les liposomes sont indéniablement les systèmes de livraison de principe actif intraveineux qui ont connu le plus de succès. Ils ont été appliqués à une grande variété de produits et à une multitude de classes thérapeutiques. Parmi celles-ci, les liposomes ont été largement exploités dans le cadre des thérapies anticancéreuses, notamment en raison des graves problèmes de toxicité reliés à l'utilisation de ces molécules cytotoxiques. La vectorisation liposomale permet de protéger le corps humain contre l'exposition systémique de ces agents toxiques et de limiter leurs effets nocifs sur les tissus sains. D'ailleurs, la doxorubicine témoigne parfaitement de ces réussites liposomales [5]. Cet intercalant de l'ADN occasionne des toxicités cardiaques telles que son utilisation doit être grandement limitée en terme de dose administrée ainsi qu'en terme de population cible. Seuls les patients sans antécédent cardiaques pouvaient se voir administrer ce puissant

anticancéreux. Cette utilisation de doses plus faibles entraîne le risque d'obtention de concentrations sous-thérapeutiques, ce qui peut entraîner une proportion de patients non-répondants au traitement et des cas plus graves de récurrence de croissance tumorale résistante aux anthracyclines. Les nano-liposomes PEGylés de doxorubicine, Doxil® (ou Caelyx®), approuvés par la FDA en 1995 ont permis d'éliminer les effets secondaires cardiaques normalement associés à la molécule seule. Dans le cadre du travail de ce mémoire, seul le Doxil® sera décrit en détail, parce qu'il est devenu une référence en cancérologie, il intègre les différentes composantes d'une seconde génération de liposome et il présente un système de livraison à encapsulation active (définition à la section 1.2.1.3.) auquel il est incontournable de se comparer. Le Doxil® est un liposome composé approximativement de 55% HSPC, 40% cholestérol et 5% DSPE-PEG₂₀₀₀ (% exprimés en pourcentages molaires), permettant l'encapsulation d'une forte quantité de doxorubicine, bien au-delà de sa limite de solubilité. En effet, ce liposome utilise une méthode de préparation ingénieuse, décrite pour la première fois en 1993 [14], utilisant la formation d'un gradient d'ions et de pH pour faciliter l'encapsulation de la molécule active (méthode décrite à la section 1.2.4.3.). Cette méthode de préparation permet donc de concentrer la doxorubicine dans le cœur aqueux du liposome et ainsi obtenir des efficacités d'encapsulation bien au-delà de 90% et des capacités de chargement plus importantes pour la livraison d'un maximum d'actif pour le traitement du cancer [14].

1.2.4 Méthodes de préparation

1.2.4.1 Réhydratation d'un film lipidique – encapsulation passive

De multiples techniques de préparation de liposome ont été décrites depuis leur développement [2, 15, 16]. La première méthode, décrite par Bangham en 1965 [17], est la méthode d'hydratation d'un film lipidique. Cette technique est considérée comme étant une

méthode d'encapsulation passive et consiste tout d'abord en la solubilisation des lipides dans un solvant organique, tel que le méthanol ou le chloroforme, dans un ballon à fond rond (Figure 1.4). À l'aide d'un évaporateur rotatif, le solvant organique est évaporé, ne laissant qu'un film lipidique sur les parois du ballon. Les lipides forment alors un film lipidique sec (Figure 1.4). Lorsqu'une solution aqueuse est ajoutée et agitée vigoureusement dans ce ballon, les molécules d'eau s'infiltrent entre les différentes couches du film lipidique. Cette infiltration cause le détachement de couches lipidiques et l'organisation spontanée de vésicules délimitées par ces couches lipidiques. Cette organisation spontanée a essentiellement lieu grâce aux interactions hydrophiles et hydrophobes des lipides amphiphiles en milieu aqueux. Les liposomes ainsi formés sont souvent de l'ordre du micromètre en termes de taille et ils possèdent généralement plusieurs bicouches concentriques, formant ainsi de larges liposomes multilamellaires (MLV, Figure 1.4).

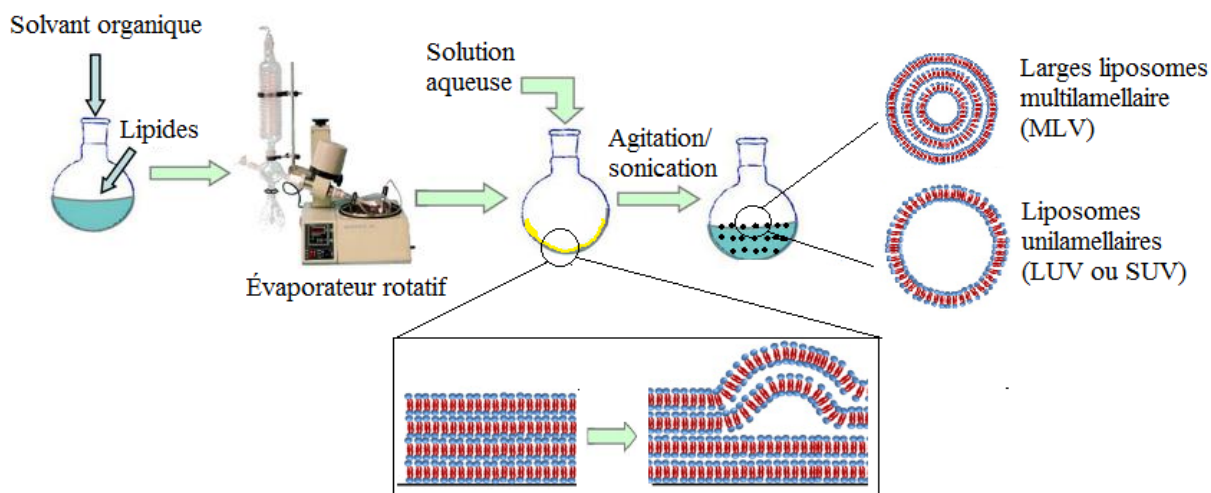


Figure 1.4 : Schéma de préparation des liposomes selon la méthode « Bangham »

La présence de molécules actives dans la solution aqueuse d'hydratation permet alors d'introduire le médicament, puisqu'une partie du volume aqueux se retrouve à l'intérieur des

vésicules formées. Des techniques post-fabrication de liposome peuvent ensuite être exercées à des fins d'homogénéisation, de raffinement de taille et d'aide à l'encapsulation. Pour n'en nommer que quelques-unes, la sonication, la méthode du gel/dégel ou encore l'extrusion permettent de réduire les MLV en large (LUV) ou petit (SUV) liposome unilamellaire avec des tailles prédéfinies, par exemple, par le diamètre de pores d'un filtre.

Avec l'utilisation de cette méthode, l'efficacité d'encapsulation de principes actifs dans les liposomes est grandement limitée par deux principaux facteurs; 1) la solubilité de la molécule active dans la phase aqueuse et 2) le faible volume aqueux interne des liposomes. Il devient alors important de sélectionner des molécules actives avec les meilleurs paramètres chimiques ou structuraux pour faciliter leur formulation sous forme de liposomes.

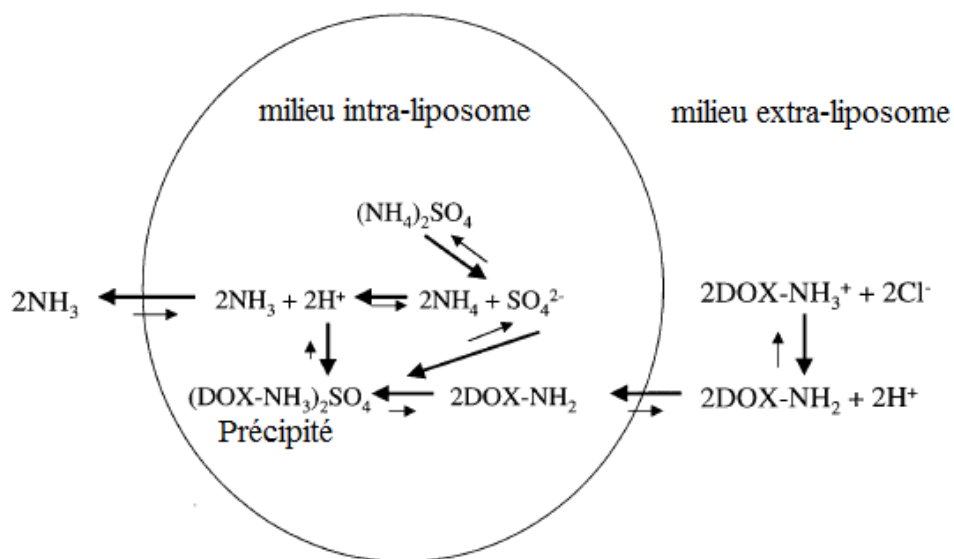
1.2.4.2 Autres méthodes – Encapsulation passive

Bien que la méthode de Bangham soit simple et largement employée, d'autres techniques ont été développées, comme l'évaporation en phase inverse, les méthodes d'injection éther/éthanol ou encore les approches d'émulsion. Toutes ces techniques consistent en pratique en l'addition d'une phase aqueuse ou organique en faible proportion à l'intérieur d'une phase de type contraire (par exemple de l'eau dans éthanol) [16]. Des gouttelettes aqueuses/organiques sont formées en suspension dans la phase mère, forçant ainsi l'arrangement des lipides à l'interface entre les deux phases. Puis, une dissipation de la phase organique permet l'obtention des vésicules lipidiques. Le détail de ces techniques ne sera pas traité dans ce travail, mais en général ces méthodes impliquent une proportion de solvants organiques qui peut affecter la stabilité de molécules plus fragiles, occasionner des traces de solvants résiduels toxiques pour l'être humain et présentent aussi de faibles efficacités d'encapsulation [16]. Elles sont aussi

classées dans les méthodes d'encapsulation passives, car il n'y a pas de force motrice pour l'encapsulation des substances actives à l'intérieur du liposome.

1.2.4.3 Méthode gradient de pH/ions – encapsulation active

La mise au point du Doxil® a occasionné des travaux majeurs d'amélioration des liposomes, en particulier au niveau de sa capacité de chargement. Cette méthode du gradient de pH/ions est dite active dans le cas où elle permet de déplacer l'équilibre intérieur/extérieur de concentration des molécules actives vers l'intérieur du liposome. Pour ce faire, les liposomes précurseurs du Doxil® présentent un milieu interne et externe de pH différent [18]. Ce gradient de pH entre l'intérieur et l'extérieur du liposome peut être atteint par l'hydratation des lipides avec une solution saline spécifique. Le sel d'ammonium sulfate est celui ayant été utilisé pour le populaire Doxil® (Figure 1.5), mais d'autres sels tels que l'ammonium



Adaptée de Barenholz [19]

Figure 1.5 : Mécanisme d'encapsulation de la doxorubicine dans des liposomes par le gradient transmembranaire d'ammonium sulfate

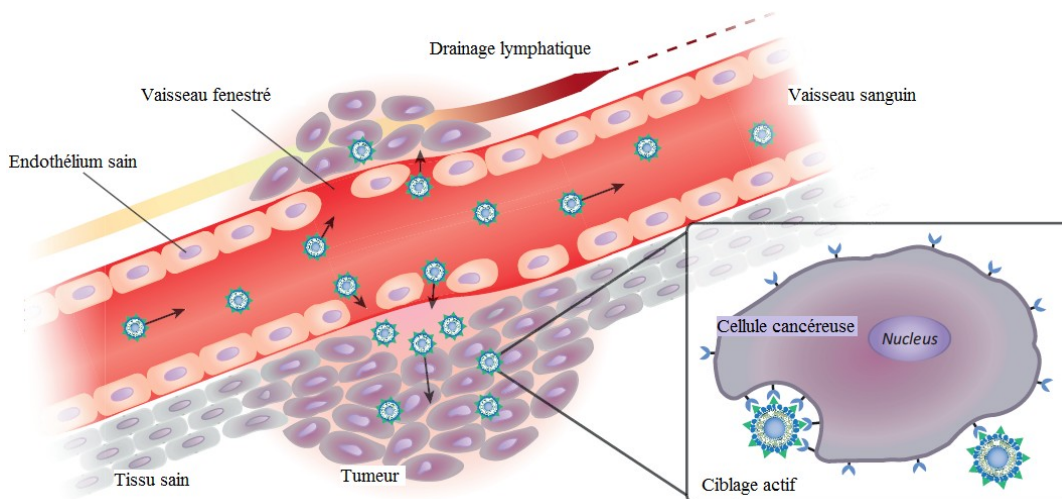
phosphate, acétate et citrate, ou encore ces mêmes sels sodiques ont également résulté en divers degrés d'encapsulation active [2]. De plus, des gradients d'ions métalliques ont également permis l'obtention d'encapsulation active, tout comme avec le chlorure ou le sulfate de manganèse ou le cuivre (CuSO_4 , CuCl_2 , MnSO_4 et MnCl_2)[18]. Brièvement, peu importe le sel utilisé, la technique consiste en l'encapsulation de ce sel puis en le changement du milieu externe des liposomes par un autre tampon ou solution, soit par dialyse ou par chromatographie d'exclusion de taille. Dans le cas du gradient à l'ammonium sulfate utilisé pour la doxorubicine (Figure 1.5), le sel se dissocie en ions ammonium (2NH_4^+) et sulfate (SO_4^{2-}) une fois en solution. L'ammonium (NH_3) peut traverser la bicouche lipidique pour équilibrer le milieu externe, laissant derrière lui un proton H^+ . L'accumulation de protons (H^+) augmente l'acidité à l'intérieur du liposome. Par la suite, les molécules de doxorubicine peuvent librement traverser la bicouche lipidique de l'extérieur vers l'intérieur (à des températures de fabrication fluide plus élevées) et lorsque cette base faible entre dans le liposome, son amine primaire devient chargée positivement à ce pH acide et devient à son tour imperméable à la bicouche lipidique. Une accumulation de molécules active apparaît donc à l'intérieur du liposome, favorisant alors la distribution de l'actif vers le coeur du liposome. De plus, la doxorubicine peut aussi se complexer avec l'ion SO_4^{2-} pour former un sel qui précipite à l'intérieur même du vecteur et forment des nanocristaux insolubles. Ce concept ingénieux a vu le jour dans le début des années 90, premièrement décrit par Cullis *et coll.* [20], et a peu de temps après été exploité par Barenholz et son équipe pour le développement du Doxil®.

Bien que le modèle ait répondu à la lacune du niveau d'encapsulation des molécules actives, il existe d'autres défis au développement d'une formulation liposomale optimale. Dans un premier temps, ce type de technique ne s'applique qu'à un seul type de molécules, soit de

petites molécules hydrophiles, mais pas trop hydrophiles pour qu'elles puissent diffuser dans les membranes lipidiques, et elles doivent être de faibles bases (gradient d'ammonium sulfate) ou de faibles acides (gradient de calcium acétate) [5]. La nature du composé à encapsuler est donc d'une importance capitale dans la réussite d'une formulation par une méthode de gradient de pH. Cette technique ne peut d'ailleurs pas être utilisée pour les molécules telles que les peptides et les protéines, qui ne peuvent diffuser au travers les membranes lipidiques en raison de leur poids moléculaire élevé et de leurs charges. Aussi, les liposomes utilisés sont généralement en phase gel pour assurer un maintien du gradient et une plus grande stabilité, ce qui occasionne inévitablement des limites au niveau de la libération du principe actif. L'absence de libération de l'actif au site d'action peut nuire à l'effet thérapeutique, comme il a été démontré dans le cas de liposomes d'ammonium sulfate chargé de cisplatine (Lipoplatin®)[21]. En bref, le développement d'une formulation, à haute capacité de chargement, entraîne généralement une faible disponibilité de l'actif à son site d'action et à l'inverse des liposomes plus fluides sont moins stables et entraînent une libération précoce du principe actif au contact avec les fluides biologiques. Ce dernier scénario n'est pas plus souhaitable puisque la formulation liposome n'apporte pas plus d'avantage que l'actif libre lui-même. Un compromis doit donc être fait entre la stabilité, la libération et la capacité de chargement.

1.2.5 Ciblage des liposomes

Dans les générations de liposome plus récentes (3^e), l'accent a été mis sur le ciblage contre des cibles spécifiques. Les liposomes, comme d'autres nanoparticules, peuvent être fonctionnalisés à leur surface avec des ligands spécifiques (voir Figure 1.1), tels que des anticorps qui augmentent le niveau de sélectivité pour un type de cellule visé [4]. Le ligand peut aussi conduire à l'internalisation du liposome par endocytose dans un type cellulaire donné (Figure 1.6). Une fois le liposome internalisé, son contenu doit être libéré avant d'être dégradé lors de son trafic vers le lysosome. Les mécanismes d'échappement à la dégradation seront repris plus en détail à la section 1.2.6.. Ce type de stratégie est appelée ciblage actif, en



Adaptée de Noble et coll. [4]

Figure 1.6 : Illustration de l'effet « EPR » et du ciblage actif par le liposome aux sites tumorale

raison de la présence d'un ligand qui force la reconnaissance d'un type cellulaire, par opposition au ciblage passif des liposomes. Elle permet d'augmenter l'innocuité et l'efficacité d'un traitement, en exploitant la surexpression des récepteurs cellulaires dans certaines lignées cancéreuses ou pathologiques. Le ciblage passif, quant à lui, est plutôt défini par la

distribution aléatoire de vecteurs dans certains types tissulaires, notamment régis par leurs propriétés physico-chimiques (tailles, charges et autres) qui peuvent influencer leur biodistribution. En oncologie et dans certaines pathologies inflammatoires, un phénomène de ciblage passif, mieux connu sous le nom d'effet « EPR » (Enhanced Permeability and Retention effect, illustré à la Figure 1.6), a pu être exploité par des liposomes de 2^e et de 3^e génération. En fait, le développement de tumeurs cancéreuses solides s'accompagne d'un processus d'angiogenèse, où les vaisseaux sanguins sont plus fenestrés et désorganisés que dans les tissus sains. Ces brèches dans l'endothélium permettent aux liposomes de s'échapper de la circulation systémique et une accumulation de vecteurs remplis d'agents anticancéreux, est décelables dans le milieu interstitiel de la tumeur [5]. Dans le cas des liposomes de doxorubicine Doxil® et Myocet®, l'accumulation de doxorubicine s'est avérée être jusqu'à dix fois plus importante qu'avec l'utilisation de la molécule libre [22]. Cette observation peut s'expliquer simplement d'une part à cause du fait que l'anticancéreux seul possède un temps de demi-vie inférieur à l'anticancéreux encapsulé et d'autre part parce que l'agent actif libre au site tumoral peut rediffuser plus facilement vers la circulation sanguine, ce qui limite son accumulation. Curieusement, même avec la présence accrue de doxorubicine encapsulée au site tumoral, l'efficacité anti-cancer n'a pas pu être améliorée par rapport à la doxorubicine libre. Ces résultats témoignent des multiples facteurs à considérer dans le développement d'une formulation optimale. Le ciblage de l'actif vers une cible thérapeutique n'est rien si l'actif ne peut être libéré et être rendu disponible pour exercer son rôle thérapeutique à sa cible.

1.2.6 Profils de libération et déclencheurs de libération

Tel qu'il a été décrit à la section 1.2.5., la libération de l'actif est un élément indispensable pour que celui-ci puisse effectuer son rôle pharmacologique. Les premières générations de liposomes avaient une stabilité et des temps de circulation plutôt limités. Leur actif était majoritairement relâché dès l'administration en milieu biologique, notamment en raison de la présence des protéines sériques. L'utilisation de lipides à haute température de transition et du cholestérol en combinaison avec des méthodes d'encapsulation actives, limitent la libération de l'actif, donc sa toxicité systémique, mais ne permettent pas d'augmenter l'activité thérapeutique (exemple du Doxil® et du Lipoplatin®). Dans le cas du Doxil®, l'internalisation cellulaire du liposome et de son contenu ne semble pas être responsable de l'efficacité thérapeutique observée [23]. La libération lente de la doxorubicine pourrait être due à la forte concentration d'ammonium au site tumoral, qui perturberait le gradient d'ammonium sulfate et faciliterait la diffusion de la doxorubicine dans le milieu interstitiel [5, 23]. Dans les liposomes actuels en recherche, des stimuli sont utilisés pour amorcer une libération contrôlée du matériel encapsulé. On distingue les stimuli internes, comme la température, le pH, ou certaines enzymes présents dans l'environnement physiologique de pathologies inflammatoires, infectieuses ou en oncologie [3], et les stimuli externes comme les ultrasons, la lumière, le champ magnétique, qui doivent être appliqués à l'aide d'un système externe [24]. À titre d'exemple, le processus inflammatoire implique une élévation locale de température, ce qui peut être exploité par des liposomes thermosensibles. Si les lipides présentent une température de transition adéquate, ces variations de quelques degrés peuvent fluidifier leur membrane et favoriser la diffusion de leur contenu [25]. Aussi, d'autres éléments tels que des polymères thermosensibles de NIPAM peuvent être ajoutés dans la

composition du liposome pour y agir en tant que déclencheur de libération, tel qu'il a été décrit par Yoshino *et coll.* [26]. Dans un même ordre d'idée, des liposomes internalisés par endocytose peuvent répondre à l'acidification de l'endosome par un caractère pH-sensible, qui entraîne la déstabilisation membranaire du liposome. Cette fragilisation peut entraîner la déstabilisation subséquente de la paroi de l'endosome et résulter en la fusion des membranes du liposome et de l'endosome pour provoquer la libération de l'actif directement dans le cytosol [27]. La molécule active peut également simplement diffuser du liposome vers l'endosome, puis vers le cytosol. L'utilisation de ces technologies, bien que très prometteuses en théorie, s'avère présenter des défis de taille. À ce jour, aussi peu que deux formulations sensibles sont parvenues à progresser dans les phases cliniques avancées, notamment le ThermoDox®, mais celui-ci a échoué à démontrer un bénéfice thérapeutique [25]. La raison la plus probable de cet échec est attribuable à la libération importante et précoce de l'actif due à l'utilisation de liposomes peu stables qui sont à quelques degrés près sur la frontière entre la phase gel et liquide-cristalline. Plus récemment, de nouvelles études du ThermoDox lui ont permis d'atteindre les études cliniques de phase III, grâce aux démonstrations prometteuses d'efficacité dans l'étude OPTIMA conduite par Celsion Corporation. La thérapie proposée consiste en l'administration du ThermoDox en combinaison avec l'ablation par radiofréquence en guise de source de chaleur pour déclencher les mécanismes du ThermoDox. Somme toute, cette thérapie nécessite l'apport extrinsèque du stimulus déclencheur de libération, ce qui complexifie le traitement.

L'utilisation de ce type de technologie de réponse à un stimulus implique nécessairement qu'un stimulus caractéristique soit identifié pour une pathologie et qu'il soit exploitable dans une formulation liposomale. De plus, la composante « déclenchable » doit assurer l'intégrité et

la stabilité du liposome dans un environnement sain et répondre rapidement à une légère variation du milieu en relâchant préférentiellement la totalité de son contenu. L'obtention d'un tel système est fréquemment atteint dans des démonstrations *in vitro*, mais ne répond pas aussi bien lorsqu'ils sont intégrés dans des systèmes biologiques complexes.

1.3. La doxorubicine

La doxorubicine (Figure 1.7), un anticancéreux de la famille des anthracyclines, qui empêche la réplication cellulaire en s'intercalant à l'ADN double brin et en empêchant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle [28]. La formation de radicaux libres et l'induction de l'apoptose pourraient également être des mécanismes reliés à l'efficacité de cette molécule qui

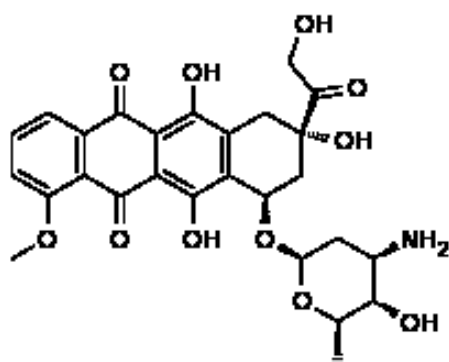


Figure 1.7 : Structure de la molécule doxorubicine

est utilisée depuis près de 50 ans. La doxorubicine possède également une formulation liposomale acceptée pour commercialisation par la FDA sur le marché américain, sous le nom Doxil® (décrite dans les sections précédentes). Cette molécule a été sélectionnée dans cette étude à titre de molécule modèle pour effectuer une de preuve de concept, puisque la formulation commerciale de cette molécule encapsule déjà près de 99% de la molécule active. La libération immédiate de doxorubicine dans le système sanguin n'est pas souhaitée en raison de ses graves effets toxiques cardiaques. Il s'agit d'un modèle auquel il est possible de se

comparer en termes d'encapsulation active et de libération, car ces liposomes commerciaux limitent la libération de l'actif.

1.3.1 Quantification de la doxorubicine

1.3.1.1 CLHP-Fluo

Pour la quantification de la doxorubicine, la méthode de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) présente une option très sensible, permettant l'analyse de concentrations de doxorubicine de l'ordre du nanomolaire. La méthode est très simple et repose sur l'affinité de la molécule active entre la phase stationnaire et la phase mobile du système CLHP (Figure 1.8). La phase stationnaire peut être de nature apolaire (chromatographie en phase inverse) ou polaire (chromatographie en phase normale). Son choix dépend de la molécule à quantifier, mais la chromatographie en phase inverse, composée de billes de silices greffées avec des chaînes alkyles (8 ou 18 carbones), permet d'analyser un large spectre de molécules

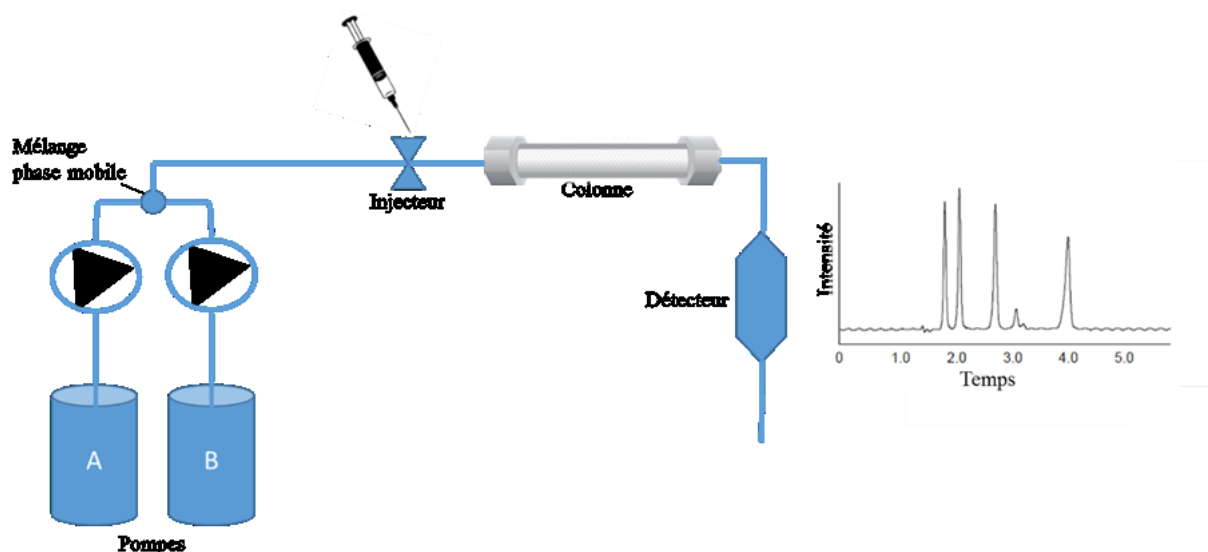


Figure 1.8 : Schématisation d'un système CLHP

organiques, y compris la doxorubicine. La polarité de la phase mobile peut être ajustée pour éluer les molécules actives hors de la colonne. Brièvement, les phases mobiles sont pompées

dans le circuit CLHP dans une proportion donnée de phases mobiles A et B et un échantillon contenant la molécule active est injecté dans le circuit. La molécule active est retenue sur la colonne de par son affinité, ce qui permet de la séparer des impuretés qui n'auront pas le même temps de rétention et la même affinité en raison de leur différence moléculaire. Finalement, elle est éluée par la phase mobile vers le détecteur. Dans le cas d'un mode à gradient, les proportions de phases mobiles A et B varient au cours du temps pour accélérer l'éluion tout en optimisant l'efficacité de séparation. La molécule active est détectée et quantifiée par un détecteur approprié et apparaît sous forme de pic sur un chromatogramme. Dans le cas de la doxorubicine, la détection se fait par fluorescence, avec une excitation de 485 nm et une détection à une longueur de 585 nm. Les aires des pics sur le chromatogramme peuvent alors être intégrés et convertis en concentrations en utilisant une courbe de calibration préparée avec des échantillons de concentration connue injectée sur le système CLHP.

1.3.1.2 Spectrophotomètre Fluo

La doxorubicine peut être tout simplement analysée par spectrophotomètre à fluorescence (principe expliqué à la section 1.5.6. pour l'ADN) en utilisant les longueurs d'onde d'excitation 485 nm et d'émission 590 nm, mais cette méthode s'est avérée en pratique être moins sensible et moins spécifique que la méthode CLHP-Fluo. Pour une raison de simplicité, la méthode spectrométrique a été utilisée lorsque possible.

1.4 Caractérisation des liposomes

1.4.1 Mesure de taille

La taille des différents liposomes préparés a été déterminée à l'aide d'un Malvern Zetasizer Nano ZS series. La mesure réalisée par l'instrument est également connue sous le nom de « diffusion dynamique de la lumière », ou DLS (Dynamic Light Scattering). L'appareil permet la mesure de particules en suspension, pour une gamme de taille variant environ de 3 nm à 10 μm . Le principe de la technique repose sur le mouvement « brownien » des particules, en tenant pour acquis le fait que les plus petites particules ont un mouvement aléatoire plus rapide que les grosses particules (Figure 1.9). Un laser est envoyé dans une cuvette contenant la suspension de particules et un détecteur capte les variations d'intensité lumineuse causées par la diffusion de la lumière sur les particules en mouvement. Dans le traitement des données, la connaissance du milieu aqueux dans lequel les particules sont suspendues est essentielle pour ajuster la formule d'intégration des données avec l'indice de réfraction du milieu. Aussi, une solution aqueuse avec plus de solutés entraîne une viscosité du milieu plus élevée, ce qui ralentit le mouvement des particules et doit être pris en compte pour la détermination adéquate des tailles de particules. En connaissant la température, la viscosité, la constante de Boltzmann et le coefficient de diffusion, le diamètre hydrodynamique de la particule est déterminé selon l'équation de Stokes-Einstein.

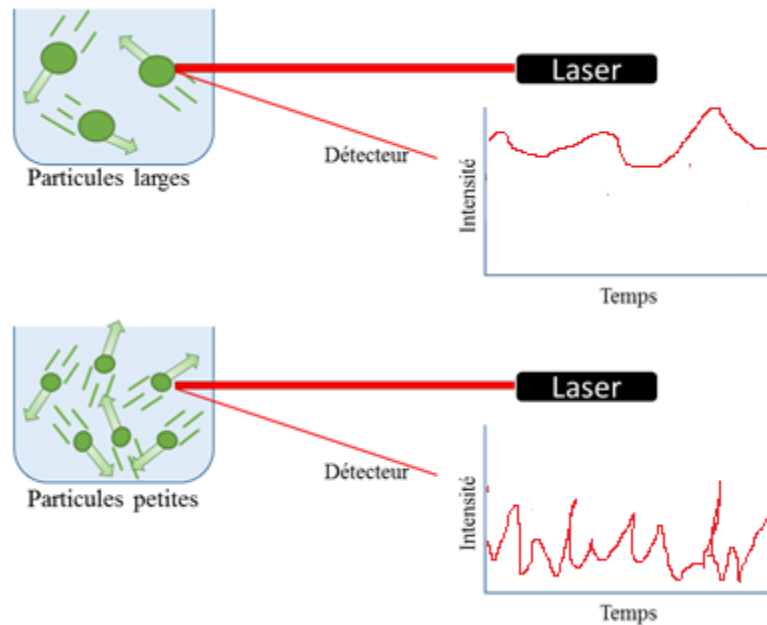


Figure 1.9 : Illustration du principe de la mesure de taille par technique de diffusion dynamique de la lumière

1.4.2 Mesure de la charge de surface

Le potentiel de surface dans une suspension permet d'obtenir un indice sur la stabilité colloïdale d'une formulation, notamment sur le potentiel d'agrégation ou de floculation d'une dispersion. Il permettra également d'obtenir des informations pertinentes sur l'éventuelle opsonisation de la formulation pour les utilisations *in vivo*. En fait, les particules avec de forts potentiels de surface positifs ou négatifs auront tendance à être reconnus comme des corps étrangers par le système immunitaire de l'être humain. Dans ce cas-ci, il peut également être un moyen qualitatif de suivre la complexation des ADN avec les vecteurs cationiques. La technique consiste en la mesure de la mobilité électrophorétique des particules. La mesure se fait dans le même appareil que celui pour la mesure de taille, dans un Malvern Zetasizer Nano ZS, cette fois-ci avec des cuvettes spéciales dotées de deux électrodes de part et d'autre d'un capillaire en forme de « U ». Un potentiel est appliqué sur les deux électrodes et dans ce cas précis, la diffusion de la lumière sur les particules est analysée en lien avec la mobilité de celles-ci. Plus une particule possède un

potentiel de surface élevé, plus elle aura tendance à se déplacer rapidement vers le pôle de courant opposé. Le courant s'inverse alors de manière séquentielle pour suivre le mouvement des particules vers l'électrode opposée. La taille de la particule et le milieu dans laquelle elle est dispersée auront un impact direct sur sa mobilité, ces paramètres doivent donc être contrôlés. Le potentiel zêta de la couche diffuse des particules est extrait d'après l'équation de Henry (Malvern).

1.4.3 Mesure de la complexation avec l'ADN

Pour mesurer le niveau de complexation de l'ADN avec des liposomes cationiques, ceux-ci sont tout d'abord complexés et les lipoplexes peuvent être centrifugés, pour plaquer au fond d'un tube tous les lipoplexes. Le surnageant peut être récolté et analysé pour y quantifier la portion d'ADN libre non-complexé (méthode de quantification de l'ADN décrite à la section 1.5.6.). Avec la concentration théorique initiale ajoutée et la concentration libre obtenue, l'efficacité d'encapsulation/complexation peut être déterminée selon l'équation 1 :

$$\text{Eq. 1 : } 100 * \frac{\text{Concentration théorique} - \text{Concentration libre}}{\text{Concentration théorique}} = \text{efficacité d'encapsulation ADN}$$

Pour confirmer ces résultats, une méthode alternative a été utilisée qui consiste en l'évaluation de l'intensité de fluorescence de liposomes mis en contact avec la sonde fluorescente SYBRGreen/SYBRGold, puis de leur rupture par l'ajout d'un détergent; le Triton X-100 (méthode résumée à la Figure 1.10). Cette sonde fluorescente émet une intensité fluorescente uniquement lorsqu'elle s'intercale ou se complexe avec un brin d'ADN. L'encapsulation est déterminée par l'équation 2 :

$$\text{Eq. 2: } 100 - \left(\frac{\text{Intensité initiale}}{\text{Intensité finale}} \right) * 100$$

La complexation doit être évaluée avant l'ajout du principe actif, dans le cas où celui-ci absorbe à des longueurs d'onde similaires à celle des sondes fluorescentes utilisées (λ absorbance = 485 nm).

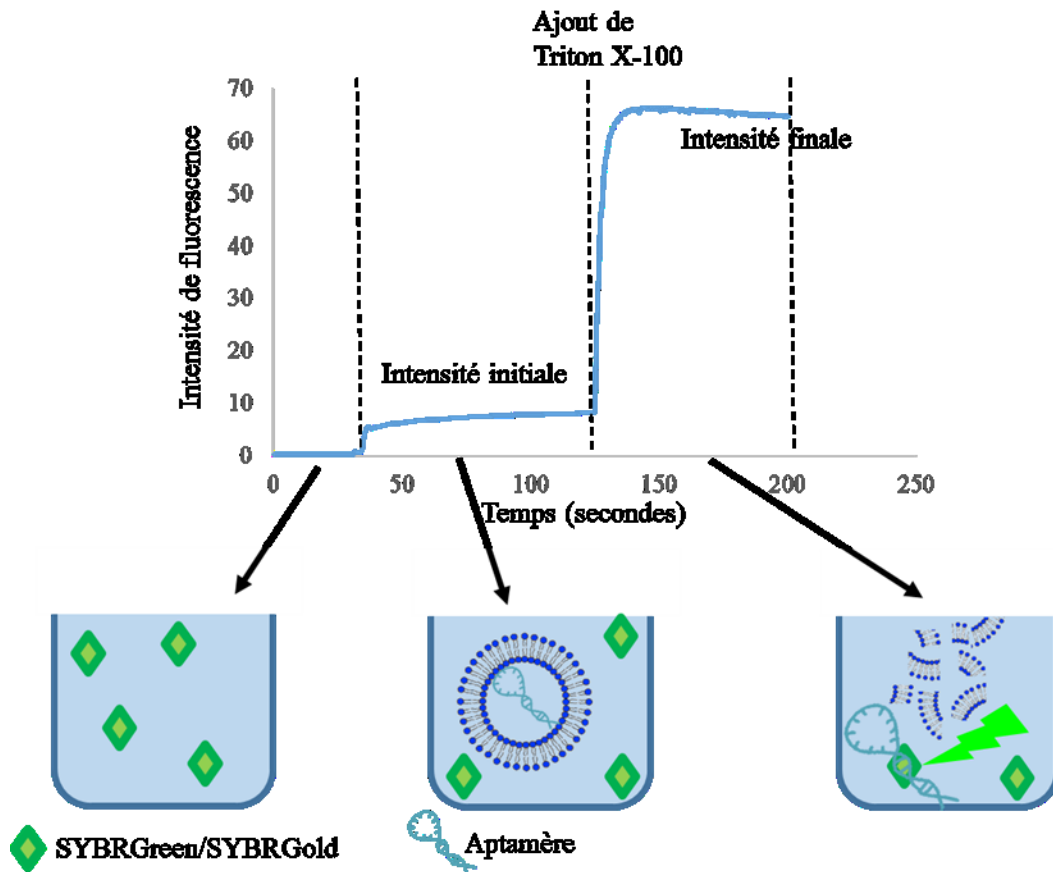


Figure 1.10 : Méthode de quantification du taux de complexation des aptamères avec les liposomes

1.4.4 Mesure de l'encapsulation de la molécule active

Pour mesurer l'efficacité d'encapsulation, les liposomes/lipoplexes chargés en principes actifs peuvent être analysés de différentes manières. La molécule active peut être quantifiée de manière directe, c'est-à-dire qu'il faut quantifier le contenu de liposomes purifiés après la rupture de ceux-ci. Sinon, la drogue encapsulée peut être quantifiée de manière indirecte, en quantifiant le matériel non encapsulé. Une façon indirecte rapide de procéder est de centrifuger les vecteurs pour les plaquer au fond de tubes à centrifuger. Les nanovecteurs sont plaqués au fond du tube

avec leur contenu encapsulé. Au même titre que pour la mesure de complexation de l'ADN, le surnageant est récolté et analysé pour la quantification du matériel non encapsulé. L'efficacité d'encapsulation est déterminée en connaissant la concentration initiale ajoutée :

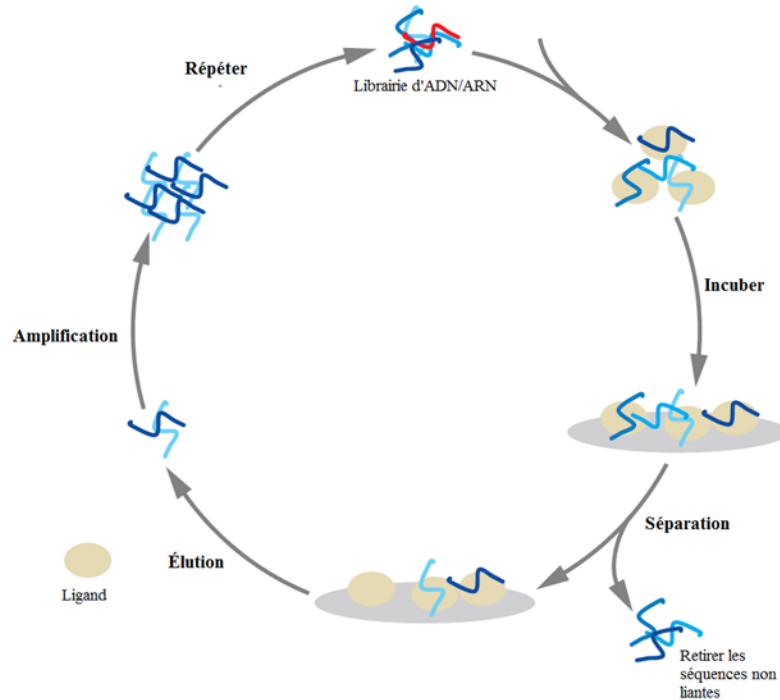
$$\text{Eq. 3: } 100 * \frac{\text{Concentration théorique} - \text{Concentration libre}}{\text{Concentration théorique}} = \text{efficacité d'encapsulation actif.}$$

Dans le cas de la doxorubicine, pour effectuer cette quantification il ne doit pas y avoir d'ADN dans le surnageant. Il faut donc qu'il y ait complexation complète des aptamères avec les vecteurs, car l'intercalation de la doxorubicine avec de l'ADN libre résulte en une diminution de l'intensité de fluorescence. Si la mesure était effectuée en présence d'aptamères non complexés, ceux-ci pourraient se lier à la doxorubicine libre et atténuer le signal de fluorescence de la doxorubicine libre, ce qui causerait une sous-estimation de la concentration de doxorubicine libre.

1.5. Les aptamères

1.5.1 Description et méthode de préparation

Les aptamères sont de courtes séquences de nucléotides d'ADN ou d'ARN, typiquement composé de 20 à 50 nucléotides, se repliant dans une conformation tridimensionnelle donnée. Ils ont été décrits pour la première fois au début des années 90, où il avait été remarqué que des structures spécifiques d'acides nucléiques pouvaient se lier très fortement et spécifiquement à des ligands donnés [29]. Les ligands peuvent être de différente nature, tels que des petites molécules chimiques, des peptides, de larges macromolécules biologiques (protéines, peptides, etc.) et même des cellules entières. Les aptamères sont donc par définition des molécules synthétiques, qui sont aujourd'hui conçues ou découvertes par un processus d'évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX, voir Figure 1.11) [29]. Ce



Adaptée de Bouchard et coll. [30]

Figure 1.11 : Illustration du processus SELEX

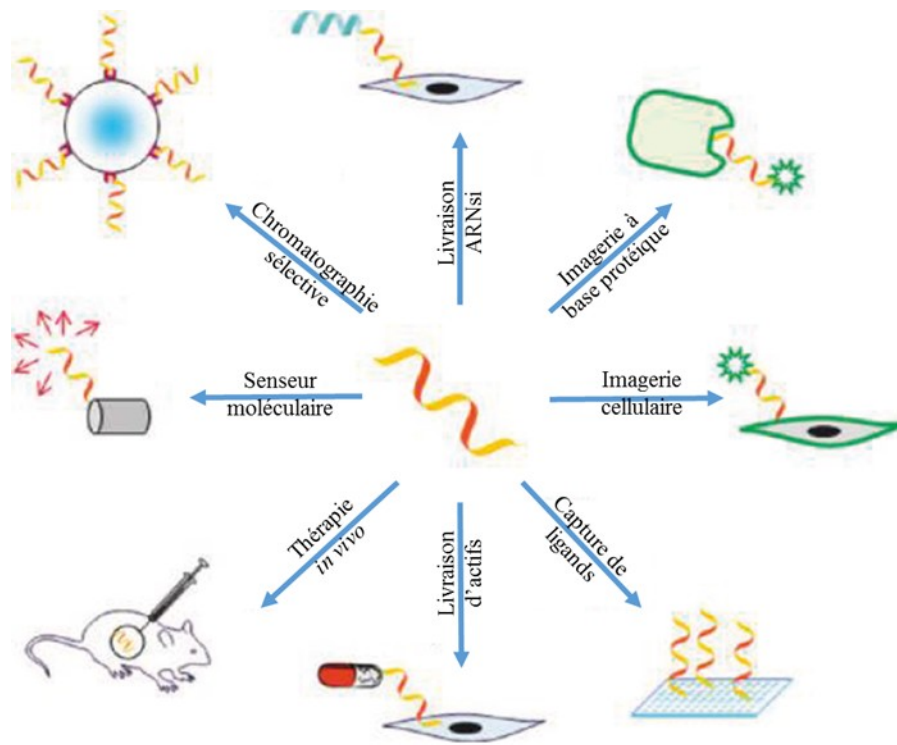
processus consiste brièvement en l'addition d'une librairie de séquences d'acides nucléiques sur un ligand d'intérêt puis, par répétition de cycles de lavage et d'amplification, les quelques séquences à plus forte affinité sont identifiées. Grâce à cette méthode, il est possible de sélectionner un aptamère pour une grande variété de cibles. En général, le repliement et la structure tridimensionnelle de ces aptamères sont régulés par l'appariement des paires de base, la longueur des chaînes, par la salinité du milieu, etc. Une majorité des aptamères adopte des structures en « tête d'épingle » et la conformation adoptée dépend de la présence de cations mono et divalents en solution [29]. Par le fait même, l'affinité d'un aptamère dépendra du milieu dans lequel les deux entités sont solubilisées et la présence de sels est essentielle au bon repliement structural de la séquence d'acides nucléiques. Les aptamères d'ADN sont généralement stables à l'entreposage, puisqu'ils sont composés des mêmes structures chimiques que le matériel génétique des différentes espèces vivantes. En milieu physiologique, les

aptamères développés à base d'acide désoxyribonucléique (ADN) ont tendance à être plus stables que les brins d'acide ribonucléique (ARN). Les aptamères à base d'ARN auront moins tendance à être utilisés lorsque la stabilité est un souci, puisque la présence abondante de nucléases sur toutes surfaces et dans la circulation sanguine entraîne plus rapidement leur dégradation. Somme toute, des aptamères composés de nucléotides non modifiés peuvent démontrer des temps de demi-vie aussi courts que deux minutes dans la circulation sanguine [31]. Des modifications chimiques de diverses natures peuvent être appliquées aux séquences d'acides nucléiques pour en augmenter leur demi-vie, telle que l'ajout d'un O-méthyl en position 2 sur les sucres des nucléotides. De plus, comme il s'agit de matériel biologique faisant déjà partie intégrante de l'organisme vivant, les aptamères sont généralement biocompatibles, biodégradables et occasionnent généralement moins de réactions immunitaires que les anticorps exogènes.

L'affinité des aptamères pour leur cible est fréquemment comparée à celle d'un anticorps pour son antigène. Des affinités de l'ordre du pico- et du nano-molaire (constante de dissociation K_D) peuvent être obtenus avec les aptamères, ce qui correspond aux grandeurs obtenues avec les anticorps [32]. Une fois une séquence identifiée, l'affinité de celle-ci peut être aisément modulée par l'addition, la soustraction ou le changement d'un nucléotide [33]. Lorsque cette séquence est optimisée, elle ne requiert pas la présence d'une cellule hôte pour être fabriquée à grande échelle. Ils peuvent être produits plus rapidement et à moindre coût que des anticorps par des techniques de PCR *in vitro*, qui ne dépendent pas d'organismes vivants pour leur production et des complexités liées au respect des bonnes pratiques de fabrication [34].

1.5.2 Rôle des aptamères

La polyvalence des aptamères et leur très forte affinité ont suscité un grand intérêt pour leur utilisation dans le domaine analytique, de la bioanalyse et dans le domaine thérapeutique (voir Figure 1.12). Ils ont été utilisés en tant que phase stationnaire, que biomarqueur cellulaire, protéique et même en remplaçant les anticorps dans les techniques de cytométrie de flux et de Western Blot [29]. Ils ont également prouvé leur intérêt dans le domaine du diagnostic médical, en permettant de détecter des molécules ou des types cellulaires pathologiques de manière plus rapide, plus sensible et moins coûteuse [29, 32]. Dans ces pratiques, d'ingénieux systèmes de fluorophore intrinsèques, d'hybridation complémentaire et d'agent d'atténuation (quencher),



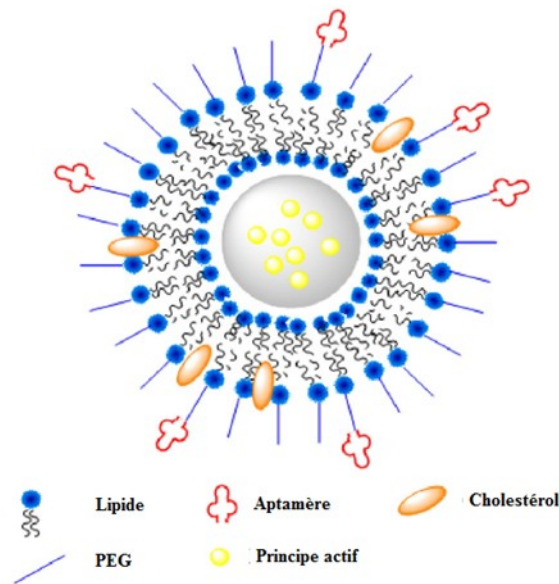
Adaptée avec la permission de Iliuk et coll. [35]. Copyright 2011, American Chemical Society

Figure 1.12 : Illustration des applications possibles des aptamères en biologie et en analytique

permettent la détection ou la quantification d'un ligand donné en temps réel. En bref, les aptamères sont principalement utilisés comme des anticorps et ils présentent des avantages considérables, tels qu'un moindre coût (courtes séquences) de recherche et de fabrication, une synthèse simple, la possibilité d'ajustement de l'affinité, une stabilité de plusieurs années en forme déshydratée et la possibilité de libération de leur ligand sous forme inchangée [32].

1.5.3 Utilisations courantes en vectorisation du médicament

Dans la formulation de vecteurs, comme pour les liposomes, des agents de ciblage comme les anticorps ont été utilisés pour conférer une sélectivité aux liposomes. Les aptamères ayant des capacités de liaison similaires aux anticorps ont donc été utilisés dans divers scénarios en tant qu'élément de ciblage greffé à la surface de liposomes (Figure 1.13) [36]. Ils ont également été directement conjugués à des molécules actives, comme dans le cas de l'aptamère sgc8c



Adaptée de Li et coll. [36]

Figure 1.13 : Illustration d'un liposome fonctionnalisé avec des aptamères pour ciblage actif

bispécifique conjuguant la doxorubicine et se liant aux cellules CEM (lymphoblastes humains), dans le but d'acheminer un actif vers une cellule cible [37]. Les aptamères eux-mêmes ont également fait l'objet de recherche en tant qu'agent thérapeutique. Le meilleur exemple est le produit commercial Macugen®, ayant reçu l'approbation de la FDA en 2004. Brièvement, la haute affinité de l'aptamère Macugen pour un facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) permet d'inhiber l'action du facteur de croissance et de retarder les symptômes de dégénérescence maculaire liés à l'âge [32]. Dans leur utilisation dans un système biologique, les aptamères, plus particulièrement les séquences d'ARN, peuvent être dégradés par les nucléases de la circulation sanguine. Cette limitation peut être corrigée en modifiant chimiquement quelques nucléotides de la séquence [37]. Malgré ces modifications, les aptamères restent une alternative moins immunogène en comparaison avec leurs équivalents les anticorps.

Très peu de travaux de recherche ont exploité les aptamères pour contrôler la libération de molécules actives dans l'organisme vivant. Néanmoins, Mo *et coll.* ont élaboré des nanogels remplis avec un aptamère spécifique à l'ATP et de son brin complémentaire. Le brin complémentaire possède des sections riches en nucléotides G-C pour la complexation de molécules de doxorubicine. En présence d'ATP intracellulaire, l'aptamère de l'ATP change de conformation et se dissocie de son brin complémentaire pour se lier à l'ATP, occasionnant une libération de doxorubicine [38]. Ce concept exploite la présence plus abondante d'ATP au niveau intracellulaire pour libérer la doxorubicine spécifiquement après l'internalisation des particules de nanogels. Dans un même ordre d'idée, Battig *et coll.* [39] ont utilisé des aptamères permettant la libération soutenue et contrôlée de protéines thérapeutiques hors d'hydrogels fonctionnalisés. Des aptamères spécifiques aux protéines ont été incorporés dans des hydrogels, agissant en guise de réservoir de peptides thérapeutiques. La haute affinité que ces acides nucléiques démontrent

pour leur cible a permis un maintien des protéines dans les hydrogels, limitant ainsi la fuite des hydrogels en molécules actives. La libération des peptides a été contrôlée par l'addition d'une séquence complémentaire aux aptamères, permettant à ceux-ci de relâcher les protéines. Finalement, une seule équipe, Kim *et coll.* [40] ont tenté d'incorporer des aptamères à l'intérieur de liposomes. Ils étaient utilisés pour concentrer de petites molécules organiques toxiques dans un liposome, facilitant ainsi leur extraction et la purification de l'eau contaminée. Les liposomes de cette recherche n'étaient pas conçus pour l'encapsulation maximale des aptamères, puisque des lipides neutres ont été utilisés.

1.5.4 Design et caractérisation des aptamères

Les séquences d'ADN suivantes ont été proposées par le Pr Vallée-Bélisle et ont été synthétisées à partir d'une même séquence cible. Cette séquence spécifique possède une forte affinité pour la doxorubicine et deux d'entre elles ont été publiée (Doxapt-28 et pour le Coop-Doxapt [41, 42]) (Figure 1.14).

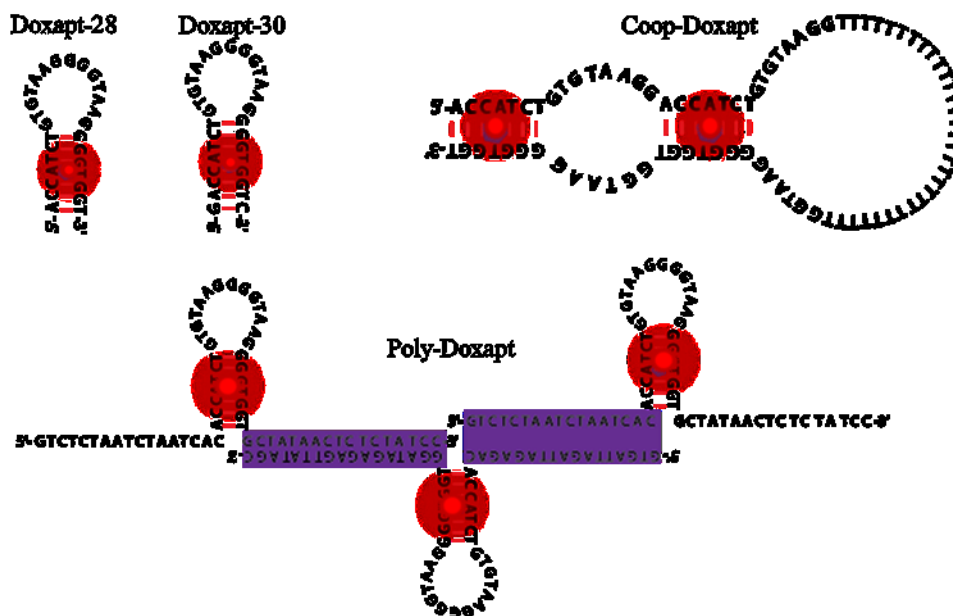


Figure 1.14 : Structure des différents aptamères à la doxorubicine

1.5.5 Mesure de l'affinité aptamère-ligand

L'affinité d'un aptamère pour sa cible peut être déterminée par des techniques de calorimétrie, visant à mesurer l'énergie de liaison dégagée dans cette liaison (phénomène exothermique). Dans le cas de la doxorubicine, elle est connue pour s'intercaler à l'ADN, ce qui est d'ailleurs son mécanisme d'action cytotoxique principal. Lorsqu'elle s'intercale, son intensité de fluorescence se voit atténuée, ce qui permet de suivre la cinétique de liaison de la doxorubicine avec une séquence d'ADN double brin (Figure 1.15). Avec des concentrations croissantes d'ADN, l'intensité de fluorescence diminue, jusqu'à l'obtention d'un plateau qui représente le maximum de liaison de la doxorubicine. Pour quantifier l'affinité, les spectres d'émission de la doxorubicine sont enregistrés à chacune des concentrations d'ADN et l'aire sous la courbe (ASC) de ces spectres est calculée. Le graphique de ces aires sous la courbe contre les valeurs

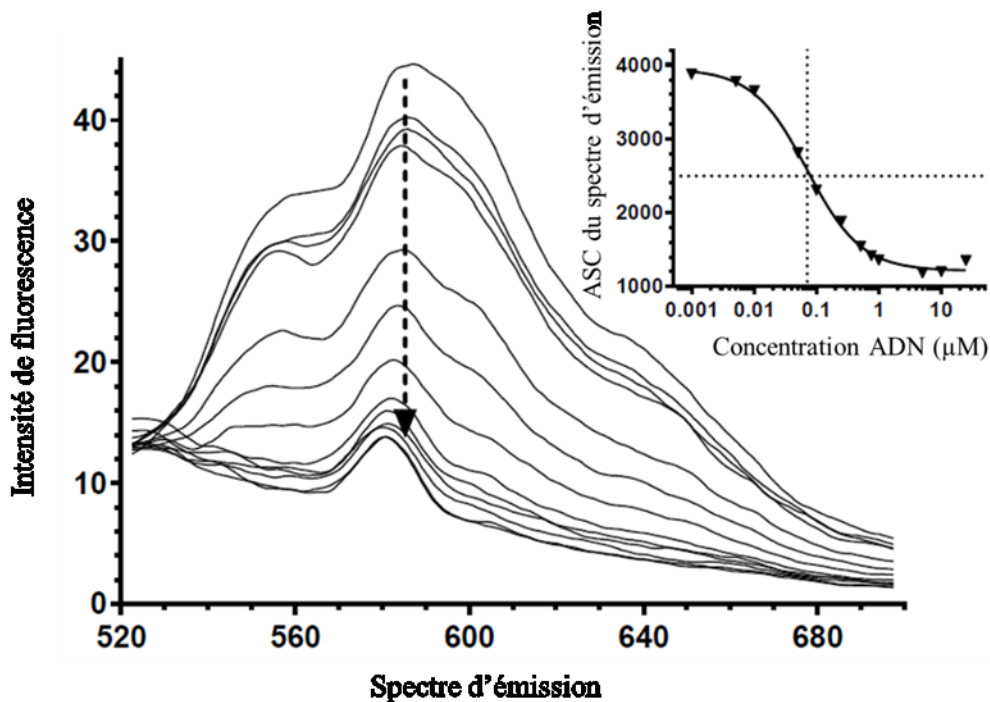


Figure 1.15 : Atténuation du signal de fluorescence de la doxorubicine avec l'augmentation de la concentration d'aptamère (de haut en bas)

d'ADN utilisées se traduit par une courbe sigmoïdale, avec pour équation :

$$\text{Eq. 4 : } Y = M_1 + (M_2 * X) / (X + M_3),$$

où le M_1 équivaut à la valeur initiale d'ASC avec une concentration d'ADN nulle, le M_2 équivaut à l'amplitude entre la valeur initiale et la valeur « plateau » finale d'ASC, et finalement le M_3 équivaut en la valeur de concentration (X) lorsque l'ASC est à 50% de son amplitude (constante de dissociation K_D). Cette constante de dissociation est l'inverse de l'affinité et correspond à une vitesse de dissociation de deux entités complexées, où plus la valeur du K_D est petite, plus l'affinité est grande et vice versa.

1.5.6 Quantification de l'ADN

L'ADN peut être quantifié de différentes manières, mais deux techniques spectrophotométriques ont été utilisés dans cette recherche (Figure 1.16). Brièvement, les acides nucléiques peuvent être quantifiés par une méthode de spectrophotométrie U.V., en déterminant l'absorbance d'une solution d'ADN à une longueur d'onde λ de 260 nm. Cependant, il est impossible d'obtenir une méthode quantitative des ADN lorsque ceux-ci sont mélangés à des liposomes, car les lipides absorbent eux aussi à la même longueur d'onde. Pour discriminer les aptamères et les quantifier adéquatement dans les liposomes, une sonde fluorescente a été utilisée. Le SYBRGreen est une sonde qui émet une intensité de fluorescence seulement lorsqu'elle est intercalée entre deux brins d'ADN, ce qui permet donc de quantifier les aptamères qui ont quelques paires de base dans leur structure secondaire. Pour les séquences à simple brin, le SYBRGreen est moins efficace et doit donc être remplacé par le SYBRGold, qui lui peut se complexer à l'ADN et à l'ARN simple brin également. Dans les deux cas, les sondes intercalées absorbent à la longueur d'onde λ 496 nm et ils émettent de la fluorescence à la longueur d'onde λ 523 nm.

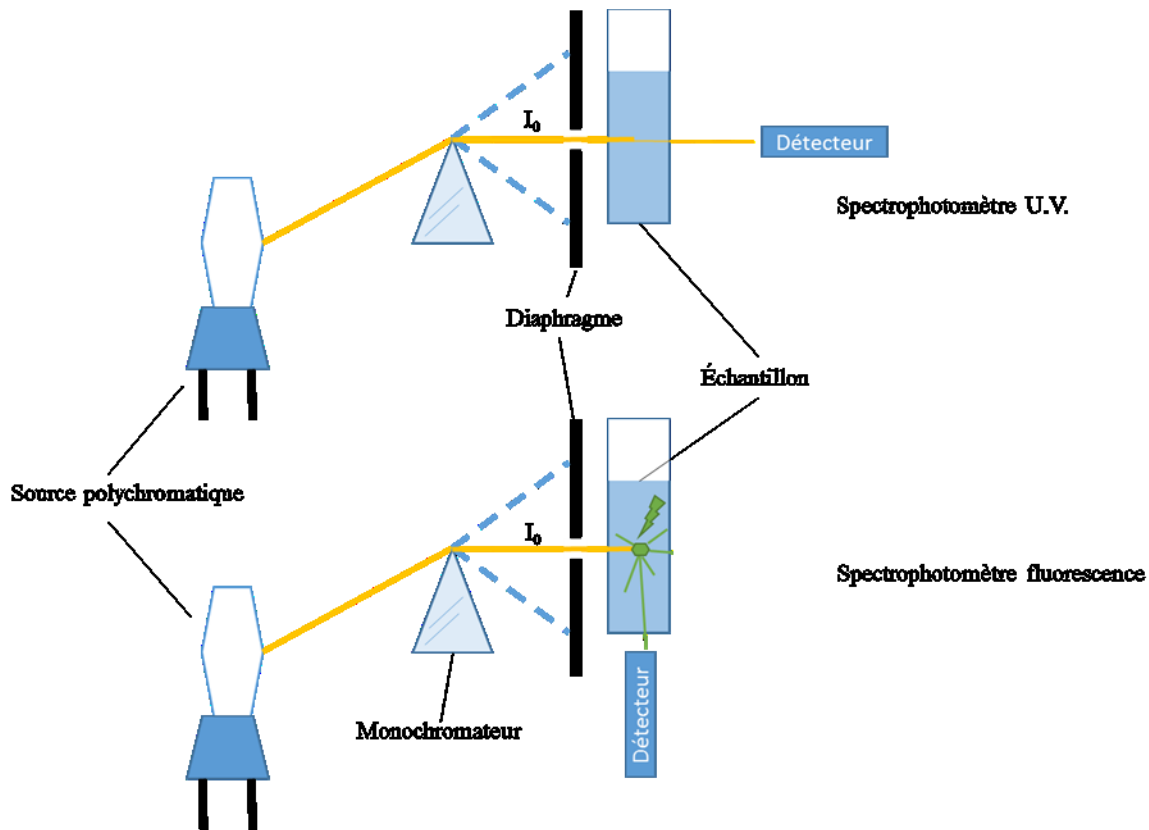


Figure 1.16 : Illustration du principe des spectrophotomètres U.V. (haut) et à fluorescence (bas)

1.5.7 Mesure de la teneur en ADN

Une courbe de calibration de la séquence d'ADN à quantifier est réalisée et un excès de la sonde SYBRGreen ou SYBRGold est ajouté à chacun des échantillons. L'intercalation d'une sonde avec une séquence d'ADN permet la lecture d'une intensité de fluorescence, où une zone de linéarité a pu être établie de 2.5 à 125 nM pour chacune des séquences d'ADN. En raison de la similarité des spectres d'émission de la doxorubicine et des sondes SYBRGreen/SYBRGold intercalés, toutes mesures de teneur d'ADN ont été réalisées en absence de doxorubicine.

1.6. Objectif de recherche

L'objectif de la recherche est de mettre au point une nouvelle méthode d'encapsulation de molécules actives à l'intérieur de liposomes. Nous voulons utiliser les aptamères et leur affinité

sélective pour une drogue afin d'augmenter l'encapsulation de molécules thérapeutiques, tout en conservant l'activité thérapeutique du principe actif. De plus, cette méthode ne doit pas être limitée par la nature du principe actif à encapsuler. L'objectif de ce travail est d'établir une preuve de concept avec une molécule modèle, la doxorubicine, et une série d'aptamères spécifiques à cette molécule.

1.6.1 Hypothèse de recherche

L'incorporation d'aptamère spécifique à la doxorubicine dans les liposomes permet d'obtenir une encapsulation active et l'utilisation d'aptamères d'affinité variable permet de moduler le profil de libération de ces liposomes.

1.6.2 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques sont :

- 1- Identifier des séquences d'aptamères pour la doxorubicine et déterminer leurs constantes d'affinité.
- 2- Développer une formulation liposomale pour chaque aptamère et optimiser l'encapsulation de la doxorubicine.
- 3- Étudier les profils de libération pour chaque formulation optimisée.
- 4- Évaluer l'efficacité cytotoxique *in vitro* des formulations retenues.

Chapitre 2 : Article pour le Journal of Controlled Release

Statut : En préparation

2.1 Résumé en français

Hypothèse : L'incorporation dans des liposomes d'aptamères spécifiques à un principe actif permet d'obtenir une encapsulation active du principe actif et de modifier les profils de libération sans diminuer l'efficacité thérapeutique.

Méthode : Une série d'aptamères d'affinité variable a été incorporée dans la préparation de liposomes cationiques. Ces lipoplexes ainsi formés ont été caractérisés en taille par diffusion dynamique de la lumière et par la mesure du potentiel de surface zêta. Ils ont été optimisés en matière de complexation maximale des aptamères, puis incubés avec la doxorubicine, choisie comme principe actif modèle. L'efficacité d'encapsulation de la doxorubicine a été comparée avec et sans aptamères, et contre la méthode d'encapsulation active offerte commercialement. Les meilleures formulations ont été étudiées sur le plan de la cinétique de libération et l'efficacité de celles-ci a été évaluée pour leur cytotoxicité sur des cellules cancéreuses de type HeLa.

Résultats : Les vecteurs cationiques optimisés permettent la complexation d'au moins 94% des aptamères. Trois des quatre aptamères ont démontré de l'encapsulation active de la doxorubicine, avec des efficacités d'encapsulation allant jusqu'à 85%. De ces trois formulations, différents profils de libération ont été obtenus, permettant tous une libération plus importante qu'une formulation ressemblant aux liposomes commerciaux de doxorubicine (Doxil®). L'efficacité des trois formulations testées sur les cellules HeLa s'est avérée équivalente ou supérieure au standard similaire du Doxil®

Mots-clés : liposome, aptamère, doxorubicine, efficacité d'encapsulation, libération contrôlée, encapsulation active, système de livraison

2.2. Article

Title: Improving encapsulation efficiency and drug release kinetic from liposome using aptamers

Authors: Kevin Plourde¹, Céline Dubath¹, Alexis Vallée-Bélisle², Jeanne Leblond¹

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Abstract:

Hypothesis : Incorporation in liposomes of specific aptamers for a drug allowed active encapsulation of that drug and allowed the modification of their drug release profiles, without negatively impacting their therapeutic efficacy.

Methods : A series of aptamers with various affinity were incorporated in the preparation of cationic liposomes. The resulting lipoplexes were characterized for their size by dynamic light scattering method and their surface potential were analysed by zeta potential measurement. Lipoplexes were optimized in terms of highest aptamer complexation and were incubated with doxorubicin, a model drug. The encapsulation efficiency of doxorubicin was compared with and without the presence of aptamers, and with the commercially available doxorubicin liposomes that uses active loading method. The best formulations were studied for their doxorubicin release kinetic, with the different aptamers, and they were tested for their cytotoxicity on HeLa cancer cells.

Results : Cationic liposomes were optimized to allow a minimum aptamer complexation of 94%. Three out of the four tested aptamers were able to demonstrate active loading capabilities, with up to 85% encapsulation efficiencies. Out of these three formulations, very different release profiles were found, all allowing more initial content release of the commercially-like available doxorubicin's liposomes (Doxil®). The efficacy of those three formulations on HeLa cancer cells demonstrated equivalent or higher cytotoxicity than the similar standard of Doxil®.

Keywords: liposome, aptamers, doxorubicin, encapsulation efficiency, controlled release, active loading, drug delivery

Introduction:

Liposomes are the first and only type of intravenous delivery system that yet have been able to reach the market, with now more than ten products available [1]. The second generation of these lipid vesicles offered a spatial control over the biodistribution of a drug. Indeed, liposomes in the nanometric scale, mostly less than 200 nm diameter and covered by a hydrophilic polyethylene glycol corona, generally enable to reduce systemic side effect, prolong blood circulation time and enhance drug accumulation at target site, such as inflammatory tissues [2, 3]. Sustained release is often referred as a major advantage of liposomes. However, achieving sustained release from nanoliposomes also contains many challenges because of the low drug loading and high burst effect observed, particularly compared to their micro-sized counterparts which present smaller surface area per volume ratio and longer diffusion distance [4]. Furthermore, achieving high encapsulation efficiencies in liposomes, thus minimizing the quantity of excipients administered, present both economical and therapeutic advantages. Several techniques have been used to improve the loading efficiency and drug release of liposomes. Passive loading, methods,

their simplest techniques, generally use spontaneous arrangement properties of amphiphilic lipids into aqueous mediums, but have unfortunately never resulted in high drug/lipid ratio [5-7]. The main reason is attributable to the poor drug solubility that tend to be lower and lower with the newest discoveries of new drug entities [8]. One of the answer to overcome this limitation is by the use of organic solvent to obtain higher drug solubility, but the method raises safety concerns for regulatory agencies due to solvent toxicities [9]. Alternatively, active loading methods generally consist in using a transmembrane pH gradient, to induce drug entrapment within the liposome core [10, 11]. Exemplified by Doxil, the first FDA approved liposomal anticancer drug, this "limited to weak base molecules" strategy enables high encapsulation efficiencies up to 99%, but very limited release of the drug [12, 13]. On the other hand, to address both these mentioned issues, increasing the cholesterol or high-transition temperature lipid content have demonstrated improved loading capacity and a better retention of the drug within the liposome [14]. Highly loaded gel membrane liposomes often result in low release of the drug, hardly reaching the therapeutic threshold [15] or requiring stimulus-triggered release [16], whereas fluid liquid-crystalline liposomes generally face early drug release and stability issues. In this perspective, there is an unmet need in developing new encapsulation strategies that achieve a high level of loading irrespective of the nature of the drug, and that could intrinsically fit the release kinetic profiles, to the specific therapeutic need [5, 17]

Aptamers are short DNA or RNA synthetic sequences that have been artificially selected to specifically bind non-DNA targets, ranging from cellular receptors to small molecules. They are easily identified by the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) method [18, 19]. Their versatility, as well as their high binding affinity, has been explored in many fields including drug and biomarker discovery, sensor design and molecular imaging [20,

21]. In nanotechnology, they have been mainly used as targeting ligand and in biosensing applications [22, 23], but few studies have exploited the binding properties of aptamers for controlling the release of a drug. Pioneer work of Mo *et al.* has reported the ATP-triggered release of doxorubicin using ATP-targeted aptamers [24-26], recently followed by Liao *et al* [27]. Aptamer-functionalized hydrogels have been programmed to release various and multiple therapeutics when needed through specific nucleic acid recognition and complementary hybridization process [28, 29]. Incorporated into hydrogels, they have been used as drug reservoirs to increase the amount of antibiotic delivered [30]. Another interesting feature of aptamers is that their affinity can be tuned by controlling their nucleotide sequence or length [31]. In this work, we propose to exploit drug-binding aptamers to improve encapsulation efficiency as well as to control drug release rate from liposomes.

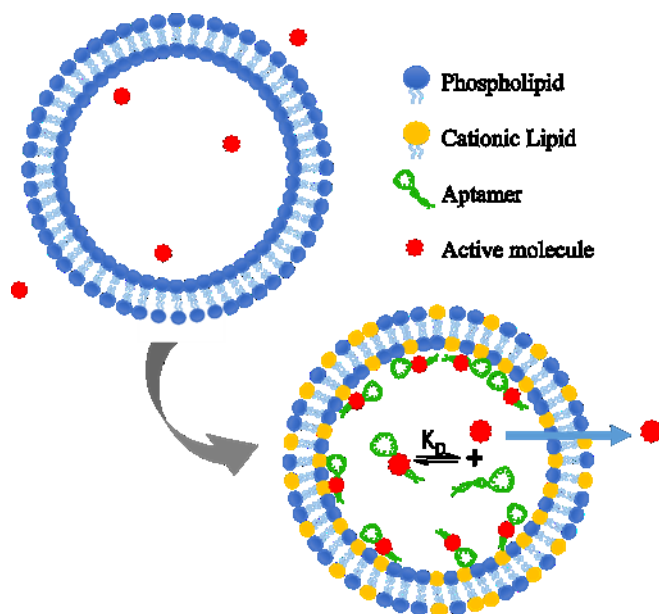


Figure 2.1: Graphical representation of the increased encapsulation capacity by the mean of aptamer incorporation into cationic liposomes, compared with common passive encapsulation methods. Liberation of the drug can occur once it's in its free form.

Material and methods:

2.1 Chemicals and material

All lipids were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). DNA aptamers and control sequences were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON) custom oligonucleotide synthesis service. Doxorubicin hydrochloride was purchased from Sigma-Aldrich. EMEM (ATCC[®] 30-2003[™]), PBS and TrypLE Express was purchased from GE Healthcare (Baie-d'Urfé, QC). Every sterile furniture were purchased from Sarstedt (Montreal, QC). All reagents, solvents and salts were either purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON) or Fisher Scientific (Whitby, ON). The HeLa cells (ATCC[®] CCL-2[™]) were kindly provided by Pr Marc Servant (University of Montreal).

2.2 Determination of aptamer's affinity

Aptamer association to doxorubicin was monitored by the quenching of doxorubicin fluorescence. DNA aptamer solution (0.1 mM in 5% dextrose and 5 mM NaCl) was annealed 5 minutes at 95 °C, vortexed for 1 minute and left to cool at room temperature. Doxorubicin sample concentration was kept constant in all samples (100 nM in 5% dextrose and 5 mM NaCl). Fluorescence emission spectrum (λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 520-700 nm) was recorded at 37 °C on a Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer (Agilent Technologies, Mississauga, ON). Increasing amounts of DNA from 0.001 to 25 μM final concentrations, with addition volume less than 20% final volume, were added and equilibrated 1 minute at 37 °C. Emission scans were taken at a high resolution of 100 nm/min and data were smoothed with a 10-neighbors Savitzky-Golay factor. The area under curve of the full scan was considered for the analysis. The dissociation constant (K_D) was calculated using GraphPad Prism 6 with the equation 1. $Y=M_1 +$

$(M_2 * X) / (X + M_3)$, where M_1 is the initial value of Y , M_2 is its magnitude, M_3 is the K_D and X is the concentration of aptamer. In the definition of Poly-Doxapt concentrations, one strand A complexed with one strand A' was considered as one aptamer molecule (dsDNA, with two binding sites).

2.3 Preparation and characterisation of liposomes

All liposome formulations, except Doxil-Like were prepared by conventional hydration method (Bangham method, summarized in reference [32]). Briefly, stock solutions of lipids in chloroform (20 and 40 mg/mL) were stored under argon at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ before use. DOTAP, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ solutions were combined in a 10-mL round bottom flask, for the preparation of cationic liposome, in a 50/48/2 molar ratio to get 30 μmol total lipid amount. The solvent was evaporated under reduced pressure at $50\text{ }^\circ\text{C}$. The dried lipid film was hydrated 30 minutes at 60 rpm with 1 mL of 5% dextrose and 5 mM NaCl. For the “No cationic lipid” formulation, the lipid composition varied with DOTAP being replaced by POPC, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ had slightly different proportions. The three lipids were put in a 55/40/5 molar ratio respectively. All liposomes were extruded through 400 and 200 nm polycarbonate membranes using a LiposoFast manual extruder (Avestin Inc., Ottawa, ON, Canada) at room temperature. Doxil-Like liposomes were prepared following the same procedure with minor modifications. Lipid composition was 55% DSPC, 40% cholesterol and 5% DSPE-PEG₂₀₀₀ (10 μmol total lipid amount). The dried lipid film was hydrated 30 minutes at $65\text{ }^\circ\text{C}$ (60 rpm) with 1 mL of a 120 mM ammonium sulfate salt solution. Extrusion was performed at controlled temperature to ensure the fluidity of the lipids ($65\text{ }^\circ\text{C}$). Finally, Doxil-Like liposomes were purified on a 1 x 20 cm Sephadex G-50 (Medium) column equilibrated in a pH 7.4 buffer (5 mM

Tris and 145 mM NaCl) to exchange external medium. All liposome preparations (total final volume ~ 2 mL) were stored in darkness at 4°C in 4 mL glass vials.

Liposome hydrodynamic diameter and ζ -potential were measured at 25°C using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK) using the automatic algorithm mode. Size measurements reported in intensity were performed in a pH 7.4 buffer (5 mM Tris and 145 mM NaCl). ζ -potential measurements were done using the Smoluchowski model by diluting liposome sample in MiliQ purified water, using theoretically 0.1 mM total lipid concentration in the cuvette. Experiments were run in triplicate or more.

2.4 Preparation of aptamer-liposomes complexes

Aptamer spiking solution (5% dextrose and 5 mM NaCl) at the right varying concentration was annealed (see section 2.2) and added dropwise under stirring into 2.5 mM liposomes solution (1:1 v/v) at predefined N/P ratios (0.5 to 15). N is the number of amines (molar quantity of DOTAP) and P is the number of phosphorous groups of aptamers (number of nucleotides). The lipoplexes were incubated in a VorTemp 56 (Labnet, Edison, NJ) for 25 minutes, at 1000 rpm and 30 °C. Lipoplexes (total final volume ~ 1 mL) were immediately used after their incubation. Full complexation was aimed and no further purification was performed.

2.5 Encapsulation of aptamers

Aptamer concentration (1 to 150 nM) was monitored using fluorescent intercalating probes SYBRGold (for Apt-Ctrl 2) or SYBRGreen (for all other aptamers). An aliquot of lipoplexes was diluted to 300 μ L and centrifuged 60 minutes at 18500 g. The supernatant was diluted to fit in the linear range (1 to 150 nM) and SYBRGreen 100 X or SYBRGold for Apt-Ctrl 2 (5% total volume) was added. 150 μ L of each sample was added to a 96-well plate (white with transparent

bottom) and analysed in a Safire microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) (λ_{ex} 496 nm, λ_{em} 523 nm for SYBRGreen and SYBRGold). A calibration curve was determined for each DNA sequence. The amount of free DNA was revealed and the encapsulation efficiency was obtained with the equation 2.

$$\text{Equation 2: } \frac{(\text{Conc. free DNA}) - (\text{Conc. total})}{(\text{Conc. total})} * 100\%$$

In addition, the amount of encapsulated aptamers within the lipoplexes was quantified according to a fluorescent method. A 2 mL solution of 1X SYBRGreen (or SYBRGold) in 5% dextrose and 5 mM NaCl was placed in a 3 mL cuvette. The fluorescence kinetic of this solution was monitored on a F-2710 Spectrophotometer (Hitachi High Technologies America Inc., Schaumburg, IL, USA) at wavelengths of 496 (λ_{ex}), 523 (λ_{em}) nm, under weak agitation (t=0 seconds). At t=30 seconds, lipoplexes (corresponding to 100 nM DNA final concentration) were added in the cuvette. At t=100 seconds, 10 μ L of Triton X100 10% (v/v) was added to release all liposome content. Final fluorescence was recorded at t=200 seconds. The percentage of aptamer encapsulation was calculated using the equation 3, where the initial intensity is the average fluorescence intensity between time points 30 and 100 seconds and the final intensity is the average fluorescence intensity between time points 100 and 200 seconds.

$$\text{Equation 3: } 100 - \left(\frac{\text{Initial intensity}}{\text{Final intensity}} \right) * 100\%$$

2.6 Preparation of Dox-loaded lipoplexes

Doxorubicin stock solutions were prepared in Tris/NaCl buffer (5 mM/145 mM, pH 7.4). Equal volumes of lipoplexes and doxorubicin solutions were combined at various doxorubicin/aptamer molar ratios (1:1 to 6:1). The mixture was incubated for 25 minutes, at 1000 rpm and room temperature, and stored in the fridge in the dark before use.

As for Doxil-like liposomes, doxorubicin stock solution was added to pH-gradient liposomes (1:1 v/v) to obtain drug/lipid ratio of 0.1 and the mixture was incubated at 50 °C, for 25 minutes and 1000 rpm horizontal shaking. No further purification method were applied for subsequent testing.

2.7 Encapsulation of doxorubicin

Dox-loaded lipoplexes were centrifuged 60 minutes at 18500 g and supernatant was collected. Free doxorubicin was quantified by fluorescence using Safire microplate reader (λ_{ex} 485 nm; λ_{em} 585 nm). As a control, it was checked if aptamers were complexing doxorubicin in the supernatant. To do so, the fluorescence of doxorubicin was monitored before and after heating at 75 °C, to force denaturation of DNA strands. It was found that no difference in fluorescence intensity of doxorubicin occurred, which suggest that no aptamer were complexing doxorubicin in the supernatant. Otherwise, the presence of aptamers in the supernatant would have resulted in doxorubicin underestimation by quenching its fluorescence intensity.

2.8 Stability of Dox-loaded lipoplexes

Lipoplexes, containing the Doxapt-30, was diluted 3:1 in PBS pH 7.4. The solution was kept at 37 °C and the hydrodynamic diameter was measured over a period of 7 days. In parallel, Dox-loaded lipoplexes composed of Doxapt-30 were stored at 4 °C and encapsulation of doxorubicin was assayed after 0, 24, 48 and 96 hours.

2.9 Release kinetics of Dox-loaded lipoplexes

Each formulation of Dox-loaded lipoplexes was prepared in triplicate. 1 mL of Dox-loaded lipoplexes (10-15 μM of doxorubicin) was added to dialysis bags (6-8 kDa MWCO, Spectra/Por, Spectrum Laboratories, Inc) and immersed into 100 mL of PBS pH 7.4. The whole set-up was

moderately stirred at 37 °C and protected from light. Samples of 0.5 mL samples were withdrawn from the external medium at predetermined time points over 48 hours and stored at 4°C before analyzed by UPLC-Fluorescence. A new calibration curve was prepared fresh from the initial doxorubicin solution (used to prepare liposomes) for each experiment. Briefly, the UPLC system (Shimadzu-Prominence UFLC, Shimadzu USA Manufacturing inc. Mandel) consisted of a LC-20AD binary pump, a DGU-20A5 solvent degasser, a SIL-20AC HT refrigerated, a CT0-20AC column oven and a RF-20AXS fluorescence detector. Mobile phase A: water/0.1% formic acid. Mobile phase B: acetonitrile. Flow rate: 0.7 mL/min. Gradient: A decreased linearly from 90 to 60% between 0.25 to 5.5 min; followed by recovery of 90% A in 0.2 min, then equilibration for 4.5 minutes at 90% A. Total run time 9 minutes. Injection volume: 50 µL. The column (Column Poroshell 120 EC-C18, 3.0 x 30 mm, 2.7 micron equipped with a pre-column Agilent EC-C18, 3.0 x 5 mm, 2.7 micron) was kept at 30 °C and retention time of doxorubicin was of 5.4 min. Detection of doxorubicin was made at excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 585 nm. The kinetics curves were also fitted using a double exponential function and the rate constants for drug release and drug degradation were obtained from the best fit.

2.10 Cell viability assay

HeLa cells were initially cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC® 30-2003™) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 100 units/mL Penicillin-streptomycin (Life Technologies, Burlington, ON). Cells were incubated at 37 °C under water-saturated atmosphere enhanced with 5 % CO₂. To conduct an experiment, at 90% confluence cells were washed with PBS (without cations) and suspended using TrypLE Express. Cells were rinsed and re-suspended in new culture medium, without the presence of antibiotic (No ATB).

Cell concentration was determined using a cell counter (Countess II Automated Cell counter, Thermo Scientific, Burlington, ON), with Trypan blue staining 0.4 % (Life Technologies, Burlington, ON). Cells were seeded in a 96-well plate to obtain a density of 5×10^3 cells per well. Post 24 hours of incubation at 37 °C and 5 % CO₂, cells were rinsed with Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS 1X) and 100 µL of fresh culture medium (No ATB) and 50 µL of tested formulation were added to each well. Final concentrations of doxorubicin ranged from 0.01 to 25 µM. In each plate, the blank formulation (without doxorubicin) was tested for its cytotoxicity at its highest concentration used. After 48 h incubation, the formulation and culture medium were removed, the cells were rinsed with DPBS 1X and 150 µL of new culture medium and is added followed by the addition in each well of 15 µL of resazurin 440 µM in DPBS 1X. The cells were incubated an additional 3 hours at 37 °C and removed from the incubator 20 minutes prior to their absorbance analysis to equilibrate solutions at room temperature. The plate was analyzed on UV-Vis spectrophotometer, at an absorbance of 570 nm with a subtracted reference wavelength of 600 nm. IC₅₀ was determined using GraphPad Prism 6 and a normalized dose-response inhibition curve fitting. Every curve were made in triplicate or more.

Results

3.1 Aptamer design

In this study, we used aptamers as the driving force to actively load drug into the liposomes. Doxorubicin was selected as a model drug for several reasons. First, it represents a good example of successful active loading of drug by ammonium sulphate gradient into liposomes. Second, a doxorubicin DNA-binding aptamer has been already reported and validated in the literature [33-35]. Third, free or bound doxorubicin fraction can be easily measured through fluorescence

measurements (Figure 2) [36]. In this study, we tested several doxorubicin aptamers with varying binding properties, since we hypothesized that tuning the affinity of the aptamers should impact the release rate of the drug from liposomes (Figure 3). The Doxapt-28 sequence corresponds to the previously reported sequence [33, 35]. Doxapt-30 possesses an extra pair of base that should stabilize the double strand section and increase the affinity of the aptamer for its ligand. Coop-Doxapt, a two-binding-site aptamer reported by Simon *et al.*, is known to display cooperative binding behaviour [34]. Poly-Doxapt, an innovative polymer-like aptamer [37], is expected to improve aptamers packing into the liposome. Finally, two sequences were used as negative controls: Apta-Ctrl-1 is a 21-nucleotide aptamer designed for tobramycin, which presents a hairpin structure, but no specificity for doxorubicin and Apta-Ctrl-2 is a 30mer of poly-thymine without any secondary structure.

3.2 Aptamer's affinity for doxorubicin

Doxorubicin fluorescence is quenched once intercalated into a DNA, which allows monitoring its interaction with different aptamer structures [38]. Affinity constants (K_D) were calculated by fitting the fluorescence intensity of doxorubicin to increasing concentrations of aptamers in the medium used for liposome formulation (dextrose 5%, 5 mM NaCl) (Figure 2 and Figure 3 for all K_D values). Doxapt-28 exhibited a K_D in agreement with previous reports, despite a change of medium [39]. As expected, the more stable Doxapt-30 exhibited a slightly higher affinity for doxorubicin than its parent Doxapt-28, due to the extra base pair stabilization (334 ± 29 nM and 380 ± 45 nM respectively). Both Coop-Doxapt and Poly-Doxapt exhibited a higher affinity for doxorubicin (160 ± 36 nM and 68 ± 6 nM respectively), with the Coop-Doxapt displaying in addition higher cooperativity for doxorubicin binding. Finally, Apta-Ctrl-1 displayed drastically

reduced affinity for doxorubicin ($K_D > 1000$ nM) while Apta-Ctrl-2 did not bind doxorubicin at all. These results confirmed the specificity of the aptamer sequences for its drug and suggested that the binding affinity of these aptamers are much higher than the natural affinity of doxorubicin for random single or double strand DNA [33]. Overall, we thus prepared a series of aptamers exhibiting various dissociation constants for doxorubicin, ranging from 68 to 380 nM.

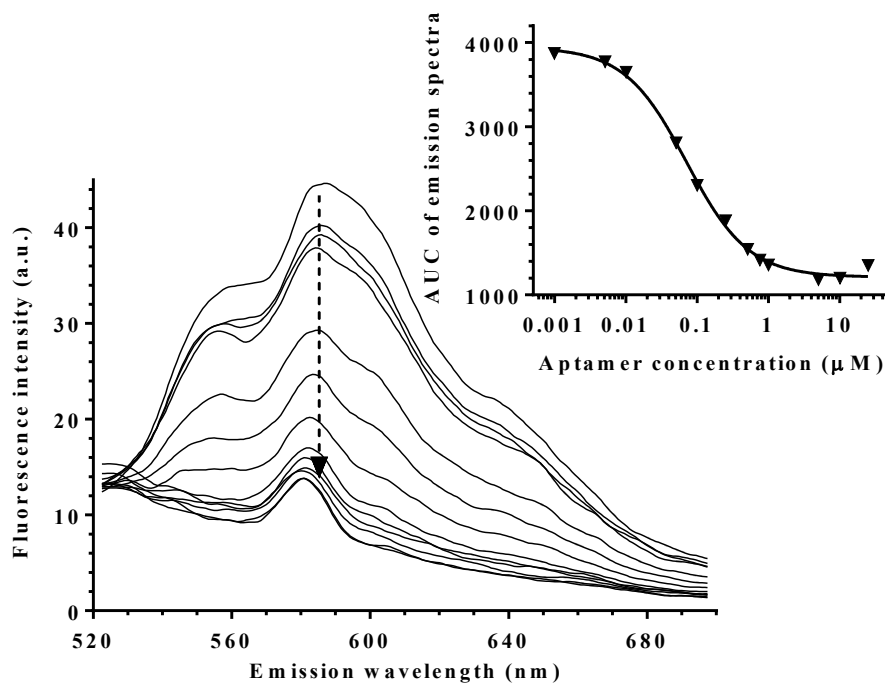
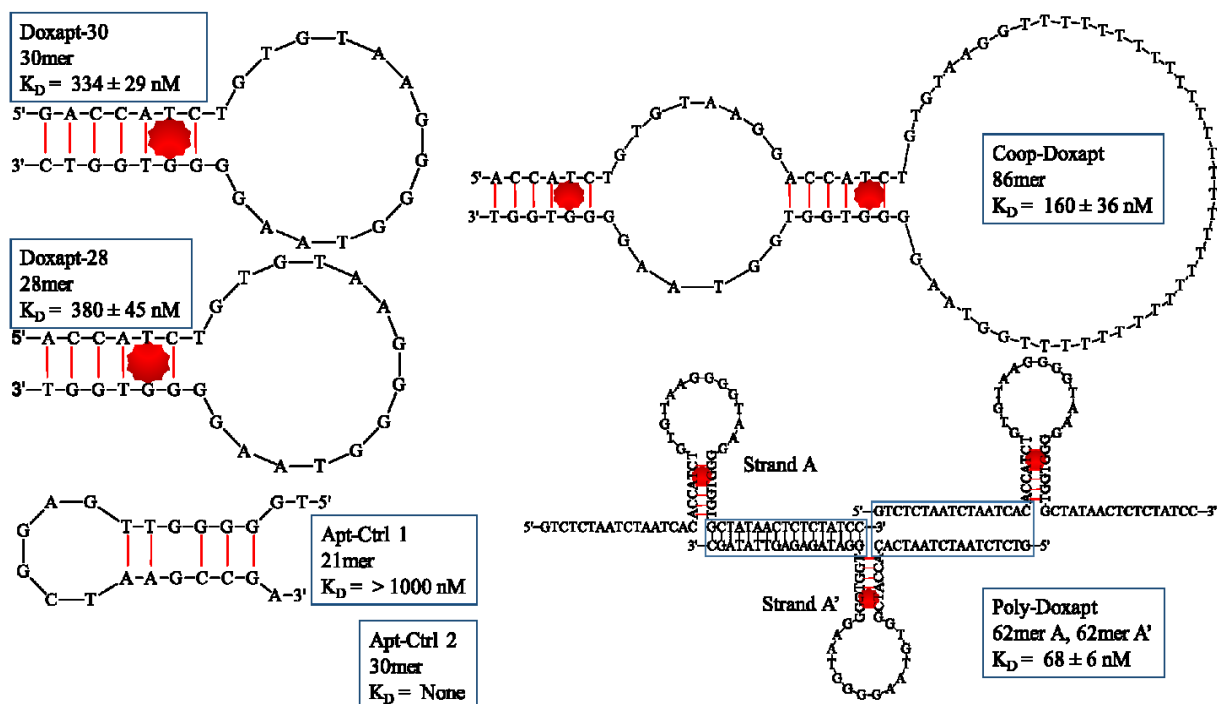


Figure 2.2: Smoothed emission spectra of doxorubicin with increasing concentration of Poly-Doxapt (from top to bottom). Each spectra represent a point on the top-right graphic, where the K_D is calculated.



5'-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-3'

Figure 2.3: Structure and affinity calculated of all DNA/aptamer sequences tested in this experiment. The red dot over double strand DNA represent a suggested “binding pocket” for the molecule doxorubicin. There are four sequences that were designed to have affinity for doxorubicin and two various types of control that have little or no affinity.

3.3 Lipoplex preparation and characterization

Aptamers were incorporated into liposomes thanks to electrostatic interactions. Liposome composition was inspired by the widely reported lipid formulations used in gene delivery [40]. Cationic liposomes were prepared with 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), cholesterol and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG) in 50/48/2 molar proportions, and were subsequently incubated with increasing quantities of aptamers. Similarly to gene-based lipid formulations, the physico-chemical properties of lipoplexes rely on the charge ratio N/P (amino group of DOTAP vs. phosphate group of nucleotide). Charge ratios below 1 or far above 1 resulted in highly charged

particles, with good colloidal stability and low polydispersity, whereas complexes close to neutrality exhibited aggregation (Figure 4).

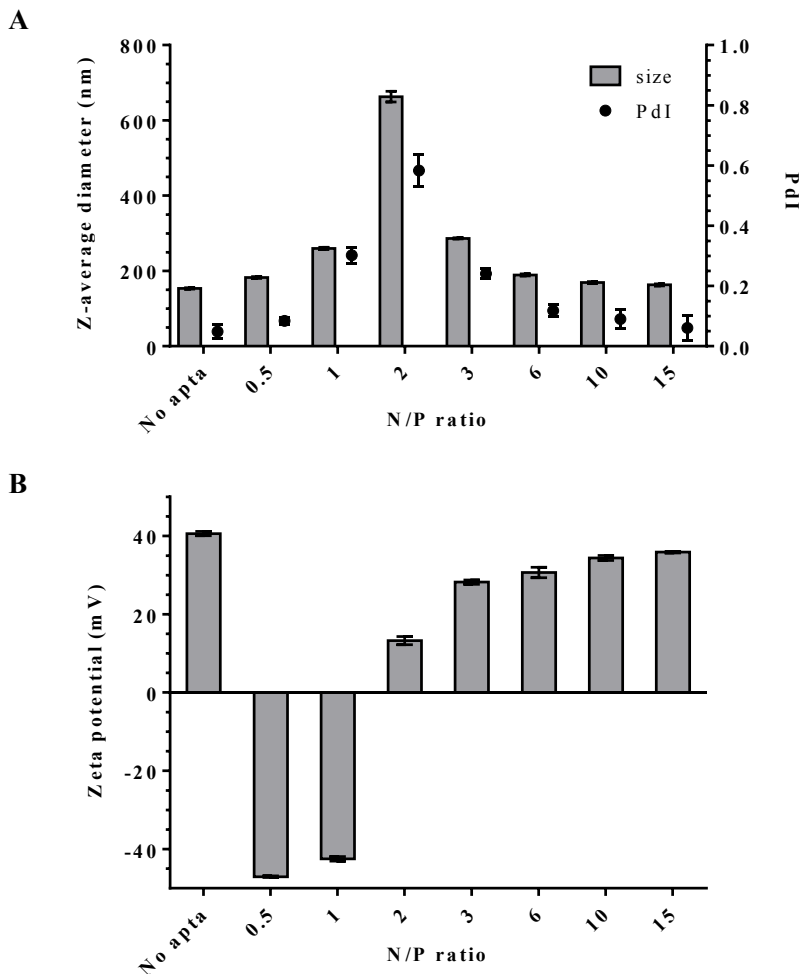


Figure 2.4: Measurements of the average size (A), polydispersity index (A) and zeta potential (B) of the cationic liposomes used to encapsulate DNA sequences. This result is with liposomes mixed with Doxapt-30 at different N/P charge ratios ($n=3$).

Encapsulation efficiency, measured using a fluorescent probe able to detect unbound aptamer, also varied according to the charge ratio and the sequence of aptamers (Figure 5). As expected, increasing the positive charges improved DNA complexation until full encapsulation. For each aptamer, N/P ratio was optimized as the lowest ratio leading to stable lipoplexes and complete encapsulation of aptamer (Table 1). Aptamers presenting one binding site (Doxapt-28 and

Doxapt-30) required $N/P = 3$ to be fully encapsulated into liposomes, whereas Coop-Doxapt and Poly-Doxapt required $N/P \geq 2$ to achieve complete DNA encapsulation (Figure 5).

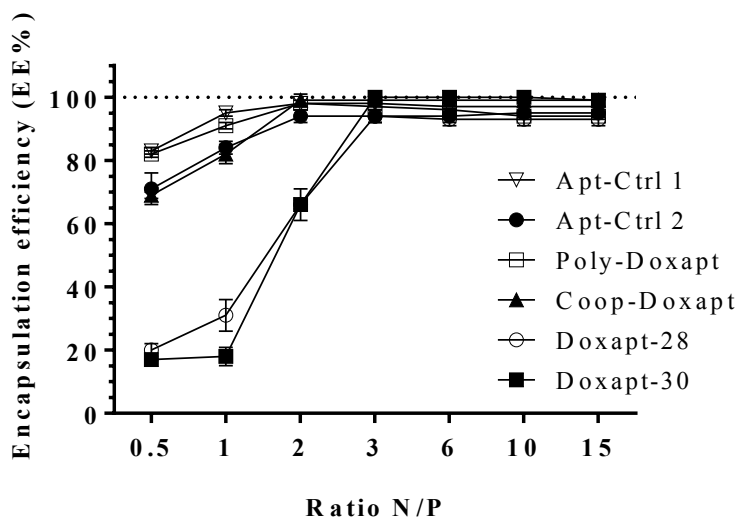


Figure 2.5: Encapsulation efficiency of all DNA sequences with the cationic liposome ($n=3$).

These results were corroborated by direct measurement of encapsulated DNA after lipoplex rupture (data not shown). In all cases, lipoplexes exhibited diameters ranging from 197 to 312 nm with low polydispersity indexes (< 0.3), and above 94% encapsulation efficiency of aptamers (Table 1). Addition of doxorubicin to lipoplexes did not significantly affect the size, the polydispersity or the stability of the formulations (data not shown).

3.4 Encapsulation of doxorubicin

Lipoplexes loaded with aptamers were further incubated with doxorubicin at increasing doxorubicin/aptamer ratios, and doxorubicin encapsulation was quantified by fluorescence of free drug after centrifugation. A representative behaviour is reported on Figure 6 with Doxapt-30. Firstly, encapsulation efficiency (EE %) reached ≥ 85 % doxorubicin for up to 2 drug molecules per aptamers, close to the Doxil-Like model. This high encapsulation efficiency,

higher than approximately 20% EE obtained with conventional passive methods, demonstrated the active loading of the drug thanks to the aptamers. Passive encapsulation was estimated to be

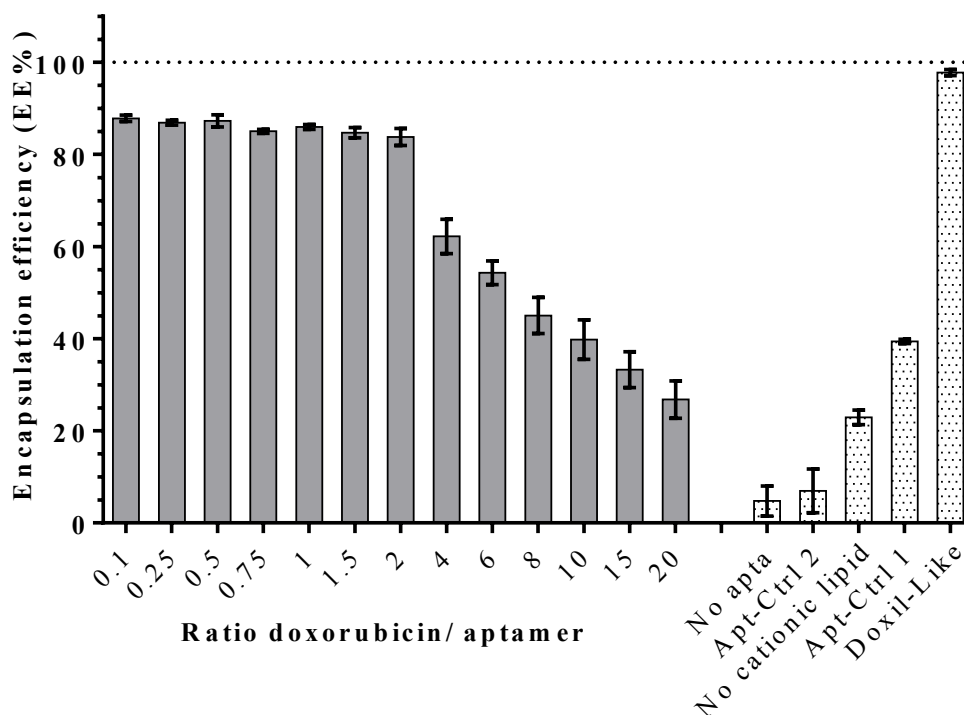


Figure 2.6: Encapsulation efficiencies of doxorubicin inside Doxapt-30 lipoplexes at different ratios of doxorubicin/aptamer. The “No apta” control consisted of the cationic liposome without the addition of any DNA sequences. The Apt-Ctrl 1 and 2 consist of the addition of DNA control sequences as defined in figure 3. The “No-cationic lipid” is a liposomal formulation of 55% POPC, 40% of cholesterol and 5% of DSPE-PEG2000 produced by the “Bangham method”, which represents a classic formulation for passive encapsulation. Doxorubicin was added in a drug-to-lipid ratio of 0.086 for this control liposome.

from 5 to 25% using cationic or plain liposomes, respectively. Moreover, the specificity was confirmed by the control aptamers: Apt-Ctrl 2 (Poly-thymine) was not able to drag doxorubicin within the liposome complex whereas Apt-Ctrl 1, presenting a hairpin structure, displayed 45% reduction in encapsulation efficiency (the binding is probably due to non-specific interactions) compared to the Doxapt-30. Secondly, the lipoplexes of Doxapt-30 enabled to load up to 2 doxorubicin molecules per aptamer, although this sequence is designed to have one binding site.

Above this doxorubicin/aptamer ratio, additional drug was not encapsulated, leading to a decrease of EE %. Both trends were also observed for other aptamer sequences (Figure 7), except Doxapt-28. This latter formulation was not able to encapsulate more than 45 % doxorubicin, albeit Doxapt-28 demonstrated a similar affinity to Doxapt-30 for doxorubicin. In contrast, high loading capacities were determined for Coop-Doxapt and Poly-Doxapt, remaining higher than 80 % EE up to 6 equivalents of drug to aptamer. Active loading was thus reached for three aptamer sequences, which were further evaluated in release kinetics. A summary of the formulation selected for kinetics and efficacy assays are presented on Table 1. For each aptamer, the selected formulation demonstrated high encapsulation of aptamer as well as doxorubicin, with a minimum amount of excipients. Doxorubicin amount was fixed as twice the number of binding sites, to maximise drug loading for both single and double-binding sites aptamers.

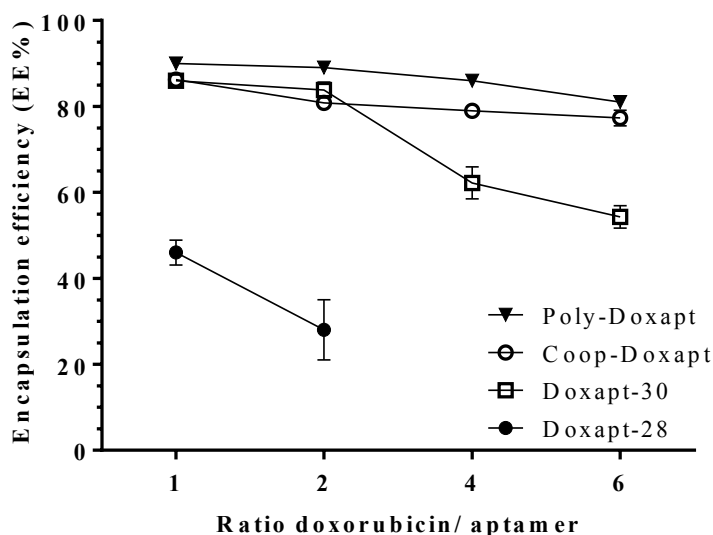


Figure 2.7: Encapsulation efficiency of doxorubicin inside cationic liposomes that encapsulate different aptamers ($n=3$). For each aptamer-liposome lipoplexe, the N/P ratio was chosen and fixed according to previously determined optimised formulations. Poly-Doxapt and Coop-Doxapt were fixed at N/P ratio of 2, Doxapt-28 and Doxapt-30 were fixed at a N/P ratio of 3.

Table 2.1: Summary characteristics of optimized formulation in term of N/P ratio and doxorubicin/ aptamer ratio that provided highest encapsulation efficiencies.

Formulation	Doxapt-28	Doxapt-30	Coop-Doxapt	Poly-Doxapt	No Apta	Doxil-like	Apt-Ctrl 1	Apt-Ctrl 2
Ratio N/P	3	3	2	2	N/A	N/A	3	3
EE% Aptamers	94 ± 2%	100 ± 0%	99 ± 2%	98 ± 1%	N/A	N/A	94 ± 1%	99 ± 0%
Ratio Doxorubicin/ Aptamer	2	2	4	4	N/A	N/A	2	2
D/L ratio	0.012	0.011	0.012	0.008	0.011	0.100	0.016	0.011
EE% Doxorubicin	28 ± 7%	84 ± 2%	73 ± 3%	86 ± 1%	5 ± 3%	98 ± 1%	39 ± 0%	7 ± 5%
Z-Average Diameter (nm)	197 ± 2	236 ± 6	254 ± 2	312 ± 4	154 ± 2	181 ± 3	285 ± 5	204 ± 2
PdI	0.052	0.095	0.094	0.198	0.074	0.094	0.075	0.068

3.5 Release kinetics of Dox-encapsulating liposomes

Part of our hypothesis was to tune the release rate of doxorubicin using various aptamer designs. Therefore, the release kinetics of doxorubicin from the aptamers-loaded liposomes were examined by a dialysis method (Figure 8). In agreement with literature, Doxil-Like particles exhibited very low release efficiency (less than 15%), possibly explained by the low solubility of the crystals precipitated in the core of liposomes and the poorly permeable high-transition-temperature-lipid bilayer [41, 42]. Interestingly, quite different profiles were obtained for the series of lipoplexes. Coop-Doxapt lipoplexes provided the fastest release with more than 80% release in 8 hours. Poly-Doxapt presented a slower initial release, reaching 60% release at 12h. Doxapt-30 demonstrated the lowest release, achieving 30% release after 8 hours, which is still twice the Doxil-Like performance in terms of initial cargo release. However, the half-life of release was calculated for all formulations and it was found that the three aptamer formulations offered a more sustained release than Doxil-Like liposomes (Figure 9). In fact, the three dox-loaded lipoplexes had calculated half-time release 5.7 to 8.5-fold higher than Doxil-like. This can be possibly explained by the fact that few of the doxorubicin was released rapidly from Doxil-

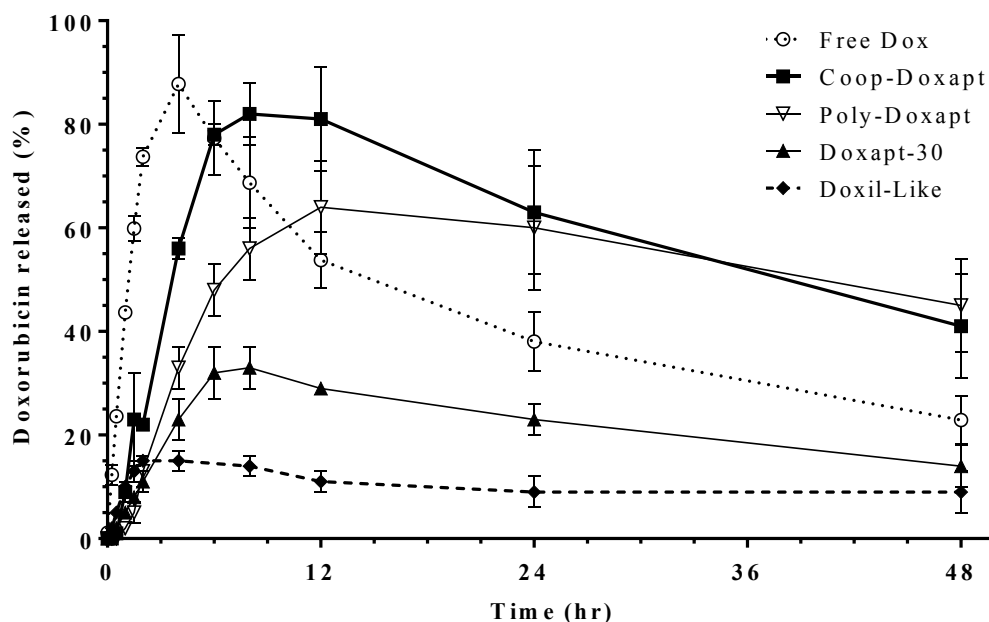


Figure 2.8: Release of doxorubicin from loaded liposomes, incorporating different aptamer sequences. The doxorubicin % released represents the percentage of theoretical doxorubicin's concentration in the release media. Free Dox is used to see the limiting impact of the dialysis bag and the degradation of the active molecule. Doxil-Like liposomes were used as a known non-liberating liposome with its pH/ion gradient active encapsulation method.

like liposomes due to a burst effect and that the release stopped right after, compared to the other formulations that were able to release their cargo over a longer period. Overall, these experiments showed that aptamers loaded-liposomes exhibited slower release rate and higher release efficiency of doxorubicin than the Doxil-Like formulation. This might be due to the presence of doxorubicin that can get slowly dissociated from their aptamer into their free form, favouring the release of the amphipathic drug by diffusion through the lipid membrane, as opposed to the precipitated doxorubicin in sulphate ammonium gradient liposomes.

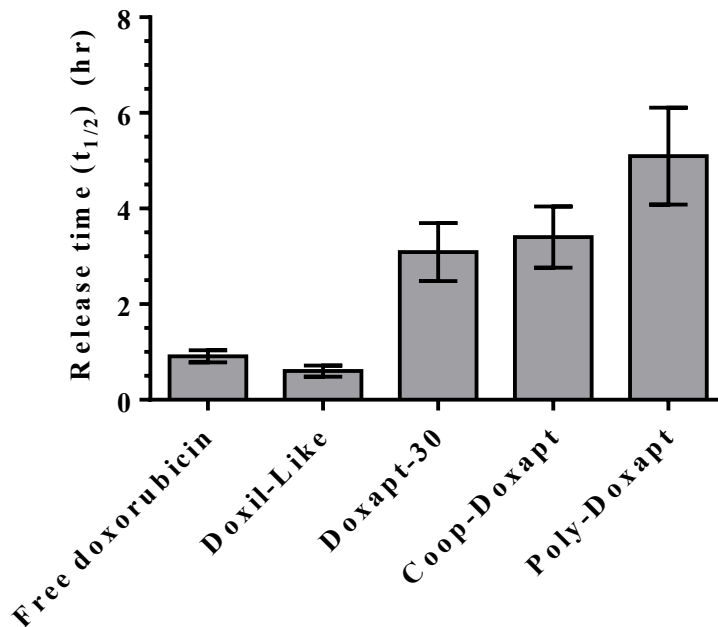


Figure 2.9: Release speed of doxorubicin from different formulations expressed in half-life constant (in hour). Values extracted from double exponential fit, taking into consideration doxorubicin's degradation over time.

3.6 Cell viability assay

Finally, the influence of aptamer complexation on the drug therapeutic efficacy was evaluated *in vitro*. Cytotoxicity assays were conducted on HeLa cells on the three selected aptamer formulations, with and without the addition of doxorubicin, to determine the vector's influence. No significant toxicity was observed for the three lipoplexes formulations at their highest concentration (Table 2), demonstrating the good biocompatibility of these lipoplexes, even higher than Doxil-Like formulation [43]. Free doxorubicin presented an IC_{50} of $1.5 \pm 0.6 \mu M$, in agreement with the literature [44]. Doxil-like formulation exhibited significantly higher values of IC_{50} , up to $38 \mu M$, because of the low immediate bioavailability of active molecules from these liposomes. Poly-Doxapt exhibited similar cytotoxicity to Doxil-like formulations, even though

its release efficiency was higher. However its release rate was the slowest obtained, which could explain its higher IC₅₀ value obtained. Conversely, the lipoplexes of Doxapt-30 demonstrated high cytotoxicity (4-fold improved as compared to Doxil-like) and Coop-Doxapt even restored the IC₅₀ of free doxorubicin. Latter results suggested the efficacy was due to the highest release efficiency, since Doxapt-30 and Coop-Doxapt released partial and nearly complete doxorubicin, respectively (Figure 8), at a nearly identical release speed. Overall, these results showed that aptamer binding did not prevent therapeutic efficacy of the drug, and could even improve its availability as compared to ammonium sulphate gradient liposomes.

Table 2.2: IC₅₀ values of doxorubicin loaded liposome on HeLa cells and cytotoxicity of blank aptamer-liposomes.

Formulation	Free Doxorubicin	Doxil-like	Doxapt-30	Coop-Doxapt	Poly-Doxapt
IC ₅₀ (μM)	1.5 ± 0.6	38.4 ± 9.2	9.1 ± 2.3	1.6 ± 0.6	36.5 ± 11.2
Blank vector* Cell viability	95.7 ± 7.9 %	62.8 ± 4.3 %	85.6 ± 12.6 %	96.0 ± 6.0 %	103.5 ± 4.2 %

**Only the highest concentration of blank liposome used is tested. All the excipients are the same, except there is no doxorubicin. For free doxorubicin, only the buffer was added.*

Discussion

Loading of actives into liposomes is a critical step of the liposome formulation, since it determines the amount of excipient required, as well as the factors governing the release rate of the drug [5]. In the passive loading method, the drug dissolved in the aqueous phase equilibrates with the liposome's internal medium, which limits its encapsulation efficiency theoretically with equilibrium of concentration between intra and extra liposome media. Higher scores can be achieved using a gradient method, such as pH or ions (ammonium sulphate, hydrogenophosphate, or metallic ion such as copper or manganese salts [6]. In this strategy, the

drug is converted to an ionic/salt form, which is unable to diffuse through the lipid membrane, thus retained into the liposome core. Unfortunately, this strategy also limits the release rate of the drug, and often requires an additional trigger. In the case of Doxil, the release of doxorubicin is likely triggered by a reverse gradient of ammonia at the tumor site [42]. The main advantage of this latter formulation is to maintain the drug efficacy while drastically limiting the drug cardiotoxicity, by preventing the early release of doxorubicin into the blood compartment [41]. But in some cases, such as cisplatin liposomes, the active loading method has considerably limited the availability of the drug and its efficacy [41]. In addition, active loading strategy involves only small permeable molecules presenting a basic or acidic protonable structure, a high difference between partition coefficient in water and lipid and does not apply to larger molecules such as proteins and peptides.

Our hypothesis is based on the affinity of the aptamer for its target. This approach presents several advantages *a priori*: (i) it can be applied to almost any molecules, including biomacromolecules, since aptamers have been initially developed for protein binding; or lipophilic drugs, which suffer from burst release when encapsulated into liposomes (ii) the binding does not change the protonation of the drug, therefore maintaining its diffusion and release ability, (iii) tuning the affinity of the aptamer to the drug could improve the control over the release rate. In this work, we demonstrated that inclusion of aptamers in the formulation indeed enabled high encapsulation efficiency, similar to the active loading scores, as well as impacted the release rate of the drug and its efficacy.

However, this relationship is worth a closer look. We expected that a high affinity constant would relate to high encapsulation efficiency and low release kinetics. However, our results

demonstrated this hypothesis is too simplistic. Among the five aptamer structures, Doxapt-28, presenting a similar affinity than Doxapt-30, was not able to encapsulate as much doxorubicin. Adding a base pair to the hairpin probably allowed a higher stabilisation of the complex, which has already been reported. All other structures cannot be discriminated according to their affinity constant, since the high concentration of the drug (more than 10 times K_D) ensures saturation of aptamers. This high concentration might also have revealed secondary sites of binding on aptamers, which resulted in the binding of more than 2 doxorubicin molecules for Doxapt-30 and more than 6 molecules for Poly-Doxapt and Coop-Doxapt (Figure 7). This phenomenon was not detected upon affinity determination up to 100 μ M (Figure 2). It should be noted that, even in the optimal formulations (Table 1), the drug/lipid ratio was still 10 times lower than Doxil-like formulations.

However, the formulations can be further discriminated according to their release properties. Indeed, the three selected formulations offer a large range of release kinetics, all higher than the Doxil-like formulation, but sustained as compared to the free drug (Figure 8). Here again, affinity was not predictive of release ability, since the aptamer presenting the highest affinity (Poly-Doxapt) resulted in the intermediate release rate and the aptamer with lowest affinity (Doxapt-30) resulted in the slowest release (Figure 8). Nevertheless, the release was higher than Doxil-like liposomes, which suggest that the drug molecule is still able to diffuse even if complexed with aptamer.

Finally, toxicity profiles appear related to the release kinetics, since low IC_{50} , related to free doxorubicin, is also observed for Coop-Doxapt which exhibits the highest release efficiency. Accordingly, Doxapt-30 released 30% of the total doxorubicin and exhibited a 6 times higher

IC50. However the high IC50 of Poly-Doxapt, similar to Doxil-Like, despite its release efficiency being higher than Doxapt-30, could possibly be explained either by the slowest release rate that was obtained or by the loss of doxorubicin's therapeutic efficacy. It was also checked that no aptamer was released from liposomes, by confirming the inability of the aptamers to cross the dialysis bag and by confirming the complexation % of aptamers after 12 hours incubation of lipoplexes at 37 degrees under agitation, so that the drug could not possibly be still complexed to aptamers when quantification of released doxorubicin was made.

Conclusion

In conclusion, we developed a new strategy of loading, using aptamers to drive drugs into liposomes. Using doxorubicin as a model drug, we demonstrated that this strategy achieved active loading of the drug, up to 85% of encapsulation efficiency. In these formulations, the drug released faster than in their gradient-loaded counterparts. Tuning the aptamer sequence did impact the liposome loading and release properties, but could not be directly related to the affinity. Further improvement might concern the drug/lipid ratio, which is still 10 times lower than Doxil-like formulations, and the control over the release rate, which could be improved by using complementary strand for instance [24]. This system could be used for a large variety of active agents, since aptamers can be synthetically prepared against about any target, from small molecules to whole cells [20]. In particular, biomacromolecules would largely benefit from this strategy, since they encounter low encapsulation efficiencies into liposomes.

References (article)

[1] T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (2013) 36-48.

- [2] B. Ozbakir, B.J. Crielaard, J.M. Metselaar, G. Storm, T. Lammers, Liposomal corticosteroids for the treatment of inflammatory disorders and cancer, *J. Controlled Release*, 190 (2014) 624-636.
- [3] M.L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel, Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential, *Int. J. Nanomedicine*, 1 (2006) 297-315.
- [4] J.V. Natarajan, C. Nugraha, X.W. Ng, S. Venkatraman, Sustained-release from nanocarriers: a review, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 193 (2014) 122-138.
- [5] Y. Barenholz, Relevancy of Drug Loading to Liposomal Formulation Therapeutic Efficacy, *J. Liposome Res.*, 13 (2003) 1-8.
- [6] J.O. Eloy, M. Claro de Souza, R. Petrilli, J.P. Barcellos, R.J. Lee, J.M. Marchetti, Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 123 (2014) 345-363.
- [7] A.R. Mohammed, N. Weston, A.G. Coombes, M. Fitzgerald, Y. Perrie, Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability, *International journal of pharmaceutics*, 285 (2004) 23-34.
- [8] M.S. Ku, Use of the Biopharmaceutical Classification System in early drug development, *AAPS J.*, 10 (2008) 208-212.

- [9] J. Dua, A. Rana, A. Bhandari, Liposome: methods of preparation and applications, *Int J Pharm Stud Res*, 3 (2012) 14-20.
- [10] G. Haran, R. Cohen, L.K. Bar, Y. Barenholz, Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1151 (1993) 201-215.
- [11] T.D. Madden, P.R. Harrigan, L.C.L. Tai, M.B. Bally, L.D. Mayer, T.E. Redelmeier, H.C. Loughrey, C.P.S. Tilcock, L.W. Reinish, P.R. Cullis, The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey, *Chem. Phys. Lipids*, 53 (1990) 37-46.
- [12] Y. Barenholz, Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 160 (2012) 117-134.
- [13] L. Silverman, Y. Barenholz, In vitro experiments showing enhanced release of doxorubicin from Doxil(R) in the presence of ammonia may explain drug release at tumor site, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 11 (2015) 1841-1850.
- [14] M.L. Briuglia, C. Rotella, A. McFarlane, D.A. Lamprou, Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release, *Drug delivery and translational research*, 5 (2015) 231-242.
- [15] S. Bandak, D. Goren, A. Horowitz, D. Tzemach, A. Gabizon, Pharmacological studies of cisplatin encapsulated in long-circulating liposomes in mouse tumor models, *Anticancer. Drugs*, 10 (1999) 911-920.

- [16] E. Oude Blenke, E. Mastrobattista, R.M. Schiffelers, Strategies for triggered drug release from tumor targeted liposomes, *Expert opinion on drug delivery*, 10 (2013) 1399-1410.
- [17] K. Park, Facing the Truth about Nanotechnology in Drug Delivery, *ACS Nano*, 7 (2013) 7442-7447.
- [18] F. Radom, P.M. Jurek, M.P. Mazurek, J. Otlewski, F. Jelen, Aptamers: molecules of great potential, *Biotechnol Adv*, 31 (2013) 1260-1274.
- [19] A.D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, Aptamers as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9 (2010) 537-550.
- [20] T.-H. Ku, T. Zhang, H. Luo, T. Yen, P.-W. Chen, Y. Han, Y.-H. Lo, Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing, *Sensors*, 15 (2015) 16281.
- [21] A.D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, Aptamers as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9 (2010) 537-550.
- [22] J. Liao, B. Liu, J. Liu, J. Zhang, K. Chen, H. Liu, Cell-specific aptamers and their conjugation with nanomaterials for targeted drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 12 (2014) 493-506.
- [23] J. Banerjee, M. Nilsen-Hamilton, Aptamers: multifunctional molecules for biomedical research, *J. Mol. Med. (Berlin, Germany)*, 91 (2013) 1333-1342.

- [24] R. Mo, T. Jiang, R. DiSanto, W. Tai, Z. Gu, ATP-triggered anticancer drug delivery, *Nat Commun*, 5 (2014).
- [25] R. Mo, T. Jiang, Z. Gu, Enhanced Anticancer Efficacy by ATP-Mediated Liposomal Drug Delivery, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53 (2014) 5815-5820.
- [26] R. Mo, T. Jiang, W. Sun, Z. Gu, ATP-responsive DNA-graphene hybrid nanoaggregates for anticancer drug delivery, *Biomaterials*, 50 (2015) 67-74.
- [27] W.-C. Liao, C.-H. Lu, R. Hartmann, F. Wang, Y.S. Sohn, W.J. Parak, I. Willner, Adenosine Triphosphate-Triggered Release of Macromolecular and Nanoparticle Loads from Aptamer/DNA-Cross-Linked Microcapsules, *ACS Nano*, 9 (2015) 9078-9086.
- [28] B. Soontornworajit, J. Zhou, M.P. Snipes, M.R. Battig, Y. Wang, Affinity hydrogels for controlled protein release using nucleic acid aptamers and complementary oligonucleotides, *Biomaterials*, 32 (2011) 6839-6849.
- [29] M.R. Battig, B. Soontornworajit, Y. Wang, Programmable Release of Multiple Protein Drugs from Aptamer-Functionalized Hydrogels via Nucleic Acid Hybridization, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 12410-12413.
- [30] X. Zhang, B. Soontornworajit, Z. Zhang, N. Chen, Y. Wang, Enhanced Loading and Controlled Release of Antibiotics Using Nucleic Acids As an Antibiotic-Binding Effector in Hydrogels, *Biomacromolecules*, 13 (2012) 2202-2210.

- [31] A. Porchetta, A. Vallee-Belisle, K.W. Plaxco, F. Ricci, Using distal-site mutations and allosteric inhibition to tune, extend, and narrow the useful dynamic range of aptamer-based sensors, *Journal of the American Chemical Society*, 134 (2012) 20601-20604.
- [32] L.A. Meure, N.R. Foster, F. Dehghani, Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review, *AAPS PharmSciTech*, 9 (2008) 798-809.
- [33] A. Wochner, M. Menger, D. Orgel, B. Cech, M. Rimmele, V.A. Erdmann, J. Glökler, A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines, *Anal. Biochem.*, 373 (2008) 34-42.
- [34] A.J. Simon, A. Vallée-Bélisle, F. Ricci, K.W. Plaxco, Intrinsic disorder as a generalizable strategy for the rational design of highly responsive, allosterically cooperative receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (2014) 15048-15053.
- [35] B.S. Ferguson, D.A. Hoggarth, D. Maliniak, K. Ploense, R.J. White, N. Woodward, K. Hsieh, A.J. Bonham, M. Eisenstein, T. Kippin, K.W. Plaxco, H.T. Soh, Real-time, aptamer-based tracking of circulating therapeutic agents in living animals, *Science translational medicine*, 5 (2013) 213ra165-213ra165.
- [36] V. Bagalkot, O.C. Farokhzad, R. Langer, S. Jon, An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 45 (2006) 8149-8152.
- [37] M.-G. Kim, J.Y. Park, W. Miao, J. Lee, Y.-K. Oh, Polyaptamer DNA nanothread-anchored, reduced graphene oxide nanosheets for targeted delivery, *Biomaterials*, 48 (2015) 129-136.

- [38] H. Zhang, Y. Ma, Y. Xie, Y. An, Y. Huang, Z. Zhu, C.J. Yang, A Controllable Aptamer-Based Self-Assembled DNA Dendrimer for High Affinity Targeting, Bioimaging and Drug Delivery, *Scientific Reports*, 5 (2015) 10099.
- [39] B.S. Ferguson, D.A. Hoggarth, D. Maliniak, K. Ploense, R.J. White, N. Woodward, K. Hsieh, A.J. Bonham, M. Eisenstein, T.E. Kippin, K.W. Plaxco, H.T. Soh, Real-time, aptamer-based tracking of circulating therapeutic agents in living animals, *Science translational medicine*, 5 (2013) 213ra165.
- [40] H. Yin, R.L. Kanasty, A.A. Eltoukhy, A.J. Vegas, J.R. Dorkin, D.G. Anderson, Non-viral vectors for gene-based therapy, *Nature Reviews Genetics*, 15 (2014) 541-555.
- [41] Y. Barenholz, Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *J. Control. Release*, 160 (2012) 117-134.
- [42] L. Silverman, Y. Barenholz, In vitro experiments showing enhanced release of doxorubicin from Doxil® in the presence of ammonia may explain drug release at tumor site, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, 11 (2015) 1841-1850.
- [43] E. Koren, A. Apte, A. Jani, V.P. Torchilin, Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 160 (2012) 264-273.
- [44] C. Chen, J.L. Zhou, X. Han, F. Song, X.L. Wang, Y.Z. Wang, A prodrug strategy based on chitosan for efficient intracellular anticancer drug delivery, *Nanotechnology*, 25 (2014) 255101.

Chapitre 3: Discussion et Conclusion

L'objectif de ce projet est de démontrer qu'il est possible d'obtenir de l'encapsulation active et de contrôler la cinétique de libération des molécules actives en utilisant des aptamères. L'affinité d'un aptamère pour un ligand a permis, pour le modèle de principe actif de doxorubicine, d'encapsuler un plus grand nombre de molécules de doxorubicine que sans aptamère, ou qu'avec un aptamère contrôle non spécifique. De plus, différentes constructions d'aptamères ont permis d'obtenir des profils de libération variables, libérant tous plus que des formulations similaires au Doxil, à un rythme plus soutenu.

3.1. L'efficacité d'encapsulation améliorée

Une molécule d'aptamère est conçue pour lier une molécule de doxorubicine, or les résultats obtenus suggèrent qu'il y ait présence de plus d'une molécule de doxorubicine par molécule d'aptamère (ratio molaire doxorubicine/aptamère supérieur à 2). Ces observations peuvent être expliquées par la capacité intrinsèque de la doxorubicine de former des dimères à des concentrations supérieures au μM [43]. Il est peu probable que ces molécules de doxorubicine excédentaires se complexent par interactions ioniques, puisque les contrôles appropriés ont démontré que l'encapsulation de la doxorubicine était séquence dépendante. Une autre hypothèse est que des sites de liaison secondaires apparaissent à de fortes concentrations de doxorubicine. Dans cette optique, il serait intéressant d'appliquer cette recherche à une autre molécule pour déterminer si les mêmes phénomènes peuvent être observables. Aussi, la concentration en doxorubicine utilisée dans les essais d'affinité et celle qui est véritablement utilisée dans les essais d'encapsulation diffèrent de plusieurs ordres de grandeur. Pour déterminer si des sites de liaison apparaissent pour la doxorubicine à de plus fortes concentrations, il serait pertinent de tester ces essais d'affinité à des concentrations du même ordre.

Dans le développement d'une formulation optimale, il est possible de raccourcir les séquences de nucléotides pour encapsuler davantage d'aptamères dans les liposomes pour un ratio N/P donné, ce qui permet au final d'encapsuler un maximum de molécules actives pour un minimum de lipides utilisés. Cependant, notre étude démontre qu'une séquence minimale est nécessaire. En effet, lorsqu'une seule paire de base est retirée d'un aptamère (Doxapt-30 vs Doxapt-28), l'encapsulation active ne fonctionne plus du tout, bien que l'affinité des deux aptamères soit très similaire pour la doxorubicine. Une hypothèse serait que des séquences trop courtes pourraient fragiliser la conformation de l'aptamère lors de son interaction ionique avec le liposome cationique. Dans sa complexation avec le liposome cationique, l'aptamère plus court et plus facile à dénaturer n'adopterait pas la conformation nécessaire à sa liaison avec la doxorubicine.

Le système que nous avons développé est intéressant sur plusieurs aspects, mais il est à noter que dans la meilleure formulation, la capacité de chargement demeurerait dix fois inférieure à celle qui est obtenue avec le Doxil®. Dans ce dernier système, les principes actifs arrivent à être encapsulés bien au-delà de leur limite de solubilité, leur ratio drogue/lipide est alors supérieur. Cependant, le système développé offre un plus grand échantillonnage au niveau des profils de libération, élément qui n'est pas pris en compte par les techniques d'encapsulation active, à moins d'ajouter d'un déclencheur de libération.

3.2. La cinétique de libération

Bien que différents profils de libération aient pu être obtenus pour des constructions d'aptamère différentes, il n'a pas été possible d'associer les vitesses de libération avec les constantes de dissociation calculées. Cette théorie beaucoup trop simpliste témoigne de la complexité des systèmes développés, autant dans leur structuration que dans leurs interactions. Les constantes de dissociation sont le ratio du K_{on} et du K_{off} qui sont respectivement les vitesses d'association et les

vitesse de dissociation de deux entités. En solution, le K_{on} ne peut être changé significativement, puisque cette interaction dépend du mouvement brownien des molécules. Dans un environnement plus restreint en termes d'espace, tel que dans un liposome, la véritable affinité entre les deux entités peut différer de celle qui est mesurée sans ces liposomes. Il aurait donc été intéressant de mesurer l'affinité aptamère-doxorubicine, une fois ces aptamères complexés à des liposomes. En plus de la proximité des entités, le milieu salin, les charges ioniques du liposome, de l'aptamère et de la molécule active et finalement la morphologie du lipoplexe peut influencer le comportement de la molécule active dans son affinité avec son aptamère. Donc, une multitude de paramètres doivent être considérés, ce qui ne nous permet pas de limiter ces prévisions seulement sur la base d'une affinité déterminée uniquement entre l'aptamère et son ligand, dans des concentrations qui ne sont pas représentatives.

3.3. Les aptamères

Une limitation envisagée de ce système de livraison est la nécessité de démontrer la sécurité de chacun des aptamères utilisés avant leur administration chez l'homme. Comme chacune des séquences est unique, la toxicité de chacune d'entre elles devrait être étudiée, pour s'assurer que chaque système ne présente pas un risque génétique. Bien que l'aptamère ne soit pas très dispendieux à produire, sa présence entraîne des coûts supplémentaires dans le développement d'une formulation et son identification et optimisation peut entraîner des coûts et des délais dans la mise au point d'un vecteur liposomal. Dans l'encapsulation d'une petite molécule chimique, peu cher, la pertinence d'encapsuler plus est moindre, car le matériel dispensé ne représente pas un fardeau économique important. Néanmoins, pour l'encapsulation d'un principe actif dispendieux, telle une protéine, ces systèmes sont un ajout intéressant pour la conservation et l'encapsulation maximale de ces molécules dispendieuses.

Chapitre 4 : Travaux futurs et perspectives

4.1 Le milieu salin et les aptamères

Il a été observé que dans toutes les formulations préparées, la présence de sel, tel que le NaCl, était essentielle pour empêcher l'agrégation immédiate lors du mélange des composants. De plus, le sel joue un rôle essentiel dans le repliement des séquences d'ADN et dans la démonstration de leur affinité. Il serait donc intéressant d'utiliser différents sels dans le milieu interne des liposomes et d'étudier leur influence sur le profil de libération de la molécule active.

4.2 Constructions d'aptamères

Comme nous l'avons démontré, le simple changement d'un nucléotide peut impacter la structure, l'affinité et la stabilité de la séquence. Cet énorme champ de possibilité offre une avenue d'étude qui peut laisser place à encore beaucoup de découvertes. À titre d'exemple, le « polymère d'aptamère » (Poly-Doxapt) utilisé dans cette étude aurait très aisément pu être pensé en intégrant le site de liaison à la molécule active au cœur de la séquence d'hybridation entre les brins A et A'. Ce changement aurait permis d'obtenir un troisième site de liaison dans le complexe A et A', ce qui aurait pu résulter en tout autre profil de libération et en des capacités d'encapsulation bien supérieures.

Cette étude n'a pas été conçue pour véritablement y découvrir l'impact de l'affinité dans les profils de libération, puisque chacune des séquences possédait des longueurs chaînes différentes, des nombres de sites de liaison différents et des nombres de nucléotides largement différents. Pour véritablement étudier l'impact de l'affinité doxorubicine-aptamère, une séquence primaire d'un nombre de nucléotides prédéterminé aurait pu être utilisée et, de cette séquence, le

changement de quelques acides nucléiques aurait pu permettre de modifier les constantes de dissociation obtenues.

4.3 Autres molécules actives

Bien sûr, la preuve de concept a été réalisée sur une seule molécule, qui n'était peut-être pas le meilleur modèle en raison de son degré de complexité et de ses propriétés intrinsèques de liaison à l'ADN. L'étude devrait être répétée avec une autre molécule active qui pourrait bénéficier des avantages de la méthode proposée, notamment la tobramycine [44] le cisplatine [19], ou encore un peptide thérapeutique, qui ne possède actuellement aucun moyen d'être activement encapsulé dans des liposomes.

Bibliographie

- [1] M.L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel, Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential, *Int. J. Nanomedicine*, 1 (2006) 297-315.
- [2] J.O. Eloy, M. Claro de Souza, R. Pettrilli, J.P. Barcellos, R.J. Lee, J.M. Marchetti, Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 123 (2014) 345-363.
- [3] T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (2013) 36-48.
- [4] G.T. Noble, J.F. Stefanick, J.D. Ashley, T. Kiziltepe, B. Bilgicer, Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations, *Trends Biotechnol.*, 32 (2014) 32-45.

- [5] Y. Barenholz, Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 160 (2012) 117-134.
- [6] F. de Meyer, B. Smit, Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106 (2009) 3654-3658.
- [7] M.L. Briuglia, C. Rotella, A. McFarlane, D.A. Lamprou, Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release, *Drug delivery and translational research*, 5 (2015) 231-242.
- [8] S. Zalipsky, Synthesis of an end-group functionalized polyethylene glycol-lipid conjugate for preparation of polymer-grafted liposomes, *Bioconjug. Chem.*, 4 (1993) 296-299.
- [9] H. Grosshans, Gene therapy--when a simple concept meets a complex reality. Review on gene therapy, *Funct. Integr. Genomics*, 1 (2000) 142-145.
- [10] S. Simoes, A. Filipe, H. Faneca, M. Mano, N. Penacho, N. Duzgunes, M.P. de Lima, Cationic liposomes for gene delivery, *Expert opinion on drug delivery*, 2 (2005) 237-254.
- [11] R.N. Majzoub, C.L. Chan, K.K. Ewert, B.F. Silva, K.S. Liang, E.L. Jacovetty, B. Carragher, C.S. Potter, C.R. Safinya, Uptake and transfection efficiency of PEGylated cationic liposome-DNA complexes with and without RGD-tagging, *Biomaterials*, 35 (2014) 4996-5005.
- [12] K.B. Knudsen, H. Northeved, P.E. Kumar, A. Permin, T. Gjetting, T.L. Andresen, S. Larsen, K.M. Wegener, J. Lykkesfeldt, K. Jantzen, S. Loft, P. Moller, M. Roursgaard, In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 11 (2015) 467-477.
- [13] D. Harries, J. Rosgen, A practical guide on how osmolytes modulate macromolecular properties, *Methods Cell Biol.*, 84 (2008) 679-735.

- [14] G. Haran, R. Cohen, L.K. Bar, Y. Barenholz, Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1151 (1993) 201-215.
- [15] J. Dua, A. Rana, A. Bhandari, Liposome: methods of preparation and applications, *Int J Pharm Stud Res*, 3 (2012) 14-20.
- [16] L.A. Meure, N.R. Foster, F. Dehghani, Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review, *AAPS PharmSciTech*, 9 (2008) 798-809.
- [17] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.*, 13 (1965) 238-IN227.
- [18] J. Gubernator, Active methods of drug loading into liposomes: recent strategies for stable drug entrapment and increased in vivo activity, *Expert opinion on drug delivery*, 8 (2011) 565-580.
- [19] Y. Barenholz, Liposome application: problems and prospects, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6 (2001) 66-77.
- [20] T.D. Madden, P.R. Harrigan, L.C. Tai, M.B. Bally, L.D. Mayer, T.E. Redelmeier, H.C. Loughrey, C.P. Tilcock, L.W. Reinish, P.R. Cullis, The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey, *Chem. Phys. Lipids*, 53 (1990) 37-46.
- [21] S. Bandak, D. Goren, A. Horowitz, D. Tzemach, A. Gabizon, Pharmacological studies of cisplatin encapsulated in long-circulating liposomes in mouse tumor models, *Anticancer. Drugs*, 10 (1999) 911-920.
- [22] J.W. Nichols, Y.H. Bae, EPR: Evidence and fallacy, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 190 (2014) 451-464.

- [23] L. Silverman, Y. Barenholz, In vitro experiments showing enhanced release of doxorubicin from Doxil(R) in the presence of ammonia may explain drug release at tumor site, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 11 (2015) 1841-1850.
- [24] K. Loomis, K. McNeeley, R.V. Bellamkonda, Nanoparticles with targeting, triggered release, and imaging functionality for cancer applications, *Soft Matter*, 7 (2011) 839-856.
- [25] E. Oude Blenke, E. Mastrobattista, R.M. Schiffelers, Strategies for triggered drug release from tumor targeted liposomes, *Expert opinion on drug delivery*, 10 (2013) 1399-1410.
- [26] K. Yoshino, A. Kadowaki, T. Takagishi, K. Kono, Temperature Sensitization of Liposomes by Use of N-Isopropylacrylamide Copolymers with Varying Transition Endotherms, *Bioconjug. Chem.*, 15 (2004) 1102-1109.
- [27] D.C. Drummond, M. Zignani, J. Leroux, Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery, *Prog. Lipid Res.*, 39 (2000) 409-460.
- [28] D.A. Gewirtz, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin, *Biochem. Pharmacol.*, 57 (1999) 727-741.
- [29] F. Radom, P.M. Jurek, M.P. Mazurek, J. Otlewski, F. Jelen, Aptamers: molecules of great potential, *Biotechnol Adv*, 31 (2013) 1260-1274.
- [30] P.R. Bouchard, R.M. Hutabarat, K.M. Thompson, Discovery and development of therapeutic aptamers, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 50 (2010) 237-257.
- [31] A.D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, Aptamers as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9 (2010) 537-550.

- [32] J. Banerjee, M. Nilsen-Hamilton, Aptamers: multifunctional molecules for biomedical research, *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 91 (2013) 1333-1342.
- [33] A. Porchetta, A. Vallee-Belisle, K.W. Plaxco, F. Ricci, Using distal-site mutations and allosteric inhibition to tune, extend, and narrow the useful dynamic range of aptamer-based sensors, *Journal of the American Chemical Society*, 134 (2012) 20601-20604.
- [34] S.D. Jayasena, Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics, *Clin. Chem.*, 45 (1999) 1628-1650.
- [35] A.B. Iliuk, L. Hu, W.A. Tao, Aptamer in bioanalytical applications, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 4440-4452.
- [36] X. Li, Q. Zhao, L. Qiu, Smart ligand: aptamer-mediated targeted delivery of chemotherapeutic drugs and siRNA for cancer therapy, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 171 (2013) 152-162.
- [37] P. Ray, K.D. Viles, E.E. Soule, R.S. Woodruff, Application of aptamers for targeted therapeutics, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 61 (2013) 255-271.
- [38] R. Mo, T. Jiang, R. DiSanto, W. Tai, Z. Gu, ATP-triggered anticancer drug delivery, *Nature communications*, 5 (2014) 3364.
- [39] M.R. Battig, B. Soontornworajit, Y. Wang, Programmable release of multiple protein drugs from aptamer-functionalized hydrogels via nucleic acid hybridization, *Journal of the American Chemical Society*, 134 (2012) 12410-12413.
- [40] Y.S. Kim, J.H. Niazi, Y.J. Chae, U.R. Ko, M.B. Gu, Aptamers-in-liposomes for selective and multiplexed capture of small organic compounds, *Macromolecular rapid communications*, 32 (2011) 1169-1173.

- [41] A.J. Simon, A. Vallee-Belisle, F. Ricci, K.W. Plaxco, Intrinsic disorder as a generalizable strategy for the rational design of highly responsive, allosterically cooperative receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111 (2014) 15048-15053.
- [42] A. Wochner, M. Menger, D. Orgel, B. Cech, M. Rimmele, V.A. Erdmann, J. Glokler, A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines, *Anal. Biochem.*, 373 (2008) 34-42.
- [43] L. Gallois, M. Fiallo, A. Garnier-Suillerot, Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles. Circular dichroism study, *Biochim. Biophys. Acta*, 1370 (1998) 31-40.
- [44] C. Beaulac, S. Clement-Major, J. Hawari, J. Lagace, Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (1996) 665-669.