

Université de Montréal

**Mise au point de complexes liposome/polymère sensibles  
au pH pour la vectorisation d'agents anticancéreux**

par

EMMANUELLE ROUX

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor  
en sciences pharmaceutiques  
option technologie pharmaceutique

Août, 2003

© Emmanuelle Roux, 2003



QV

705

U58

2004

v.002

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Mise au point de complexes liposome/polymère sensibles au pH pour la vectorisation  
d'agents anticancéreux

présentée par :  
EMMANUELLE ROUX

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Prof. Louis Cartilier, président-rapporteur  
Prof. Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche  
Prof. Marc Servant, membre du jury  
Dr Olivier Meyer, examinateur externe  
\_\_\_\_\_, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Les liposomes sensibles au pH sont des vésicules qui sont stables à pH neutre mais qui deviennent perméables et/ou fusogènes à pH acide. Ils visent à augmenter le passage de médicaments dans le cytoplasme suite à leur endocytose. L'objectif de ces travaux de doctorat était de mettre au point une formulation liposomale sensible au pH dans laquelle un polymère provoquerait la libération de son contenu à un pH correspondant à celui des endosomes. De plus, cette formulation devait être stable en présence de fluides biologiques et montrer un temps de circulation prolongé. Ainsi, ce travail a porté sur la préparation et la caractérisation de complexes liposome/copolymère de *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) pour la vectorisation d'agents anticancéreux.

Des copolymères alkylés de NIPAM et d'acide méthacrylique ont été complexés avec des liposomes. Les formulations développées ont été caractérisées quant à leur sensibilité au pH, leur stabilité dans le sérum ainsi que leur pharmacocinétique chez le rat. Des vésicules de différentes compositions ont été complexées avec des copolymères de NIPAM sensibles au pH de diverses structures.

Toutes les formulations mises au point étaient stables à pH neutre et libéraient efficacement leur contenu à pH légèrement acide (*i.e.* 4,9 à 5,8). De façon générale, l'incubation des liposomes dans le sérum a peu affecté leurs propriétés de libération.

Afin d'acquérir des informations pertinentes au développement rationnel d'une formulation sensible au pH, le changement de conformation induit par un changement de pH et de température a été étudié pour un des copolymères synthétisés. Des expériences de calorimétrie différentielle à balayage et de spectroscopie infrarouge ont révélé que le polymère, bien que soluble à pH 7,4 et à 37 °C, n'était pas totalement dans une conformation de pelote statistique et était partiellement déshydraté. Ces études ont ainsi révélé que certains polymères n'étaient pas dans leur conformation idéale pour procurer une stabilité stérique aux liposomes à pH neutre.

La pharmacocinétique de différentes formulations sensibles au pH a été étudiée. Deux copolymères de NIPAM ont augmenté le temps de circulation systémique de liposomes après administration intraveineuse. L'augmentation du temps de circulation des liposomes qu'ont procuré ces copolymères de NIPAM étant faible, la pharmacocinétique *in vivo* a été optimisée en incorporant des dérivés lipidiques du poly(éthylène glycol) (PEG) à la formulation.

Ce travail a montré qu'il était possible de mettre au point une formulation liposomale sensible au pH qui libère son contenu à pH acide mais demeure stable à pH neutre en présence de sérum. De surcroît, ces liposomes ont démontré un temps de circulation prolongé. La meilleure formulation a été obtenue par l'ajout d'un copolymère de NIPAM alkylé en bout de chaîne et d'un dérivé lipidique de PEG de masse molaire 5000.

**Mots-clés :** liposomes sensibles au pH, poly(*N*-isopropylacrylamide), poly(éthylène glycol)

## Abstract

pH-Sensitive liposomes are vesicles that are stable at neutral pH and become leaky and/or fusion competent under acidic conditions. They have been suggested as a means to increase the cytoplasmic delivery of drug following their endocytosis. The purpose of this doctorate work was to develop a pH-sensitive liposomal formulation in which contents release would be triggered by a polymer at a pH corresponding to the endosomal pH. Moreover, this formulation had to be stable in the presence of biological fluids and to demonstrate a prolonged circulation time. Thus, different liposome/*N*-isopropylacrylamide (NIPAM) copolymer complexes were prepared and characterized as delivery systems for anticancer drugs.

Alkylated copolymers of NIPAM and methacrylic acid were complexed with liposomes. Formulations were characterized with regard to their pH-sensitivity, stability in serum and pharmacokinetic profile in rats. Vesicles of different compositions were complexed with different pH-sensitive NIPAM copolymers.

All formulations were stable at neutral pH and efficiently released their contents at mildly acidic pH (*i.e.* 4.9 to 5.8). In general, incubation of these formulations in serum did not affect their release properties.

In order to gain additional information for the rational design of a pH-sensitive formulation, pH- and temperature triggered conformational change of one of the synthesized copolymer was studied. Differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy experiments revealed that at pH 7.4 and 37 °C, although the polymer was water-soluble, it was not in a random coil conformation and was partly dehydrated. Thus, these studies showed that some polymers were not in an optimal conformation to provide liposomes with an optimal steric protection at neutral pH.

The pharmacokinetics of different pH-sensitive formulations was also studied. Two NIPAM copolymers were found to increase the systemic circulation time of liposomes following their intravenous administration. As only a slight increase in the circulation time was obtained with NIPAM copolymers, optimization of the *in vivo* pharmacokinetics was achieved by incorporating poly(ethylene glycol) (PEG)-lipid derivatives to the formulation.

This work showed that it was possible to develop a pH-sensitive liposomal formulation that releases its content at acidic pH while maintaining its stability at neutral pH in the presence of serum. Moreover, these liposomes exhibited a long circulation time. The best formulation was obtained by combining a terminally alkylated NIPAM copolymer with a PEG-lipid derivative of a molecular weight of 5000.

**Keywords :** pH-sensitive liposomes, poly(*N*-isopropylacrylamide), sterically stabilized liposomes.



## Table des matières

Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des figures.....	xvi
Liste des sigles et abréviations.....	xxiii
Remerciements.....	xxviii
Avant-propos.....	1
CHAPITRE 1. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	3
1.1. Les systèmes de relarguage des médicaments.....	4
1.1.1. Généralités.....	4
1.1.2. Les vecteurs pharmaceutiques.....	7
1.2. Les liposomes.....	9
1.2.1. Introduction.....	9
1.2.2. Les lipides.....	10
1.2.2.1. Polymorphisme des lipides.....	12
1.2.2.1.1. Polymorphisme et rôles fonctionnels des lipides.....	15
1.2.2.2. Thermotropisme des membranes.....	16
1.2.2.2.1. Effet du cholestérol sur le thermotropisme des membranes.....	17
1.2.3. Stabilité des liposomes dans les fluides biologiques.....	19
1.2.4. Les liposomes furtifs.....	21
1.3. Les liposomes et le traitement du cancer.....	23
1.3.1. Ciblage passif.....	23
1.3.2. Ciblage actif.....	26
1.4. Les immunoliposomes.....	26
1.4.1. Le couplage des ligands aux liposomes.....	28
1.4.1.1. Les groupements réactifs des anticorps et leurs liaisons.....	29
1.4.2. Propriétés des immunoliposomes conventionnels et furtifs.....	32
1.4.3. Immunogénicité des immunoliposomes.....	34

1.4.4	Choix de l'anticorps et biodisponibilité du principe actif.....	36
1.5.	Les liposomes répondant à un stimulus .....	38
1.5.1.	Les liposomes sensibles à la température.....	39
1.5.1.1.	Les liposomes à base de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC).....	39
1.5.1.2.	Les complexes liposome/polymère sensibles à la température .....	41
1.5.1.2.1.	Les propriétés de surface des complexes liposome/polymère sensibles à la température .....	47
1.5.2.	Les liposomes photosensibles .....	48
1.5.2.1.	Les plasmalogènes labiles .....	48
1.5.2.2.	Les lipides photo-isomérisables .....	50
1.5.2.3.	La photodéprotection des phosphatidyléthanolamines .....	51
1.5.2.4.	Les liposomes photopolymérisables .....	52
1.5.3.	Les liposomes sensibles au pH.....	54
1.5.3.1.	Les liposomes à base de phosphatidyléthanolamines (PE) insaturées .	59
1.5.3.1.1.	Effet des cations divalents.....	61
1.5.3.1.2.	Libération cytoplasmique de marqueurs fluorescents.....	62
1.5.3.1.3.	Vectorisation du fragment A de la toxine de la diphtérie .....	63
1.5.3.1.4.	Vectorisation du cytosine arabinofuranoside (ara-C) .....	64
1.5.3.1.5.	Vectorisation d'antigènes.....	65
1.5.3.1.6.	Vectorisation de matériel génétique.....	66
1.5.3.1.6.1.	Vectorisation de plasmides .....	66
1.5.3.1.6.2.	Vectorisation d'oligonucléotides antisens.....	67
1.5.3.1.7.	Stabilité des liposomes à base de PE insaturées dans le plasma/sérum .....	68
1.5.3.1.8.	Pharmacocinétique et biodistribution des liposomes à base de PE insaturées .....	70
1.5.3.2.	Les liposomes contenant un conjugué lipide-PEG labile.....	71

1.5.3.3.	Les liposomes composés d'un mélange de lipides anioniques et cationiques .....	73
1.5.3.4.	Les liposomes à base d'alcool oléoylique (OAlc).....	74
1.5.3.5.	Les liposomes à base de lipides hydrolysables .....	75
1.5.3.5.1.	Les phosphatidyléthanolamines <i>N</i> -alkylées .....	75
1.5.3.5.2.	Les plasmalogènes labiles .....	76
1.5.3.5.3.	Les ortho ester de lipides hydrolysables .....	78
1.5.3.6.	Les liposomes utilisant des peptides synthétiques .....	79
1.5.3.7.	Les complexes liposomes/polymère sensible au pH.....	82
1.5.3.7.1.	Les poly(glycidol)s succinylés (SucPG) .....	83
1.5.3.7.2.	L'acide poly(éthacrylique) (PEAA).....	84
1.5.3.7.3.	Les copolymères de <i>N</i> -isopropylacrylamide (NIPAM) .....	85
CHAPITRE 2. OBJECTIFS.....		88
2.1.	Objectifs généraux .....	89
2.2.	Objectifs spécifiques .....	89
PRÉSENTATION DES MANUSCRITS.....		90
CHAPITRE 3. STERIC STABILIZATION OF LIPOSOMES BY PH-RESPONSIVE <i>N</i> -ISOPROPYLACRYLAMIDE COPOLYMER.....		91
3.1.	Abstract .....	92
3.2.	Introduction .....	93
3.3.	Experimental section.....	94
3.3.1.	Chemicals.....	94
3.3.2.	Synthesis of the copolymers.....	95
3.3.3.	Characterization of the copolymer .....	95
3.3.4.	Force-Measuring Technique .....	96
3.3.5.	Construction of supported bilayers .....	96
3.3.6.	SFA preparation .....	97
3.3.7.	Liposome preparation.....	97

3.3.8.	<i>In vitro</i> release kinetics .....	97
3.3.9.	<i>In vivo</i> pharmacokinetics.....	98
3.4.	Results .....	98
3.4.1.	Phase transition of the copolymers .....	98
3.4.2.	Force Measurements .....	99
3.4.3.	<i>In vitro</i> release kinetics .....	101
3.4.4.	Pharmacokinetics .....	104
3.5.	Discussion .....	105
3.6.	References .....	108
CHAPITRE 4. POLYMER BASED PH-SENSITIVE CARRIERS AS A MEANS TO IMPROVE THE CYTOPLASMIC DELIVERY OF DRUGS .....		113
4.1.	Abstract .....	114
4.2.	Introduction .....	115
4.3.	Materials and methods .....	119
4.3.1.	Polymer synthesis.....	119
4.3.2.	Liposome and niosome preparation .....	120
4.3.3.	Fluorescence measurements.....	121
4.3.4.	<i>In vitro</i> release kinetics .....	121
4.3.5.	<i>In vitro</i> uptake of vesicles by macrophages and cytotoxicity assays.....	121
4.4.	Results and discussion.....	123
4.5.	Conclusion.....	131
4.6.	References .....	133
CHAPITRE 5. ON THE CHARACTERIZATION OF PH-SENSITIVE POLYMER/LIPOSOME COMPLEXES .....		139
5.1.	Abstract .....	140
5.2.	Introduction .....	141
5.3.	Materials and methods .....	144
5.3.1.	Chemicals.....	144

5.3.2.	Synthesis of the copolymer .....	144
5.3.3.	Differential scanning calorimetry (DSC) .....	145
5.3.4.	Thermal FTIR spectroscopy .....	145
5.3.5.	<sup>2</sup> H-NMR spectroscopy .....	146
5.3.6.	Liposome preparation for <i>in vitro</i> release and pharmacokinetic studies....	147
5.3.7.	<i>In vitro</i> pH-triggered release .....	147
5.3.8.	<i>In vivo</i> pharmacokinetics.....	148
5.4.	Results and discussion.....	148
5.4.1.	Phase transition of NIPAM copolymer in solution .....	148
5.4.1.1.	Light scattering.....	148
5.4.1.2.	Differential scanning calorimetry (DSC) .....	149
5.4.1.3.	Thermal FTIR spectroscopy .....	152
5.4.2.	<sup>2</sup> H-NMR spectroscopy .....	156
5.4.3.	<i>In vitro</i> release of pH-sensitive liposomes .....	158
5.4.4.	Pharmacokinetics .....	162
5.5.	Conclusion.....	164
5.6.	References .....	165
CHAPITRE 6. STIMULI-RESPONSIVE LIPOSOME-POLYMER COMPLEXES. TOWARDS THE DESIGN OF INTELLIGENT DRUG CARRIERS.....		169
6.1.	Abstract .....	170
6.2.	Introduction .....	171
6.3.	Experimental section.....	174
6.3.1.	Polymer synthesis.....	174
6.3.2.	<i>In vitro</i> release kinetics .....	174
6.3.3.	Cytoplasmic delivery of calcein.....	177
6.3.4.	Pharmacokinetics .....	177
6.4.	Results and discussion.....	178
6.4.1.	<i>In vitro</i> pH-triggered release of vesicle/polymer complexes .....	178

6.4.1.1.	Liposomes composed of high phase transition lipids .....	178
6.4.1.2.	Niosomes.....	180
6.4.1.3.	Liposomes composed of low phase transition lipids.....	181
6.4.2.	<i>In vitro</i> cytoplasmic delivery .....	182
6.4.3.	Pharmacokinetics .....	182
6.5.	Conclusion.....	183
6.6.	References .....	186
CHAPITRE 7. SERUM-STABLE AND LONG-CIRCULATING, PEGYLATED, PH-SENSITIVE LIPOSOMES .....		188
7.1.	Abstract .....	189
7.2.	Introduction.....	190
7.3.	Materials and methods .....	191
7.3.1.	Synthesis and characterization of the copolymer.....	191
7.3.2.	Liposome preparation.....	191
7.3.3.	<i>In vitro</i> release kinetics .....	192
7.3.4.	<i>In vivo</i> pharmacokinetics and biodistribution .....	192
7.4.	Results and discussion.....	193
7.4.1.	<i>In vitro</i> release of pH-sensitive liposomes .....	193
7.4.2.	Pharmacokinetics .....	195
7.5.	Conclusion.....	198
7.6.	References .....	198
CHAPITRE 8 .....		201
CHAPITRE 8. DISCUSSION GÉNÉRALE.....		201
8.1.	Sensibilité au pH des complexes liposome/polymère .....	202
8.1.1.	Utilisation de lipides possédant des transitions de phase différentes.....	202
8.1.2.	Influence de la composition des copolymères sur les propriétés de libération .....	203
8.1.2.1.	Effet de la position de l'ancre hydrophobe dans le polymère .....	203

8.1.2.2. Effet de la proportion d'ancre hydrophobe et d'acide méthacrylique dans le polymère .....	205
8.1.3. Effet de l'incorporation de PEG-PE dans la formulation.....	206
8.2. Caractérisation physico-chimique de la LCST des copolymères de NIPAM ....	208
8.3. Libération cytoplasmique de l'ara-C.....	210
8.4. Pharmacocinétiques.....	211
CHAPITRE 9. CONCLUSION .....	214
Bibliographie.....	217

## Liste des tableaux

### Chapitre 1. Recension de la littérature

Tableau 1. Structure des phospholipides les plus couramment utilisés. ....	11
Tableau 2. Polymorphisme des lipides et forme moléculaire dynamique correspondante. .	14
Tableau 3 : Amphiphiles utilisés pour la formulation de liposomes sensibles au pH à base de PE insaturées. ....	61

### Chapitre 3: Steric stabilization of liposomes by pH-responsive *N*-isopropylacrylamide copolymer

Table 1. Pharmacokinetic parameters of control and pH-sensitive EPC/Chol liposomes.	105
---	-----

### Chapitre 4: Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drug

Table 1. Characteristics of the different pH-sensitive polymers.....	120
--	-----

### Chapitre 5: On the characterization of pH-sensitive Polymer/liposome complexes

Table 1. pH-dependencies of phase transition temperature and enthalpy of the NIPAM copolymer as determined by DSC.....	151
Table 2. Area under the blood concentration-time curve ( $AUC_{0-\infty}$ ) of the different liposomal formulations .....	164



**Chapitre 6: Stimuli-responsive liposome-polymer complexes. Towards the design of intelligent drug carriers**

Table 1. Characteristics of different pH-sensitive formulations and AUC after their i.v. administration in rats..... 176

## Liste des figures

### Chapitre 1. Recension de la littérature

- Figure 1. Concentration plasmatique du principe actif administré par voie extravasculaire par une forme pharmaceutique à libération immédiate..... 5
- Figure 2. Concentration plasmatique du principe actif administré par voie extravasculaire par un système de libération prolongée des médicaments. .... 6
- Figure 3. Concentration plasmatique du principe actif administré par voie extravasculaire par un système de libération contrôlée des médicaments. .... 7
- Figure 4. Représentation schématique d'un liposome..... 9
- Figure 5. Phospholipides en phase hexagonale inverse ( $H_{II}$ ). .... 15
- Figure 6. Diagramme de phase des mélanges DPPC/Chol.  $L_{\alpha}$  est la phase liquide-cristalline, « gel » est la phase cristalline et  $\beta$  est la phase riche en cholestérol (Vist & Davis, 1990). Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society. .... 19
- Figure 7. Représentation schématique d'anticorps et de fragments d'anticorps. (A) IgG murin; (B) IgG chimérique; (C) IgG humanisé; (D) IgG humain; (E)  $F(ab')_2$ ; (F) Fab'; (G) fragment à chaîne simple scFv; (H) fragment à chaîne simple scFv bivalent; (I) fragment à chaîne simple scFv bivalent recombinant. Les séquences murines et humaines sont respectivement représentées en blanc et en gris..... 27
- Figure 8. Représentation schématique des différents types d'immunoliposomes portant des anticorps complets. (A) Immunoliposome conventionnel, (B) immunoliposome furtif dont les anticorps sont liés à la membrane lipidique et (C) immunoliposome furtif dont les anticorps sont liés à l'extrémité du PEG..... 29
- Figure 9. Réaction d'un ligand-NH<sub>2</sub> (anticorps complet ou fragments) avec l'agent de thiolation SPDP. Le pont dithiopyridine est ensuite réduit avec du dithiothréitol (DTT) pour libérer la fonction thiol. Le ligand thiolé est ensuite couplé à la MPB-PE incorporée dans les liposomes (Schuber & Frisch, 1993). .... 31

Figure 10. Structure chimique de l'acide 3-(2-pyridyldithio)propionique d'hydrazide (PDPH).....	32
Figure 11. Structure du <i>N</i> -[4-(1'-pyrényl)butyl]- <i>N</i> - <i>n</i> -octadécylacrylamide (Py). ....	43
Figure 12. Insertion des copolymères de NIPAM (A) alkylé de façon aléatoire et (B) alkylé en position terminale dans les membranes des liposomes (Leroux <i>et al.</i> , 2000). Reproduit avec la permission d'Elsevier.....	44
Figure 13. Photooxydation d'un diplasménylcholine (A) et d'un plasménylcholine (B) (Gerasimov <i>et al.</i> , 1999).....	49
Figure 14. Formation de défauts structuraux de type micellaire à l'intérieur de la bicouche causée par l'hydrolyse des plasmalogènes. (Gerasimov <i>et al.</i> , 1999).....	50
Figure 15. Photo-isomérisation de la 1,2-(4'- <i>n</i> -butylphényl)azo-4'-( $\gamma$ -phénylbutyroyl)-glycéro-3-phosphatidylcholine (Bis-AzoPC) (Morgan <i>et al.</i> , 1995). ....	51
Figure 16. Photodéprotection de la NVOC-DOPE (Zhang & Smith, 1999).....	52
Figure 17. Structure de la 1,2-bis[10-(2'-hexadiénoyloxy)décanoyl]- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphatidylcholine (bis-SorbPC). ....	53
Figure 18. Endocytose des liposomes sensibles au pH. Suite à leur internalisation, les liposomes sensibles au pH sont destabilisés dans l'endosome et libèrent leur contenu. Les liposomes pourraient aussi fusionner avec la membrane endosomale ou la destabiliser.....	58
Figure 19. Structure du mPEG-DTP-DSPE.....	71
Figure 20. Structure du conjugué PEG-diortho ester-distéaroyl glycérol (POD). ....	72
Figure 21. Géométrie suggérée du complexe issu de l'association des molécules de PC et d'Oalc qui serait similaire à celle de la DOPE (Boggs <i>et al.</i> , 1986).....	75
Figure 22. Hydrolyse du phosphatidyléthanolamine lié à divers groupements <i>N</i> -maléyles. (A) anhydride maléique; (B) anhydride citraconique; (C) anhydride diméthylmaléique; (D) anhydride 3,4,5,6-tétrahydrophthalique et (E) anhydride phtalique (Drummond <i>et al.</i> , 2000). ....	76
Figure 23. Hydrolyse acide d'un diplasménylcholine (Gerasimov <i>et al.</i> , 1999). ....	77

Figure 24. Hydrolyse acide d'un ortho ester de lipide (Zhu <i>et al.</i> 2000).....	79
Figure 25. Structure générale des poly(glycidol)s succinylés (SucPG).....	84

### **Chapitre 3: Steric stabilization of liposomes by pH-responsive *N*-isopropylacrylamide copolymer**

Figure 1. Chemical structure of the terminally-alkylated NIPAM copolymer. ....	95
Figure 2. Phase transition of terminally-alkylated NIPAM copolymers at 37 °C. Closed circles: $M_w=8\ 200$ , $PI=2.2$ ; Empty circles: $M_w=29\ 000$ , $PI=2.0$ .....	99
Figure 3. Measured forces normalized by the curvature radius ( $F/R$ ) between supported heterogeneous bilayers (DPPE/DSPC) across the 29 000 $M_w$ copolymer DODA-poly(NIPAM- <i>co</i> -MAA) solution at a concentration of 5 mg/L with 0.1 M of NaCl at $T=22$ °C. The zero reference distance, $D=0$ , corresponds to the contact of the two bilayer-coated surfaces in water. The forces were measured at pH 5.4 (shaded diamonds) and 7 (open circles). The solid curves to the data are calculated polyelectrolyte-surface interactions using the Eq. 2 with a prefactor of 0.0409 (which includes $s$ ), $N=260$ and for pH 5.4: $f=0.0308$ , $L=3.9$ nm, and for pH 7: $f=0.06015$ , $L=15$ nm. ....	101
Figure 4. Percent HPTS release over time at 37 °C from EPC/Chol liposomes containing 0.3 <i>w/w</i> of NIPAM copolymer at pH 4.9 (closed circles), 5.8 (open circles) and 7.2 (closed triangles) before (A) and after (B) 1h incubation in 75% human serum at 37 °C. Mean $\pm$ S.D. of 3 independent experiments.....	103
Figure 5. Pharmacokinetics of control (open circles) and pH-sensitive (closed circles) EPC/Chol liposomes. Mean $\pm$ S.D. ( $n=6$ ).....	104

## Chapitre 4: Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drug

- Figure 1. Potential intracellular trafficking route of polymer-based pH-sensitive vesicles following receptor-mediated internalization. .... 119
- Figure 2. Variation in the fluorescence spectrum of P(NIPAM<sub>83</sub>-*co*-Gly<sub>16</sub>-*co*-Py<sub>1</sub>) (polymer A) upon their complexation with cationic niosomes.  $\lambda_{exc} = 330$  nm; polymer concentration, 0.002 g/L; total lipid concentration, 0.1 g/L; niosome composition (*w/w*), 75% EO<sub>2</sub>C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>, 20% Chol, 5% DDAB. Adapted from Polozova and Winnik (1999) with permission from the American Chemical Society..... 125
- Figure 3. Change in the ratio  $I_E/I_M$  as a function of the amount of charged surfactant in mixtures of P(NIPAM<sub>83</sub>-*co*-Gly<sub>16</sub>-*co*-Py<sub>1</sub>) (polymer A) with vesicles of different types: EO<sub>2</sub>C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>/Chol/DDAB niosomes (triangles), EO<sub>2</sub>C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>/Chol/DP niosomes (squares) and POPC/DDAB liposomes (circles). Polymer concentration, 0.002 g/L; total lipid concentration, 0.01 g/L; Tris buffer (5 mM) containing 0.15 M NaCl. Reproduced from Polozova and Winnik (1999) with permission from the American Chemical Society..... 126
- Figure 4. Percent HPTS release after 3 min at 37°C from EO<sub>4</sub>C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>/Chol niosomes (3:2 mol/mol) (circles) and POPC/Chol liposomes (3:2 mol/mol) (triangles) incubated with 0.3 (*w/w*) of P(NIPAM<sub>93</sub>-*co*-Gly<sub>5</sub>-*co*-ODAM<sub>2</sub>) (polymer B) as a function of pH (3.0 – 7.0), before (closed symbols) and after (open symbols) 1-h incubation in 75% human serum at 37°C. Adapted from Francis et al. (2001) with permission from the American Chemical Society. .... 128
- Figure 5. Percent HPTS release after 8 min at 37 °C from EPC/Chol liposomes (3:2 mol/mol) at pH 4.9 and 5.8, before (closed bars) and after (open bars) 1-h incubation in 75% human serum. P(NIPAM<sub>90</sub>-*co*-VP<sub>4</sub>-*co*-MAA<sub>2</sub>-*co*-ODA<sub>4</sub>) was either incorporated during liposome preparation (open and shaded bars) or incubated overnight at 4°C with liposomes (black bars). Mean  $\pm$  S.D. (*n* = 3)..... 132

Figure 6. Toxicity of ara-C encapsulated in control (closed circles) and pH-sensitive (open circles) EPC/Chol liposomes (4:1 mol/mol) toward J774 cells. Mean  $\pm$  S.D. (n = 5).  
 ..... 132

### Chapitre 5: On the characterization of pH-sensitive Polymer/liposome complexes

- Figure 1. Phase transition pH of poly(NIPAM-*co*-MAA-*co*-VP-*co*-ODA) at a concentration of 0.025 g L<sup>-1</sup> at 37°C in PBS (53 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 mM NaCl). The data are expressed as % scattered light relative to the maximal recorded value. 149
- Figure 2. DSC thermograms of poly(NIPAM-*co*-MAA-*co*-VP-*co*-ODA) at different pH values..... 151
- Figure 3. Changes in the amide I' band of poly(NIPAM-*co*-MAA-*co*-VP-*co*-ODA) in solution at 30°C (A) and 56°C (B), and pH 7.4. Solid black line: experimental spectra. Grey lines: components obtained from band fitting. Dashed line: residual curve. .... 154
- Figure 4. Increase of relative intensity of the amide I' component located at 1646 cm<sup>-1</sup> of poly(NIPAM-*co*-MAA-*co*-VP-*co*-ODA) in the absence (A) and presence (B) of POPC/Chol multilamellar liposomes as a function of temperature at pH 5.0 (closed triangles), 6.0 (open circles) and 7.4 (closed circles). For comparison, the dashed lines in (B) show the intensity of the amide I' band in the absence of liposomes..... 155
- Figure 5. <sup>2</sup>H-NMR spectra of POPC-d<sub>31</sub>/Chol (left panel) and POPC-d<sub>31</sub>/Chol/poly(NIPAM-*co*-MAA-*co*-VP-*co*-ODA) (right panel). ..... 157
- Figure 6. Percent HPTS release from EPC/Chol liposomes with different NIPAM copolymer/lipid ratios after 8-min incubation at pH 4.9 and 37°C. Liposome size: 160-210 nm (unimodal distribution). Mean  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments..... 159
- Figure 7. Percent HPTS release from EPC/Chol liposomes with a 0.3 (w/w) NIPAM copolymer/lipid ratio after 8-min incubation at 37°C, before (open bars) and after (closed bars) a 1-h incubation in 75% human serum. Liposome size: 160-210 nm (unimodal distribution). Mean  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments..... 159

- Figure 8. Percent HPTS release from pH-sensitive liposomes with a 0.3 (*w/w*) NIPAM copolymer/lipid ratio containing either 3 mol% (open bars) or 6 mol% PEG (closed bars) after 8-min incubation at 37°C before (A), and after (B) a 1-h incubation in 75% human serum. Liposome size: 160-210 nm (unimodal distribution). Mean  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments..... 161
- Figure 9. Pharmacokinetics of non-pH-sensitive liposomes containing 6 mol% PEG (closed circles; n=7); pH-sensitive liposomes containing 6 mol% PEG and 0.3 *w/w* NIPAM copolymer (open circles; n=4); pH-sensitive liposomes containing 3 mol% PEG and 0.3 *w/w* NIPAM copolymer (closed triangles; n=4); pH-sensitive liposomes containing 0.3 *w/w* NIPAM copolymer (open triangles; n=7); and control non-pH-sensitive non-pegylated liposomes (closed squares; n=8). All liposomes were made of EPC/Chol (3:2 molar ratio). Liposome size: 180-230 nm (unimodal distribution). ..... 163

## Chapitre 6: Stimuli-responsive liposome-polymer complexes. Towards the design of intelligent drug carriers

- Figure 1. After receptor-mediated internalization (a), polymer-based, pH-sensitive vesicles are destabilized in the endosome and release their contents (b). Vesicles can also fuse with the endosomal membrane and/or destabilize it (c)..... 172
- Figure 2. Structures of random copolymers P(NIPAM-co-MAA-co-ODA) (A), DODA-P(NIPAM-co-MAA) (B), P(NIPAM-co-Gly-co-ODAM) (C), and P(NIPAM-co-MAA-co-ODA-co-VP) (D)..... 175
- Figure 3. Percent HPTS release from DSPC/Chol liposomes bearing DODA-P(NIPAM<sub>95</sub>-co-MAA<sub>5</sub>) over time at 37°C at pH 7.4 (triangles) and 4.9 (circles). Solid symbols: 200-nm liposomes; empty symbols: 100-nm liposomes..... 179
- Figure 4. Percent HPTS release from 200-nm liposomes bearing DODA-P(NIPAM<sub>95</sub>-co-MAA<sub>5</sub>) over time at 37°C at pH 7.4 (empty triangles), 4.9 (empty circles), 4.6 (solid triangles), and 4.3 (solid circles) after 1-h (37°C) incubation in human serum..... 180

- Figure 5. Representation of the interactions between a cationic niosome and a pH-sensitive, randomly-alkylated NIPAM copolymer (for clarity only half a bilayer is shown and cholesterol has been omitted). Reproduced from Polozova and Winnik (12) with permission from the American Chemical Society..... 184
- Figure 6. Fluorescence micrographs of J774 macrophage-like cells treated with vesicles containing calcein. (A) Naked POPC/Chol liposomes; (B) POPC/Chol liposomes coated with P(NIPAM<sub>90</sub>-co-VP<sub>4</sub>-co-MAA<sub>2</sub>-co-ODA<sub>4</sub>). ..... 185

### Chapitre 7: Serum-stable and long-circulating, PEGylated, pH-sensitive liposomes

- Figure 1. Percent HPTS release from pH-sensitive liposomes with a 0.3 (*w/w*) NIPAM copolymer/lipid ratio containing either no PEG-PE (open bars), PEG(2000)-PE (closed bars) or PEG(5000)-PE (striped bars) after 8-min incubation at 37°C before (A), and after (B) a 1-h incubation in 75% human serum. Liposome size: 115-165 nm. .... 194
- Figure 2. Pharmacokinetics of pH-sensitive liposomes containing PEG(5000)-PE (closed circles; n=5; AUC<sub>0-∞</sub>=74.2±12.5 [%injected dose/g blood]h/mL); pH-sensitive liposomes containing PEG(2000)-PE (open circles; n=5; AUC<sub>0-∞</sub>=44.2±19.5 [%injected dose/g blood]h/mL); pH-sensitive liposomes (closed triangles; n=8; AUC<sub>0-∞</sub>=21.6±6.9 [%injected dose/g blood]h/mL); and control non-pH-sensitive non-PEGylated liposomes (open triangles; n=7; AUC<sub>0-∞</sub>=14.7±5.2 [%injected dose/g blood]h/mL). Liposome size: 100-130 nm..... 196
- Figure 3. Percent injected <sup>67</sup>Ga dose found in different organs 24 h post-injection of the different liposomal formulations. pH-Sensitive liposomes containing PEG(5000)-PE (horizontal stripes); pH-sensitive liposomes containing PEG(2000)-PE (vertical stripes); pH-sensitive liposomes (black bars); and control non-pH-sensitive non-PEGylated liposomes (open bars). ..... 197



## Liste des sigles et abréviations

°C	degré Celcius
5-FU	5-fluorouracile
AA	acide acrylique
AAM	acrylamide
ACCN	<i>1,1'-azobis(cyclohexane carbonitrile)</i>
AlPcS <sub>4</sub> <sup>4-</sup>	tétrasulfonate de phtalocyanine chloroaluminium
APr	acryloylpyrrolidine
ara-C	cytosine arabinofuranoside
ARNm	ARN messenger
AUC <sub>∞</sub>	<i>area under the blood concentration-time curve</i> ; aire sous la courbe concentration-temps
Bchl <sub>a</sub>	bactéριοchlorophylle <i>a</i>
Bis-AzoPC	1,2-(4'- <i>n</i> -butylphényl)azo-4'-(γ-phénylbutyroïl)-glycéro-3-phosphatidylcholine
bis-SorbPC	1,2-bis[10-(2'-hexadiénoyloxy)décanoyl]- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphatidylcholine
cAlPcS <sub>4</sub> <sup>4-</sup>	AlPcS <sub>4</sub> <sup>4-</sup> d'origine commerciale
CAT	chloramphénicol acétyltransférase
CHEMS	hémisuccinate de cholestéryle
Chol	cholestérol
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice d'antigène
DC-Chol	3β-[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamol]-Chol
DDAB	<i>dimethyldioctadecylammonium bromide</i> ; bromure de diméthyldioctadécylammonium
DHC	dihydrocholestérol
DiI	perchlorate de 1,1'-dioctadécyl-3,3',3',3'-tétraméthylindocarbocyanine
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMPC	1,2-dimyristoylphosphatidylcholine
DODA	<i>dioctadecylamine</i>

DODA-501	<i>4,4'-azobis(4-cyano-N,N-dioctadecyl)-pentanamide</i>
DOPE	dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOPG	1,2-dioléoylphosphatidylglycérol
DOTAP	1,2-dioléoyl-3-triammonium propane
DP	<i>dioctadecyl phosphate</i>
DPPC	1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPE	<i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine</i>
DPPIsC	dipalmitoyldiplasménylcholine
DPSG	1,2-dipalmitoylsuccinylglycérol
DPX	<i>p-xylene-bis-pyridinium</i>
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
DSPC	1,2-distéaroylphosphatidylcholine
DSPE-PEG	distéaroylphosphatidyléthanolamine-poly(éthylène glycol)
DSPG	1,2-distéaroylphosphatidylglycérol
DTA	fragment A de la toxine de la diphtérie
DTT	dithiothréitol
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EO <sub>2</sub> C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>	<i>n-octadecyldiethylene oxide</i>
EO <sub>4</sub> C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>	<i>n-octadecyltriethylene oxide</i>
EPC	phosphatidylcholine d'œuf
EPR	<i>enhanced permeability and retention</i> ; perméabilité et rétention accrue
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared</i>
Gly	<i>glycine acrylamide</i>
GM <sub>1</sub>	monoganglioside GM <sub>1</sub>
HA2	peptide de fusion hémagglutinine 2
HDL	lipoprotéines de haute densité
HEPES	<i>N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(-2-ethanesulfonic acid)</i>
H <sub>II</sub>	phase hexagonale inverse

HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)méthacrylate
HPTS	acide 1-hydroxypyrrène-3,6,8-trisulfonique
HS	<i>human serum</i>
HSPC	phosphatidylcholine de soja hydrogénée
i.v.	intraveineux
IgG	immunoglobuline
IMI	structure intermédiaire micellaire inverse
L <sub>β</sub>	phase cristalline
L <sub>α</sub>	phase liquide-cristalline
LCST	<i>lower critical solution temperature</i> ; point de trouble
LMA	leucémie myéloïde aiguë
LTC	lymphocytes T cytotoxiques
LTSL	liposomes de DPPC/MPPC/PEG-PE
LUV	vésicule unilamellaire large
MAA	acide méthacrylique
mAb	anticorps monoclonaux
MDB-PE	<i>N</i> -[4-( <i>p</i> -maléimidophényl)]butyl- phosphatidyléthanolamine
MDR	<i>multi-drug resistance</i> ; résistance pléiotrope
MES	<i>2-N-(morpholino)ethanesulfonic acid</i>
min	minute
MLV	vésicule multilamellaire large
MPPC	monophosphatidylcholine
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide</i>
M <sub>w</sub>	<i>weight-average molecular weight</i>
NDDAM	<i>N,N</i> -didodécylacrylamide
NIPAM	<i>N</i> -isopropylacrylamide
NVOC-DOPE	dérivé photoclivable de la DOPE
OA	acide oléique

OAlc	alcool oléoylique
OAP	acide <i>N</i> -oléoyl-2-aminopalmitique
OAP-sérine	<i>N</i> -( <i>N</i> -oléoyl-2-aminopalmitoyl)sérine
ODA	octadécylacrylamide
ODAm	<i>octadecylacrylamide</i>
ODN	oligonucléotide
pAlPcS <sub>4</sub> <sup>4-</sup>	AlPcS <sub>4</sub> <sup>4-</sup> purifié par chromatographie liquide à haute performance
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	phosphatidylcholine
PDPH	acide 3-(2-pyridyldithio)propionique d'hydrazide
PDP-PE	pyridylthiopropionyl-phosphatidyléthanolamine
PE	phosphatidyléthanolamine
PEAA	poly(acide éthacrylique)
PEG	poly(éthylène glycol)
PEG(2000)-PE	<i>1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-[poly(ethylene glycol)2000]</i>
PEG(5000)-PE	<i>1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-[poly(ethylene glycol)2000]</i>
PEG-PE	<i>1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-[poly(ethylene glycol)2000]</i>
PEI	poly(éthylènimine)
PG	phosphatidylglycérol
PHC	palmytoylcystéine
PI	phosphatidylinositol
PI	<i>polydispersity index</i>
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub>
PlsPamCho	2-palmitoyl- <i>sn</i> -plasménylcholine
PNIPAM	poly( <i>N</i> -isopropylacrylamide)
POD	3,9-diéthyl-3-(distéaroyloxypropyloxy)-9-(méthoxypoly(éthylène glycol)2000-1-yl)-2,4,8,10-tétraoxaspiro[5,5]undécane
POPC	1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -glycérophosphatidylcholine

PPAA	poly( acide propylacrylique)
PS	phosphatidylsérine
Py	<i>N</i> -[4-(1'-pyrényl-butyl)- <i>N</i> - <i>n</i> -octadécylacrylamide
Q <sub>II</sub>	phase cubique inverse
RMN	résonance magnétique nucléaire
SDM	sulfonamide
SFA	<i>surface forces apparatus</i> ; appareil de forces de surface
SMPB	4-( <i>p</i> -maléimidophényl)butyrate de <i>N</i> -succinimidyle
SPDP	3-(2-pyridyldithio)propionate de <i>N</i> -succinimidyle
SPM	système des phagocytes mononucléés
SSL	<i>sterically-stabilized liposomes</i>
Suc-DOPE	<i>N</i> -Succinyldioléoylphosphatidyléthanolamine
SucPG	poly(glycidol) succinylé
SUV	petite vésicule unilamellaire
$t_{1/2}$	temps de demi-vie
T <sub>m</sub>	température de transition L <sub>β</sub> - L <sub>α</sub>
TNF-α	facteur de nécrose tumorale-α
TTSL	liposomes de DPPC/HSPC/Chol/PEG-PE
VP	<i>N</i> -vinyl-2-pyrrolidone

## Remerciements

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance envers mon directeur de recherche, le Dr Jean-Christophe Leroux. Tout d'abord pour sa confiance dès le début, alors qu'il économisait ses revenus de consultation pour m'assurer une bourse. Cette confiance s'est manifestée tout au cours de ces 4 années, où j'ai eu droit en matière de supervision à un parfait équilibre entre encadrement et autonomie. Ensuite, pour cet amour de la recherche, cette flamme créatrice, ce dynamisme contagieux devant quoi nous ne pouvons qu'abdiquer. Évidemment, il me serait impossible de passer outre sa rigueur scientifique et sa compétence exceptionnelle. Et que dire de son efficacité inégalée! Jeune professeur, ses qualités humaines, dont son respect et sa générosité, sont toutes à son honneur. Merci pour tout.

Je tiens à remercier tous les coauteurs de mes articles et collaborateurs, les Drs Michel Lafleur, Pierre Moreau, Catherine Passirani, Jean-Pierre Benoit, Michel Pézolet et Françoise Winnik, ainsi que Mira Francis, Romain Stomp, Émilie Lataste et Stefanie Scheffold. Je remercie également Christine Daigle et Louise Grondin qui m'ont tout appris sur la canulation des rats et le Dr Jean-Louis Brazier pour m'avoir si généreusement démystifié la pharmacocinétique. Les conseils judicieux de Guiseppe Molinaro et du Dr Albert Adam sur les anticorps monoclonaux et les plaisirs gastronomiques furent aussi grandement appréciés.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse. Je suis particulièrement honorée que le Dr Olivier Meyer ait accepté la fonction d'examineur externe. Le Dr Meyer étant l'un des co-inventeurs des liposomes sensibles au pH à base de copolymère de *N*-isopropylacrylamide, je n'aurais pu espérer qu'un plus grand spécialiste dans ce domaine siège dans le jury.

J'aimerais remercier chaleureusement mes collègues de laboratoire, ces membres de la « Secte Leroux™ ». J'ai eu la chance d'évoluer dans un environnement où motivation,

échanges, entraide et amitié étaient au rendez-vous. Je dois avouer que cet agréable cocktail m'a parfois aidé à me tirer du lit lorsque l'appel de la recherche se faisait un peu moins sentir (!). Sachez, mes amis, que vous allez me manquer.

Je remercie particulièrement Marie-Christine Jones et Elvire Fournier d'avoir relu et corrigé cette thèse avec beaucoup d'attention.

Ma famille et mes amis ne resteront pas en reste dans ce flot de remerciements. Ils m'ont entre autre permis d'évoluer dans un monde où la curiosité intellectuelle, sous toutes ses formes, est valorisée. Enfin, je les remercie de m'avoir supportée et encouragée durant les durs et les heureux moments de cette formation.

## Avant-propos

L'efficacité thérapeutique des médicaments anticancéreux peut être limitée par leur faible accumulation sous forme active au niveau du site tumoral. Les agents chimiothérapeutiques témoignent souvent d'un faible indice thérapeutique dû à leur sérieuse toxicité sur les tissus sains. Ceci s'explique notamment par leur important volume de distribution après administration par voie intraveineuse (i.v.). C'est à ce moment qu'intervient le concept de vectorisation des médicaments qui offre le potentiel d'augmenter l'efficacité de ces agents en diminuant leur volume de distribution et, par conséquent, d'atténuer les effets toxiques qui leur sont associés. À cet effet, des vecteurs colloïdaux, tels que les micelles, les nanoparticules et les liposomes, ainsi que des transporteurs macromoléculaires solubles, tels que le poly(*N*-hydroxypropylméthylacrylamide), ont été développés. Leur utilisation confère au principe actif encapsulé ou associé une pharmacocinétique et une biodistribution guidée par les caractéristiques du vecteur. Si aujourd'hui tous ces types de vecteurs font l'objet de recherches intensives, les liposomes ont fait l'objet des tous premiers travaux, il y a plus de 30 ans. Ainsi, trois formulations liposomales d'anthracyclines (doxorubicine et daunorubicine), dont deux de type conventionnel, ont été récemment commercialisées et trouvent leur application dans le traitement de divers types de tumeurs solides.

Les formes liposomales d'agents anticancéreux démontrent toujours un potentiel d'amélioration de leur efficacité thérapeutique, que ce soit par modification de leurs propriétés d'accumulation dans la tumeur ou par modification de leur distribution au sein de cette dernière. Pour atteindre cet objectif, plusieurs stratégies de ciblage des liposomes ont été développées. Le ciblage peut reposer soit sur l'attribution d'une spécificité pour un récepteur par incorporation ou greffage d'un ligand, soit sur l'attribution d'une sensibilité à l'action d'un agent physique, tel que la lumière, la température ou le pH. C'est sur l'exploitation de cette dernière stratégie, c'est-à-dire la mise au point de liposomes sensibles au pH, que s'appuient ces travaux de doctorat et ce, dans l'optique de développer un vecteur permettant d'accroître l'efficacité d'agents anticancéreux. Le premier chapitre



de cette thèse rappelle les caractéristiques générales des liposomes et recense dans la littérature les derniers développements dans la recherche sur les systèmes ciblés.

Au cours de ces travaux de doctorat, l'objectif principal était de concevoir une formulation liposomale sensible au pH, stable dans le sérum, et qui présentait un temps de circulation prolongé suite à son administration par voie intraveineuse. Nous verrons au premier chapitre que ces propriétés sont une condition *sine qua non* à l'obtention d'un système qui soit cliniquement viable. La seconde partie de la thèse présente, dans l'ordre chronologique, les publications issues de ces travaux de doctorat. Trois articles sont publiés, un chapitre de livre est sous-presse et un dernier article est soumis. Enfin, la dernière partie consiste en une discussion générale des résultats obtenus suivie d'une conclusion. Les publications sont présentées selon la séquence suivante:

Roux E., Stomp R., Giasson S., Moreau P. and Leroux J.-C. (2002) Steric stabilization of liposomes by pH-sensitive N-isopropylacrylamide copolymers. *J. Pharm. Sci.*, **91**: 1795-1802.

Roux E., Francis M., Winnik F.M. and Leroux J.-C. (2002) Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drugs. *Int. J. Pharm.*, **242**: 25-36.

Roux E., Lafleur M., Lataste E., Moreau P. and Leroux J.-C. (2002) On the characterization of pH-sensitive liposome/polymer complexes. *Biomacromolecules*, **14**: 240-248.

Roux E., Francis M., Winnik F.M. and Leroux J.-C. (2003) Stimuli-responsive liposome-polymer complexes: Towards the design of intelligent drug carriers. In: Svenson S. (Ed) Carrier based drug delivery. American Chemical Society: Washington, DC. *Sous-Presses*.

Roux E., Passirani C., Scheffold S., Benoit J.-P. and Leroux J.-C. (2003) Serum-stable and long-circulating, PEGylated, pH-sensitive liposomes. *J. Controlled Release*, *Sous-Presses*.

# **CHAPITRE 1**

## **RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

## 1.1. Les systèmes de relargage des médicaments

### 1.1.1. Généralités

La façon dont un médicament est administré est presque aussi importante que le médicament lui-même. La concentration du médicament au site d'action doit être maintenue à un niveau qui procure un bénéfice thérapeutique maximal tout en maintenant la toxicité minimale. Ainsi, lors du développement d'un médicament, il est important de considérer comment acheminer le principe actif à la partie appropriée du corps et, une fois au site désiré, comment le rendre biodisponible.

Un médicament administré extravasculairement doit d'abord être absorbé avant d'atteindre le compartiment sanguin. Il est ensuite distribué vers les tissus et enfin éliminé par excrétion, sous forme chimiquement inchangée ou sous forme de métabolites. D'autre part, après administration intravasculaire (classiquement par voie intraveineuse), seuls les processus de distribution et de d'élimination sont impliqués. Les processus de distribution et d'élimination dépendent essentiellement des propriétés physico-chimiques du médicament, tels que son pKa, son coefficient de partage, son affinité pour les protéines, etc. Ces propriétés étant intrinsèques à la molécule, il apparaît difficile de les modifier. Dans le cas des produits administrés par voie extravasculaire, la modulation de l'absorption du principe actif apparaît une avenue plus réaliste pour influencer le devenir d'un médicament dans l'organisme. Ceci peut être obtenu à l'aide de formes d'administration particulières, soit dites à libération « prolongée » ou « contrôlée » (Benoit *et al.*, 1986).

Traditionnellement, les formes pharmaceutiques vouées à une administration par voie extravasculaire ne démontrent pas une libération contrôlée du principe actif. Ainsi, la concentration plasmatique du principe actif atteint un niveau maximum puis redescend rapidement après chaque administration et peut souvent être au-dessus ou en dessous de sa fenêtre thérapeutique (Figure 1).

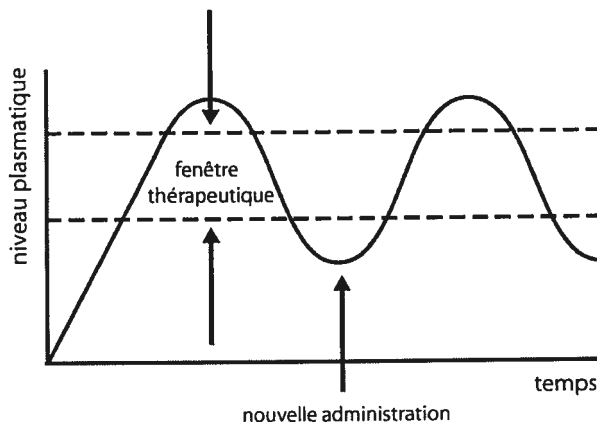


Figure 1. Concentration plasmatique du principe actif administré par voie extravasculaire par une forme pharmaceutique à libération immédiate.

Les systèmes à libération prolongée consistent une amélioration des systèmes traditionnels en ce sens qu'ils procurent une libération soutenue, sans être constante, du principe actif et réduisent ainsi la nécessité de répéter les administrations. Une fois le niveau plasmatique maximum atteint, la quantité de médicament dans le corps diminue lentement ce qui procure un certain délai avant que la concentration en médicament ne tombe sous le niveau thérapeutique (Figure 2). Par exemple, des comprimés de type pelliculé ou matriciel ont été développés à cette effet pour l'administration orale (Ségot-Chicq *et al.*, 1985).

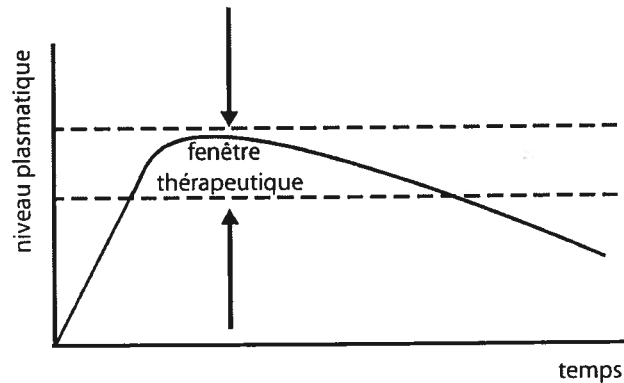


Figure 2. Concentration plasmatique du principe actif administré par voie extravasculaire par un système de libération prolongée des médicaments.

Enfin, les systèmes à libération contrôlée permettent de programmer la vitesse de libération (constante ou non, selon les cas) du principe actif et ce, sans être influencés de façon importante par l'environnement externe. La libération peut ainsi s'effectuer sur d'importantes périodes de temps (Figure 3). Les pompes osmotiques destinées à la voie orale représentent un bon exemple de ce type de système. La modulation de l'absorption et de la biodisponibilité d'un principe actif peut ainsi diminuer les effets secondaires du médicament liés à des concentrations plasmatiques élevées, éliminer les variations importantes de la concentration plasmatique et réduire la fréquence des administrations du médicament.

Afin de modifier le devenir du principe actif, il est aussi possible de moduler sa distribution une fois dans l'organisme. Dans la majorité des cas, les molécules actives se distribuent entre des sites très variés sans spécificité particulière pour la cible visée et peuvent s'accumuler, entre autres, dans des sites où elles exerceront un effet toxique. Un ciblage plus précis du principe actif peut être envisagé pour diminuer sa toxicité et, par

conséquent, augmenter son indice thérapeutique. Divers vecteurs pharmaceutiques exerçant un contrôle sur la distribution des médicaments ont été développés dans cette optique.

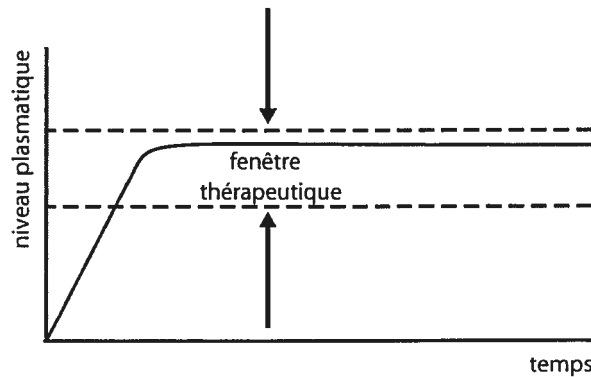


Figure 3. Concentration plasmatique du principe actif administré par voie extravasculaire par un système de libération contrôlée des médicaments.

### 1.1.2. Les vecteurs pharmaceutiques

L'utilisation de vecteurs confère au principe actif qui leur est associé une pharmacocinétique et une biodistribution guidées par les caractéristiques du vecteur plutôt que par celles de la molécule libre. On classe généralement les vecteurs selon qu'ils soient de première, de seconde ou de troisième génération (Benoit *et al.*, 1986). Les vecteurs de première génération sont des systèmes microparticulaires conçus pour demeurer au site d'action. Les microsphères (système matriciel à l'intérieur duquel est dispersé le principe actif) ou et les microcapsules (système formé d'un réservoir contenu à l'intérieur d'une enveloppe de polymère) appartiennent à cette classe. Leur taille varie de 1  $\mu\text{m}$  – 1 mm. Ce type de vecteur, chargé d'un agent anticancéreux, a été utilisé en chimio-embolisation. Les microparticules sont alors injectées dans l'artère en amont de la tumeur où elles iront se loger et exercer une toxicité localisée (Benoit, 1985).

Les vecteurs de deuxième génération sont de taille colloïdale (1  $\mu\text{m}$ ) et comprennent notamment les nanoparticules (Brigger *et al.*, 2002), les émulsions submicroniques, les suspensions colloïdales, les macromolécules solubles (Duncan, 1999) et les liposomes (Drummond *et al.*, 1999). Ils visent à modifier la distribution tissulaire d'un principe actif suite à son injection intraveineuse. De plus, leur association au médicament peut permettre de le protéger contre une dégradation potentielle. Les médicaments peuvent être vectorisés de façon passive, c'est-à-dire guidés uniquement par les propriétés physico-chimiques du vecteur. D'autre part, une vectorisation active peut être exercée, en appliquant par exemple un stimulus local, telle hyperthermie locale, qui favoriserait la déstabilisation du vecteur et la libération de son contenu (Kong & Dewhirst, 1999). Enfin, ces vecteurs colloïdaux sont dits de troisième génération lorsqu'ils sont couplés à des ligands permettant leur reconnaissance par un type particulier de cellules ou de tissus. Ce concept de ciblage actif ainsi que celui de vectorisation passive seront adressés plus en détail dans la section traitant des liposomes et du traitement du cancer.

Les liposomes et les nanoparticules (nanosphères et nanocapsules) comptent parmi les vecteurs colloïdaux ayant fait objet du plus grand nombre d'études. Les liposomes servent généralement à encapsuler des molécules hydrophiles (ou amphiphiles) au sein de leur compartiment aqueux, bien qu'il soit possible de vectoriser des molécules hydrophobes en les solubilisant dans leurs membranes (Figure 4). Les nanoparticules sont plus adaptées à l'administration de médicaments hydrophobes. Dans les deux cas, les vecteurs peuvent s'accumuler préférentiellement dans certains organes ou tissus (*e.g.* tumeurs, foie, rate) et ce, de façon passive. Cette caractéristique avantageuse des vecteurs colloïdaux sera traitée en détail à la section 1.3.1. (*Ciblage passif*). Par ailleurs, tant les liposomes que les nanoparticules peuvent souffrir d'un mauvais contrôle de la libération de leur contenu. En effet, les liposomes démontrent parfois une instabilité dans la circulation sanguine alors que les nanoparticules peuvent présenter une faible rétention du principe actif encapsulé. De plus, une fois au site d'action, la vitesse de libération du médicament à partir du vecteur peut être inadéquate. Plusieurs stratégies propres à chaque type de vecteur ont été explorées

afin d'améliorer leur performance. La section suivante décrit les caractéristiques des liposomes ainsi que les différents systèmes qui ont été développés afin d'améliorer le contrôle de leur libération.

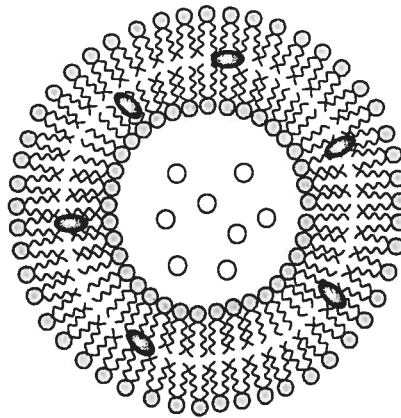


Figure 4. Représentation schématique d'un liposome. (⊗) phospholipide; (○) médicament hydrophile et hydrophobe (◐).

## 1.2. Les liposomes

### 1.2.1. Introduction

Les liposomes sont des vésicules sphériques composées de bicouches lipidiques (généralement des phospholipides) entourant un volume aqueux. Ils peuvent être constitués d'une ou plusieurs membranes concentriques et leur taille varie de 20 nm à plusieurs micromètres. Selon leur taille et le nombre de lamelles qui les constituent, on distingue les vésicules multilamellaires larges (MLV) et petites (SUV) et larges vésicules unilamellaires (LUV).

Suite à l'identification de leur structure en 1965 (Bangham *et al.*, 1965), les liposomes furent d'abord utilisés comme modèles de membranes biologiques. En effet, les membranes biologiques sont constituées de bicouches lipidiques (phospholipides et cholestérol) et, entre-autres, de protéines et de glucides. Les bicouches de lipides possèdent



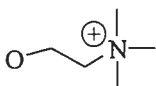
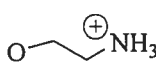
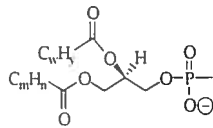
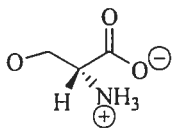
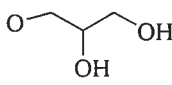
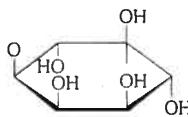
une surface polaire et un cœur non polaire. Ce dernier agit comme une barrière au passage des ions et aux autres entités polaires mais représente un environnement favorable pour les molécules non polaires. Ce n'est qu'au début des années '70 que les liposomes furent envisagés en tant que vecteurs de médicaments par Gregoriadis et Ryman (1972a; 1972b). Leur intention était alors d'administrer une enzyme à des patients. Cette approche thérapeutique comportait plusieurs avantages. D'une part, l'encapsulation de l'enzyme à l'intérieur de membranes lipidique permettait d'éviter le contact direct entre une protéine étrangère et l'hôte. D'autre part, les liposomes étant généralement constitués de substances issues des membranes cellulaires (lipides et cholestérol), ils furent rapidement considérés comme biodégradables, non-toxiques et non-immunogènes (Gregoriadis, 1976).

### **1.2.2. Les lipides**

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire liée par un pont glycérol à une partie hydrophobe, généralement une ou deux chaînes d'acides gras, saturées ou insaturées. Ils comptent parmi les constituants membranaires lipidiques les plus abondants (40 à 80% du poids sec des membranes cellulaires des mammifères). Les seules exceptions sont les tissus neuraux, qui contiennent une portion importante de cérébrosides et de gangliosides, et les chloroplastes des plantes, qui sont enrichis en diacylglycolipides (Thompson, 1980). Le contenu total en phospholipides et la composition des différents types de membrane varient considérablement selon le type de cellule. On classe les différents phospholipides selon la nature de leur tête polaire. Les plus couramment utilisés dans la préparation de liposomes sont les phosphatidylcholines (PC), les phosphatidyléthanolamines (PE), les phosphatidylsérines (PS) et les phosphatidylglycérols (PG) (Tableau 1). Or, il existe plusieurs autres types de phospholipides, tels que les acides phosphatidiques (PA), les phosphatidylinositols (PI), les plasmalogènes de cholines et d'éthanolamines, les lysophosphatidylcholines, les sphingomyélines (céramides) et les diphosphatidylglycérols (cardiolipides), qui entrent dans la composition des tissus des mammifères et qui peuvent également être utilisés dans

la formulation de liposomes. Les phospholipides peuvent être neutres grâce à la présence d'un zwitterion ou chargés négativement, ce qui permet de moduler la charge des liposomes. Pour la production de liposomes cationiques, divers amphiphiles de synthèse peuvent être utilisés, tels que les 1,2-diacyl-3-triammonium propanes ou les 1,2-diacyl-3-diméthylammonium propanes.

Tableau 1. Structure des phospholipides les plus couramment utilisés.

Phosphatidyle	Tête polaire	Nom	Abbréviation	Charge
	OH	Acide phosphatidique	PA	Négative
		Phosphatidylcholine (lécithine)	PC	Neutre
		Phosphatidyléthanolamine	PE	Neutre
		Phosphatidylsérine	PS	Négative
		Phosphatidylglycérol	PG	Négative
		Phosphatidylinositol	PI	Négative

Une grande variété d'acides gras peut constituer la partie hydrophobe des phospholipides décrits, qu'ils soient d'origine naturelle (œuf ou soja) ou synthétique. Les chaînes alkyles ont une longueur qui varie généralement de 8 à 24 atomes de carbone et peuvent contenir jusqu'à 4 liaisons doubles. Contrairement aux phospholipides synthétiques purs, les phospholipides d'origine naturelle ont une composition en acides gras qui consiste en un mélange de chaînes d'hydrocarbures de différentes longueurs et de divers degrés d'insaturation. Presque tous les acides gras naturels possèdent un nombre pair




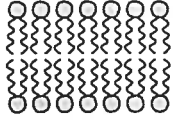

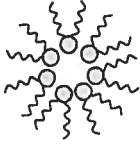

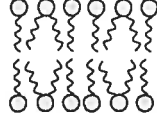
d'atomes de carbone, en raison de leur cycle de synthèse dans le métabolisme. Dans les membranes naturelles, les acides gras les plus fréquemment rencontrés sont les acides palmitique (16 carbones), stéarique (18 carbones) et miristique (14 carbones). Pour ce qui est des lipides insaturés, l'acide oléique (18 carbones et une liaison double) *cis* est le plus abondant. La longueur de la chaîne alkyle et le degré d'insaturation des phospholipides ont une influence importante sur certaines caractéristiques physico-chimiques des liposomes, telles que le polymorphisme et la température de transition de phase

### 1.2.2.1. Polymorphisme des lipides

L'un des rôles fondamentaux des lipides au sein des membranes biologiques est sans contredit le maintien de la structure de cette dernière. Plusieurs phospholipides, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, s'associent en bicouches lorsqu'ils sont hydratés et il est possible d'observer des régions présentant un tel arrangement dans les membranes biologiques. Bien que beaucoup de lipides dispersés en solution aqueuse adoptent un arrangement lamellaire, ceux-ci peuvent s'auto-assembler en une variété de structures différentes. La structure morphologique adoptée par les lipides dépend de leur géométrie moléculaire, tel qu'illustré au Tableau 2 (Israelachvili *et al.*, 1980). Ainsi, les lipides qui possèdent une tête polaire de taille proportionnelle à l'aire de section de leur partie hydrophobe ont une géométrie cylindrique et s'arrangeront en bicouches (cas des PC). Les lipides qui possèdent une tête polaire large en comparaison à l'aire de section de leur partie hydrophobe ont une géométrie en forme de cône et s'assembleront en micelles. Parmi ceux-ci, on retrouve notamment les lysophospholipides qui sont des phospholipides avec une seule chaîne alkyle. Au contraire, les lipides qui ont une petite tête polaire en comparaison à l'aire de section de leur partie hydrophobe adopteront des phases dites « inverses », comme les phases hexagonale inverse ( $H_{II}$ ) (Figure 5) ou cubique. Les PE insaturées, dont la 1,2-dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), font partie de cette dernière classe (dans des conditions physiologiques) et ont été largement étudiées quant à leur comportement de phase (Cullis & de Kruijff, 1978; Lewis *et al.*, 1989; Allen *et al.*, 1990). Divers facteurs

influencent la morphologie adoptée par les lipides. De façon générale, plus le degré d'insaturation des chaînes alkyle est élevé, plus la température de transition lamellaire -  $H_{II}$  est basse. Ainsi, les PE qui contiennent des chaînes saturées de 14 à 18 carbones ont une température de transition supérieure à 100 °C (Gruner *et al.*, 1985). L'ajout d'insaturations dans la chaîne augmente sa largeur et diminue la température de transition de phase. Ainsi, la DOPE, qui contient 1 liaison double *cis*, s'assemble en phase lamellaire à des températures inférieures à 10 °C alors qu'à température plus élevée, elle adopte une phase  $H_{II}$  (Cullis & de Kruijff, 1978). Par ailleurs, l'ionisation de la tête polaire crée une répulsion qui favorise la formation d'une phase lamellaire. Il devient alors possible de contrôler la formation de l'une des phases en ajustant le pH. Ainsi, les PE insaturées s'arrangent en phase lamellaire à  $pH \geq 8,5$  (Gruner *et al.*, 1985). Il a aussi été suggéré qu'à  $pH < 8,5$ , la présence de ponts hydrogène intermoléculaires entre les phosphates et les amines protonées serait à l'origine d'une mauvaise hydratation du lipide, favorisant ainsi la phase  $H_{II}$  (Papahadjopoulos & Miller, 1967). Par contre, l'augmentation du pH entraîne la déprotonation des amines et empêche la formation de ces liens. Il en résulte une augmentation de l'aire moléculaire dans la région polaire du lipide, ce qui permet à la DOPE de s'assembler en une structure lamellaire stable au-dessus de 10 °C. La présence de cations divalents, tels que le calcium et le magnésium, peut toutefois déstabiliser cet arrangement et favoriser le retour vers une structure de type  $H_{II}$  (Allen *et al.*, 1990).

Tableau 2. Polymorphisme des lipides et forme moléculaire dynamique correspondante.

Lipides	Forme	Phase
Détergent lysolipides		 Micellaire
Phosphatidylcholines Phosphatidylsérines Phosphatidylinositols Sphingomyélines	 Cylindrique	 Lamellaire
Phosphatidyléthanolamines (insaturées) Acides phosphatidiques Cardiolipines	 Cône inversé	 Hexagonale inverse
Mélange de phosphatyléthanolamines et de lysophosphatidylcholine		 Lamellaire

L'ajout de 20 mol% ou plus de PC, PS, PI ou de PG à la PE permet aussi de former des liposomes à température et pH physiologiques. Cette stabilisation proviendrait d'une diminution des liens intermoléculaires et d'une augmentation de l'hydratation interfaciale. De même, les membranes de PE peuvent être stabilisées par l'addition d'amphiphiles acides (Litzinger & Huang, 1992). Il a été démontré que les lipides adoptant des phases inverses favoriseraient la fusion des bicouches lipidiques (Hope & Cullis, 1979; Ellens *et al.*, 1985). Cette propriété des PE, et plus particulièrement de la DOPE, en fait les lipides les plus couramment utilisés pour la préparation de liposomes fusogènes sensibles au pH (voir section 4.3.1. *Les liposomes à base de phosphatidyléthanolamines (PE) insaturées*).

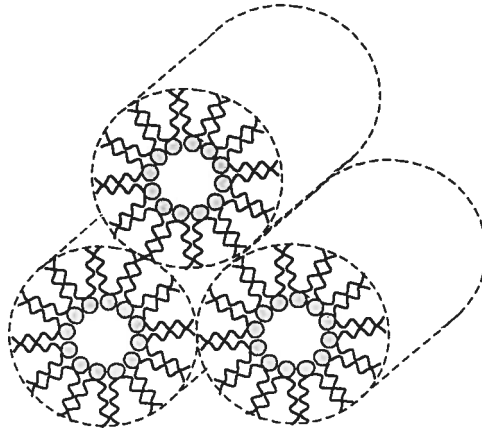


Figure 5. Phospholipides en phase hexagonale inverse ( $H_{II}$ ).

#### 1.2.2.1.1. Polymorphisme et rôles fonctionnels des lipides

Le polymorphisme des lipides augmente considérablement le nombre de rôles fonctionnels que peuvent jouer les lipides au sein des membranes biologiques. En effet, l'existence de phases autres que lamellaire, comme les phases micellaire ou phases hexagonale formant des segments cylindriques, suggère l'implication de ces arrangements dans certaines fonctions membranaires. Ainsi, les rôles structuraux associés au maintien de l'intégrité de la bicouche sont attribués aux lipides tels que les PC et les sphingomyélines, alors que les lipides qui adoptent des arrangements autres qu'en bicouche en présence de  $Ca^{2+}$  ou lorsqu'ils sont isolés seraient impliqués dans les processus requérant des intermédiaires non lamellaires. Ainsi, le phénomène de fusion membranaire (incluant les processus qui y sont reliés tels que l'endocytose et l'exocytose) et les mécanismes de transport transmembranaire (incluant le «flip-flop» des lipides et le transport facilité) font intervenir des lipides qui n'adoptent pas spontanément une structure lamellaire. Le rôle des structures micellaires inverses dans la fusion des membranes sera décrit brièvement à la

section 1.4.3.1. (*Les liposomes à base de phosphatidyléthanoline (PE) insaturées*). Pour plus d'informations sur la relation entre le polymorphisme des lipides et leurs rôles fonctionnels dans les membranes, le lecteur est invité à consulter la revue de littérature de Cullis et Kruijff (1979).

### 1.2.2.2. Thermotropisme des membranes

Selon la température, les membranes de phospholipides peuvent exister en deux phases distinctes, la phase cristalline (gel,  $L_{\beta}$ ) ou la phase liquide-cristalline (fluide,  $L_{\alpha}$ ). En phase cristalline, sous la température de transition  $L_{\beta} - L_{\alpha}$  ( $T_m$ ), les chaînes alkyle sont rigides et alignées les unes contre les autres. Au-dessus de la  $T_m$ , elles deviennent désordonnées et les lipides peuvent rapidement diffuser latéralement dans le plan de la membrane. A basse température, les liens carbone-carbone des chaînes alkyle sont préférentiellement en configuration *trans* alors qu'au-dessus de la  $T_m$ , ces liens peuvent aisément adopter les conformations *trans* et *gauche*. Les chaînes des rotamères *gauches* ont une longueur globale plus courte et occupent une aire moléculaire plus importante que les rotamères *trans*, ce qui a pour effet de réduire l'épaisseur de la membrane. En général, au sein d'une même classe de phospholipides (selon leur tête polaire), plus la chaîne d'hydrocarbure est longue et le degré de saturation élevé, plus la  $T_m$  est élevée. Par exemple, la 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, dont la chaîne alkyle possède 16 carbones) a une  $T_m$  de 41,5 °C alors que la 1,2-distéaroylphosphatidylcholine (DSPC, 18 carbones) a une  $T_m$  de 55 °C. D'autre part, le 1,2-dioléoylphosphatidylglycérol (DOPG, 18 carbones, 1 insaturation) a une  $T_m$  de -18 °C alors que 1,2-distéaroylphosphatidylglycérol (DSPG, 18 carbones) a une  $T_m$  de 55 °C. Il est à noter que les lipides en phase cristalline ne sont pas présents dans les membranes cellulaires des eucaryotes. La plupart des lipides d'origine naturelle sont insaturés ce qui résulte en une température de transition de phase des membranes bien en deçà des valeurs physiologiques. Ainsi, les modèles décrivant les membranes biologiques (développés à partir du modèle de mosaïque fluide énoncé par Singer & Nicolson en 1972) décrivent la bicouche de phospholipides comme une matrice

fluide où les constituants membranaires peuvent diffuser latéralement ou avoir des mouvements de rotation.

Le comportement de phase des membranes de phospholipides a un effet important sur leur perméabilité. Bien que ces membranes constituent une barrière au passage des ions métalliques, la zone de transition de phase se traduit par une augmentation marquée de la perméabilité. Ceci serait dû à la présence de défauts structuraux à l'interface des domaines cristallin et liquide (Papahadjopoulos *et al.*, 1973b). Par ailleurs, la perméabilité aux cations est généralement faible de part et d'autre de la  $T_m$ , quoique légèrement plus importante lorsque la membrane est en phase fluide (Blok *et al.*, 1975). Toutefois, le comportement des solutés de masse moléculaire plus importante est différent. En effet, il a été démontré que la calcéïne, un marqueur fluorescent chargé négativement à pH neutre, était libérée plus rapidement des liposomes de DSPC que de ceux de phosphatidylcholine d'œuf (EPC,  $T_m = -2$  °C) à 37 °C (Allen, 1981). Les systèmes en phase gel présentent un arrangement des cristaux en mosaïque en raison des multiples orientations que peuvent adopter les lipides. Les défauts structuraux aux interfaces des cristaux qui en résultent permettraient une diffusion accrue du matériel encapsulé à travers la bicouche (Lee, 1977; Ruppel & Sackmann, 1983).

#### 1.2.2.2.1. *Effet du cholestérol sur le thermotropisme des membranes*

L'incorporation de cholestérol modifie de façon importante les propriétés des membranes de phospholipides. L'ajout de cholestérol à différentes concentrations produit un équilibre de phases où plusieurs d'entre elles peuvent coexister. Un diagramme de phase théorique a d'abord été établi par Ipsen *et al.* (1987) puis confirmé expérimentalement par Vist et Davis (1990) pour des mélanges de DPPC et de cholestérol (Figure 6). En présence de cholestérol, les bicouches de phospholipides peuvent exister sous 5 phases selon la température et la concentration en cholestérol. Selon que l'on est à basse ou à haute température, il y a, à faible concentration de cholestérol, une phase gel ou une phase fluide.



A concentration intermédiaire en cholestérol, les phases cristalline et fluide contiennent des domaines  $\beta$  riches en cholestérol. Finalement, à forte concentration de cholestérol, il n'y a qu'une seule phase, la phase  $\beta$ , à toutes les températures. Les caractéristiques de la phase  $\beta$  (riche en cholestérol) sont les suivantes: (i) la bicouche a une vitesse de diffusion latérale comparable à celle de la phase fluide; (ii) la réorientation moléculaire axiale est rapide; (iii) les chaînes de phospholipides sont ordonnées. Ainsi, à basse température, la phase  $\beta$  est moins ordonnée que la phase cristalline alors qu'à haute température, la phase  $\beta$  est plus ordonnée que la phase fluide normalement présente en l'absence de cholestérol.

Plusieurs études ont mis en évidence une perméabilité plus faible des membranes de phospholipides en phase  $\beta$  qu'en phase  $L_{\alpha}$  (De Gier *et al.*, 1970; Papahadjopoulos *et al.*, 1973a). Par son effet sur les propriétés structurales des bicouches membranaires, le cholestérol (généralement de 30 à 50 mol%) est nécessaire pour assurer le maintien de l'intégrité des liposomes *in vivo*. En effet, en plus d'augmenter la rétention du principe actif en réduisant la perméabilité membranaire, la présence de cholestérol a une influence considérable sur les interactions des liposomes avec les protéines sériques, tel que décrit à la section suivante.

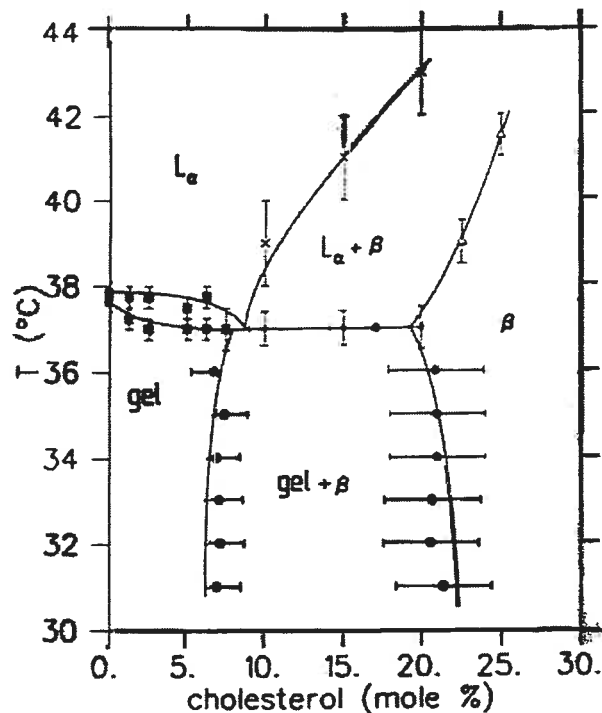


Figure 6. Diagramme de phase des mélanges DPPC/Chol.  $L_{\alpha}$  est la phase liquide-cristalline, « gel » est la phase cristalline et  $\beta$  est la phase riche en cholestérol (Vist & Davis, 1990). Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society.

### 1.2.3. Stabilité des liposomes dans les fluides biologiques

Après administration par la voie i.v., les liposomes sont exposés à des conditions qui influencent grandement leur intégrité et leur longévité. La stabilité des liposomes dans le plasma dépend principalement des interactions avec les différentes protéines présentes. Celles-ci peuvent s'adsorber sur la surface des liposomes ou pénétrer dans la bicouche. Si l'adsorption des protéines a peu d'influence sur la stabilité des liposomes *in vitro*, la pénétration des protéines dans les membranes et l'échange de lipides avec les lipoprotéines de haute densité (HDL) peuvent entraîner la perte de l'intégrité de la membrane et par conséquent, la libération du contenu liposomal (Damen *et al.*, 1980). *In vivo*, outre la déstabilisation des liposomes par ces interactions, l'adsorption de diverses protéines, telles

que les immunoglobulines (IgG), les protéines du complément et les apolipoprotéines, est associée à la reconnaissance des liposomes par les cellules du système des phagocytes mononucléés (SPM) qui conduit à leur élimination (Moghimi & Hunter, 2001).

L'état physique des membranes liposomales joue un rôle déterminant dans les interactions entre les protéines plasmatiques et les liposomes. La fluidité et les défauts structuraux de la membrane la rendent plus susceptible à l'insertion des protéines et au transfert de phospholipides aux HDL. En effet, il a été observé que les liposomes de PC en phase cristalline présentent un taux de transfert de lipides aux HDL beaucoup moins important que les liposomes qui sont en phase fluide et, par conséquent, une libération moins rapide de leur contenu (Allen, 1981). Par ailleurs, la présence de cholestérol peut également avoir une influence sur ces interactions, comme dans le cas des liposomes d'EPC pour lesquels l'ajout de cholestérol réduit de 3 fois l'extraction des lipides par les HDL (Allen, 1981). De plus, le cholestérol augmente la rigidité et l'ordre dans les membranes ce qui retarde la pénétration des protéines dans les bicouches (Senior, 1987). Il a été démontré que les liposomes riches en cholestérol (contenant 50 mol%) incubés dans du sérum avaient une quantité moins importante de protéines associées que les liposomes pauvres en cholestérol (contenant 20 mol%). Cette diminution des interactions avec les protéines a pour effet de réduire la capture des liposomes constitués de lipides ayant une  $T_m$  inférieure à 37 °C par les cellules du SPM (Patel, 1992). L'ajout de cholestérol dans de tels liposomes peut accroître leur stabilité dans les fluides biologiques (Allen, 1981; Senior & Gregoriadis, 1982; Senior, 1987). D'autre part, les formulations qui contiennent du cholestérol montrent une stabilité et des temps de circulation plus importants lorsqu'elles sont constituées de lipides qui ont une  $T_m$  supérieure à 37 °C plutôt que de lipides qui sont fluides à 37 °C. Ceci s'explique par la plus grande rigidité de leurs membranes (Papahadjopoulos *et al.*, 1973a).

La première génération de liposomes, communément appelée liposomes « conventionnels », a été largement étudiée pour la vectorisation d'agents anticancéreux.

tels que le cytosine arabinofuranoside (ara-C) (Kobayashi *et al.*, 1977; Rustum *et al.*, 1979), l'actinomycine D (Hashimoto *et al.*, 1983), la doxorubicine (Rahman *et al.*, 1982) ou le 5-fluorouracile (5-FU) (Joshi *et al.*, 1993). Toutefois, leur aptitude à délivrer le principe actif aux cellules tumorales *in vivo* s'est souvent montrée décevante en raison de leur capture élevée par le foie et rate (Gregoriadis & Ryman, 1972b; Juliano & Stamp, 1975). Il a ensuite été démontré que les cellules du SPM étaient majoritairement responsables de cette capture (Freise *et al.*, 1980; Roerdink *et al.*, 1981). Il existe deux formulations commerciales de liposomes conventionnels pour la vectorisation d'agents anticancéreux, l'EVACET™ (Elan), constitué de liposomes de EPC/Chol (55:45, ratio molaire) chargés en doxorubicine, et le DaunoXome® (Nexstar Pharmaceuticals), constitué de liposomes de DSPC/Chol (2:1) chargés en daunorubicine. La doxorubicine et la daunorubicine sont des agents anticancéreux de la classe des anthracyclines qui agissent en s'intercalant entre l'ADN cellulaire ce qui inhibe les synthèses de l'ARN et de l'ADN. Ces formulations liposomales sont approuvées respectivement pour le traitement du cancer du sein métastatique et du sarcome de Kaposi. Le concept de stabilisation stérique des liposomes, qui a donné lieu au développement d'une seconde génération de liposomes dits furtifs, a ensuite été introduit comme un moyen d'optimiser le temps de circulation des liposomes et constitue une percée importante dans la recherche sur les liposomes.

#### **1.2.4. Les liposomes furtifs**

Le terme « furtif » (Stealth®) s'applique à tous types de liposome ayant un temps de circulation prolongé en comparaison aux liposomes dits « conventionnels ». Ceux-ci sont obtenus par l'ajout de glycolipides ou de polymères hydrophiles. Les premiers liposomes furtifs, mis au point par Allen et Chonn en 1987, ont été obtenus par l'incorporation de monoganglioside GM<sub>1</sub> dans les bicouches. En effet, l'une des différences notables entre les membranes liposomales et les membranes cellulaires est la présence d'une importante quantité de glucides à la surface de ces dernières et, plus particulièrement, de résidus d'acide sialique qui confèrent une charge négative à la surface membranaire. Il a été

démontré que les cellules circulantes étaient capturées plus rapidement par les cellules de Kupffer du foie lorsque l'acide sialique était enlevé de la surface par traitement enzymatique (Greenberg *et al.*, 1979). De la même façon, l'introduction d'acide sialique, sous forme de GM<sub>1</sub>, augmente l'hydrophilie de la surface liposomale et réduit les interactions avec les opsonines sériques qui s'associent préférentiellement aux surfaces hydrophobes (Senior, 1987). Ainsi, suite à leur injection par la voie i.v. chez la souris, ces liposomes présentent un temps de circulation prolongé (Allen & Chonn, 1987), conséquence d'une réduction de leur capture par les cellules du SPM (Allen & Chonn, 1987) et les macrophages dérivés de la moelle épinière (Allen *et al.*, 1991). Par contre, ces liposomes sont rapidement éliminés chez le rat dont le sérum contient des anticorps anti-GM<sub>1</sub> (Liu *et al.*, 1995a; Liu *et al.*, 1995b). Chez l'humain, il est probable que la présence de GM<sub>1</sub> ne pourrait empêcher l'élimination rapide des liposomes, le sérum contenant également de tels anticorps.

La seconde génération de liposomes furtifs contient du poly(éthylène glycol) (PEG) lié de façon covalente à un lipide. L'effet du PEG sur la stabilité des liposomes a fait l'objet de plusieurs études (Klibanov *et al.*, 1990; Lasic *et al.*, 1991; Torchilin *et al.*, 1994). Il a été démontré qu'en plus de l'hydrophilie qu'elles confèrent, les chaînes de PEG ancrées à la surface des liposomes créeraient une zone d'encombrement stérique réduisant l'accès aux protéines sériques, dont les opsonines. La réduction de l'adsorption de ces dernières entraînerait une phagocytose plus faible des liposomes par les macrophages (Patel, 1992). La présence d'une barrière stérique créée par le PEG a été mise en évidence par différentes méthodes, incluant la mesure directe des interactions entre des bicouches de lipides à l'aide d'un appareil de forces de surface (« *surface forces apparatus* », SFA) (Dong & Hoffman, 1991; Efremova *et al.*, 2000). De plus, cette stabilisation stérique pourrait affecter la liaison des protéines fixées aux liposomes à leur récepteur sur les macrophages (Klibanov *et al.*, 1991; Allen, 1994). Enfin, comme le PEG n'empêche pas l'élimination des liposomes par le SPM mais en réduit la vitesse, il a été suggéré que les liposomes furtifs étaient éliminés suite à la perte progressive du PEG à leur surface (Allen, 1994), ou suite à la liaison avec

les opsonines dont la cinétique d'adsorption serait plus lente qu'en absence de PEG (Blume & Cevc, 1993). Ainsi, l'ajout de distéaroylphosphatidyléthanolamine (DSPE)-PEG dans les liposomes de DSPC/Chol (3:2) et de EPC/Chol (2:1) augmente leurs niveaux plasmatiques respectivement de 2 à 2,5 fois et de 7 à 10 fois (Lasic *et al.*, 1991; Woodle *et al.*, 1992). La recherche sur les liposomes furtifs a mené à la commercialisation du Doxil<sup>®</sup> (appelé Caelyx<sup>®</sup> au Canada ; Alza Corporation), constitué de liposomes de HSPC (PC de soja hydrogénée)/Chol/DSPE-PEG (65:39:5) et approuvé pour le traitement du sarcome de Kaposi.

### **1.3. Les liposomes et le traitement du cancer**

L'affinité naturelle des macrophages pour les liposomes a déjà été utilisée pour cibler spécifiquement ces cellules. Cette approche a notamment été exploitée en immunothérapie du cancer (Fidler *et al.*, 1982; Kleinerman *et al.*, 1995). Or, de façon générale, le succès des formulations liposomales anticancéreuses actuellement disponibles repose principalement sur leur capacité à s'accumuler de façon passive au site tumoral.

#### **1.3.1. Ciblage passif**

L'accumulation préférentielle des vecteurs colloïdaux dans les tumeurs résulte de ce qui est communément appelé l'effet EPR (« *enhanced permeability and retention effect* »). Ce phénomène s'explique par la perméabilité accrue de la microvascularisation tumorale et par l'absence de drainage lymphatique efficace au sein du néoplasme (Jain, 1997; Maeda *et al.*, 2000).

Lors du développement néoplasique, le besoin accru en nutriments et en oxygène favorise la croissance des vaisseaux du tissu hôte ainsi que le développement de nouveaux vaisseaux sanguins par angiogénèse. Selon le type de tumeur et sa vitesse de croissance, la vascularisation tumorale peut différer complètement de celle du tissu hôte. Par exemple,

des capillaires continus se retrouveraient au centre de néoplasmes hautement différenciés (Warren, 1968) alors que des capillaires discontinus ont été trouvés dans des néoplasmes mammaires peu différenciés (Vogel, 1965) et des carcinomes rénaux (Warren & Chauvin, 1977). Aussi, les mélanomes et certains sarcomes présentent des canaux non recouverts de cellules endothéliales et qui sont reliés avec des sinusoides ou d'autres vaisseaux. Ces canaux permettent un contact direct entre les globules rouges sanguins et les cellules tumorales (Warren & Shubik, 1966). En plus de ces irrégularités morphologiques potentielles, les capillaires naissants issus du processus angiogénique sont formés de parois minces, ce qui les rend fragiles.

Un certain nombre d'études ont tenté d'établir la taille particulière limite pouvant franchir l'endothélium vasculaire tumoral, notamment avec l'utilisation de liposomes et/ou de sphères de latex. Il a été déterminé que la taille maximale des pores vasculaires des tumeurs LS174T (adénocarcinomes humains du colon) implantées chez la souris était d'environ 500 nm (Yuan *et al.*, 1995). Une étude semblable impliquant plusieurs types de tumeurs (implantation dorsale) a conduit à l'obtention de résultats similaires avec des tailles limites d'extravasation comprises entre 380-780 nm, hormis pour un type tumoral (MCA-IV) où la limite s'est avérée être de 1,2-2  $\mu\text{m}$  (Hobbs *et al.*, 1998). L'environnement de la tumeur a également un effet direct sur sa perméabilité aux colloïdes. En effet, la vascularisation des tumeurs implantées dans le cerveau possède des pores plus petits (100-380 nm) que les tumeurs implantées au niveau dorsal (Siegler *et al.*, 1995; Hobbs *et al.*, 1998).

Bien que l'augmentation de la perméabilité vasculaire puisse permettre l'accès des liposomes aux tumeurs, ceux-ci ont une faible vitesse de diffusion et leur transport se fait majoritairement par convection. Or, le transport par convection dépend du gradient de pression transvasculaire qui est généralement réduit par les conditions physiopathologiques de la tumeur. Bien que la forte pression interstitielle (Stohrer *et al.*, 2000), combinée à l'absence d'un drainage lymphatique adéquat (Leu *et al.*, 2000), résulte en une meilleure

réention des macromolécules au sein de la tumeur (Yuan *et al.*, 1994), elle est paradoxalement aussi responsable de leur accessibilité limitée. En effet, le gradient de pression transvasculaire est pratiquement nul car la pression microvasculaire est à peu près égale à la pression interstitielle (Boucher & Jain, 1992). Ainsi, une fois dans l'environnement de la tumeur, les liposomes sont faiblement distribués à l'intérieur de l'interstice tumoral (Jain, 1990). De plus, les grosses tumeurs présentent une plus forte pression interstitielle que les petites, ce qui prévient l'accès des médicaments au cœur nécrotique et rend celles-ci plus difficiles à traiter (Liu *et al.*, 1995b).

La perméabilité de la vascularisation tumorale justifie l'utilisation des vecteurs colloïdaux tels que les liposomes pour la chimiothérapie des tumeurs solides, permettant ainsi de réduire les effets toxiques du principe actif au niveau des tissus sains. En effet, la doxorubicine libre a un volume de distribution d'environ 25 L/kg alors que son encapsulation dans des liposomes furtifs réduit celui-ci au volume total de sang (~0.075 L/kg), indiquant le confinement du médicament dans la circulation systémique (Drummond *et al.*, 1999). L'utilisation des liposomes est particulièrement prometteuse pour le traitement des tumeurs hautement vascularisées comme le sarcome de Kaposi dont une des caractéristiques principales est une vascularisation abondante et perméable (Cornali *et al.*, 1996). Par exemple, l'utilisation du Doxil<sup>®</sup> permet d'atteindre des taux tumoraux en doxorubicine de 21 fois supérieurs à ceux trouvés dans les tissus sains (source: Alza Corporation, monographie du produit). Par contre, l'efficacité de telles formulations dépend d'un certain nombre d'éléments. La taille de la tumeur est un facteur important car la perméabilité vasculaire des tumeurs augmente avec leur taille et certaines lésions très petites (<1-2 mm) ne sont pas vascularisées (Zhang *et al.*, 1992). Ainsi, les vecteurs colloïdaux nécessitant une extravasation ne seront d'aucune aide, particulièrement dans les cas où la chimiothérapie est administrée comme adjuvant suite à l'exérèse de la tumeur. Comme il a été décrit précédemment, la localisation de la tumeur peut être un facteur affectant sa perméabilité. Bien qu'il ait été démontré que les pores vasculaires des tumeurs du cerveau sont plus petits que ceux des tumeurs situées dans le reste du corps, Siegal *et al.*



(1995) ont montré que des liposomes chargés en doxorubicine pouvaient s'accumuler dans les tumeurs cérébrales.

### 1.3.2. Ciblage actif

La conjugaison de ligands spécifiques à la surface des liposomes peut augmenter l'interaction des liposomes avec certains tissus ou types cellulaires dans le corps. Ces ligands incluent des anticorps ou des fragments d'anticorps ( $F(ab')_2$ , Fab') (Connor *et al.*, 1985; Torchilin, 1994; Park *et al.*, 1997b; Maruyama *et al.*, 1999; Mastrobattista *et al.*, 1999), des vitamines (acide folique) (Wang & Low, 1998), des protéines (Kamps *et al.*, 1997; Singh, 1999), des peptides (Zalipsky *et al.*, 1997) et des glucides (Zalipsky *et al.*, 1997; Nag & Ghosh, 1999; Kawakami *et al.*, 2000). En plus de permettre la liaison des liposomes aux cellules cibles, la fixation du ligand à son récepteur peut promouvoir l'endocytose des liposomes par la cellule, selon le ligand utilisé et le type de cellule visé (Kirpotin *et al.*, 1997; Wang & Low, 1998). Développés il y a plus de 20 ans par Torchilin *et al.* (1979), les immunoliposomes font appel au greffage d'anticorps monoclonaux (mAb) ou de leurs fragments. Ils ont fait l'objet d'une attention importante, principalement pour la vectorisation d'agents utilisés en imagerie médicale (pour une revue, voir Torchilin, 1994) et d'agents anticancéreux. Seule cette dernière application sera discutée dans cette revue.

## 1.4. Les immunoliposomes

Les immunoliposomes peuvent être produits par le couplage d'anticorps complets ou de fragments d'anticorps à des liposomes. Les anticorps ou immunoglobulines (IgG) sont composés de deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères identiques ( $\kappa$  ou  $\lambda$ ) formant une structure en forme de Y stabilisée par des ponts disulfures (Figure 7A). Les extrémités des bras du Y contiennent les régions variables des chaînes lourdes et légères se liant à l'antigène (domaines  $V_H$  de la chaîne lourde et  $V_L$  de la chaîne légère). La base du Y contient la région Fc impliquée dans la fixation de la molécule à des

récepteurs cellulaires et à la fixation du complément. Les régions variables sont composées de sous-régions hypervariables, également appelées déterminants de complémentarité, qui définissent la spécificité et l'affinité de liaison de l'anticorps à l'antigène. La partie variable est unique à chaque immunoglobuline. Les structures des immunoglobulines et des différents fragments qu'il est possible d'utiliser sont illustrées à la figure 7. Les différents types de ligands utilisés en thérapie anticancéreuse sont traités en détail dans un article récent de T.M. Allen (2002).

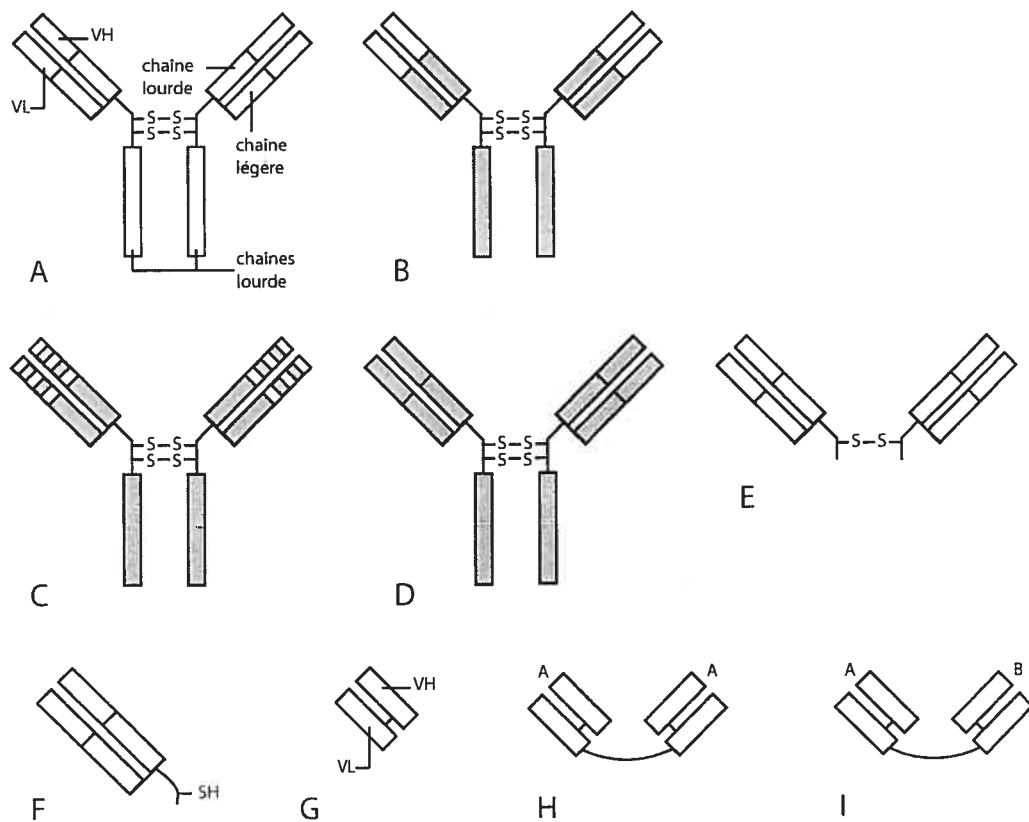


Figure 7. Représentation schématique d'anticorps et de fragments d'anticorps. (A) IgG murin; (B) IgG chimérique; (C) IgG humanisé; (D) IgG humain; (E) F(ab')<sub>2</sub>; (F) Fab'; (G) fragment à chaîne simple scFv; (H) fragment à chaîne simple scFv bivalent; (I) fragment à chaîne simple scFv bivalent recombinant. Les séquences murines et humaines sont respectivement représentées en blanc et en gris.

Les avantages potentiels de l'utilisations des fragments d'anticorps seront décrits dans les sections traitant de l'immunogénicité et de la biodisponibilité des immunoliposomes.

#### **1.4.1. Le couplage des ligands aux liposomes**

Les anticorps ou les fragments d'anticorps peuvent être couplés aux liposomes de façon non-covalente ou covalente. La conjugaison non-covalente des anticorps peut s'effectuer sur des liposomes portant la protéine A (Gray *et al.*, 1988) ou à partir d'anticorps biotinylés liés à des liposomes conjugués à de la streptavidine (Longman *et al.*, 1995). L'importante constante d'affinité du complexe streptavidine-biotine ainsi que la disponibilité d'anticorps biotinylés rend cette dernière approche intéressante. Toutefois, l'introduction à la surface liposomale de protéines additionnelles au ligand, outre l'accroissement de volume qu'elle entraîne, risque également d'augmenter l'immunogénicité du vecteur (Park *et al.*, 1997b). Ainsi, bien que le potentiel thérapeutique de ces immunoliposomes soit déjà démontré (Ahmad *et al.*, 1993), les approches impliquant une conjugaison covalente de l'anticorps à la surface liposomale sont maintenant privilégiées.

Deux stratégies peuvent être utilisées pour effectuer le couplage covalent des anticorps aux liposomes. L'anticorps peut être conjugué soit à un lipide qui sera ensuite employé lors de la préparation des liposomes, soit à la surface de liposomes préformés. La première méthode, peu employée, nécessite la préparation des liposomes dans des conditions qui n'affecteront pas l'intégrité du ligand. Par exemple, les liposomes peuvent être préparés par dialyse de détergent. Cependant, le choix des lipides pouvant être utilisés est restreint et constitue le principal inconvénient de la méthode (Allen *et al.*, 1980). De plus, bien que la conjugaison préalable de l'anticorps à un lipide présente une efficacité de couplage importante, l'incorporation de l'anticorps se fait à la fois dans les feuillettes interne

et externe de la bicouche (Huang *et al.*, 1980). Dans les cas où l'anticorps est conjugué à la surface des liposomes préformés, un lipide possédant une fonction réactive est incorporé aux liposomes pour permettre le couplage avec l'anticorps, lui-même préalablement modifié chimiquement. Le greffage des anticorps aux liposomes de type furtif peut aussi être effectué à l'extrémité du PEG (Figure 8). La position de l'anticorps à la surface aura alors un effet sur les propriétés pharmacocinétiques des liposomes et sur leur capacité à se lier à leur cible, comme il sera décrit plus loin.

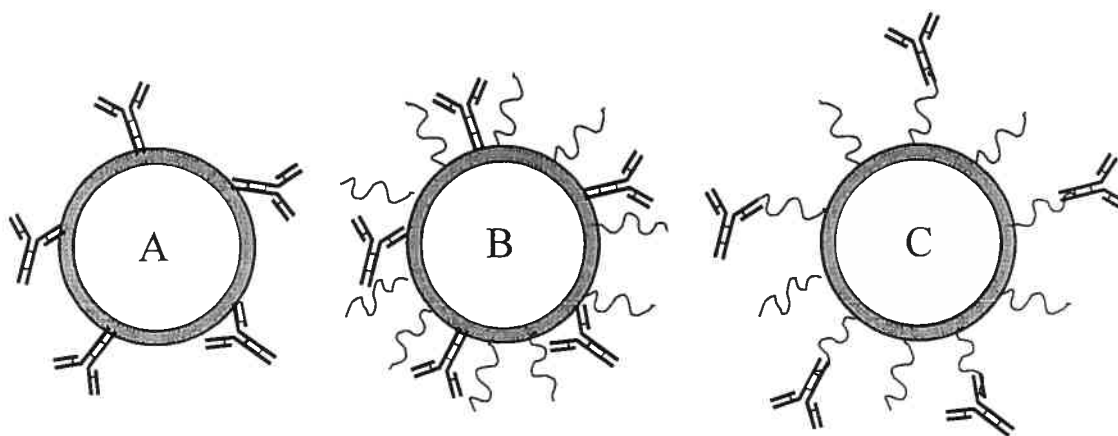


Figure 8. Représentation schématique des différents types d'immunoliposomes portant des anticorps complets. (A) Immunoliposome conventionnel, (B) immunoliposome furtif dont les anticorps sont liés à la membrane lipidique et (C) immunoliposome furtif dont les anticorps sont liés à l'extrémité du PEG.

#### 1.4.1.1. Les groupements réactifs des anticorps et leurs liaisons

Les anticorps possèdent plusieurs groupements amine primaire ( $-NH_2$ ) localisés aux extrémités amine protéiques et sur les chaînes latérales des résidus lysine. Certaines procédures impliquent l'utilisation d'un agent de condensation, tel que le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), qui permet la formation d'un lien amide entre les groupements amine de l'anticorps et un lipide fonctionnalisé avec un acide carboxylique présent dans la membrane liposomale (Endoh *et al.*, 1981). Il est aussi possible d'effectuer

le couplage à l'aide d'un agent homo-bifonctionnel, tel que le glutaraldéhyde, qui permettra de lier l'anticorps à un lipide de PE (Connor *et al.*, 1985). Or, ce type de réaction, en plus d'être inefficace, conduit souvent à l'obtention de mélanges complexes et à la formation de polymères protéiques. Les techniques plus récentes reposent généralement sur l'utilisation de réactifs de couplage hétéro-bifonctionnels, tels que le 4-(*p*-maléimidophényl)butyrate de *N*-succinimidyle (SMPB) ou le 3-(2-pyridyldithio)propionate de *N*-succinimidyle (SPDP), qui permettent d'introduire respectivement une fonction chimique unique, comme un groupement maléimide ou une fonction thiol protégée (Barbet *et al.*, 1981; Hansen *et al.*, 1995). Suite au couplage du ligand avec le SPDP, le thiol est déprotégé pour permettre sa réaction avec une molécule de pyridylthiopropionyl-PE (PDP-PE) ou de *N*-[4-(*p*-maléimidophényl)]butyl-PE (MPB-PE) incorporée dans la membrane liposomale, et ainsi former un lien disulfure ou thioéther. La réaction de thiolation d'un ligand-NH<sub>2</sub> à l'aide du SPDP ainsi que sa conjugaison à un lipide portant un résidu maléimide est illustrée à la Figure 9. Certains inconvénients sont toutefois associés à l'utilisation des amines de l'anticorps pour effectuer la réaction de couplage. En effet, celles-ci étant distribuées sur les fragments Fc et Fab' de l'anticorps, elles peuvent être impliquées dans la reconnaissance de l'antigène, et leur modification comporte le risque d'affecter le site de liaison. De plus, leur large distribution peut aussi entraîner une orientation aléatoire de l'anticorps sur le liposome et augmenter sa clairance, comme il le sera décrit subséquemment (cette dernière considération ne s'applique pas dans le cas de l'utilisation de fragments d'anticorps).

L'introduction de groupements sulfydryles (-SH) sur l'anticorps peut aussi être effectuée par la transformation de l'IgG en fragments Fab'. Cependant, dans certains cas, cette fonction thiol, distale par rapport à la zone de combinaison aux antigènes, ne réagit pas avec la MPB-PE ou la PDP-PE (Leserman *et al.*, 1984). Des fonctions thiols peuvent aussi être générées sur l'anticorps par la réduction des liaisons disulfures que contient la protéine à l'aide du 2-iminothiolane (réactif de Traut) (Thomas *et al.*, 1994a). Ce dernier, qui réagit également avec des fonctions amine des ligands à modifier, requiert souvent des

conditions relativement basiques (pH 9) qui ne sont pas tolérées par la plupart des protéines (Schuber & Frisch, 1993).

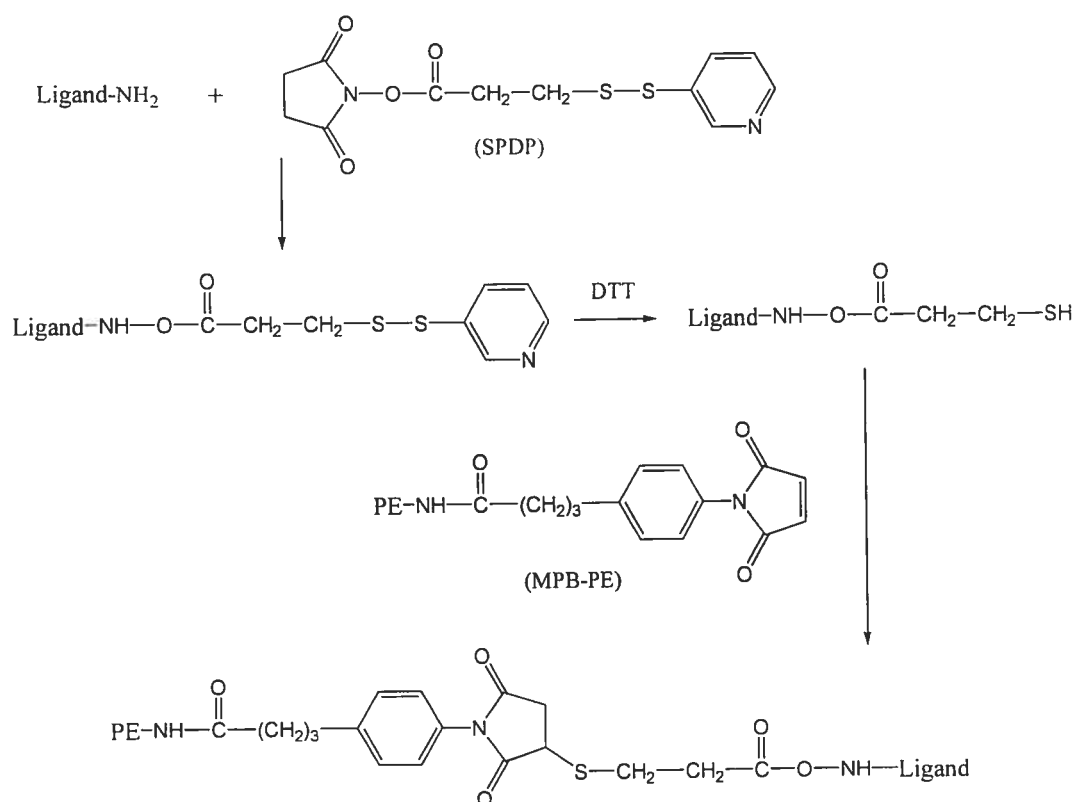


Figure 9. Réaction d'un ligand-NH<sub>2</sub> (anticorps complet ou fragments) avec l'agent de thiolation SPDP. Le pont dithiopyridine est ensuite réduit avec du dithiothréitol (DTT) pour libérer la fonction thiol. Le ligand thiolé est ensuite couplé à la MPB-PE incorporée dans les liposomes (Schuber & Frisch, 1993).

Des groupements aldéhyde (-CHO) peuvent être introduits sur les anticorps par l'oxydation des glucides par le périodate. Les aldéhydes ainsi produits peuvent réagir avec de l'hydrazide-PE (Chua *et al.*, 1984) ou de l'hydrazide-PEG-PE (Harding *et al.*, 1997) incorporés dans les liposomes pour former des liens hydrazone stables. Alternativement, une hydrazone peut être formée avec un réactif de couplage hétéro-bifonctionnel, l'acide 3-

(2-pyridyldithio)propionique d'hydrazide (PDPH, Figure 10) pour permettre la génération d'un thiol protégé qui pourra être couplé à un lipide fonctionnalisé, tel que décrit précédemment (Ansell *et al.*, 1996; Suh *et al.*, 2001). Les glucides étant éloignés du site de liaison à l'antigène, leur réaction ne comporte pas le risque d'affecter l'activité de l'anticorps comme dans le cas des amines ou des liaisons disulfures intrinsèques (Suh *et al.*, 2001). De plus, la fonctionnalisation des glucides permettrait d'orienter les anticorps à la surface des liposomes de manière à réduire la présentation de leur fragment Fc aux cellules phagocytaires (Ansell *et al.*, 1996).

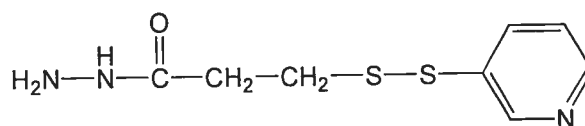


Figure 10. Structure chimique de l'acide 3-(2-pyridyldithio)propionique d'hydrazide (PDPH).

#### 1.4.2. Propriétés des immunoliposomes conventionnels et furtifs

L'ajout d'anticorps aux liposomes de type conventionnel (sans PEG à leur surface; Figure 8, A) accélère leur élimination de la circulation (Derksen *et al.*, 1987; Mastrobattista *et al.*, 1999). Tel que décrit à la section 1.1.5 (*Stabilité des liposomes dans les fluides biologiques*), l'adsorption des IgG sériques à la surface liposomale est associée à la reconnaissance des liposomes par les cellules du SPM et à leur élimination subséquente par phagocytose. En effet, les phagocytes mononucléés expriment des récepteurs pour la fraction Fc des molécules d'IgG (récepteurs FcR, de «*Fc receptor*») (Moghimi & Hunter, 2001). De la même façon, il a été démontré que l'exposition de la portion Fc des immunoliposomes induisait leur reconnaissance et leur phagocytose par les macrophages (Derksen *et al.*, 1987). L'utilisation de fragments d'anticorps permet d'éliminer cette portion Fc mais peut aussi conduire à une perte d'affinité de l'anticorps (Lamarre & Talbot, 1995).

Le temps de circulation des immunoliposomes peut être prolongé par l'ajout de PEG à leur surface. Le couplage de l'anticorps peut alors être effectué soit à la membrane des liposomes soit à l'extrémité du PEG (Figure 8, B et C, respectivement). Dans le premier cas, les techniques de couplage sont les mêmes que celles utilisées lors de la production d'immunoliposomes conventionnels. Toutefois, il est à noter que l'incorporation de plus de 5 mol% de PEG<sub>2000</sub> peut réduire l'efficacité de couplage entre l'anticorps et le liposome. Par ailleurs, la présence de PEG<sub>2000</sub> en quantité inférieure à 2 mol% réduit les réactions de couplage liposome-liposome, sans toutefois affecter la réaction de couplage avec un anticorps thiolé (Harasym *et al.*, 1995). Il a été observé que les chaînes de PEG<sub>5000</sub> pouvaient réduire l'interaction anticorps-antigène. Or, cet effet n'a pas été constaté avec le PEG<sub>2000</sub> (Klibanov *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1991). La présence d'anticorps au niveau de la membrane des liposomes furtifs ne modifie pas de façon significative leurs propriétés pharmacocinétiques (Ahmad *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1991). En effet, il semble que les chaînes de PEG, entre lesquelles est situé l'anticorps, nuisent à la reconnaissance de la portion Fc de l'anticorps et retardent l'opsonisation des liposomes.

La possibilité de voir l'interaction anticorps-antigène réduite par les chaînes de PEG a mené au développement de dérivés lipide-PEG fonctionnalisés permettant le couplage de l'anticorps à l'extrémité du PEG. Par ailleurs, en raison de leur petite taille, les fragments Fab' doivent être conjugués au niveau du PEG. En effet, lorsqu'ils sont couplés à la surface du liposome, les chaînes de PEG sont d'une longueur suffisante pour créer une barrière stérique qui peut empêcher leur interaction avec l'antigène (Park *et al.*, 1995). La pharmacocinétique des liposomes portant le ligand à l'extrémité du PEG est influencée par la densité d'anticorps présents à leur surface (Allen *et al.*, 1995; Maruyama *et al.*, 1997b). Ainsi, une densité d'anticorps inférieure à ~50 µg mAb/µmol phospholipides conduit à une élimination des immunoliposomes légèrement plus rapide qu'en absence d'anticorps. Par contre, une forte concentration d'anticorps (> 1000 µg mAb/µmol phospholipides) entraîne une élimination très rapide des immunoliposomes, avec des demi-vies de l'ordre de quelques minutes (Allen *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'utilisation de fragments Fab' plutôt que



d'anticorps complets résulte en un temps de circulation supérieur des immunoliposomes (Maruyama *et al.*, 1997a).

### 1.4.3. Immunogénicité des immunoliposomes

Les immunoliposomes peuvent induire une réponse immunitaire anti-IgG lorsqu'ils sont injectés à répétition chez l'animal (Phillips & Dahman, 1995; Harding *et al.*, 1997). Harding *et al.* (1997) ont observé que des PEG-immunoliposomes dans lesquels les anticorps étaient couplés aux extrémités du PEG par un lien hydrazide, provoquaient la production d'anticorps spécifiques à la région Fc de l'anticorps conjugué. Toutefois, l'administration de l'IgG sous sa forme libre n'a pas induit de réponse immunitaire. Ceci suggère que la liaison de l'IgG aux liposomes et/ou sa modification chimique augmente ses propriétés immunogènes (Mastrobattista *et al.*, 1999). Par ailleurs, une autre étude a démontré que les conjugués F(ab')<sub>2</sub> étaient plus immunogènes que les liposomes liés à l'anticorps complet (Phillips & Dahman, 1995). Ceci s'expliquerait par le fait que les anticorps endommagés sont éliminés plus rapidement de la circulation (Harasym *et al.*, 1998).

Différentes stratégies de modification de l'anticorps ont été développées afin de réduire leur immunogénicité. Des anticorps chimériques ont été produits, dans lesquels les domaines constants de l'IgG humain sont combinés avec les régions variables de l'anticorps murin par fusion transgénique des gènes d'immunoglobulines (Figure 7B). L'utilisation de ces anticorps réduit la réponse immunitaire de l'hôte mais ne l'élimine pas totalement (Pimm, 1994). Il existe aussi des anticorps dits humanisés qui sont des anticorps humains dans lesquels seules les régions déterminant la complémentarité (CDRs) proviennent d'un anticorps de souris (Figure 7C). Bien que ce procédé réduise ou élimine totalement l'immunogénécité de l'anticorps, il peut aussi affecter la spécificité et l'affinité de l'anticorps murin original. La plupart des immunoliposomes mis au point jusqu'à maintenant utilisent des anticorps de rongeurs, non chimériques ou humanisés. Par ailleurs,

un système d'immunoliposome qui a été largement étudié, les liposomes ciblés contre HER2 (glycoprotéine surexprimée par différents cancers incluant les carcinomes de l'ovaire, du sein et du poumon), utilise un fragment Fab' provenant d'un anticorps humanisé (Park *et al.*, 1995)

L'utilisation de petits fragments d'anticorps a aussi été étudiée afin de réduire la réponse immunitaire. Des fragments à chaîne simple (scFv pour « *single chain Fv* », c'est-à-dire une région V<sub>H</sub> et une région V<sub>L</sub> liées l'une à l'autre par un peptide) (Figure 7G) liés à un lipide (durant leur production par les bactériophages) ont été construits, incorporés dans des liposomes (de Kruif *et al.*, 1996; Laukkanen *et al.*, 1994) et utilisés pour cibler des lymphocytes B (de Kruif *et al.*, 1996). Modifiés de la sorte, ces fragments s'insèrent spontanément dans les membranes de phospholipides. En théorie, l'utilisation de ces fragments pour la préparation d'immunoliposomes présente plusieurs avantages par rapport aux anticorps complets. D'une part, d'importantes banques de fragments scFv sont disponibles et ceux-ci peuvent être produits à grande échelle plus aisément que les fragments complets. D'un point de vue biologique, la petite taille des fragments scFv ainsi que leur origine humaine devraient réduire leur immunogénécité. L'absence de la région constante de l'immunoglobuline préviendrait également leur reconnaissance par les macrophages. Or, l'unique étude *in vivo* impliquant des scFv-immunoliposomes ne démontre pas la supériorité d'un tel système. En effet, Il a été observé que les immunoliposomes de doxorubicine ciblés contre HER2 avaient la même efficacité thérapeutique lorsqu'un fragment Fab' ou scFv était utilisé (Park *et al.*, 2002). Il est à noter qu'il existe des fragments scFv bivalents et bivalents recombinants qui permettent d'avoir plus d'une région de liaison contrairement aux fragments Fab' ou scFv (Figure 7H, I) (Allen, 2002).

#### 1.4.4. Choix de l'anticorps et biodisponibilité du principe actif

Lors de la conception d'immunoliposomes, le choix d'un anticorps approprié est primordial. En effet, la molécule de surface choisie comme cible doit être présente sur toutes les cellules tumorales mais être exprimée à des niveaux plus faibles par les cellules saines. Or, les cellules tumorales sont connues pour l'hétérogénéité de leur phénotype et de leurs antigènes de surface. De plus, dans certains cas, l'expression antigénique est régulée à la baisse selon le cycle cellulaire, l'état de différenciation des cellules cancéreuses ou le traitement de la maladie (Park *et al.*, 1997b; Mastrobattista *et al.*, 1999).

Quelle que soit la cible choisie, il est préférable que la liaison du ligand au récepteur entraîne l'internalisation de l'immunoliposome, car ceci permet d'augmenter la biodisponibilité du principe actif encapsulé. Si cela est évident dans le cas des tumeurs circulantes où une libération extracellulaire du contenu liposomal mènerait à sa dilution immédiate dans le volume sanguin, la localisation de certaines tumeurs solides peut engendrer le même phénomène de dilution. Par exemple, le couplage du fragment Fab' de l'anticorps OV-TL3 dirigé contre l'antigène OA3, qui est présent sur plus de 90% des cellules de carcinome ovarien humain, n'a pu augmenter l'efficacité antitumorale de liposomes chargés en doxorubicine (Vingerhoeds *et al.*, 1996). En fait, bien que l'administration de ces immunoliposomes par la voie intra-péritonéale dans un modèle de xénogreffe ait conduit à la liaison de ~70% de la dose aux cellules tumorales en 30 min, l'internalisation cellulaire des immunoliposomes n'a pu être observée. Ainsi, les résultats obtenus s'expliquent par la fuite du contenu liposomal dans la cavité péritonéale (Mastrobattista *et al.*, 1999; Vingerhoeds *et al.*, 1996). Le choix d'un ligand qui favorise la délivrance intracellulaire des liposomes semble aussi avantageux lorsqu'une dilution du principe actif est exclue. En effet, il a été observé, avec des immunoliposomes ciblés contre HER2, que l'utilisation d'un ligand promouvant l'internalisation des liposomes produisait une augmentation de l'activité antitumorale de la doxorubicine encapsulée dans un modèle de cancer du sein (Kirpotin *et al.*, 1997). Par contre, l'utilisation d'immunoliposomes

préparés avec un ligand qui n'était pas internalisé n'a pas permis cette hausse d'activité (Goren *et al.*, 1996). Or, dans les 2 cas, l'accumulation des immunoliposomes au niveau de la tumeur ne s'est pas avérée plus importante que pour les liposomes furtifs équivalents non-ciblés (Goren *et al.*, 1996; Kirpotin *et al.*, 1997).

Weinstein *et al.* (1987) ont suggéré que la liaison des anticorps à la surface cellulaire pouvait limiter la distribution des immunoliposomes au sein de la tumeur. Selon cette hypothèse, les liposomes furtifs auraient une meilleure pénétration dans les tumeurs solides que les immunoliposomes, qui resteraient confinés à la zone périvasculaire. Ceci expliquerait pourquoi, dans certains cas, les liposomes furtifs ont montré une activité antitumorale plus importante que les immunoliposomes (Allen, 1997). La localisation des immunoliposomes dans l'espace périvasculaire pourrait provenir de leur internalisation, *via* la reconnaissance de leur portion Fc, par les macrophages localisés à cet endroit (Mastrobattista *et al.*, 1999). La démonstration d'une distribution intratumorale des immunoliposomes ciblés contre HER2 par l'intermédiaire d'un fragment Fab' corrobore cette hypothèse (Park *et al.*, 1997a). Ainsi, l'utilisation d'un fragment Fab' plutôt que d'un anticorps complet, outre l'obtention de temps de circulation plus élevés, pourrait permettre une distribution plus importante du principe actif au sein de la tumeur.

Lors de leur administration *i.v.*, l'accumulation des immunoliposomes au site tumoral se ferait donc essentiellement par ciblage passif. Le ciblage actif des immunoliposomes furtifs, par leur conjugaison avec des anticorps ou des fragments d'anticorps, augmenterait l'efficacité thérapeutique d'agents anticancéreux en permettant l'internalisation des liposomes par les cellules tumorales. Ceci pourrait aussi changer la distribution intratumorale des liposomes et ainsi augmenter le nombre de cellules exposées au médicament, bien que cet effet n'ait été observé qu'avec les immunoliposomes ciblés contre HER2 (Park *et al.*, 1997a). De plus, la libération intracellulaire d'agents anticancéreux aurait l'avantage de surmonter la résistance pléiotrope (« *multi-drug resistance* », MDR). La MDR peut être une des causes importantes de l'échec d'une

thérapie anticancéreuse. Ce phénomène est caractérisé par une résistance à une grande variété d'agents anticancéreux. La MDR a été associée à la surexpression de la glycoprotéine P (Pgp) ou de la protéine associée à la MDR (MRP), deux transporteurs moléculaires transmembranaires qui expulsent les médicaments cytotoxiques des cellules tumorales. Par exemple, il a été démontré que les liposomes utilisant le folate comme système de ciblage permettaient de contourner l'action de la Pgp (Goren *et al.*, 2000). Bien que le mécanisme expliquant ces résultats ne soit pas clairement établi, il est présumé que dans ces circonstances, les substrats de la Pgp, n'ayant pas accès à l'environnement de la membrane plasmique, sont reconnus moins efficacement par la Pgp (Huwlyer *et al.*, 2002).

Par ailleurs, une fois les liposomes accumulés au site tumoral par ciblage passif, un accroissement de la biodisponibilité du médicament pourrait aussi être obtenue par l'augmentation de la libération du contenu liposomal. Plusieurs types de liposomes sensibles à un stimulus ont donc été développés à cet effet.

### **1.5. Les liposomes répondant à un stimulus**

Afin d'augmenter la biodisponibilité du contenu liposomal au site visé, des liposomes répondant à des variations de température, de lumière ou de pH ont été conçus. Initialement suggérés en 1978 par Yatvin *et al.*, les liposomes thermosensibles ont fait l'objet de nombreuses études *in vivo*, dont plusieurs ont démontré que de tels systèmes pouvaient augmenter l'efficacité thérapeutique d'agents anticancéreux (Kong & Dewhirst, 1999). De conception plus récente, les liposomes photosensibles n'ont pas encore été étudiés sur des modèles animaux. Contrairement aux liposomes thermo- et photosensibles qui nécessitent l'application d'un stimulus externe, les liposomes sensibles au pH exploitent plutôt les différences de pH inhérentes à l'organisme. Le but visé, dans ce cas, est d'augmenter la biodisponibilité du principe actif en favorisant sa libération au niveau des compartiments intracellulaires acides. Un ciblage actif des liposomes demeure par

contre nécessaire pour favoriser leur internalisation par les cellules. Les liposomes sensibles au pH nécessitent une interaction avec les cellules qui peut être difficile à obtenir dans le cas des tumeurs solides. Ainsi, ils pourraient être mieux adaptés au traitement des tumeurs circulantes qui sont plus accessibles. Proposés il y a plus de 20 ans (Yatvin *et al.*, 1980), les liposomes sensibles au pH n'ont cependant fait l'objet que d'un nombre restreint d'études *in vivo* démontrant leur potentiel thérapeutique.

### **1.5.1. Les liposomes sensibles à la température**

L'application locale de micro-ondes, d'ultrasons ou de fréquences radios permet d'augmenter la température d'une région spécifique du corps. Une hyperthermie locale modérée (41-42 °C) au site tumoral provoque une augmentation du flux sanguin ainsi qu'une augmentation de la perméabilité vasculaire de la tumeur. Ceci permet une extravasation accrue des liposomes, augmentant ainsi l'accumulation préférentielle du principe actif au site tumoral (Huang *et al.*, 1994). La biodisponibilité du principe actif peut aussi être augmentée par un traitement hyperthermique combiné à l'utilisation de liposomes sensibles à la température. Deux types de liposomes sensibles à la température ont été développés, les premiers étant préparés à partir de lipides qui ont une température de transition de quelques degrés supérieure à 37 °C et les seconds, à partir de polymères qui répondent à une variation de température.

#### **1.5.1.1. Les liposomes à base de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)**

Tel que décrit à la section 1.2.2. (*Thermotropisme des membranes*), les liposomes montrent une perméabilité accrue aux températures avoisinant leur transition de phase. L'exploitation de cette propriété en vue de la conception de liposomes sensibles à la température a d'abord été proposée par Yatvin *et al.* (1978) qui ont élaboré des liposomes dont la  $T_m$  est de quelques degrés supérieure à la température physiologique. Bien qu'ayant une température de transition de phase de 41,5 °C, les liposomes de DPPC pur présentent

une libération maximale à 38 °C à cause de la préfusion des lipides situés aux zones limitrophes des grains de la phase cristalline (Mouritsen & Zuckermann, 1987). L'ajout d'un lipide possédant une température de transition plus élevée que la DPPC permet de moduler la  $T_m$  des liposomes. Par exemple, l'incorporation de diverses proportions de DSPC ( $T_m = 55$  °C) au DPPC permet d'obtenir des  $T_m$  comprises entre 41,5 °C et 55 °C. Ainsi, les liposomes de DPPC/DSPC (3:1) libèrent leur contenu entre 42,5 et 44,5 °C alors que la libération à 37 °C est minimale (Yatvin *et al.*, 1978). Afin d'augmenter leur stabilité, du cholestérol (Merlin, 1991; Gaber *et al.*, 1995;) et du PEG (Gaber *et al.*, 1995) ont aussi été ajoutés dans les formulations de liposomes sensibles à la température. Il a été démontré que des liposomes composés de DPPC/HSPC/Chol/PEG-PE (100:50:30:6) pouvaient libérer plus de 60% de leur contenu en doxorubicine en 30 min à 42 °C dans le plasma humain, alors que moins de 10% était libéré en 4h à 37 °C (Gaber *et al.*, 1995). De façon générale, il apparaît que les liposomes sensibles à la température présentent une vitesse de libération de leur contenu plus importante en présence de sérum (Magin & Niesman, 1984; Gaber, 1998), principalement à cause de leurs interactions avec les lipoprotéines (Weinstein *et al.*, 1981). Ce type de liposomes a fait l'objet de plusieurs études sur des modèles tumoraux *in vivo* (pour une revue sur l'hyperthermie et les liposomes, consulter la référence Kong & Dewhirst, 1999).

Plus récemment, des liposomes thermosensibles à base de DPPC et de monophosphatidylcholine (MPPC), le lysolipide correspondant à la DPPC, ont été développés (pour une revue, voir Needham & Dewhirst, 2001). La MPPC, piégée dans la bicouche lorsque celle-ci est en phase cristalline, a tendance à se distribuer dans la phase aqueuse lorsque la température atteint la  $T_m$ , ce qui augmente sa perméabilité. Les liposomes composés de DPPC/MPPC/PEG-PE (90:10:4) (LTSL) démontrent, à 42 °C, une vitesse de libération supérieure à celle des liposomes thermosensibles traditionnels (DPPC/HSPC/Chol/PEG-PE (100:50:30:6); TTSL). Ainsi, les LTSL libèrent 45% de leur contenu en doxorubicine dans les 20 premières secondes d'exposition à 42 °C, alors que 30 min sont nécessaires pour libérer 40% du contenu des TTLS (Needham *et al.*, 2000). De

plus, l'incorporation de 10 mol% de MPPC dans les membranes de DPPC réduit sa  $T_m$  à 40,5 °C et sa température de préfusion à 39-40 °C. L'efficacité de cette formulation liposomale chargée en doxorubicine a été étudiée *in vivo* chez la souris athymique porteuse d'un carcinome sous-cutané de cellules squameuses humaines (FaDu) (Kong *et al.*, 2000; Needham *et al.*, 2000). Les LTSL, combinés avec une hyperthermie locale à 42 °C, se sont montrés significativement plus efficaces que les TTSL ou la doxorubicine libre pour réduire la croissance tumorale. L'accumulation de la doxorubicine dans la tumeur s'est aussi avérée beaucoup plus importante lorsqu'elle était administrée au moyen des LTSL plutôt que des TTSL (Kong *et al.*, 2000). Bien que ces 2 formulations liposomales aient une aptitude similaire à s'extraire du compartiment sanguin, les LTSL disposeraient d'une capacité supérieure à libérer leur contenu dans la vascularisation de la tumeur. En effet, lorsque la zone tumorale est chauffée à 42 °C, la température de la vascularisation tumorale est moindre en raison du flux sanguin, ce qui est insuffisant pour déstabiliser les TTSL. De plus, une concentration intravasculaire élevée en doxorubicine créerait un gradient de concentration qui favoriserait son mouvement vers l'interstice tumoral. Il semble donc que l'aptitude des LTSL à libérer leur contenu à une température inférieure à celle requise par les TTSL en fasse des vecteurs mieux adaptés à des traitements par hyperthermie modérée. En effet, il a été démontré qu'il était cliniquement difficile d'atteindre une température cible qui permettrait la déstabilisation des liposomes thermosensibles traditionnels (Kong & Dewhirst, 1999). Par exemple, lors d'une étude de traitement de tumeurs ovariennes combinant le cisplatine et l'hyperthermie induite par des fréquences radios externes, l'inconfort d'une majorité de patients a limité la puissance pouvant être appliquée, résultant en une température intrapéritonéale médiane atteinte de 40,7 °C alors que la température visée était de 41,5 °C (Leopold *et al.*, 1993).

#### **1.5.1.2. Les complexes liposome/polymère sensibles à la température**

Une seconde approche pour produire des liposomes sensibles à la température consiste à modifier des liposomes conventionnels avec un polymère thermosensible. Parmi



ces polymères, le poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) est certainement le plus étudié (pour une revue, voir Kono, 2001). En solution aqueuse, ce polymère précipite au-dessus de son point de trouble (« *lower critical solution temperature* », LCST), qui est d'environ 32 °C, passant d'une conformation en pelote statistique à une conformation globulaire (Heskins & Guillet, 1968). Il est possible de fixer le PNIPAM à la surface des liposomes en modifiant sa structure de façon à introduire des groupements hydrophobes pouvant s'ancrer dans les bicouches de phospholipides. La première étude a été effectuée par Ringsdorf *et al.* (Ringsdorf *et al.*, 1991), avec le *N*-[4-(1'-pyrényl)butyl]-*N*-*n*-octadécylacrylamide (Py) comme monomère hydrophobe (0,5 mol%) (Figure 11). Le groupement pyrényle qu'il contient permet d'observer les changements conformationnels du polymère par spectroscopie de fluorescence. En effet, le pyrène possède des spectres d'émission différents selon qu'il est isolé (monomère) ou qu'il est, dans son état excité, à proximité d'un pyrène dans son état d'énergie fondamentale. L'excimère ainsi formé présente une large bande d'émission centrée à 485 nm, différente de l'émission structurée du monomère qui est de plus haute énergie. En solution, le PNIPAM marqué au pyrène produit une forte émission associée à l'excimère, indiquant l'existence de microdomaines concentrés en pyrène. L'ajout de liposomes au polymère a pour effet de diminuer considérablement l'émission de l'excimère en raison de l'insertion des groupements octadécyle/pyrène dans les membranes. De plus, la précipitation du PNIPAM lors du chauffage des complexes au-dessus de la LCST du polymère force le rapprochement des ancrages hydrophobes par diffusion latérale dans la bicouche, menant à une augmentation de l'émission de l'excimère. Lorsque les bicouches sont en phase liquide-cristalline, une contraction et une expansion thermoréversibles du polymère sont observées de part et d'autre de la LCST (Ringsdorf *et al.*, 1991).

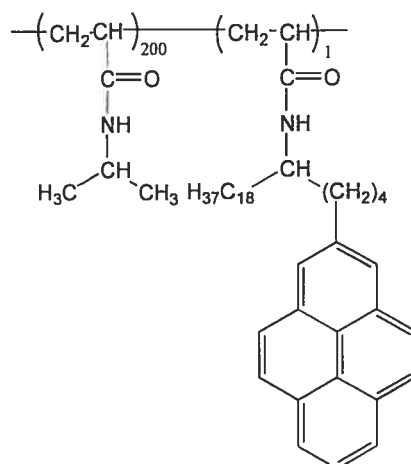


Figure 11. Structure du *N*-[4-(1'-pyrényl)butyl]-*N*-*n*-octadécylacrylamide (Py).

Selon le mode de synthèse, il est possible de contrôler la position des ancrs hydrophobes au sein de la chaîne polymère. L'incorporation statistique, dans la structure du polymère, de monomères hydrophobes contenant de longues chaînes alkyle, tel que le *N*-[4-(1'-pyrényl)butyl]-*N*-*n*-octadécylacrylamide (Ringsdorf *et al.*, 1991), le *N,N*-didodécylacrylamide (NDDAM) (Kono *et al.*, 1999b) ou l'octadécylacrylamide (ODA) (Kono *et al.*, 1994a), donne lieu à une distribution aléatoire des ancrs au sein de la chaîne polymère. Il est à noter que, de façon générale, l'incorporation de monomères hydrophobes dans les chaînes de PNIPAM réduit sa LCST (Ringsdorf *et al.*, 1991; Hayashi *et al.*, 1999). L'ancre hydrophobe peut également être positionnée à l'extrémité du polymère, lorsqu'un initiateur radicalaire (Winnik *et al.*, 1995) ou un agent de transfert de chaînes lipophiles (Kitano *et al.*, 1994; Yamazaki *et al.*, 1998) est utilisé lors de la synthèse. Il est aussi possible de conjuguer un groupement hydrophobe à du PNIPAM qui aurait été synthétisé de façon à avoir, à son extrémité, une fonction amine réactive (Kono *et al.*, 1999d). En théorie, les polymères alkylés en position terminale, lorsqu'ils sont ancrés à la surface des liposomes, devraient avoir une plus grande liberté conformationnelle que les polymères alkylés de façon aléatoire, qui s'ancrent en plusieurs points dans la membrane (Yakushiji *et al.*, 1998) (Figure 12). L'effet de la position de l'ancre hydrophobe sur l'association du

PNIPAM à des liposomes a été étudié en utilisant le pyrène comme sonde fluorescente. Il a été ainsi observé que, lorsqu'il est incubé avec les vésicules, le PNIPAM alkylé en position terminale avait une constante de liaison plus grande que son équivalent alkylé de façon aléatoire (Polozova *et al.*, 1999). Par contre, les polymères utilisés dans cette étude présentaient d'importantes différences quant à leur masse molaire et au nombre de groupements hydrophobes par unité de monomère, ce qui peut aussi expliquer ce résultat (Kono *et al.*, 1999d).

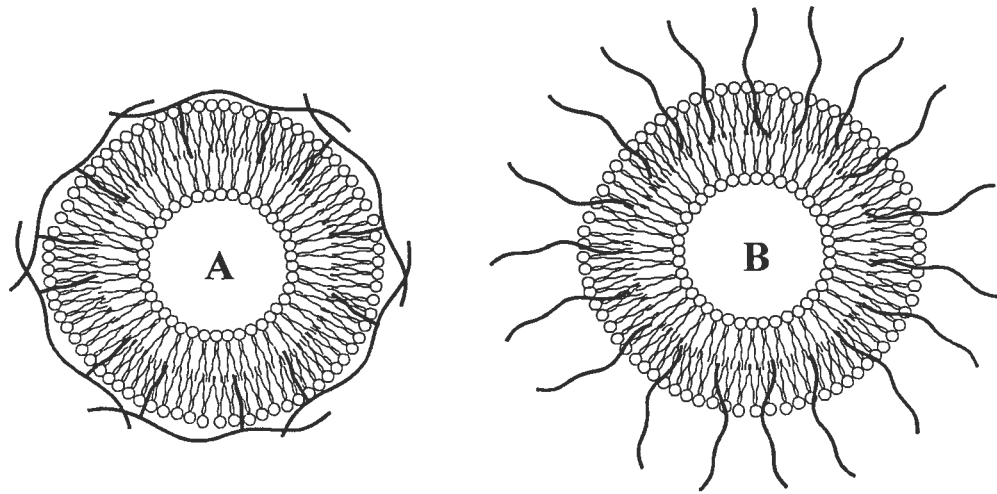


Figure 12. Insertion des copolymères de NIPAM (A) alkylé de façon aléatoire et (B) alkylé en position terminale dans les membranes des liposomes (Leroux *et al.*, 2000). Reproduit avec la permission d'Elsevier.

La capacité des polymères de NIPAM à déstabiliser les membranes des liposomes afin d'obtenir une libération de leur contenu a principalement été étudiée par le groupe de Kono (Kono *et al.*, 1994a; Hayashi *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 1999; Kono *et al.*, 1999b; Kono, 2001; Kono *et al.*, 2002). Il a été démontré que les liposomes de DPPC libéraient leur contenu de façon plus importante à la température correspondant à leur transition de phase lorsqu'un copolymère de NIPAM/ODA était ancré à leur surface (Kono *et al.*, 1994a). La création de défauts structuraux associés à la transition de phase de la membrane

serait accentuée par le polymère qui est alors à une température supérieure à la LCST (27 °C). Toutefois, à 20 °C, soit sous la LCST du polymère, la libération du contenu liposomal est minimale. Ce même polymère promeut également, à température élevée, la libération de carboxyfluorescéine encapsulée dans des liposomes d'EPC. Par contre, il ne peut induire la libération d'un marqueur fluorescent de taille plus importante, la calcéine, de liposomes de même composition. Ceci suggère qu'au-dessus de la LCST, le polymère induit des défauts structuraux dans les membranes sans détruire les liposomes (Kono *et al.*, 1994a). Toutefois, l'incorporation dans la formulation liposomale d'un polymère similaire, le P(NIPAM-co-NDDAM), durant la préparation des liposomes plutôt que par incubation avec les vésicules préformées, permet d'obtenir une libération de la calcéine des liposomes d'EPC au-dessus de la LCST du polymère (Kono *et al.*, 1999b). Cette méthode d'incorporation du polymère permettrait de fixer le polymère des 2 côtés de la membrane et ainsi, de déstabiliser les 2 feuillettes de la membranes. Dans le premier cas, seul le feuillet externe de la membrane serait déstabilisé, ce qui ne serait pas suffisant pour permettre la libération de la calcéine encapsulée.

Les caractéristiques de libération des liposomes modifiés avec du PNIPAM peuvent être modulées par leur composition. Ainsi, l'ajout d'une quantité croissante de DOPE dans des liposomes d'EPC augmente leur sensibilité à la température. Il a été suggéré que la présence de ponts hydrogène entre le polymère et les groupements de tête des molécules de PE résultait en une plus grande affinité du polymère pour les liposomes (Kono *et al.*, 1999b). De plus, les liposomes constitués uniquement de DOPE peuvent être stabilisés à température ambiante par l'ajout de P(NIPAM-co-ODA), alors que la précipitation du polymère suite à l'augmentation de la température promeut la formation d'une phase hexagonale II et la libération entière du contenu liposomal (Hayashi *et al.*, 1996; Kono *et al.*, 1999b). Sous la LCST, lorsqu'il est hydraté, le copolymère de NIPAM préviendrait le rapprochement entre les liposomes alors qu'au-dessus de la LCST, sa conformation globulaire permettrait le contact nécessaire à la formation de la phase la plus stable thermodynamiquement.

Afin d'obtenir une libération du contenu liposomal à des températures légèrement au-dessus de la température physiologique, la LCST des polymères de NIPAM peut être modifiée par sa copolymérisation avec divers monomères hydrophiles, tels que l'acide acrylique (AA) (Kim *et al.*, 1997) ou l'acrylamide (AAM) (Hayashi *et al.*, 1999). L'introduction de 10 mol% d'AAM dans un polymère de NIPAM permet d'obtenir un copolymère dont le point de trouble se situe à 39 °C. D'autre part, l'ajout de NDDAM (1 mol%) entraîne une réduction de sa LCST à 33,8 °C. Néanmoins, une fois complexé aux liposomes, ce copolymère de NIPAM/AAM/NDDAM induit la libération de leur contenu autour de 39 °C. Il semble donc que, lorsqu'ils sont insérés dans la membrane des liposomes, les segments alkyle ont peu d'influence sur la transition de phase de la chaîne principale du copolymère (Hayashi *et al.*, 1999).

Une autre approche pour contrôler la LCST des polymères de NIPAM consiste à ajouter un autre monomère dont l'homopolymère est aussi thermosensible. L'acryloylpyrrolidine (APr), dont l'homopolymère possède une LCST de 50 °C, a été utilisé pour produire le P(NIPAM-*co*-APr) (28:72 ratio molaire) qui a une LCST de 38 °C (Kono *et al.*, 1999d; Kono *et al.*, 2002). Lorsqu'il est ancré à la surface de liposomes de DOPE *via* un groupement didodécyle (2C<sub>12</sub>) attaché à son extrémité, ce copolymère induit la déstabilisation des liposomes de DOPE vers 36-38 °C. De plus, la stabilité de la formulation peut être accrue sous la LCST du copolymère par l'incorporation de PEG(550)-2C<sub>12</sub>. Ce dernier formerait des ponts hydrogène avec les segments déshydratés du copolymère, ce qui préviendrait leur interaction avec les membranes. La présence de PEG(550)-2C<sub>12</sub> dans la formulation permet aussi le maintien des propriétés de libération des complexes liposome/P(NIPAM-*co*-APr) dans le sérum. En son absence, celles-ci sont grandement réduites en raison de l'adsorption de protéines sériques qui stabiliserait la DOPE en phase lamellaire (Kono *et al.*, 2002).

#### 1.5.1.2.1. Les propriétés de surface des complexes liposome/polymère sensibles à la température

Les changements de conformation des polymères sensibles à la température permettent de moduler les propriétés de surface des liposomes. Par exemple, les liposomes cationiques recouverts de poly(APr) voient leur potentiel zêta réduit à une valeur presque nulle sous la LCST, ce qui limite leur interaction avec des liposomes chargés négativement. Par contre, au-dessus de cette température, une augmentation considérable du potentiel zêta leur permet d'interagir avec des liposomes de charge opposée (Kono *et al.*, 1999a).

Il a été démontré que le PNIPAM alkylé en position terminale pouvait réduire l'adsorption de protéines sériques sur des liposomes de 1,2-dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) sous la LCST, alors que cette barrière stérique n'était plus effective au-delà de cette température (Yamazaki *et al.*, 1999). De la même façon, l'interaction des liposomes avec les cellules peut être contrôlée par l'emploi de P(NIPAM-co-APr). Sous la LCST du copolymère, la capture des liposomes d'EPC par des fibroblastes rénaux de singe (CV-1) est légèrement réduite. Toutefois, à des températures supérieures à la LCST, la phagocytose est 2 fois plus importante que celle des liposomes non modifiés (Kono *et al.*, 1999c). Il a aussi été démontré qu'au-dessus de la LCST, les plaquettes sanguines adhéraient à la surface de pétris de culture en polystyrène recouverts de PNIPAM; en dessous de celle-ci, l'adhésion plaquettaire était inhibée de façon comparable à l'inhibition obtenue dans le cas des surfaces recouvertes de PEG (Uchida *et al.*, 2000). Les propriétés de conformation du PNIPAM (pelote statistique vs globule) ont été exploitées dans le développement de surfaces intelligentes destinées à la culture cellulaire qui répondent à des changements de température (Okano *et al.*, 1995).

À des températures inférieures à la LCST, les polymères thermosensibles, et plus particulièrement le PNIPAM, procurent une barrière stérique qui pourrait s'avérer efficace pour la protection des liposomes en milieu biologique. Bien qu'aucune étude *in vivo* n'ait

été conduite jusqu'à maintenant, il est possible que ces polymères puissent conférer une certaine furtivité aux liposomes en réduisant la cinétique d'adsorption des protéines sériques et de capture par le SPM.

## 1.5.2. Les liposomes photosensibles

L'activation par la lumière est une autre approche pour contrôler la vitesse de libération du contenu des liposomes au niveau de leur site d'action. La lumière est alors utilisée comme source d'énergie pour initier une réaction chimique des lipides ou induire leur isomérisation. Ces transformations ont pour but de déstabiliser les liposomes et de provoquer la libération de leur contenu au site désiré à une vitesse accrue.

### 1.5.2.1. Les plasmalogènes labiles

Thompson et ses collaborateurs ont décrit la synthèse de plasmalogènes, qui sont des phospholipides contenant un lien *O*-1'-alcényle sur la chaîne de glycérol (Anderson & Thompson, 1992; Thompson *et al.*, 1996; Gerasimov *et al.*, 1997). Les plasménylcholines et les diplasménylcholines appartiennent à cette classe. Les premiers sont caractérisés par une chaîne unique *O*-1'-*Z*-alcényle à la position *sn*-1 du glycérol et une tête 3-phosphatidylcholine, alors que les seconds sont modifiés aux positions *sn*-1 et *sn*-2 du glycérol. Les plasmalogènes peuvent être clivés par photo-oxydation du lien *O*-1'-*Z*-alcényle des lipides par un intermédiaire 1,2-dioxétane putatif qui produit des surfactifs à chaîne unique, soit une lysophosphatidylcholine et un aldéhyde gras dans le cas de la plasménylcholine ou 2 aldéhydes gras dans le cas de la diplasménylcholine (Figure 13). Cette réaction de dégradation induit la formation de défauts structuraux de type micellaire à l'intérieur de la bicouche, résultant en une perméabilité accrue de la membrane pour les solutés encapsulés (Figure 14). L'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) nécessaire à l'oxydation de ce lien peut être généré par l'utilisation de bactériochlorophylle *a* (Bchl*a*), un sensibilisant soluble dans les membranes, qui est excité à une longueur d'onde de 780 nm. La vitesse de

libération du contenu des liposomes de Bchl $a$ /2-palmitoyl-*sn*-plasménylcholine (PlsPamCho) dépend de l'intensité de la lumière, de la concentration en oxygène présente et de l'absence d'extincteurs d'oxygène singulet (Thompson *et al.*, 1996). Ce type de liposomes a été étudié pour la libération de Ca $^{2+}$  dans l'optique de développer un système agissant en cascade (Wymer *et al.*, 1998). La photolibération de Ca $^{2+}$  contenu dans des liposomes de Bchl $a$ /dipalmitoyldiplasménylcholine (DPPlsC) peut être utilisée pour réguler l'activité d'une enzyme dépendante du calcium, comme la phospholipase A $_2$  (PLA $_2$ ). Une fois activée, cette dernière peut hydrolyser une seconde population de liposomes (DPPC) et provoquer la libération de leur contenu. Bien que cette approche soit intéressante d'un point de vue fondamental, l'innocuité de la PLA $_2$  dans un système biomédical est à questionner, et la complexité de ce système est importante.

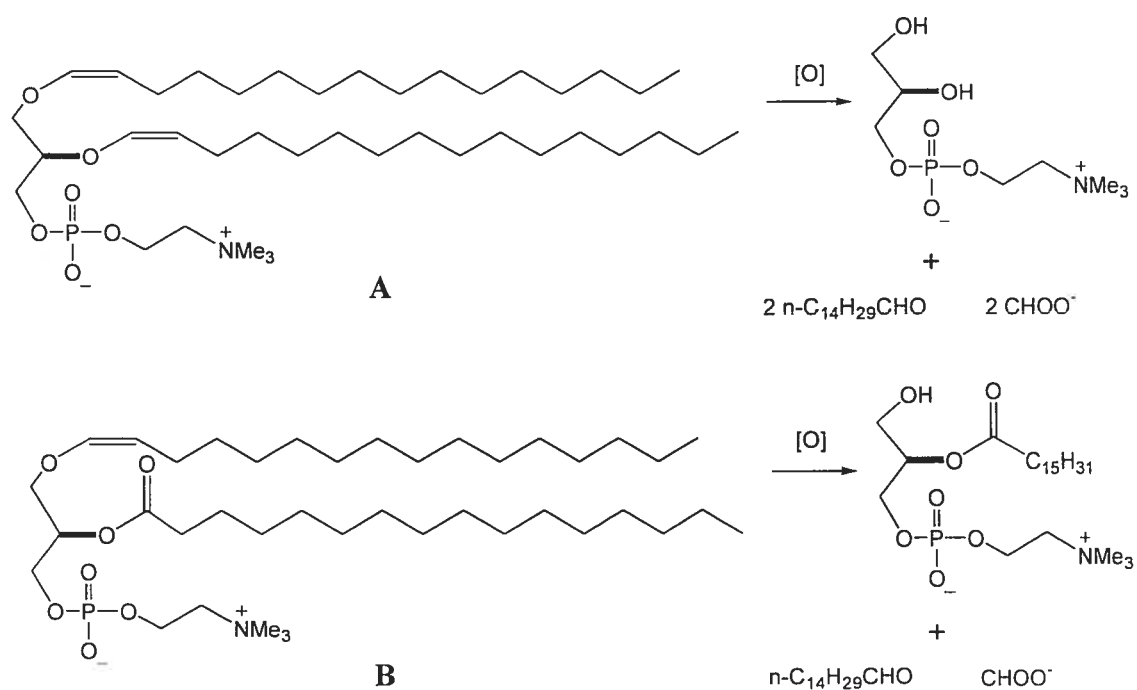


Figure 13. Photooxydation d'un diplasménylcholine (A) et d'un plasménylcholine (B) (Gerasimov *et al.*, 1999).





Figure 14. Formation de défauts structuraux de type micellaire à l'intérieur de la bicouche causée par l'hydrolyse des plasmalogènes. (Gerasimov *et al.*, 1999).

### 1.5.2.2. Les lipides photo-isomérisables

Morgan et ses collaborateurs (Morgan *et al.*, 1987; Morgan *et al.*, 1995; Bisby *et al.*, 1999a; Bisby *et al.*, 1999b; Bisby *et al.*, 2000a; Bisby *et al.*, 2000b) ont montré que la photo-isomérisation de la 1,2-(4'-*n*-butylphényl)azo-4'-( $\gamma$ -phénylbutyroïl)-glycéro-3-phosphatidylcholine (Bis-AzoPC) pouvait déstabiliser les membranes liposomales (Figure 15). En effet, la forme *trans* du Bis-AzoPC est la plus stable d'un point de vue thermodynamique et sa géométrie permet son insertion dans les bicouches de phospholipides. L'exposition de cette molécule à la lumière UV ou alternativement, à la lumière visible combinée à la chaleur, fait passer la molécule dans un état photostationnaire dominé par l'isomère *cis*. Ceci a pour effet de créer des défauts structuraux dans la membrane des liposomes et ainsi de permettre la libération du matériel encapsulé. Seules les formulations constituées de lipides en phase gel sont déstabilisées par cette isomérisation, les liposomes en phase liquide-cristalline ayant une fluidité adéquate pour s'adapter à ce changement de conformation. Il a été démontré que la vitesse de libération du contenu liposomal augmentait avec la température et avec la quantité de Bis-AzoPC ajoutée aux liposomes, alors qu'elle diminuait avec la longueur des chaînes des lipides utilisés (Bisby *et al.*, 1999a). De plus, la présence de cholestérol dans les membranes de DPPC/Bis-AzoPC permet d'augmenter la vitesse de libération du contenu liposomal par photolyse. Il a été suggéré que le cholestérol favorise une séparation de phase latérale qui permettrait l'agrégation des lipides sensibilisants à l'intérieur de la bicouche, causant des discontinuités dans l'arrangement des chaînes acyle (Bisby *et al.*, 1999b).

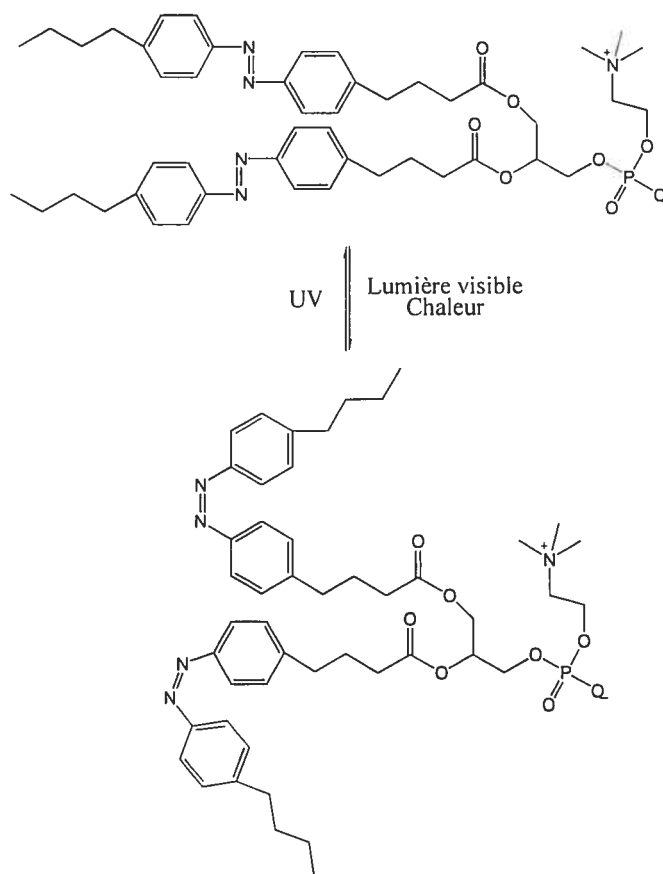


Figure 15. Photo-isomérisation de la 1,2-(4'-*n*-butylphényl)azo-4'-( $\gamma$ -phénylbutyroyl)-glycéro-3-phosphatidylcholine (Bis-AzoPC) (Morgan *et al.*, 1995).

### 1.5.2.3. La photodéprotection des phosphatidyléthanolamines

Zhang et Smith (Zhang & Smith, 1999) ont synthétisé un dérivé photoclivable de la DOPE par réaction avec le chlorure de 6-nitrovératryloxy-carbonyl, la NVOC-DOPE. Bien que la DOPE adopte un arrangement hexagonal inverse dans des conditions physiologiques, la NVOC-DOPE peut s'associer en bicouches. L'illumination de ce dérivé avec une lampe au xénon à une longueur d'onde supérieure à 300 nm provoque sa lyse et sa conversion en DOPE (Figure 16). Les liposomes sont ainsi déstabilisés et libèrent leur contenu. Toutefois, les courtes longueurs d'ondes requises pour la photolyse de ce lipide limitent les applications potentielles d'un tel système.

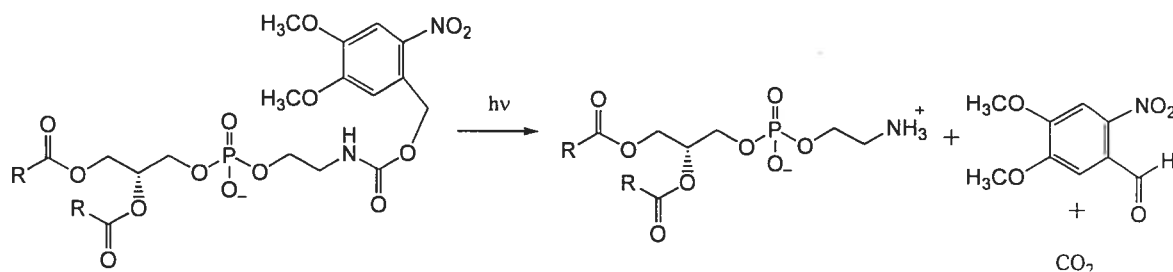


Figure 16. Photodéprotection de la NVOC-DOPE (Zhang & Smith, 1999).

#### 1.5.2.4. Les liposomes photopolymérisables

O'Brien et ses collaborateurs ont développé une formulation liposomale constituée de DOPE et de 1,2-bis[10-(2'-hexadiénoyloxy)décanoyl]-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (bis-SorbPC) (Figure 17) dont l'exposition à la lumière UV provoque la fusion des vésicules (Bennett & O'Brien, 1995; Lamparski *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1996). La photoréaction du SorbPC produit des domaines de poly(bis-SorbPC) et des domaines riches en DOPE, ce qui déstabilise les liposomes et promeut leur fusion puis la libération de leur contenu (l'implication des PE insaturées, dont la DOPE, dans la fusion membranaire sera vue plus en détail à la section 4.3.1. *Les liposomes à base de phosphatidyléthanolamines (PE) insaturées*). La vitesse et l'ampleur de la fusion dépendent du degré de photopolymérisation, de la température et du pH. La seule présence de DOPE favorise la fusion des liposomes à pH acide mais la polymérisation des vésicules permet d'accroître la vitesse de ce phénomène. L'étude du comportement de phase des membranes de DOPE/bis-SorbPC (3:1) par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par diffraction des rayons X a montré que ce système ne présente que des phases lamellaire et cubique inverse ( $Q_{II}$ ) à des températures inférieures à 80 °C. L'existence d'une phase  $H_{II}$  n'a toutefois pas été prouvée, ce qui suggère que la fusion de tels liposomes implique des intermédiaires associés à la transition de phase  $L_{\alpha}$ - $Q_{II}$  (Barry *et al.*, 1992).

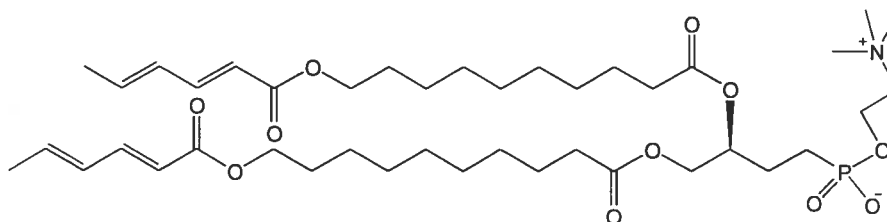


Figure 17. Structure de la 1,2-bis[10-(2'-hexadiényloxy)décanoyl]-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (bis-SorbPC).

L'utilité potentielle d'une déstabilisation des liposomes induite par la lumière dépend, entre autres, de l'utilisation d'une lumière compatible avec des visées biomédicales, *i.e.* de verte à infrarouge. L'ajout de composés cyanines sensibilisants au sein des membranes de DOPE/bis-SorbPC offre la possibilité d'utiliser la lumière visible pour accroître la fusion des liposomes. Le perchlorate de 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine (DiI ou DiI-C(18)3, selon les articles) et le DiI disulfoné anionique correspondant, le DiI-DS, ont été utilisés à cette fin (Miller *et al.*, 2000). L'effet de la lumière sur la distribution intracellulaire d'une sonde fluorescente encapsulée dans des liposomes de DOPE/bis-SorbPC/DiI ou de DOPE/bis-SorbPC/DiI-DS (16:4:1) a été étudié *in vitro*. L'acide 1-hydroxypyrene-3,6,8-trisulfonique (HPTS) est un marqueur qui peut être utilisé pour observer la répartition intracellulaire du contenu liposomal (Chu *et al.*, 1990). Lors de cette expérience, il a été observé qu'après endocytose par les cellules HeLa, l'exposition des liposomes à une lumière de 550 nm entraînait le passage du HPTS encapsulé d'un environnement à pH acide vers un environnement à pH plus élevé. Ceci suggère que la photolyse des liposomes dans les endosomes/lysosomes conduit à la libération de leur contenu dans le cytoplasme. Ainsi, la libération du HPTS dans le cytoplasme requiert la fusion photo-activée des liposomes avec les membranes endosomales.

De façon similaire, la photosensibilisation avec de la lumière UV de liposomes de type furtif de DOPC/bis-SorbPC/PEG-DOPE augmente leur perméabilité de 200 fois

(Bondurant *et al.*, 2001). Ces liposomes peuvent aussi être déstabilisés par la lumière visible par l'ajout de DiI dans les membranes (Mueller *et al.*, 2000). Très récemment, il a été démontré que la lumière UV pouvait perméabiliser de plus de 28 000 fois une formulation semblable de type furtif contenant un lipide saturé, la 1,2-diarachidoyl-*sn*-phosphatidylcholine (Spratt *et al.*, 2003).

### 1.5.3. Les liposomes sensibles au pH

Les liposomes dits sensibles au pH sont des vésicules stables à pH neutre mais qui libèrent leur contenu et/ou deviennent capables de fusion à pH acide. Ce type de liposomes a d'abord été proposé au début des années '80 afin d'augmenter la libération de médicaments au niveau des régions du corps dont le pH est inférieur à la valeur physiologique, comme dans le cas des tumeurs (Yatvin *et al.*, 1980). Or, l'interstice tumoral a rarement un pH inférieur à 6,5, ce qui rend difficile la conception de liposomes qui seraient déstabilisés dans une fenêtre de pH si étroite. Les applications cliniques possibles des liposomes sensibles au pH ont ensuite été étendues à l'augmentation de la biodisponibilité cytoplasmique des médicaments après internalisation des liposomes par endocytose (Figure 18). Suivant leur endocytose au moyen d'un système de ciblage, les liposomes devraient être déstabilisés par l'environnement acide des endosomes (pH 5,0 – 6,5) et ainsi libérer rapidement leur contenu. Une fois libérés dans les endosomes, les médicaments amphiphiles peuvent diffuser au travers de la membrane endosomale. D'autres principes actifs, comme les antifolates et les analogues des nucléosides, peuvent subir une translocation par des transporteurs situés dans les membranes des endosomes (Wiley *et al.*, 1982; Brown & Silvius, 1990; Kamen *et al.*, 1991). Selon leurs propriétés, les liposomes pourraient aussi fusionner avec la membrane endosomale et/ou la déstabiliser, et ainsi faciliter la diffusion du principe actif directement dans le cytoplasme. La libération du contenu des liposomes avant que ceux-ci n'atteignent les lysosomes permettrait de minimiser la dégradation prématurée des médicaments par les différentes hydrolases et peptidases qu'ils contiennent (Huang *et al.*, 1983). Ceci peut présenter un avantage pour la

vectorisation de macromolécules fragiles, comme les peptides ou les oligonucléotides antisens, et de certains médicaments antinéoplasiques, comme l'ara-C, qui sont dégradés dans les lysosomes lors de leur administration au moyen de liposomes insensibles au pH (Huang *et al.*, 1983). L'ara-C est un médicaments appartenant à la classe des antimétabolites et est un analogue de la pyrimidine. L'incorporation de sa forme triphosphate (ara-CTP) dans l'ADN entraîne un inhibition de sa réplication. L'efficacité des médicaments qui ne sont pas dégradés au niveau des lysosomes, comme la doxorubicine, pourrait aussi être augmentée : leur libération rapide au niveau des endosomes ou des lysosomes permettrait de surmonter la résistance pléiotrope (Drummond *et al.*, 1999; Lopes de Menezes *et al.*, 1999; Lopes de Menezes *et al.*, 1998). Tel que mentionné précédemment, la libération intracellulaire d'agents anticancéreux aurait l'avantage de surmonter la MDR en contournant l'action des protéines qui y sont associées. De la même façon, une accumulation nucléaire en doxorubicine plus importante a été observée lorsque celle-ci était véhiculée dans des liposomes sensibles au pH (Ishida *et al.*, 2001), ce qui suggère qu'une libération massive du principe actif des organelles vers le cytoplasme pourrait réduire sa capture par de telles pompes.

Hormis les liposomes, d'autres types de vecteurs sensibles au pH ont été développés afin de faciliter la libération intratumorale et/ou intracellulaire de médicaments. Parmi ceux-ci, on trouve les conjugués macromolécule soluble-médicament dont le lien chimique assurant la liaison entre ces 2 molécules est sensible au pH. L'un des système macromoléculaires de vectorisation des médicaments qui a été étudié en détail est le polymère de *N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylate (HPMA) (Duncan, 1999). La toxicité de la doxorubicine conjuguée à un copolymère de HPMA dépend de la capacité du système à libérer le principe actif dans la cellule cible ce qui est normalement assuré par un lien oligopeptidique sensible aux enzymes lysosomales (Putnam & Kopecek, 1995). Récemment, des copolymères de HPMA capables de libérer, à pH acide, la doxorubicine qui leur est conjuguée ont été étudiés. *In vivo*, dans un modèle de lymphome murin, l'activité antitumorale de ce type de conjugué s'est avérée supérieure à celle de la

doxorubicine libre (Ulbrich *et al.*, 2003b). D'autres macromolécules telles que le PEG (Rodrigues *et al.*, 1999) ou des poly(acide aminé)s (Li, 2002) ont aussi été liées à des médicaments anticancéreux par l'entremise de liens sensibles au pH.

Des micelles sensibles au pH constituées de copolymères de poly(L-histidine)-*b*-PEG qui sont déstabilisées à des valeurs de pH inférieures à 7,4 ont été synthétisées par Lee *et al.* (2003b). Chargées en doxorubicine et couplées à l'acide folique, celles-ci ont montré une toxicité plus importante pour des cellules de cancer du sein que le médicament libre (Lee *et al.*, 2003a). Aussi, des copolymères de NIPAM sensibles au pH ont été utilisés pour vectoriser des agents anticancéreux photosensibilisants (Taillefer *et al.*, 2001). L'étude de l'activité photodynamique d'un tel système *in vivo* a démontré sa plus grande efficacité à traiter des tumeurs mammaires implantée chez la souris que la formulation à base de Cremophor EL (Le Garrec *et al.*, 2002).

Afin de favoriser l'interaction de vecteurs nanoparticulaires avec les cellules tumorales, des nanoparticules constituées de conjugué d'acétate de pullulane et de sulfonamide (SDM) sensibles au pH ont été préparées (Na *et al.*, 2003). À pH acide, la SDM est déionisée ce qui rend la particule plus hydrophobe et augmente son affinité pour les membranes. Ce système, conçu pour répondre à une variation du pH intratumoral, a permis d'augmenter la cytotoxicité de la doxorubicine pour des cellules de tumeurs mammaires *in vitro* en culture à pH 6,8.

Plusieurs types de liposomes sensibles au pH ont été développés à ce jour. Parmi ceux-ci, on retrouve les liposomes composés de lipides dont l'arrangement structurel est fonction du pH (PE) et les liposomes contenant des lipides hydrolysables, des peptides synthétiques ou des polymères en guise de composante sensible au pH (pour une revue sur les liposomes sensibles au pH, voir Drummond *et al.*, 2000). Les liposomes à base de PE insaturées sont sans nul doute ceux qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'études. Or, comme il le sera décrit dans la section suivante, leur faible stabilité en fait l'une des formulations sensibles au pH les moins prometteuses d'un point de vue clinique.

Néanmoins, leur développement a permis de démontrer le potentiel des liposomes sensibles au pH en tant que système à libération contrôlée de médicaments et a ouvert la porte à la conception de nouvelles générations de systèmes de ce type.



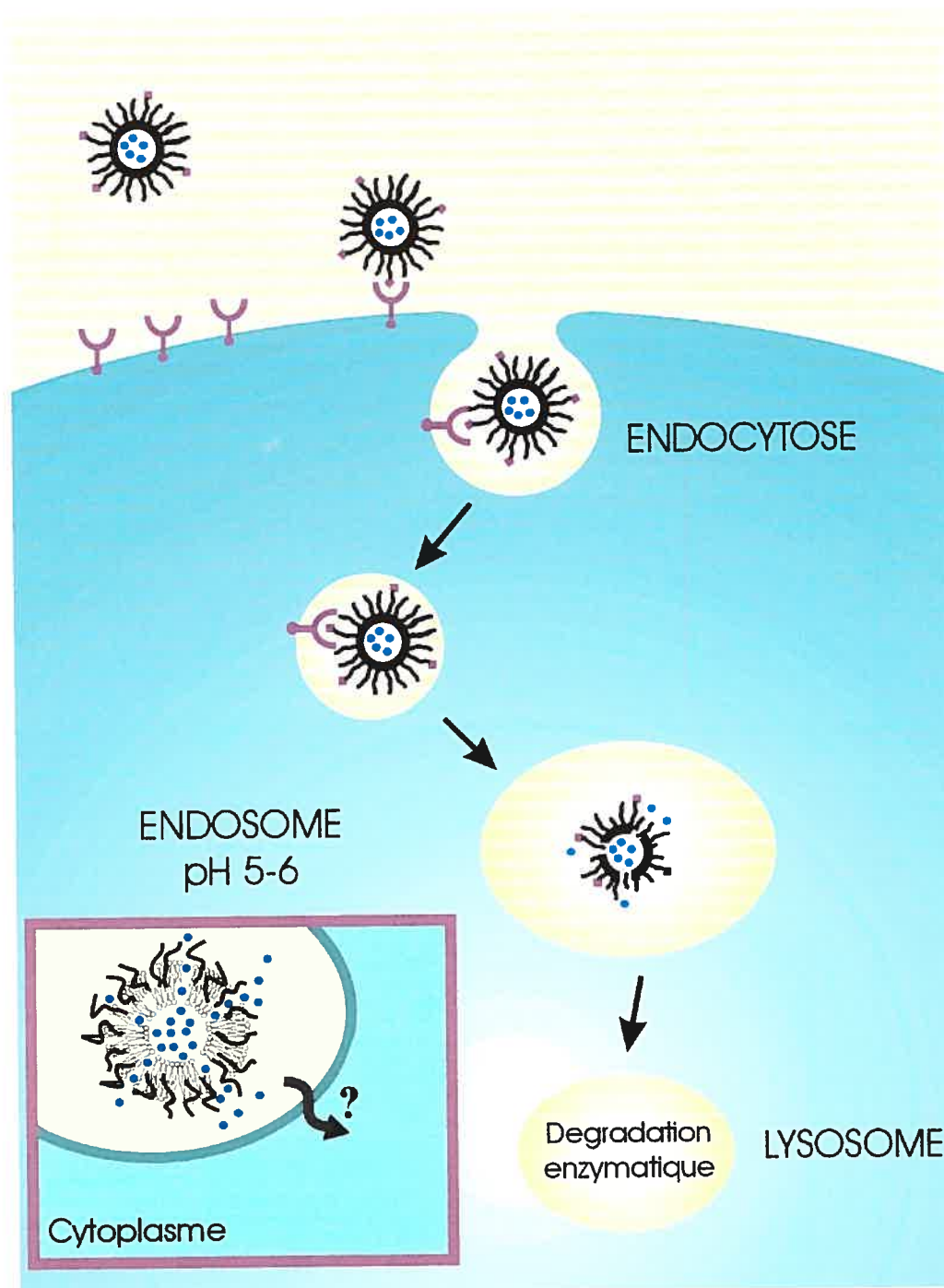


Figure 18. Endocytose des liposomes sensibles au pH. Suite à leur internalisation, les liposomes sensibles au pH sont destabilisés dans l'endosome et libèrent leur contenu. Les liposomes pourraient aussi fusionner avec la membrane endosomale ou la destabiliser.

### 1.5.3.1. Les liposomes à base de phosphatidyléthanolamines (PE) insaturées

Tel que discuté à la section 1.2.1 (*Polymorphisme des lipides*), les PE insaturées s'associent préférentiellement en phase  $H_{II}$  à pH neutre. Toutefois, il est possible de les stabiliser dans un arrangement lamellaire par l'addition d'amphiphiles acides, tels que l'acide oléique (OA) ou l'hémisuccinate de cholestéryle (CHEMS), de façon à produire des liposomes sensibles au pH (pour une revue, consulter les références Litzinger & Huang, 1992 et Drummond *et al.*, 2000). À pH neutre, la charge portée par l'amphiphile augmente la répulsion entre les lipides et permet d'augmenter l'hydratation interfaciale, stabilisant ainsi l'arrangement lamellaire. Inversement, à pH acide, la protonation de l'amphiphile entraîne la déshydratation de la région interfaciale ce qui permet le rapprochement des bicouches (Ellens *et al.*, 1984; Papahadjopoulos & Miller, 1967). De plus, la formation de ponts hydrogène entre les molécules de PE, limitée à pH neutre par les répulsions électrostatiques, est de nouveau favorisée lors de la neutralisation de l'amphiphile (Boggs, 1987; Hauser *et al.*, 1981). Siegel a proposé un modèle de transition de phases  $L_{\alpha}$ - $H_{II}$  dans lequel les structures intermédiaires micellaires inverses (IMI) jouent un rôle fondamental suite au contact entre les bicouches (Siegel, 1993). Les IMI seraient impliquées dans la fusion des membranes par la formation de pores ou de ponts interlamellaires. Ainsi, à pH acide, la protonation de l'amphiphile des liposomes à base de PE insaturées conduirait à une transition de phases  $L_{\alpha}$ - $H_{II}$  durant laquelle il y aurait fusion des membranes et libération du contenu liposomal. Les différents lipides ionisables amphiphiles qui ont été utilisés en combinaison avec les PE insaturées afin de produire des liposomes sensibles au pH sont présentés dans le Tableau 3.

Parmi les différentes formulations étudiées, les systèmes OA/PE et CHEMS/PE ont été caractérisés de manière exhaustive. Düzgünes *et al.* (1985) ont démontré des changements irréversibles dans la turbidité, le mélange des contenus aqueux et le mélange des lipides résultant de la fusion des liposomes de OA/PE induite par l'acidification du milieu (pH < 6,5). Le mélange des lipides des bicouches, qui est généralement étudié en

spectrométrie de fluorescence par transfert d'énergie par résonance (Struck *et al.*, 1981), est un indicateur important de la fusion des vésicules. Celle-ci se produit à pH plus élevé lorsque la concentration en lipides est plus importante, indiquant le rôle des collisions intervésiculaires dans le processus fusionnel de ce type de système (Collins *et al.*, 1990a). Enfin, l'implication d'une phase hexagonale inverse dans la déstabilisation des liposomes à pH acide a été mise en évidence par RMN du  $^{31}\text{P}$  (Connor & Huang, 1985) ainsi que par microscopie électronique (Collins *et al.*, 1990b). Les liposomes de CHEMS/PE sont considérablement moins sensibles au pH que ceux de OA/PE, car ils ne libèrent leur contenu qu'à des valeurs de pH inférieures à 5,5. Bien qu'il y ait mélange des lipides et libération du matériel encapsulé, le mélange des contenus aqueux n'est pas observé après acidification du milieu (Ellens *et al.*, 1984; Ellens *et al.*, 1985). Ainsi, la fuite du contenu liposomal s'effectuerait aux points de contacts entre les bicouches (Ellens *et al.*, 1985). Récemment, Hafez et Cullis (2000) ont démontré que le CHEMS lui-même présentait un polymorphisme sensible au pH, adoptant une organisation  $\text{H}_{\text{II}}$  à un pH inférieur à 4,3. Ainsi, il a été suggéré que le CHEMS soit aussi impliqué dans la déstabilisation des liposomes de CHEMS/PE à pH acide.

Tableau 3 : Amphiphiles utilisés pour la formulation de liposomes sensibles au pH à base de PE insaturées.

<b>Amphiphile ionisable</b>	<b>Références</b>
Phosphatidylsérine (PS)	Morgan <i>et al.</i> , 1987
Palmytoylcystéine (PHC)	Connor <i>et al.</i> , 1984
Hémisuccinate de cholestéryle (CHEMS)	Ellens <i>et al.</i> , 1984
<i>N</i> -Succinyldioléoylphosphatidyléthanolamine (Suc-DOPE)	Nayar & Schroit, 1985
Acide oléique (OA)	Düzgünes <i>et al.</i> , 1985
Diacylsuccinylglycérols	Collins <i>et al.</i> , 1990b; Hong <i>et al.</i> , 2002
Amphiphiles à double chaîne*	Leventis <i>et al.</i> , 1987; Brown & Silvius, 1990
Hémisuccinate de $\alpha$ -tocophérol	Jizomoto <i>et al.</i> , 1994
Sulfatide	Wu <i>et al.</i> , 1996

\* Acide *N*-oléoyl-2-aminopalmitique (OAP), *N*-(*N*-oléoyl-2-aminopalmitoyl)sérine (OAP-sérine), et *N* <sup>$\alpha$</sup> -(*N*-oléoyl-2-aminopalmitoyl)glycine

#### 1.5.3.1.1. Effet des cations divalents

Le comportement des vésicules de OA/PE et de CHEMS/PE peut aussi être affecté par la présence de cations divalents. À pH neutre, le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$  augmentent le mélange et l'agrégation des lipides (Ellens *et al.*, 1985; Collins *et al.*, 1990a). Toutefois, dans ce cas, le mécanisme responsable de la fusion serait différent de celui induit par une baisse de pH. Les cations divalents augmenteraient les collisions entre les vésicules par la formation de ponts entre les molécules d'OA ou de CHEMS. De plus, la formation de ponts OA- $\text{Ca}^{2+}$ -OA au sein d'une même bicouche induirait une séparation de phase de l'OA, ce qui favoriserait une organisation en phase  $\text{H}_{\text{II}}$ . Alternativement, les cations divalents provoqueraient la déshydratation de la bicouche, permettant un rapprochement intime des vésicules (Collins *et al.*, 1990a). Il est à noter que les cations divalents peuvent aussi bien

avoir des effets stabilisants que des effets déstabilisants sur la phase lamellaire (Lai *et al.*, 1985; Collins *et al.*, 1990a). En effet, les structures finales du système OA/PE incubé en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , telles qu'elles ont été observées par microscopie électronique (cryofracture), démontrent tant des zones d'association en feuillet lamellaires qu'en phase  $\text{H}_{\text{II}}$  (Collins *et al.*, 1990a).

Les mécanismes de déstabilisation induits par les cations divalents et les protons pourraient se combiner pour produire des effets synergiques. Les protons, en réduisant la charge de surface des vésicules, permettent un rapprochement intime des bicouches de lipides ce qui, en retour, favorise la formation de ponts entre les vésicules par les cations (Litzinger & Huang, 1992). Le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$ , qui sont tous deux d'importantes composantes des milieux de culture cellulaire et des fluides biologiques, pourraient ainsi augmenter la déstabilisation de ce type de liposomes sensibles au pH dans les vésicules d'endocytose.

#### 1.5.3.1.2. Libération cytoplasmique de marqueurs fluorescents

La visualisation de la distribution intracellulaire de sondes fluorescentes permet d'évaluer de façon qualitative la capacité des liposomes sensibles au pH à faciliter la libération cytoplasmique de composés hydrophiles *in vitro*. En effet, la vectorisation restreinte de ces sondes au niveau des compartiments endosomaux et/ou lysosomaux donne lieu à une fluorescence ponctuelle, alors que leur répartition cytoplasmique conduit à une fluorescence diffuse observable au microscope. En l'absence de système de ciblage favorisant l'internalisation des liposomes, ces expériences sont réalisées avec des cellules phagocytaires. Ainsi, il a été démontré sur des cellules rénales CV-1 que les liposomes de OA/PE sensibles au pH étaient plus aptes que les liposomes conventionnels de OA/PC à promouvoir la libération cytoplasmique de la calcéine et du dextran-isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (20 kDa) (Straubinger *et al.*, 1985). Sur 2 lignées cellulaires de type macrophage, les liposomes de CHEMS/PE ont aussi permis une diffusion de la calcéine au

niveau du cytosol. Par ailleurs, l'ajout d'un agent chélateur de cations, l'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA), au milieu de culture, a résulté en une distribution vésiculaire de la calcéïne, mettant en évidence le rôle des cations divalents dans l'induction d'une déstabilisation des liposomes (Chu *et al.*, 1990). Tant pour les liposomes de OA/PE que de CHEMS/PE, l'inhibition du processus d'acidification des endosomes par l'ajout de chloroquine, de chlorure d'ammonium ou de monensine, a réduit la libération cytoplasmique des marqueurs.

L'HPTS a aussi été utilisé pour observer la distribution intracellulaire du contenu liposomal (Chu *et al.*, 1990). Il a ainsi été démontré que ce fluorophore pouvait rejoindre le cytoplasme lorsqu'il était transporté par des liposomes de CHEMS/PE. D'autre part, sa vectorisation dans des liposomes non sensibles au pH a conduit à sa ségrégation dans des vacuoles. Dans cette étude, la fraction d'HPTS délivrée dans le cytoplasme par les liposomes de CHEMS/PE a été estimée à moins de 10%. Malgré ce faible pourcentage, les liposomes de CHEMS/PE ont tout de même montré leur capacité à permettre la libération cytoplasmique de plusieurs principes actifs, dont le fragment A de la toxine de la diphtérie.

#### 1.5.3.1.3. *Vectorisation du fragment A de la toxine de la diphtérie*

La toxine de la diphtérie est une protéine cytotoxique composée de 2 fragments. Le fragment A (DTA), qui est la partie active de la toxine, est responsable de l'inhibition de la synthèse protéique des eucaryotes. Le second fragment, le fragment B, permet la liaison de la toxine à la surface cellulaire et sa translocation dans le cytoplasme. En l'absence du fragment B, le DTA est incapable de franchir les membranes lipidiques (Litzinger & Huang, 1992). Toutefois, son encapsulation dans des liposomes sensibles au pH, dont ceux composés de CHEMS/DOPE, lui permet d'être relargué dans le cytosol (Chu *et al.*, 1990). Ces liposomes se sont avérés 100 fois plus efficaces que les liposomes non sensibles au pH (CHEMS/DOPC). De plus, l'activité du DTA a pu être bloquée par l'ajout de chlorure d'ammonium ou d'EDTA, indiquant la nécessité d'un environnement acide et de cations

divalents pour que son relargage dans le cytoplasme soit effectif (Chu *et al.*, 1990). La vectorisation du DTA à l'aide de vésicules de OA/DOPE (Collins *et al.*, 1989; Collins & Huang, 1987), de palmitoylhomocystéine (PHC)/DOPE (Collins *et al.*, 1989) et de 1,2-dipalmitoylsuccinylglycérol (DPSG)/PE (Collins *et al.*, 1989; Collins *et al.*, 1990b) a aussi été investiguée, notamment pour étudier la voie endocytaire cellulaire (Collins *et al.*, 1989). Pour obtenir un mélange des lipides correspondant à 50% du maximum de fusion ( $pH_{50}$ ), ces formulations requièrent un pH de 6,9, 6,25 et 5,0, respectivement. Lorsqu'ils sont conjugués à un anticorps ciblant les cellules L929, les liposomes de PHC/DOPE ont une demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de relargage du DTA de 5 min. De plus, cette libération n'est pas inhibée par l'ajout de chlorure d'ammonium, indiquant une libération dans les endosomes précoces. Les immunoliposomes de DPSG/PE ont, pour leur part, une  $t_{1/2}$  d'approximativement 25 min, ce qui correspondrait à un relargage dans les endosomes tardifs. De façon surprenante, les immunoliposomes composés de OA/DOPE possèdent une  $t_{1/2}$  d'environ 15 min. Ceci s'expliquerait par un changement du  $pH_{50}$  de ces liposomes de 6,9 à 6,0 en présence des cellules. Ainsi, la conception de liposomes de sensibilité différente au pH, dictée par le choix de l'amphiphile utilisé comme stabilisant, permet le contrôle de la cinétique et du lieu de libération du matériel encapsulé.

#### 1.5.3.1.4. Vectorisation du cytosine arabinofuranoside (*ara-C*)

Tel qu'énoncé précédemment, l'*ara-C* présente une susceptibilité à la dégradation par les enzymes lysosomales. L'amélioration de l'efficacité thérapeutique de l'*ara-C* liposomal nécessite donc sa libération au niveau des endosomes puis sa translocation dans le cytoplasme par des transporteurs transmembranaires. Ainsi, il a démontré que l'*ara-C* encapsulé dans des liposomes de OA/DOPE conjugués à un anticorps anti H-2K<sup>k</sup> était plus toxique envers les cellules L929 que l'*ara-C* libre ou encapsulé dans des immunoliposomes non sensibles au pH (Connor & Huang, 1986). De la même façon, Brown et Silvius (1990) ont observé une plus grande toxicité de l'*ara-C* envers les cellules CV-1 lorsqu'il était

encapsulé dans des immunoliposomes de PE/EPC/Chol/*N*-(*N*-oléoyl-2-aminopalmitoyl)sérine (OAP-sérine)/succinimidyl-*S*-acéthylthioacétate-PE.

#### 1.5.3.1.5. Vectorisation d'antigènes

Les liposomes sensibles au pH peuvent être utilisés pour délivrer des antigènes endogènes à des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Les molécules du CMH de classe I interviennent dans la présentation des antigènes provenant de protéines qui ont été synthétisées dans le cytosol (*e.g.* fragments peptidiques de protéines virales). Les molécules du CMH de classe II, de leur côté, lient des peptides provenant d'antigènes exogènes qui ont été internalisés par endocytose dans des vésicules intracellulaires. Lorsqu'ils sont vectorisés par des liposomes non sensibles au pH, les antigènes sont délivrés dans les lysosomes où ils peuvent subir une protéolyse partielle. Les fragments peptidiques ainsi formés peuvent alors être piégés par les molécules du CMH de classe II. Par ailleurs, la libération dans les endosomes d'antigènes encapsulés dans des liposomes sensibles au pH empêche leur transit vers les lysosomes, ce qui réduit leur capacité à être présentés par le CMH de classe II (Harding *et al.*, 1991; Agrewala *et al.*, 1996). Au contraire, l'accès au CMH de classe I se voit facilité si l'antigène subit une translocation des compartiments endosomaux au cytosol (Zhou & Huang, 1994). Ainsi, il a été démontré que les liposomes de DOPE/DOSG sensibles au pH pouvaient sensibiliser les CPA par l'intermédiaire du CMH de classe I et permettre la reconnaissance d'une protéine soluble (ovalbumine) par les lymphocytes T cytotoxiques (LTC). D'autre part, les liposomes non sensibles au pH se sont avérés beaucoup moins efficaces pour sensibiliser les CPA dans les mêmes conditions (Reddy *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1994). *In vivo*, les liposomes sensibles au pH se sont aussi montrés efficaces pour l'immunisation de souris contre le virus de l'immunodéficience humaine (Chang *et al.*, 1999). Plus récemment, ils ont aussi été étudiés comme adjuvant pour l'activation de LTC dirigés contre un antigène (Lee *et al.*, 2002) et



plus spécifiquement en immunothérapie du cancer, pour la vectorisation de peptides visant à stimuler ces mêmes lymphocytes (Chang *et al.*, 2001).

#### 1.5.3.1.6. Vectorisation de matériel génétique

##### 1.5.3.1.6.1. Vectorisation de plasmides

La thérapie génique apparaît comme une approche des plus prometteuses pour le traitement de diverses pathologies génétiques. Les techniques permettant l'introduction de gènes exogènes dans les cellules peuvent être virales ou non. Les techniques virales ont recours à des rétrovirus ou des adénovirus. Ces vecteurs, bien qu'efficaces, présentent des risques immunogène et infectieux importants. Les méthodes non-virales sont basées sur l'utilisation de transporteurs à base de lipides, comme les liposomes et la Lipofectine<sup>®</sup>, ou à base de polymères, comme la polylysine ou le poly(éthylèneimine). Or, plusieurs de ces techniques ont une faible efficacité de transfection et ne sont pas applicables *in vivo* (Merdan *et al.*, 2002). En raison de leur capacité à faciliter la libération cytoplasmique de macromolécules, les liposomes sensibles au pH ont aussi été étudiés comme vecteur de plasmides, seuls ou en tant que composante de complexes ADN-polycation (polyplexes) ou ADN-lipide (lipoplexes). Les liposomes sensibles au pH présentent l'avantage de ne pas être toxiques. Ils permettent aussi de protéger le matériel génétique contre une dégradation par les nucléases et d'éviter les associations indésirables que forment les vecteurs cationiques avec les protéines sériques. Un plasmide porteur du gène de la thymine kinase du virus de l'herpès simplex a été encapsulé dans des liposomes de DOPE/Chol/OA (4:4:2) portant un anticorps anti-H-2K<sup>k</sup> (Wang & Huang, 1989). *In vitro*, l'efficacité de transfection de cette formulation a été 8 fois supérieure à celle obtenue avec des liposomes non sensibles au pH. *In vivo*, cette même formulation a été utilisée pour transférer, avec cette fois le plasmide pBBO.6-CAT, des cellules tumorales (lymphomes RDM-4) implantées chez la souris. L'activité du gène chloramphénicol acétyltransférase (CAT) contenu dans le plasmide s'est avérée 4 fois plus élevée chez les souris traitées avec la

formulation sensible au pH que chez celles ayant reçu la formulation équivalente non sensible au pH (Wang & Huang, 1987). Une formulation d'immunoliposomes sensibles au pH composée de DOPE/Chol/OA (en proportions non spécifiées) portant l'anticorps 5-113 dirigé contre un antigène de surface de cellules gliales de rat a été étudiée pour faciliter la transfection de cellules gliales en culture (Holmberg *et al.*, 1994). *In vivo*, l'utilisation de cette formulation a également permis la transfection de neurones et de cellules gliales avec un plasmide contenant un gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase (Geisert *et al.*, 1995). Lors de ces expériences, aucune formulation non sensible au pH n'a été utilisée en guise de contrôle. Ainsi, bien que ces résultats semblent intéressants à première vue, ils ne justifient pas nécessairement l'utilisation d'une formulation liposomale sensible au pH pour cette application.

Legendre et Szoka (Legendre & Szoka, 1992) ont pour leur part démontré que les liposomes sensibles au pH (CHEMS/DOPE; 2:1) étaient de 3 à 150 fois moins efficaces pour la transfection de plasmides que les liposomes cationiques (Lipofectine<sup>®</sup>; dioléoyloxypropyldiméthylammonium:DOPE; 1:1), selon la lignée cellulaire et les conditions expérimentales utilisées. Ces résultats peuvent expliquer le nombre limité d'études de transfection portant sur les liposomes sensibles au pH à base de PE et ce, malgré les problèmes de toxicité associés à l'utilisation de liposomes cationiques.

#### 1.5.3.1.6.2. Vectorisation d'oligonucléotides antisens

Les oligonucléotides (ODN) antisens sont des fragments d'acides nucléiques qui bloquent la synthèse d'une protéine spécifique en s'hybridant à l'ARN messenger (ARNm) par complémentarité de bases. Les méthodes de vectorisation des ODN sont généralement les mêmes que celles utilisées pour les plasmides. Des liposomes sensibles au pH (DOPE/Chol/OA; 10:5:2) ont été évalués dans l'optique d'augmenter l'efficacité de la vectorisation d'un ODN complémentaire à l'ARNm transcrit à partir du gène *env* (Ropert *et al.*, 1992). *In vitro*, il a été démontré que la prolifération du rétrovirus de Friend était

spécifiquement inhibée lorsque l'ODN était encapsulé dans les liposomes. Toutefois, cette formulation liposomale s'est avérée seulement 2 fois plus active que son équivalent non sensible au pH. Cette différence d'efficacité serait attribuable à une association 2 fois plus élevée des liposomes de DOPE avec les cellules comparée aux liposomes non sensibles au pH, plutôt qu'à une fusion des liposomes avec les membranes endosomales/lysosomales. En effet, une observation similaire avait déjà été faite par Chu *et al.* (1990). Plus récemment, Skalko-Basnet *et al.* (2002) ont démontré que l'utilisation de liposomes sensibles au pH (DOPE/CHEMS; 3:2) permettait la capture d'un ODN fluorescent par les cellules NG108-15 alors qu'une formulation conventionnelle (PC de soja) s'est avérée inefficace. Bien que ces études remettent en question le rôle exact de la DOPE dans l'efficacité accrue des formulations qui en contiennent, l'implication d'une déstabilisation de la barrière endosomale et/ou lysosomale n'est pas à écarter dans tous les cas. Ponnappa *et al.* (2001) ont notamment montré qu'un ODN phosphorothioate antisens, dirigé contre facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), encapsulé dans des liposomes sensibles au pH (PE/CHEMS/Chol; 7:4:2) pouvait réduire la production de TNF- $\alpha$  induite par les endotoxines chez les macrophages *in vivo*. Or, l'utilisation d'une formulation liposomale anionique non sensible au pH, pourtant efficace pour cibler les ODN au niveau des cellules Kupffer du foie *in vivo* (Ponnappa *et al.*, 1998), s'est avérée inefficace à inhiber la production de TNF- $\alpha$  (Ponnappa *et al.*, 2001).

#### 1.5.3.1.7. Stabilité des liposomes à base de PE insaturées dans le plasma/sérum

L'utilisation thérapeutique des liposomes sensibles au pH, comme de toute autre formulation liposomale, requiert de telles vésicules qu'elles demeurent stables dans la circulation jusqu'à leur capture par les cellules cibles. Malheureusement, les liposomes de PE, et plus particulièrement les LUV composées de DOPE/OA (4:1), sont rapidement déstabilisés en présence de plasma (Liu & Huang, 1989a). Ce phénomène est attribuable notamment à l'extraction de l'OA présent dans les membranes liposomales par l'albumine

(Connor *et al.*, 1986; Liu & Huang, 1989b). Bien que les SUV de DOPE/OA présentent une certaine stabilité dans le plasma, elles sont instables en milieu neutre à 37 °C (Liu & Huang, 1989b). En revanche, leur pré-incubation dans le plasma leur confère une stabilité dans ces mêmes conditions, en raison de l'insertion de protéines plasmatiques dans la bicouche lipidique. Une perte de sensibilité au pH est toutefois observée. Bien que l'ajout de cholestérol aux liposomes de DOPE/OA permette d'accroître leur stabilité dans le plasma, leur sensibilité au pH se voit diminuée (Liu & Huang, 1989a). Un phénomène semblable a été observé dans le cas des liposomes de DOPE/palmitoylcystéine (PHC) (Connor *et al.*, 1984).

Afin d'éviter l'extraction des stabilisants tels que l'OA par l'albumine sérique, l'utilisation d'amphiphiles acides à double chaîne a été proposée par Silvius et ses collaborateurs (Leventis *et al.*, 1987). Ceux-ci ont notamment comparé l'effet de l'albumine et du sérum sur la stabilité de liposomes de PE/acide *N*-oléoyl-2-aminopalmitique et de PE/OA. Bien qu'aucune extraction du stabilisant des liposomes de PE/acide *N*-oléoyl-2-aminopalmitique ne fut détectée lors de leur incubation avec de l'albumine de sérum bovin, leur exposition à du sérum bovin a provoqué une libération du contenu liposomal à une vitesse comparable à celle des liposomes de PE/OA. De façon similaire, Collins *et al.* (1990b) ont comparé la stabilité de liposomes sensibles au pH composés de PE et de 3 différents diacylsuccinylglycérols. Les liposomes constitués de PE/DPSG se sont avérés significativement plus stables dans le plasma que les liposomes de PE/OA, mais un déplacement du pH de déstabilisation de 5,3 à 4,2 a été observé après incubation dans le plasma. Plus récemment, Hong *et al.* (2002) ont démontré que l'ajout de 3-5% de DSPE-PEG aux liposomes de PE/DPSG pouvait augmenter leur stabilité dans le plasma, tout comme pour les liposomes de PE/OA. Bien qu'il ait été démontré que la présence de DSPE-PEG ne compromet pas de façon importante la sensibilité au pH des vésicules, l'effet de leur pré-incubation dans le sérum sur leur pH de déstabilisation n'a pas été évalué. La stabilité modérée des liposomes à base de PE dans le plasma/sérum a

évidemment un impact direct sur leur temps de circulation lorsqu'ils sont injectés chez l'animal, comme il le sera rapporté à la section suivante.

#### *1.5.3.1.8. Pharmacocinétique et biodistribution des liposomes à base de PE insaturées*

La première étude pharmacocinétique impliquant des liposomes sensibles au pH fut réalisée par Connor *et al.* (1986). Des liposomes de DOPE/OA ainsi qu'une formulation équivalente non sensible au pH de DOPC/OA contenant la [<sup>125</sup>I]tyraminyl-inuline (marqueur aqueux) et le [<sup>3</sup>H]éther de cholestanyle (marqueur membranaire) ont été injectés par voie i.v. chez la souris. Les deux formulations ont démontré une clairance rapide et une accumulation importante au niveau du foie et de la rate. Ceci indique que les liposomes sont éliminés rapidement par les macrophages, notamment en raison de leur charge négative (Gabizon *et al.*, 1990; Park *et al.*, 1992). Par ailleurs, les liposomes de DOPE/OA se sont aussi accumulés dans les poumons, signe d'une embolie pulmonaire causée par le dépôt dans le lit capillaire d'agrégats de liposomes formés dans la circulation. De plus, selon les ratios <sup>3</sup>H/<sup>125</sup>I trouvés dans les différents organes, il a été établi que les 2 formulations avaient libéré la majeure partie de leur contenu en 15 min.

La possibilité d'optimiser le temps de circulation des liposomes sensibles au pH par stabilisation stérique a aussi été investiguée. En effet, l'inclusion de GM<sub>1</sub> (Liu & Huang, 1990) ou de dérivés lipidiques du PEG (Slepishkin *et al.*, 1997) prolonge de façon significative le temps de circulation des liposomes à base de PE. Toutefois, leur ajout réduit aussi sérieusement leur sensibilité au pH. Seule l'étude récente de Hong *et al.* (2002) mentionnée précédemment montre qu'il est possible de stabiliser des vésicules de DOPE par l'ajout de DSPE-PEG sans compromettre de façon importante leur sensibilité au pH. Malgré les temps de circulation prolongés de ces liposomes obtenus chez le rat, le manque de données relatives au maintien de la sensibilité au pH suite à l'exposition des vésicules à des fluides biologiques ne permet pas de conclure en une supériorité de ce système.

### 1.5.3.2. Les liposomes contenant un conjugué lipide-PEG labile

L'impact négatif du PEG sur les propriétés fusogènes des liposomes peut être limité par l'utilisation de conjugués de lipide-PEG labiles (Kirpotin *et al.*, 1996; Guo & Szoka, 2001). Le premier système issu de cette stratégie consiste en des vésicules de DOPE stabilisées par l'incorporation de 3-6 mol% d'un lipide lié à un segment de PEG par un pont disulfure (mPEG-DTP-DSPE, Figure 19) (Kirpotin *et al.*, 1996). Bien que ces liposomes demeurent imperméables au HPTS qui y est encapsulé en présence de plasma humain ou de sérum de cheval, la thiololyse du polymère greffé à la surface liposomale conduit à la fusion des liposomes et à la libération complète de leur contenu. Par ailleurs, la sensibilité au pH perdue lors de l'incorporation de mPEG-DTP-DSPE dans des liposomes de DOPE/CHEMS est restaurée suite au clivage des chaînes de PEG. Malheureusement, les liposomes DOPE/mPEG-DTP-DSPE chargés en doxorubicine se sont avérés très perméables dans le plasma humain et n'ont pas démontré un temps de circulation prolongé, probablement en raison d'un clivage rapide des ponts disulfures dans la circulation (Ishida *et al.*, 2001). Néanmoins, l'efficacité thérapeutique de cette formulation, lorsqu'elle est conjuguée à un anticorps anti-CD19, s'est avérée supérieure à celle d'une formulation immunoliposomale furtive non sensible au pH chez un modèle murin de lymphome des cellules B (Ishida *et al.*, 2001).

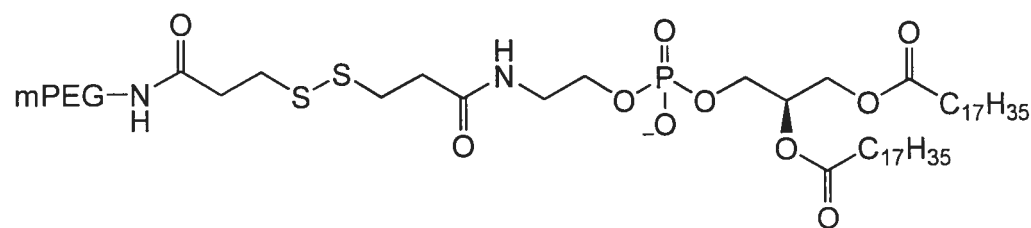


Figure 19. Structure du mPEG-DTP-DSPE.

Récemment, un système exploitant la grande susceptibilité des fonctions ortho esters à l'hydrolyse acide a été développé. Guo et Szoka (2001) ont ainsi synthétisé un

conjugué de PEG-distéaroyl glycérol, le 3,9-diéthyl-3-(distéaroyloxypropyloxy)-9-(méthoxypoly(éthylène glycol)2000-1-yl)-2,4,8,10-tétraoxaspiro[5,5]undécane (POD, Figure 20), qui est stable pendant plus de 3h à pH neutre, mais qui est complètement dégradé en 1h à pH 5. Préparés à pH basique, les liposomes de DOPE contenant 10% de POD sont stables jusqu'à 12h à pH neutre mais s'agrègent et libèrent la majorité de leur contenu en 30 min à pH 5,5. Les cinétiques de libération de ces liposomes sont caractérisées d'abord par une phase de latence dont le logarithme de la durée est directement proportionnel au pH, suivie d'une phase de libération rapide. De plus, il a été démontré que les liposomes de POD/DOPE étaient stables à 37 °C pendant 12h dans 75% de sérum bovin. Après injection chez la souris, la cinétique d'élimination de ces liposomes était celle d'un modèle à un compartiment, ce qui est caractéristique des formulations liposomales furtives. La vitesse d'élimination de ces liposomes étant proche de celle observée pour les liposomes de DSPE-PEG/DOPE ( $t_{1/2}$ ~200 et 300 min, respectivement), il est clair que le POD procure une stabilisation stérique aux liposomes de DOPE. Bien que l'efficacité, tant *in vitro* qu'*in vivo*, des liposomes de POD/DOPE n'ait pas encore été établie, leur stabilité dans des conditions physiologiques additionnée à leur capacité à libérer leur contenu à pH faiblement acide en font l'un des systèmes liposomaux sensibles au pH les plus prometteurs.

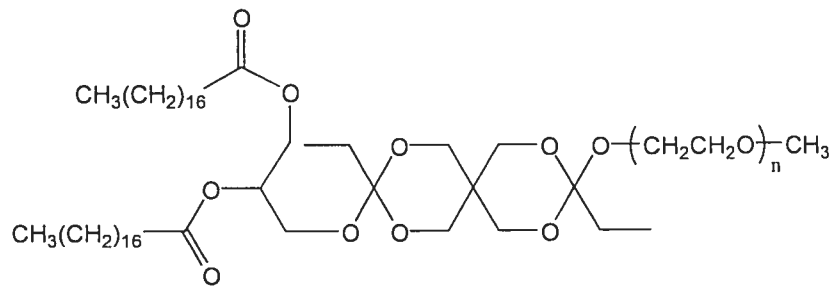


Figure 20. Structure du conjugué PEG-diortho ester-distéaroyl glycérol (POD).

### 1.5.3.3. Les liposomes composés d'un mélange de lipides anioniques et cationiques

Tel que mentionné précédemment, le CHEMS démontre un polymorphisme sensible au pH, adoptant une organisation  $H_{II}$  à des pH inférieurs à 4,3 (Hafez & Cullis, 2000). Toutefois, il est possible d'augmenter le pH auquel se produit la fusion des vésicules par l'ajout d'un lipide cationique aux LUV composées de CHEMS. Hafez *et al.* (2000) ont étudié l'influence du ratio molaire de lipides cationiques/anioniques sur le pH de fusion de vésicules de CHEMS/chlorure de *N,N*-dioléyl-*N,N*-diméthylammonium. Les résultats de cette étude ont montré que l'utilisation de différents ratios molaires de lipides cationiques/anioniques se situant entre 0 et 0,85 permet de faire varier le pH critique de fusion entre 4,0 et 6,7. À pH acide, la protonation du CHEMS entraîne la neutralisation de la surface liposomale, ce qui permet la fusion et l'agrégation des membranes. De plus, l'implication d'une phase inverse dans la fusion de ces liposomes lorsque leur charge de surface est nulle a été mise en évidence par RMN du  $^{31}\text{P}$  et par microscopie électronique.

S'inspirant de ces travaux, Shi *et al.* (2002) ont développé une nouvelle formulation de liposomes constituée d'EPC, de bromure de diméthyl dioctadécylammonium (DDAB), de CHEMS et de polysorbate 80 (25:25:49:1). Le polysorbate 80 a été ajouté à la formulation afin d'en augmenter la stabilité par l'intermédiaire de son extrémité portant un groupement poly(oxyde d'éthylène). En effet, les auteurs ont observé une instabilité des liposomes de DDAB/CHEMS (33:66) et de EPC/DDAB/CHEMS (40:20:40) en présence de sérum. La formulation ainsi modifiée est stable à pH neutre mais libère son contenu lorsque le pH est réduit; jusqu'à ~90% de la charge est libérée à pH 4,0. En présence de sérum, la sensibilité au pH de cette formulation est partiellement maintenue, avec ~55% de libération à pH 4,0. Ces liposomes, auxquels 0,1 mol% de folate-PEG-PE a été ajouté pour faciliter leur endocytose par les cellules nasopharyngiennes KB, ont permis de vectoriser la calcéine au niveau du cytoplasme. De plus, l'encapsulation de l'ara-C dans de tels liposomes a permis de réduire la concentration minimale de médicament requise pour



provoquer la mort de 50% des cellules ( $IC_{50}$ ) de 11 fois comparée à l'ara-C encapsulé dans des liposomes contrôles. Il est à noter que ces liposomes ont aussi été utilisés dans la fabrication de complexes pour la thérapie génique (Shi *et al.*, 2002).

#### **1.5.3.4. Les liposomes à base d'alcool oléoylique (OAlc)**

Une formulation liposomale de EPC/CHEMS/OAlc/polysorbate 80 ayant la capacité de libérer son contenu suite à une baisse du pH a récemment été décrite (Sudimack *et al.*, 2002). Les propriétés de ces liposomes peuvent être modulées en variant les quantités de polysorbate 80 et d'OAlc présentes dans la formulation. L'augmentation des proportions de polysorbate 80 et d'OAlc dans les liposomes permet d'accroître respectivement leur stabilité et leur sensibilité au pH. Ainsi, les liposomes EPC/CHEMS/OAlc/polysorbate 80 (50:50:80:2) libèrent 83% de leur contenu en calcéine à pH 5,0. En présence de sérum, une diminution de la libération à 56% est observée. Il a été suggéré que l'OAlc, un alcool gras insaturé, puisse s'associer à une molécule de PC par l'intermédiaire d'un pont hydrogène, conduisant à la formation d'un complexe de géométrie similaire à celle du DOPE (Figure 21) (Boggs *et al.*, 1986). Toutefois, aucune activité de fusion des liposomes EPC/OAlc/polysorbate 80 n'a pu être détectée en réponse à une réduction du pH. Enfin, cette formulation, ciblée contre les récepteurs de l'acide folique, a aussi été évaluée pour la libération intracellulaire de l'ara-C. Elle s'est avérée 17 fois plus toxique pour les cellules KB que son pendant non sensible au pH (Sudimack *et al.*, 2002).

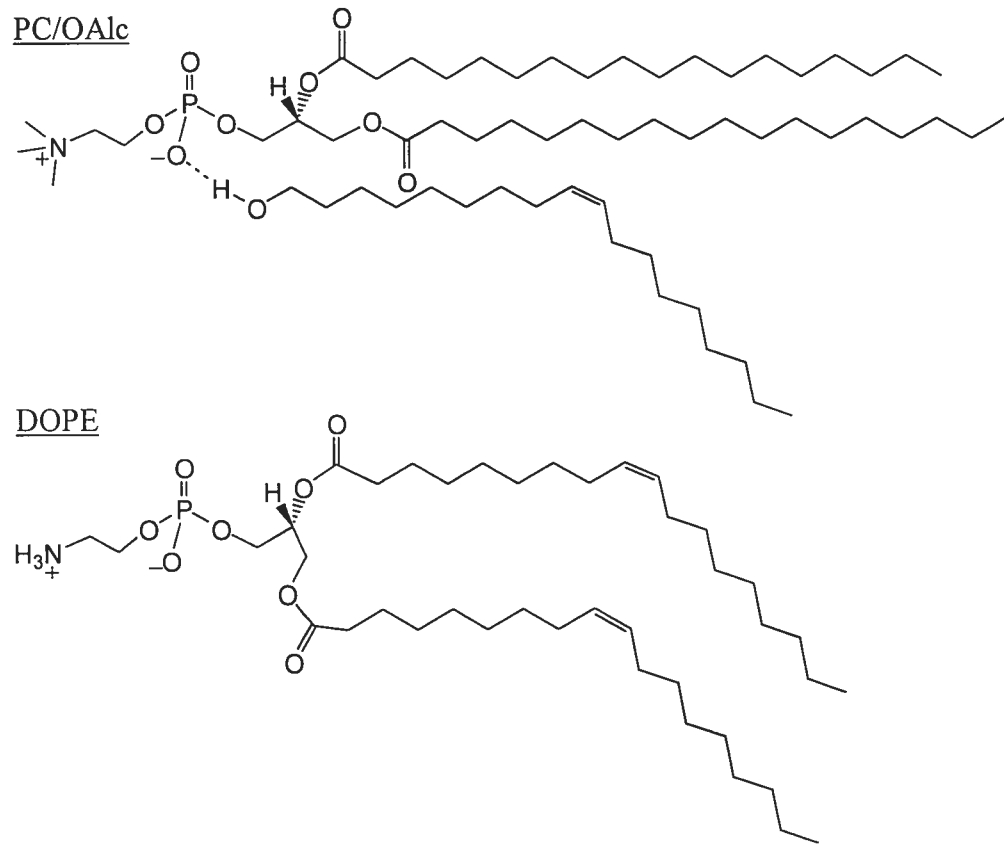


Figure 21. Géométrie suggérée du complexe issu de l'association des molécules de PC et d'Oalc qui serait similaire à celle de la DOPE (Boggs *et al.*, 1986).

### 1.5.3.5. Les liposomes à base de lipides hydrolysables

#### 1.5.3.5.1. Les phosphatidyléthanolamines N-alkylées

Drummond et Daleke (Drummond, 1997; Drummond & Daleke, 1997) ont décrit la synthèse de dérivés *N*-maléyles de la DOPE dont le groupement stabilisant est clivé suite à l'hydrolyse acide du lipide (Figure 22). Ces phospholipides ont une géométrie cylindrique, permettant la formation d'un arrangement lamellaire à pH neutre. À pH acide, le groupement maléyle est clivé, ce qui augmente la quantité de DOPE présente dans les membranes et déstabilise le liposome. Ainsi, l'acidification promeut la fusion des liposomes et la libération de leur contenu (Drummond & Daleke, 1997). De plus, il a été

démontré que des complexes de lipides contenant de la *N*-citraconyl-DOPE pouvaient augmenter la transfection de gènes *in vitro* (Reddy & Low, 2000).

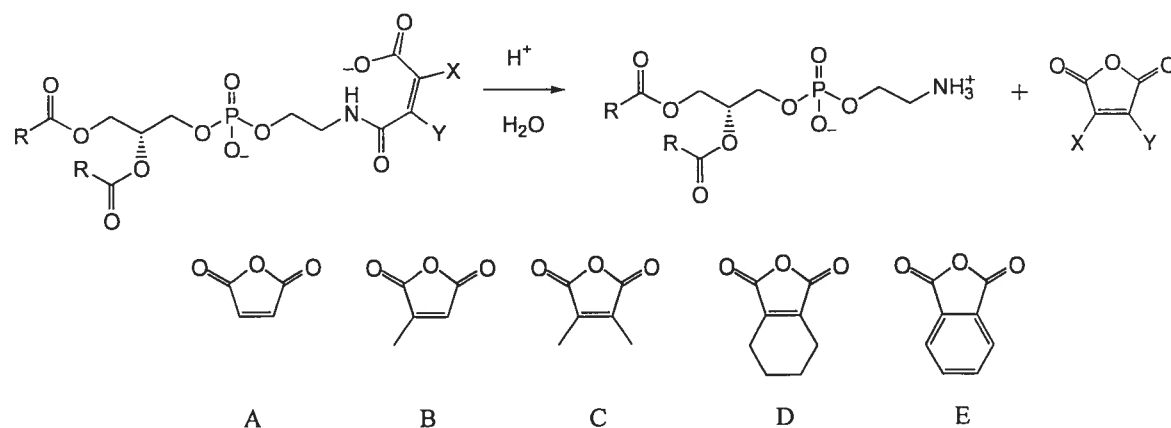


Figure 22. Hydrolyse du phosphatidyléthanolamine lié à divers groupements *N*-maléyles. (A) anhydride maléique; (B) anhydride citraconique; (C) anhydride diméthylmaléique; (D) anhydride 3,4,5,6-tétrahydrophthalique et (E) anhydride phtalique (Drummond *et al.*, 2000).

#### 1.5.3.5.2. Les plasmalogènes labiles

Les plasmalogènes mis au point par Thompson et collaborateurs qui sont utilisés dans la fabrication de liposomes sensibles à la lumière (section 4.2.1. *Les plasmalogènes labiles*) peuvent aussi être clivés par hydrolyse acide du lien vinyl éther, qui est riche en électrons (Figure 23). À l'instar de ce qui a été observé dans le cas de leur photodégradation, l'hydrolyse acide des plasmalogènes résulte en une perméabilité accrue de la membrane aux solutés encapsulés (Anderson & Thompson, 1992; Thompson *et al.*, 1996; Gerasimov *et al.*, 1999). Il a été montré que la libération de la calcéïne contenue dans des liposomes de plasménylcholine (PlsPamCho) ou de diplasménylcholine (DPPlsC) dépendait du pH de la solution, de la température et de la composition de la membrane (Gerasimov *et al.*, 1997; Gerasimov *et al.*, 1999). En effet, les liposomes de PlsPamCho libèrent plus lentement leur contenu à pH acide lorsqu'ils contiennent du dihydrocholestérol (DHC) ( $t_{50\%}$  libération = 3 min et 65 min à pH 2,5 pour les liposomes de

PlsPamCho pur et de PlsPamCho/DHC (6:4), respectivement), bien que le DHC ait peu d'effet sur la vitesse d'hydrolyse des lipides. L'influence de la présence de DHC dans les liposomes de DPPIsC sur la libération de leur contenu est similaire. De façon générale, la vitesse de libération du contenu des liposomes augmente avec la formation de lysolipides et ce, tant pour les liposomes de PlsPamCho que de DPPIsC. Cependant, les liposomes de DPPIsC libèrent soudainement leur contenu en réponse à un faible changement dans les taux d'hydrolyse des lipides, alors que les liposomes de PlsPamCho libèrent leur contenu de façon plus progressive (Gerasimov *et al.*, 1999).

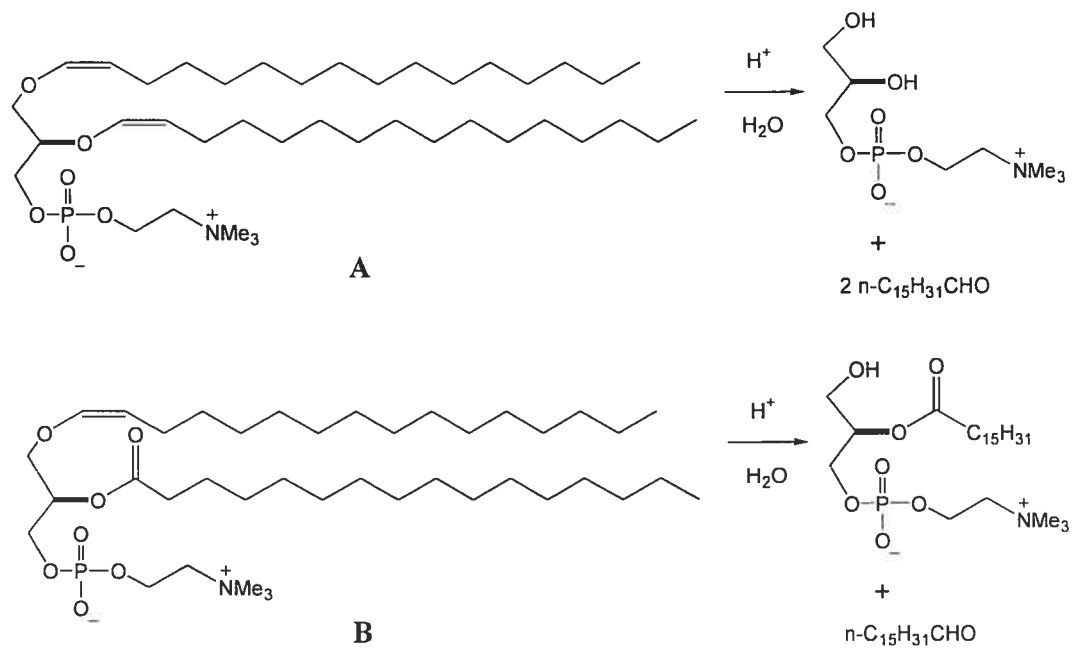


Figure 23. Hydrolyse acide d'un diplasménylcholine (Gerasimov *et al.*, 1999).

La capacité des liposomes à base de plasmalogènes à augmenter la libération cytoplasmique de leur contenu a été étudiée *in vitro* sur les cellules KB en utilisant le folate comme système de ciblage. Les liposomes de DPPIsC/DHC (9:1) ont pu livrer 83% de leur contenu en iodure de propidium au noyau en 8h. Par contre, une augmentation de la quantité de DHC dans la formulation de 10 à 20% a réduit la quantité d'iodure de

propidium libérée à 36%. D'autre part, le traitement des cellules avec de la chloroquine ou de la monensine, deux inhibiteurs de l'acidification des endosomes, a réduit cette libération à moins de 5% (Rui *et al.*, 1998). L'utilisation d'un tel système a permis d'augmenter de 6000 fois la toxicité de l'ara-C envers les cellules KB, en comparaison avec l'ara-C administrée sous forme de solution (Rui *et al.*, 1998). Il a été démontré que le folate, lorsqu'il est utilisé comme système de ciblage, permettait de réduire l'accumulation des vésicules dans les lysosomes (Leamon & Low, 1991; Lee & Low, 1994), ce qui explique en partie l'efficacité du système. Or, la cytotoxicité de l'ara-C encapsulé dans des liposomes contrôlés de EPC-folate étant très faible dans les mêmes conditions, la présence seule de folate ne permet pas d'expliquer l'efficacité observée. Le rôle joué par la sensibilité au pH des liposomes à base de DPPIsC ne peut donc pas être ignoré. La stratégie des plasmalogènes a aussi été exploitée pour la libération de tétrasulfonate de phtalocyanine chloroaluminium ( $\text{AlPcS}_4^{4-}$ ), un sensibilisant utilisé en thérapie photodynamique (Qualls & Thompson, 2001). En raison de la tendance de l' $\text{AlPcS}_4^{4-}$  d'origine commerciale ( $\text{cAlPcS}_4^{4-}$ ) à s'agréger, les auteurs ont aussi utilisé de l' $\text{AlPcS}_4^{4-}$  purifié par chromatographie liquide à haute performance ( $\text{pAlPcS}_4^{4-}$ ). L'utilisation de liposomes de DPPIsC/DHC-folate a permis d'accroître la phototoxicité du  $\text{cAlPcS}_4^{4-}$  dans des conditions d'illumination similaires à celles utilisées pour le  $\text{cAlPcS}_4^{4-}$  libre ou administré au moyen des liposomes non sensibles au pH (DPPC-folate). D'autre part, la cytotoxicité du  $\text{pAlPcS}_4^{4-}$  s'est avérée indépendante de la formulation. Ainsi, bien que les auteurs concluent à la supériorité de leur système, les différents résultats obtenus selon l'origine de l' $\text{AlPcS}_4^{4-}$  soulèvent la question du rôle exact de la sensibilité au pH de cette formulation en ce qui a trait à sa toxicité.

#### 1.5.3.5.3. Les ortho ester de lipides hydrolysables

En se basant sur la stratégie d'utilisation des plasmalogènes, Zhu *et al.* (2000) ont synthétisé un lipide qui possède une fonction ortho ester dont l'hydrolyse à pH acide conduit à la formation d'un lysolipide (Figure 24). Les liposomes composés de ce lipide et

de DOPE libèrent 40% de leur contenu en calcéine lorsqu'ils sont exposés à un pH de 3,5 durant 10 min. Ce lipide a aussi été utilisé avec succès lors d'une étude de transfection cellulaire. Utilisé pour complexer l'ADN, il s'est avéré ~10 fois plus actif que le système 1,2-dioléoyl-3-triammonium propane (DOTAP)/3β-[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamol]-Chol (DC-Chol). La supériorité de ce lipide à vectoriser du matériel génétique peut s'expliquer par la formation, lors de l'hydrolyse, d'un amphiphile portant un ion ammonium. En effet, il a été suggéré que les propriétés détergentes de certains lipides facilitent le transfert de l'ADN des endosomes vers le cytoplasme (Liang & Hughes, 1998). Bien que préliminaires, ces résultats illustrent le potentiel d'utilisation de ce lipide dans la conception de liposomes sensibles au pH.

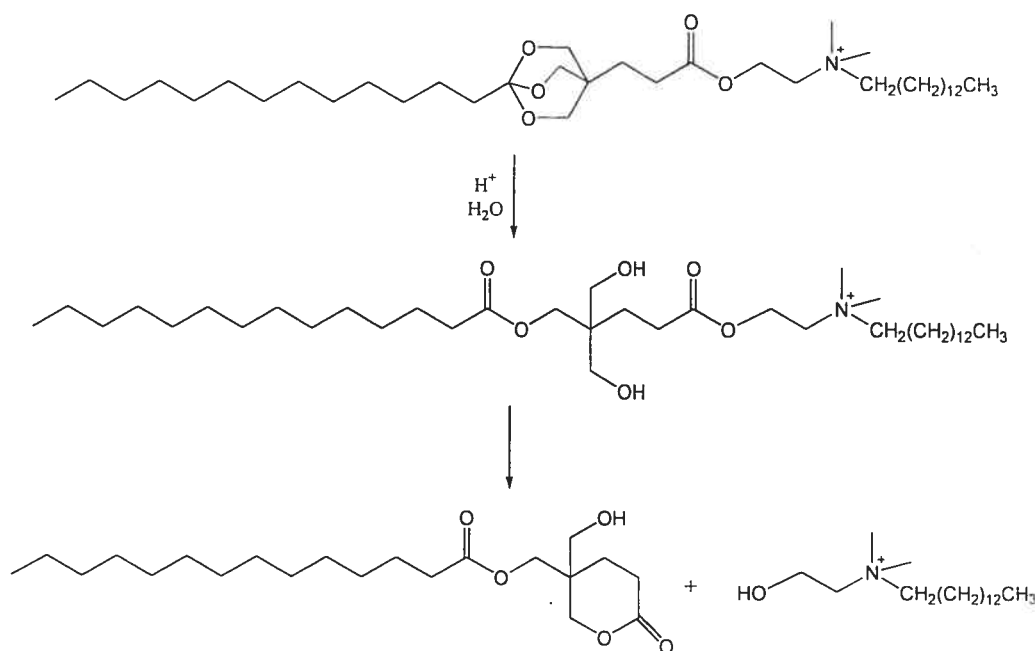


Figure 24. Hydrolyse acide d'un ortho ester de lipide (Zhu *et al.* 2000).

### 1.5.3.6. Les liposomes utilisant des peptides synthétiques

En milieu acide, la déstabilisation des liposomes peut également être obtenue par l'incorporation de peptides fusogènes synthétiques qui imitent les peptides de fusion

viraux. Le changement de conformation de ces peptides, induit par leur exposition à des pH acides, provoque la libération du contenu liposomal (Deber & Li, 1995). Ainsi, à pH neutre, ces peptides se retrouvent principalement sous forme de pelote statistique alors qu'à des valeurs de pH se situant autour de 5, ils adoptent plutôt une conformation en hélice amphiphile (Epanand *et al.*, 1995). Ils s'insèrent alors dans la membrane liposomale et s'agglomèrent entre eux pour former des pores et/ou induire la fusion des vésicules (pour des revues voir Nir *et al.*, 1999 et Nir & Nieva, 2000). La plupart des recherches sur ce type de peptides ont été réalisées dans l'optique d'étudier les protéines de fusion virales ou de concevoir des vecteurs favorisant la libération intracellulaire de matériel génétique, qu'ils soient de types polyplexes ou lipoplexes (Wagner *et al.*, 1992; Gottschalk *et al.*, 1996; Wagner, 1998; Simoes *et al.*, 1999a; Simoes *et al.*, 1999b; Wagner, 1999). Toutefois, les peptides fusogènes ont fait l'objet d'un nombre limité d'études visant à développer une formulation liposomale sensible au pH (Puyal *et al.*, 1994; Vogel *et al.*, 1996; Turk *et al.*, 2002).

Le GALA, un peptide de 30 acides aminés dont l'unité de répétition principale est Glu-Ala-Leu-Ala, a été le premier à être spécifiquement conçu pour provoquer la déstabilisation de liposomes en fonction du pH (Subbarao *et al.*, 1987). La libération du contenu liposomal résulte alors du changement de conformation du peptide après protonation des résidus d'acide glutamique (Parente *et al.*, 1990). Bien que l'interaction du GALA avec les vésicules de phospholipides ait été largement caractérisée (Parente *et al.*, 1988; Parente *et al.*, 1990; Nicol *et al.*, 1996; Mechtler & Wagner, 1997; Nir *et al.*, 1999), son incorporation dans une formulation liposomale n'a pas été étudiée. Plusieurs peptides apparentés au GALA ont depuis été synthétisés et caractérisés quant à leur capacité à former des pores membranaires en réponse à une variation de pH (Kono *et al.*, 1993; Puyal *et al.*, 1994; Jinbao *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 1997; Turk *et al.*, 2002). Parmi ceux-ci, le EALA, dont la séquence principale est identique au GALA mais dont les extrémités sont différentes, a notamment servi à la préparation de liposomes sensibles au pH. Celui-ci peut être incorporé dans la formulation liposomale par encapsulation dans le

volume aqueux ou par liaison covalente à la surface de liposomes (Vogel *et al.*, 1996). Couplés à du folate-PEG-DSPE pour permettre leur ciblage, ces liposomes se sont avérés capables de libérer environ 25% de leur contenu dans le cytoplasme des cellules KB. Bien que le EALA assure une bonne stabilité liposomale et des propriétés de relarguage en fonction du pH intéressantes, la quantité importante de peptides requise pour induire une perméabilité des liposomes a récemment conduit ce même groupe à la synthèse d'un peptide similaire de 29 acides aminés, mais plus efficace (Turk *et al.*, 2002). La structure du GALA et du EALA est caractérisée par la présence d'acides glutamiques qui sont distribués parmi les résidus leucine et alanine situés sur le même côté de l'hélice. Le nouveau peptide, quant à lui, a été conçu de façon à ce que les acides glutamiques soient regroupés sur la même surface de l'hélice- $\alpha$  et ne soient pas entrecoupés de résidus hydrophobes. Cet arrangement autour d'un plus petit arc de cercle hélicoïdale réduit le nombre de molécules requises pour former un pore. Ce nouveau peptide a permis de provoquer la libération d'un marqueur aqueux à des concentrations plus faibles que le EALA à pH  $\sim 6$ , ce qui confirme cette dernière hypothèse (Turk *et al.*, 2002). En revanche, il a été observé que ce peptide devenait moins efficace avec l'augmentation de la taille moléculaire du contenu encapsulé dans les liposomes et que son activité était partiellement réduite en présence de cholestérol, ce qui avait déjà été noté dans le cas du GALA (Nicol *et al.*, 1996). Ce peptide, co-encapsulé dans des liposomes de EPC/Chol/folate-PEG-PE (60:40:0.5), a permis d'augmenter la cytotoxicité de l'ara-C pour les cellules KB de  $\sim 30$  fois *in vitro*. Toutefois, ces études ont été menées en absence d'une formulation contrôle ne contenant pas de peptide (non sensible au pH).

Les propriétés structurales du peptide de fusion hémagglutinine 2 (HA2) du virus de l'influenza ont été largement étudiées et plusieurs peptides de synthèse sensibles au pH en sont issus (Takahashi, 1990; Clague *et al.*, 1991; Rafalski *et al.*, 1991; Ishiguro *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 1997). Parmi ceux-ci, le lipo-AcE4K, un dérivé du HA2, a été couplé à un groupement distéaroylglycérol de façon à permettre son ancrage dans les membranes liposomales (Bailey *et al.*, 1997). Il a été démontré qu'une fois complexé à la surface de



liposomes, ce peptide induisait la fusion des lipides et la libération du contenu liposomal en réponse à une baisse de pH. Par ailleurs, la capacité de ce peptide à déstabiliser les membranes dépend de leur composition lipidique. Une telle différence d'efficacité selon la composition des vésicules avait déjà été observée pour un peptide apparenté au GALA (Puyal *et al.*, 1994).

Bien que l'utilisation de peptides fusogènes comme composante active de liposomes sensibles au pH démontre un potentiel certain quant à leur utilisation, de plus amples études visant à montrer leur application possible *in vivo* sont nécessaires. Leur faible capacité à déstabiliser des membranes contenant du cholestérol demeure un facteur limitant leur utilisation (Haensler & Francis C. Szoka, 1993; Kono *et al.*, 1993; Puyal *et al.*, 1994), bien qu'il soit possible de formuler des liposomes stables sans cholestérol en ajoutant du PEG (Woodle *et al.*, 1992). Néanmoins, cette dernière alternative n'a pas été explorée jusqu'à maintenant. De plus, l'immunogénicité de ces peptides pourrait s'avérer importante.

#### **1.5.3.7. Les complexes liposomes/polymère sensible au pH**

Plusieurs polymères synthétiques démontrant un effet sur les membranes lipidiques en fonction du pH ont été décrits. Ils sont l'objet d'un intérêt croissant, notamment en raison de leur faible potentiel immunogène et de leur facilité de synthèse à grande échelle. De plus, ces polymères offrent, en théorie, l'avantage de pouvoir rendre sensible au pH toute formulation liposomale. Ces polymères sont généralement des polyélectrolytes qui répondent à une variation de pH par un changement de conformation et/ou une association avec les membranes liposomales. Certains polycations, tels que la poly(L-lysine) (Walter *et al.*, 1986), les poly(amidoamine)s (Richardson *et al.*, 2001) ou le poly(éthylènimine) (PEI) (Godbey *et al.*, 1999), ont été étudiés mais principalement dans le cadre de la thérapie génique. En effet, la présence de charges positives permet leur complexation avec l'ADN. De tels polymères peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec des lipides pour former des polyplexes. Il a tout de même été démontré que la modification du PEI avec un

groupement hydrophobe permet son insertion dans des liposomes de PC et qu'à un pH inférieur à 7, le PEI peut induire leur fusion avec des liposomes de PS chargés négativement (Oku *et al.*, 1987). Les polymères de type polyanion, tels que les poly(glycidol)s succinylés (SucPG), les poly(acide acrylique)s et les dérivés du NIPAM, ont fait l'objet de plusieurs études d'incorporation dans un système liposomal.

#### 1.5.3.7.1. Les poly(glycidol)s succinylés (SucPG)

Des polymères de SucPG contenant différents proportions de fonctions carboxyliques ont été utilisés afin de promouvoir la fusion des membranes à pH acide (Figure 25) (Kono *et al.*, 1994b). À pH 7,4 en présence de tels polymères, une fusion des liposomes d'EPC est observée et augmente avec la diminution des résidus acides dans le polymère. La fusion à pH neutre demeure toutefois inférieure à 20% quel que soit le polymère utilisé. D'autre part, dans le cas de certains polymères, une fusion plus importante des liposomes d'EPC est observée à pH 4,0. Aucune relation n'est toutefois observée entre la fusion obtenue et la quantité d'acides présents dans polymère. Afin d'assurer une certaine stabilité à pH neutre, un polymère alkylé contenant une forte proportion d'acide carboxylique (84%) a été choisi pour modifier les liposomes. Une fois incorporé dans les liposomes, ce polymère induit la libération de la calcéïne encapsulée à un pH inférieur à 5,5 (soit sous la valeur de son pKa), alors que la libération est négligeable à pH neutre. La fusion des vésicules ainsi que la libération du contenu liposomal augmentent avec la quantité de polymère ajoutée dans les membranes. Un minimum de 1,1 mol% est requis pour l'obtention d'une sensibilité au pH. Il a été suggéré que, suite à la protonation des groupements acide carboxylique, la fusion des liposomes résulte d'une déshydratation des membranes causée par l'interaction accrue du polymère avec celles-ci. De plus, il a été démontré sur des cellules rénales CV-1 que la modification de liposomes d'EPC avec du SucPG favorisait leur fusion avec les membranes cellulaires ainsi que la libération cytoplasmique de la calcéïne encapsulée (Kono *et al.*, 1997). Plus récemment, des résultats semblables ont été obtenus *in vitro* avec des immunoliposomes EPC/SucPG anti-BCG,

ciblant les cellules de colon C26 (Mizoue *et al.*, 2002). La complexation des liposomes à base de SucPG à des lipoplexes de DC-Chol/DOPE/plasmide a aussi été étudiée en vue du développement d'un système de libération fusogène et sensible au pH (Kono *et al.*, 2001). Les complexes lipoplexe/liposome de EPC/SucPG chargés négativement ont démontré une bonne capacité de transfection des cellules HeLa lorsqu'ils sont couplés à la transferrine. Par contre, les niveaux de transfection sont demeurés similaires à ceux obtenus lors de l'emploi de lipoplexes qui ne portaient pas ce ligand. Par ailleurs, les complexes sensibles au pH présentent l'avantage d'être moins toxiques pour les cellules que les lipoplexes. Bien qu'aucune étude *in vivo* n'ait été effectuée avec les liposomes à base de SucPG, il est probable que ceux-ci soient éliminés rapidement suite après injection par la voie i.v. En effet, les liposomes contenant des polymères SucPG avec une forte proportion d'acide carboxylique devraient avoir un potentiel zêta fortement négatif, ce qui devrait favoriser leur élimination rapide par le SPM (Juliano & Stamp, 1975).

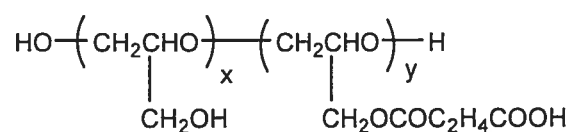


Figure 25. Structure générale des poly(glycidol)s succinylés (SucPG).

#### 1.5.3.7.2. L'acide poly(éthacrylique) (PEAA)

Le PEAA a été l'objet de nombreuses études visant à caractériser son interaction avec des vésicules lipidiques (Tirrell *et al.*, 1985; Walter *et al.*, 1986; Borden *et al.*, 1987; Haensler & Francis C. Szoka, 1993; Thomas *et al.*, 1994b). Il a été démontré que le PEAA, dont la conformation varie de pelote statistique (pH > 6,2) à globule (pH < 6,2) (Borden *et al.*, 1987), pouvait créer des pores dans les membranes liposomales ou induire leur fusion en solution acide, selon la concentration en polymère utilisée (Chung *et al.*, 1996). La libération du contenu s'effectue à un pH inférieur lorsque les membranes contiennent du cholestérol (Mills *et al.*, 1999). Peu d'études ont mis en évidence l'effet de la conjugaison du PEAA à la surface liposomale sur ses capacités de déstabilisation. Il a tout de même été

démontré que des SUV d'EPC (Maeda *et al.*, 1988) et des LUV EPC/Chol (55:45) (Chen *et al.*, 1999) pouvaient être déstabilisées respectivement à des pH de 6,5 ou inférieurs à 6 par du PEAA lié à leur surface. Par contre, les liposomes EPC/PEAA ont présenté une stabilité modérée à pH 7,4 et une libération complète de leur contenu en 24h à 4 °C (Maeda *et al.*, 1988). Par ailleurs, les liposomes EPC/Chol/PEAA se sont avérés stables dans les mêmes conditions pour une période de 3 semaines, probablement à cause du degré de courbure plus faible des LUV et de la présence de Chol. En plus de libérer leur contenu en milieu acide, les liposomes EPC/Chol/PEAA sont capables de fusionner avec des liposomes constitués de EPC/Chol ou avec des érythrocytes fantômes (Chen *et al.*, 1999). Récemment, Hoffman et ses collaborateurs (Murthy *et al.*, 1999) ont synthétisé d'autres polymères appartenant à la famille des acides acryliques, dont l'acide poly(propyl acrylique) (PPAA), qui déstabilisent les membranes à pH acide de façon plus importante que le PEAA. Il a été montré que l'ajout de PPAA dans des formulations de lipoplexes permettait d'augmenter les niveaux de transfection obtenus *in vitro* (Cheung *et al.*, 2001; Kyriakides *et al.*, 2002). Ainsi, bien qu'aucune étude d'efficacité impliquant des liposomes rendus sensibles au pH par leur complexation avec du PEAA ou du PPAA n'ait été effectuée, ces derniers résultats démontrent le potentiel de ces polymères en tant que vecteur cytoplasmique de principes actifs. Comme dans le cas des polymères de SucPG, à pH neutre, la forte proportion d'acide carboxylique sous forme ionisée des polymères d'acide acrylique risque de favoriser l'élimination rapide des liposomes qu'ils recouvrent par le SPM.

#### 1.5.3.7.3. Les copolymères de *N*-isopropylacrylamide (NIPAM)

L'utilisation d'un copolymère de NIPAM dans le but de conférer une sensibilité au pH à des liposomes a été rapportée pour la première fois par Meyer *et al.* (1998). Tel que décrit à la section 4.1.2 (*Les complexes liposome/polymère sensibles à la température*), la LCST du NIPAM peut être modulée par l'ajout de co-monomères hydrophiles. Lorsque le monomère hydrophile employé est aussi ionisable, il devient à la fois possible d'augmenter la LCST du PNIPAM et de le rendre sensible au pH (Hirotsu *et al.*, 1987; Chen &

Hoffman, 1995). L'insertion de copolymères de NIPAM contenant de l'ODA (ancrage hydrophobe) et de l'acide méthacrylique (MAA, composante sensible au pH) a permis de contrôler la libération du contenu de liposomes conventionnels ou furtifs, cette dernière se produisant au pH correspondant à la transition de phase des polymères (Meyer *et al.*, 1998; Zignani *et al.*, 2000). Ainsi, les liposomes de EPC/Chol, lorsqu'ils sont recouverts d'un copolymère de NIPAM/MAA/ODA (93:5:2), libèrent 80% de leur contenu à pH 4,9 alors qu'ils sont stables à pH 7,2 (Zignani *et al.*, 2000). Par ailleurs, il a été montré que la présence de PEG dans la formulation liposomale empêchait l'insertion d'un copolymère de NIPAM dans la membrane. Cette inhibition, d'origine stérique, peut toutefois être évitée en incorporant le copolymère de NIPAM durant la préparation des liposomes (lors de l'hydratation des lipides). Une libération de 40% du contenu des liposomes de EPC/Chol/PEG-DSPE (3:2:0.3) a ainsi pu être obtenue à pH 4,9. Lors de cette étude conduite par Zignani *et al.* (2000), la libération du contenu liposomal à pH acide a été attribuée à une déstabilisation transitoire de l'intégrité des bicouches par les copolymères de NIPAM. En effet, aucune fusion des membranes de EPC/Chol n'a été observée à pH 4,5. La fusion de liposomes de 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycérophosphatidylcholine (POPC) induite par un copolymère de NIPAM/MAA/ODA (89:10:1) a récemment été rapportée par Félix *et al.* (2002). Le pourcentage de fusion, déterminé par la méthode calcéine-cobalt qui mesure le mélange des contenus aqueux, s'est avéré être supérieur à 10% à pH acide (pH 2,6, 4,1 et 5,6) et 37 °C. Il est à noter que cette dernière étude a été réalisée avec des quantités beaucoup plus importantes de polymère, soit un ratio en poids polymère/lipide de 2,6, alors que ce même ratio était de 0,3 lors de l'étude de Zignani *et al.*

L'interaction entre les copolymères de NIPAM et les vésicules liposomales peut être modulée par le choix des constituants des vésicules. Polozova et Winnik (1999) ont montré que les copolymères de NIPAM, de *N*-glycidylacrylamide et d'un monomère hydrophobe permettant leur ancrage avaient une affinité plus importante pour les vésicules de di(oxyde d'éthylène) d'alkyle (niosomes) que pour les liposomes de phospholipides. Cette observation résulterait de la formation de liens hydrogène entre les groupements amide du

NIPAM et les groupements hydroxyle du surfactant constituant les vésicules. De plus, cette interaction particulière entre les niosomes et les copolymères de NIPAM aurait une influence sur le pH de transition de ces derniers. En effet, il a été démontré que la déstabilisation des vésicules en milieu acide avait lieu à un pH plus élevé que celui induisant la précipitation du copolymère (Francis *et al.*, 2001). Par ailleurs, les complexes niosome/polymère se sont avérés instables dans le sérum (28% du contenu libéré en 3h) alors que, dans les mêmes conditions, les complexes liposome/polymères ont présenté une bonne rétention de leur contenu ( $\approx 5\%$  du contenu libéré). En revanche, l'incubation de ces 2 formulations en présence de sérum a entraîné une perte totale de sensibilité au pH, probablement en raison de l'extraction du polymère par les composantes sériques ou d'une adsorption protéique sur les vésicules. Enfin, tel qu'observé en microscopie, seuls les liposomes ont pu libérer leur contenu en calcéine au niveau du cytoplasme cellulaire après internalisation par phagocytose (Francis *et al.*, 2001). Bien que les copolymères sensibles au pH démontrent certaines caractéristiques intéressantes pour la modification de liposomes, les caractéristiques des vésicules et du polymère demeure à optimiser pour développer un système cliniquement viable.

## **CHAPITRE 2**

### **OBJECTIFS**

## 2.1. Objectifs généraux

Au cours de ces travaux de doctorat, l'objectif principal était de mettre au point une formulation liposomale sensible au pH dans laquelle un polymère provoquerait la libération de son contenu à pH acide. Cette formulation devait être stable en présence de fluides biologiques et montrer un temps de circulation prolongé suite à son administration par voie intraveineuse.

## 2.2. Objectifs spécifiques

Afin de concevoir une formulation liposomale regroupant toutes ces caractéristiques, cette recherche a porté sur différents points liés à la stabilité des formulations *in vitro* et sur leurs propriétés *in vivo*. Les objectifs spécifiques relatifs au développement d'une telle formulation étaient de :

- a) Préparer différents copolymères de NIPAM sensibles au pH et les complexer avec des liposomes afin de produire des vésicules stables à pH neutre mais qui seraient déstabilisées à pH acide.
- b) Évaluer la sensibilité au pH des différentes formulations liposomales ainsi que leur stabilité en présence de fluides biologiques *in vitro*.
- c) Caractériser les changements conformationnels des copolymères de NIPAM en fonction de la température et du pH ainsi que les propriétés de surface des complexes liposome/copolymère.
- d) Évaluer la capacité des complexes liposome/copolymère sensibles au pH à augmenter la cytotoxicité d'un agent anticancéreux *in vitro*.
- e) Établir la pharmacocinétique et la biodistribution des formulations chez le rat.



# **PRÉSENTATION DES MANUSCRITS**

## **CHAPITRE 3**

# **STERIC STABILIZATION OF LIPOSOMES BY PH- RESPONSIVE *N*-ISOPROPYLACRYLAMIDE COPOLYMER**

**Steric stabilization of liposomes by pH-responsive *N*-isopropylacrylamide copolymer [*Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91: 1795-1802, 2002]\***

Emmanuelle Roux<sup>1</sup>, Romain Stomp<sup>2</sup>, Suzanne Giasson<sup>2</sup>, Michel Pézolet<sup>2</sup>, Pierre Moreau<sup>1</sup> and Jean-Christophe Leroux<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering and CERSIM, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada G1K 7P4

\*Corresponding author : mailing address : Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montréal (PQ), H3C 3J7, Canada. Tel. : (514) 343-6455, Fax: (514) 343-7738, Email: jean-christophe.leroux@umontreal.ca.

\*Reproduit avec la permission de John Wiley & Sons, Inc.

### **3.1. Abstract**

The aim of this study was to characterize a pH-sensitive liposome formulation bearing a terminally-alkylated *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) copolymer with regard to its pH-responsiveness, surface properties and pharmacokinetics. The interacting forces between two lipid bilayers bearing the anchored NIPAM copolymer were measured using a surface force apparatus. The pH-triggered content release was evaluated in buffer before and after incubation in human serum. The pharmacokinetics was determined in rats following the intravenous injection of <sup>67</sup>Ga-loaded liposomes with or without the polymer coating. The force measurements between lipid bilayers showed that NIPAM copolymers provide a steric barrier that was dependent on pH. The pH-sensitive liposomes maintained their pH-sensitivity after incubation in serum. *In vivo*, the polymer coated liposomes

exhibited a prolonged circulation time in rats with an area under the blood concentration-time curve 1.6 fold higher than the control formulation. This study showed that liposomes can be rendered pH-sensitive by anchoring a terminally-alkylated NIPAM copolymer at their surface. At neutral pH, the polymer provides a steric barrier which increases the liposome circulation time *in vivo*.

**Keywords.** pH-sensitive liposomes, poly(*N*-isopropylacrylamide), sterically-stabilized liposomes.

### 3.2. Introduction

pH-sensitive liposomes have been suggested as a means to facilitate the delivery of drugs to the cytoplasm following receptor-mediated endocytosis (1). Most pH-sensitive liposome formulations described in the literature are prepared using unsaturated phosphatidylethanolamine (PE) in combination with mildly acidic amphiphiles (2, 3). Although pH-sensitive PE liposomes have been shown to be effective for the *in vitro* cytoplasmic delivery of active agents (1), *in vivo* applications remain rather limited, mainly because of moderate plasma stability and/or rapid removal by the mononuclear phagocyte system (MPS) (4). pH-sensitive polymer/liposome complexes have been developed to avoid the limitations associated with PE-based liposomes (5, 6). In 1998, we demonstrated that copolymers of *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) randomly modified with a hydrophobic alkyl chain and a pH-responsive moiety could trigger pH-sensitivity to intrinsically-stable liposomes (7). Despite this interesting finding, such a formulation would not be clinically viable if it were to be not biocompatible or rapidly cleared following systemic administration. Data on biocompatibility of NIPAM copolymers is scarce but most studies performed to date have revealed good tolerability, both *in vitro* and *in vivo* (8-10). Recently, Yamazaki and coworkers (11) showed that, at 25°C, liposomes coated with poly(NIPAM) adsorb less plasma proteins than their non-coated counterparts. Indeed, a decrease in plasma protein adsorption to the surface of colloidal carriers provided by

hydrophilic polymers such as poly(ethylene glycol) (PEG) has been correlated with increased circulation times *in vivo* (12).

The purpose of this study was to characterize liposomes surface-modified with a pH-responsive NIPAM-copolymer. The pH-sensitivity, stability in human serum, surface properties and effect on the *in vivo* circulation time provided by this polymer were assessed. Since an important factor contributing to the stealth properties of PEGylated liposomes is the mobility of the polymeric chain (13, 14), it was decided to attach hydrophobic anchor to one end of the NIPAM copolymer rather than randomly-alkylating it, to confer an optimal mobility to the hydrophilic segment.

### 3.3. Experimental section

#### 3.3.1. Chemicals

NIPAM and methacrylic acid (MAA) were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). NIPAM was purified by recrystallization from heptane/acetone (3:2, v/v). MAA was purified using an inhibitor remover disposable column (Aldrich). The lipophilic initiator 4,4'-azobis(4-cyano-*N,N*-dioctadecyl)pentanamide (DODA-501) was prepared by reaction of dioctadecylamine (DODA) with disuccinimidyl 4,4'-azobis(4-cyanovalerate) as described previously (15). Egg phosphatidylcholine (EPC), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DPPE) and cholesterol (Chol) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Trisodium 8-hydroxypyrene trisulfonate (HPTS) and *p*-xylene-bis-pyridinium (DPX) were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). <sup>67</sup>Ga citrate was obtained from Dupont Pharma Inc. (Mississauga, ON, Canada).

### 3.3.2. Synthesis of the copolymers

The terminally-alkylated copolymers DODA-poly(NIPAM-co-MAA) (Fig. 1) were prepared by free radical polymerization using DODA-501 as radical initiator (16). This initiator has 2 octadecylamide groups that allow polymer anchoring in the liposome bilayer (17). Briefly, NIPAM, MAA (95:5 molar ratio) and DODA-501 (1 mol%) were dissolved in freshly distilled 1,4-dioxane. The solution was degassed by bubbling N<sub>2</sub> for 15 min and heated at 69 °C for 20 h. The polymers were recovered by precipitation in diethyl ether. They were then dissolved in water, dialyzed for 48h (Molecular weight cut-off 6000-8000, Spectrum Laboratories, Laguna Hills, CA) and freeze-dried.

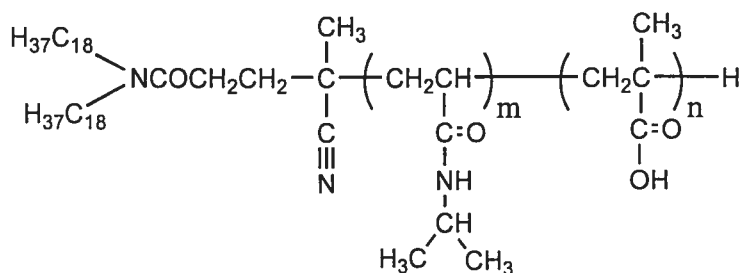


Figure 1. Chemical structure of the terminally-alkylated NIPAM copolymer.

### 3.3.3. Characterization of the copolymer

The copolymers were characterized by <sup>1</sup>H-NMR spectrometry for MAA and DODA contents (18). <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded on a Bruker AMX600 spectrometer in deuterated methanol solutions. The weight-average molecular weight (M<sub>w</sub>) and polydispersity index (PI) of the polymers were determined at 40 °C by gel permeation chromatography performed in tetrahydrofuran using polystyrene standards for calibration. The phase transition pH of the polymers was determined by light scattering at 480 nm (Series 2 Aminco Bowman Fluorometer, Spectronics Instruments Inc. Rochester, NY) at

37°C in phosphate buffered saline (PBS) (53 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 mM NaCl) of different pH values (10).

### 3.3.4. Force-Measuring Technique

The interacting forces between the phospholipid bilayers were directly measured at 22 °C using a surface forces apparatus (SFA) (19). The supports for the bilayers are mica surfaces which are back-silvered, glued onto two cylindrical silica disks, and finally mounted in a crossed-cylinder geometry in the SFA chamber. Briefly, the SFA enables the force as a function of surface separation between the surfaces to be determined by measuring the deflection of a variable stiffness spring that supports the lower surface. The distance between the back silver coated-mica substrates is measured by an interferometry technique that uses fringes of equal chromatic order (19). A force-distance profile is generated by plotting the total measured interaction force ( $F$ ) normalized by the mean radius of curvature of the surfaces ( $R$ ) as a function of the surface separation distance ( $D$ ). The resulting force profiles can be analyzed in terms of the energy per unit area between two infinite flat surfaces using the Derjaguin approximation (Eq. 1) (20).

$$\frac{F(D)}{R \text{ crossed-cylinders}} = 2\pi E(D) \text{ flat-surfaces} \quad (1)$$

### 3.3.5. Construction of supported bilayers

The Langmuir-Blodgett technique was used for the deposition of bilayers of phospholipids (DPPE/DSPC) on the mica surfaces. The phospholipids were spread using chloroform:ethanol (4:1 v/v) solution at a concentration of 1 mg/mL. Transfer ratio determined at room temperature was in the range  $1.0 \pm 0.2$ . The deposition was achieved at 22°C and at a constant dipping rate of 1.5 mm/min. Surface pressures of 35 mN/m were maintained for the deposition of the first layer (DPPE) corresponding to a surface area of 0.36 nm<sup>2</sup> and 30 mN/m for the second layer (DSPC) for a surface area of 0.31 nm<sup>2</sup>. The

resulting bilayer-coated surfaces were constantly maintained under water from the deposition to the mounting into the SFA chamber.

### 3.3.6. SFA preparation

The bilayer-coated mica surfaces were mounted in the SFA chamber without removing them from water and were incubated overnight with 5 mg/mL of copolymer ( $M_w=29\ 000$ ) and 0.1 M NaCl. *N*-(-2-hydroxyethyl)-piperazine-*N'*-(-2-ethanesulfonic acid) (HEPES) (20 mM) was used as buffer.

### 3.3.7. Liposome preparation

Large unilamellar liposomes were composed of EPC/Chol (3:2 molar ratio). The polymer was added to the lipid mixture in chloroform at a ratio of 0.3 *w/w*. After solvent evaporation, dried lipid films were hydrated with an isotonic aqueous solution of the appropriate marker, followed by extrusion through polycarbonate filters of varying pore sizes (50-200 nm). Untrapped marker and free polymer were removed by gel exclusion chromatography over Sepharose 2B (column i.d. 1 cm, length 23 cm), equilibrated with HEPES/dextrose buffer, pH 7.2 (20 mM HEPES, 5% *w/v* dextrose). Liposome size was obtained by dynamic light scattering (N4 Plus, Coulter Electronics, Miami, FL).

### 3.3.8. *In vitro* release kinetics

pH-Sensitive liposomes (20 mM lipids, 125-170 nm, unimodal distribution) containing HPTS-DPX-HEPES (35 mM-50 mM-20 mM) were added to 2-*N*-(morpholino)ethanesulfonic acid (MES)-saline buffer (100 mM MES, 144 mM NaCl, pH 4.9 or 5.8) or to HEPES-saline buffer (20 mM HEPES, 144 mM NaCl, pH 7.2) preheated at 37° C. The content release was calculated from the fluorescence intensity of HPTS ( $\lambda_{ex} = 413\text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 512\text{ nm}$ ) over that obtained following sample lysis in 0.5% Triton X-100. The % leakage at the different time points were corrected for the initial fluorescence of the



sample by subtracting the % HPTS released at time 0, pH 7.2. The *in vitro* release following incubation in serum was done by incubating first the liposomes in 75% preheated human serum for 3h at 37 °C. The excess of serum components was then removed by passage over Sepharose 2B and the release of HPTS from liposomes was determined as described above.

### **3.3.9. *In vivo* pharmacokinetics**

*In vivo* studies were carried out with male Sprague-Dawley rats (300-350 g) (Charles River, St-Constant, PQ, Canada). Rats were surgically prepared for intravenous administration and arterial blood sampling. Polyethylene catheters were inserted into the femoral vein and artery, protected with a tethering system according to the procedure described by Moreau et al. (21), and the rats were allowed to recover for at least 24 h. Liposomes (30 mM lipids, 180-230 nm, unimodal distribution) containing  $^{67}\text{Ga}$  were prepared by hydrating the lipid film with a  $^{67}\text{Ga}$  citrate solution (2 mCi/mL) that was previously neutralized (pH 7.5-8.5). After removal of the free  $^{67}\text{Ga}$ , a 400  $\mu\text{L}$  sample (10  $\mu\text{mol}$  lipids/kg) was administered via the venous cannula. Blood samples (400  $\mu\text{L}$ ) were collected and the levels of  $^{67}\text{Ga}$  were determined by  $\gamma$ -counting (Cobra II auto-gamma counting system, Packard Instrument Company, Meriden, CT).

## **3.4. Results**

### **3.4.1. Phase transition of the copolymers**

The lower critical solution temperature (LCST), which is about 32 °C for the homopolymer, is characteristic of aqueous solutions of poly(NIPAM) (22). Below the LCST, the polymer is hydrated and in coiled conformation whereas it precipitates above it. The introduction of a small amount of MAA as comonomer in the structure of poly(NIPAM) can increase the LCST above 37 °C and makes the polymer pH-sensitive (7).

Fig. 2 shows that the phase transition of the two terminally-alkylated copolymers in isotonic buffer occurs at about pH 5.6 at 37 °C.

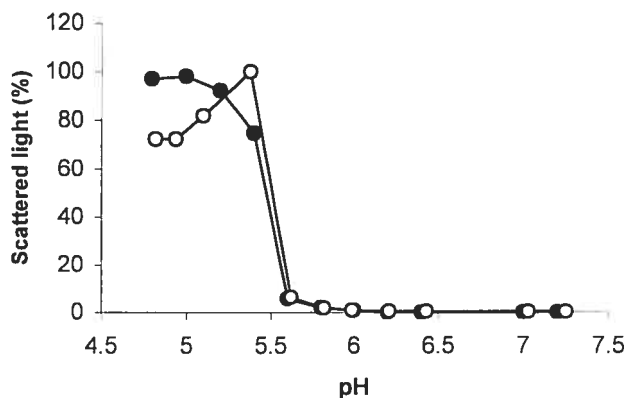


Figure 2. Phase transition of terminally-alkylated NIPAM copolymers at 37 °C. Closed circles:  $M_w=8\ 200$ ,  $PI=2.2$ ; Empty circles:  $M_w=29\ 000$ ,  $PI=2.0$ .

### 3.4.2. Force Measurements

All forces measurements were done with the copolymer having a  $M_w$  of 29 000. The results are presented as force-distance profiles. The curves shown correspond to inward runs, i.e., the measured force as the surfaces are brought toward one another. In the purely repulsive regimes, the forces were reversible and no hysteresis was measured. To establish a well defined reference frame for the experiments, the forces between bilayer-coated mica surfaces in 0.1 mM NaCl in the absence of any copolymer were first measured. The force profile represents an attractive regime that agrees well with currently available literature data (not shown) (23). When the headgroup area of the exposed outer phospholipid layer does not correspond to a full coverage, the exposed hydrophobic core area to the aqueous phase allows hydrophobic attractive forces to emerge at long range (for  $D$  smaller than few nanometer). At shorter range, the presence of steric-hydration repulsion forces may prevent the bilayer to interpenetrate.

When the NIPAM copolymer is added to water at pH 7 (0.1 M NaCl) for a final concentration of 5 mg/L, long range repulsive forces (extending up to  $D=30$  nm), similar to polymer-mediated interaction profiles, are measured between the bilayer-coated surfaces (Fig. 3). At smaller separation distances ( $D<30$  nm) the force raises significantly, becoming increasingly repulsive. The measurements were stopped voluntarily at  $D\approx 15$  nm in order to avoid an irreversible damage of the bilayers. The adsorption most probably occurs via the hydrophobic part of the copolymer (dangling alkyl chain of DODA) that anchors through to the hydrophobic core of the phospholipid bilayer, leaving the hydrophilic and negatively charged part of the copolymer extending into the aqueous solution. The forces between bilayer-coated mica surfaces across the copolymer solution at pH 5.4 are relatively different from the profiles at pH 7 (Fig. 3). The range of repulsive force is significantly reduced and the magnitude of forces is weaker. The shorter range of repulsion forces suggests a partial collapse of the adsorbed copolymer layer. It has to be mentioned that the experiment was carried out at a temperature (22 °C) where the copolymer does not phase separate in order to maintain the integrity of the lipid bilayer.

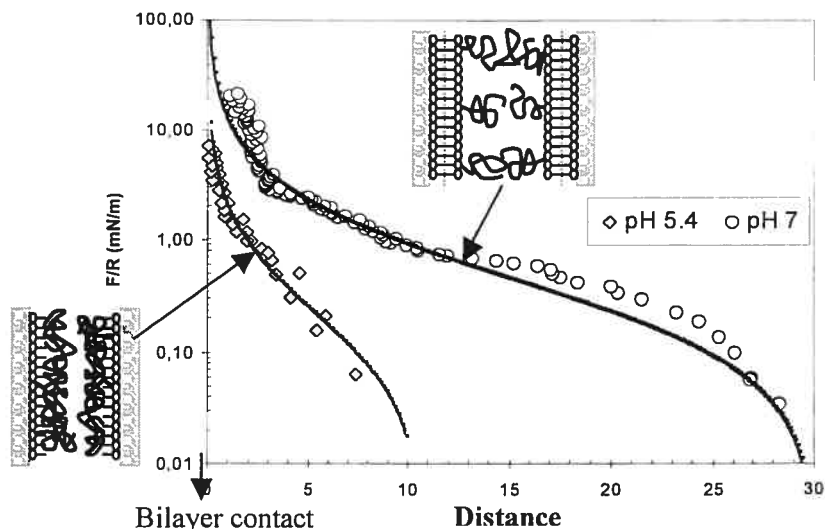


Figure 3. Measured forces normalized by the curvature radius ( $F/R$ ) between supported heterogeneous bilayers (DPPE/DSPC) across the 29 000  $M_w$  copolymer DODA-poly(NIPAM-*co*-MAA) solution at a concentration of 5 mg/L with 0.1 M of NaCl at  $T=22$  °C. The zero reference distance,  $D=0$ , corresponds to the contact of the two bilayer-coated surfaces in water. The forces were measured at pH 5.4 (shaded diamonds) and 7 (open circles). The solid curves to the data are calculated polyelectrolyte-surface interactions using the Eq. 2 with a prefactor of 0.0409 (which includes  $s$ ),  $N=260$  and for pH 5.4:  $f=0.0308$ ,  $L=3.9$  nm, and for pH 7:  $f=0.06015$ ,  $L=15$  nm.

### 3.4.3. In vitro release kinetics

We previously reported that terminally-alkylated NIPAM copolymer ( $M_w=29\ 000$ ) conferred pH-sensitivity to DSPC/Chol liposomes (24). However, experiments undertaken in biological fluids suggested a poor anchoring of the polymer in the liposomal membranes (data not shown). In order to increase the retention of the polymer at the liposomal surface, we decided to use a copolymer of similar composition but having a lower molecular weight

( $M_w$  8 200 vs 29 000) and thus lower hydrophilic-to-lipophilic balance for the *in vitro* release kinetics and *in vivo* experiments. As experiments with the SFA are extremely tedious, surface force measurements were not reproduced with the small molecular weight polymer. It can reasonably be anticipated that only the extent of steric repulsion will change as the molecular weight is decreased.

In a previous study (25), we showed that EPC/Chol liposomes (3:2) bearing a randomly-alkylated copolymer of NIPAM containing 5% MAA ( $M_w=44\ 633$ ) could release up to 80% of their contents at pH 4.9. Fig. 4A shows that the terminally-alkylated copolymer, containing the same molar ratio of MAA, triggered, within 8 min, the release of 75% and 55% liposomal contents at pH 4.9 and 5.8, respectively. The liposomal destabilization is usually correlated to the pH at which the polymer collapses in solution (7, 25), but the significant content leakage observed above the pH of phase transition (5.8) suggests that leakage occurs before the polymer precipitates. Indeed, we demonstrated by FTIR that the anchoring of the polymer in the lipid bilayer does not modify the phase transition threshold (data to be published).

One of the key features in the development of pH-sensitive liposomes is their stability in biological fluids. Despite the fact that some PE-based formulations have been found to be stable in plasma (1), incubation of such liposomes in plasma has often resulted in a rapid loss of pH-sensitivity or substantial shift of the destabilization pH (26). Our results demonstrate that the pH-sensitivity of the polymer-coated liposomes was essentially preserved following 3-h incubation in 75% human serum, with 61% and 38% of HPTS released at pH 4.9 and 5.8, respectively (Fig. 4B).

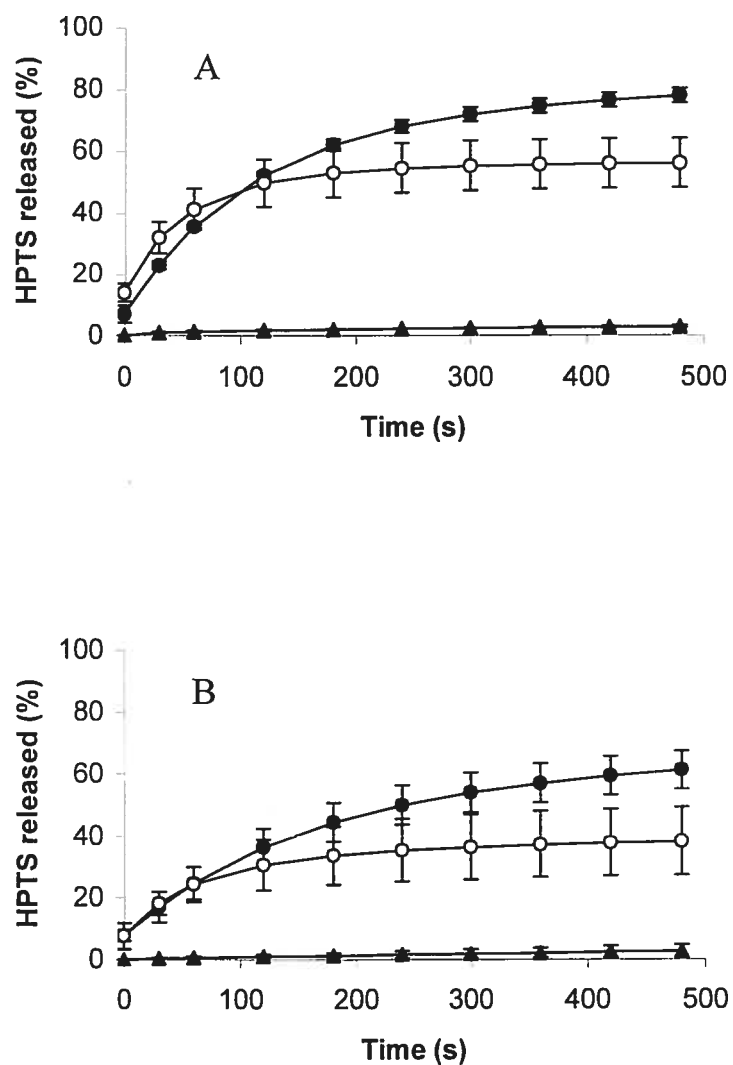


Figure 4. Percent HPTS release over time at 37 °C from EPC/Chol liposomes containing 0.3 w/w of NIPAM copolymer at pH 4.9 (closed circles), 5.8 (open circles) and 7.2 (closed triangles) before (A) and after (B) 1h incubation in 75% human serum at 37 °C. Mean  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments.

### 3.4.4. Pharmacokinetics

Fig. 5 shows the pharmacokinetics of liposomal  $^{67}\text{Ga}$  following intravenous injection of control and polymer-coated liposomes. The pharmacokinetic parameters were calculated using the PK solutions 2.0 software (Summit Research Services, Montrose, CO) and are presented in Table 1. For the time points between 15 min and 4 h, the blood concentrations of polymer-coated liposomes were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than non-coated liposomes. The area under the blood concentration-time curve ( $\text{AUC}_{\infty}$ ) for the polymer-coated liposomes was 1.6 fold higher than that of the control formulation. After 24 h, the radioactivity for both formulations was mostly located in the organs of the MPS (liver and spleen), with  $67 \pm 8\%$  and  $50 \pm 8\%$  of the injected dose found for the non-coated and polymer-coated liposomes, respectively.

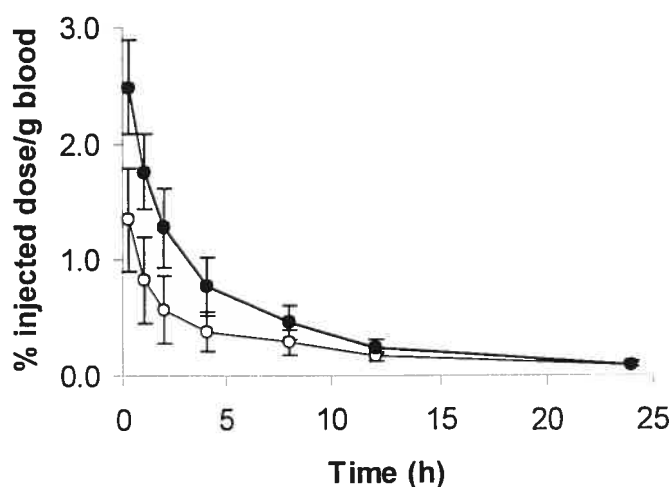


Figure 5. Pharmacokinetics of control (open circles) and pH-sensitive (closed circles) EPC/Chol liposomes. Mean  $\pm$  S.D. (n=6).

Table 1. Pharmacokinetic parameters of control and pH-sensitive EPC/Chol liposomes.

Parameter	Control liposomes	pH-sensitive liposomes
$AUC_{\infty} \pm S.D.$ ([% injected dose]-h/mL)	$7.8 \pm 2.1$	$12.2 \pm 4.4$
$T_{1/2\alpha}$ (h)	$0.60 \pm 0.2$	$0.8 \pm 0.2$
$T_{1/2\beta}$ (h)	$9.8 \pm 2.7$	$7.7 \pm 1.4$

### 3.5. Discussion

We showed, using the SFA, that the high molecular weight pH-sensitive NIPAM copolymer ( $M_w=29\ 000$ ) was able to provide a strong steric barrier to bilayer surfaces at neutral pH. Indeed, the large magnitude of the short-range forces measured at pH 7 for  $D < 30$  nm is indicative of the highly favorable adsorption of the copolymer to the bilayer-coated mica surfaces. The typical S-shaped force profile is characteristic of the interactions measured between neutral polymer- (20) and polyelectrolyte-coated surfaces (27). The structure of the adsorbed layer and therefore the resulting force profile are greatly affected by the pH as evidenced by the change in the magnitude and the range of the repulsive forces measured at pH 5.4. Theoretical force profiles, based on the pioneer work of Pincus on colloidal stabilization with grafted polyelectrolytes (28), were calculated and compared with the experimental data. For this model, Pincus developed an equation based on simple analytic scaling laws quantifying the surface pressure (or interaction forces) between two opposing polyelectrolyte-covered surfaces in high screening regime as a function of separation distance ( $D$ ) in the region of compressed layers ( $D \leq$  twice the layer thickness). The repulsive interaction forces result from a balance between the osmotic pressure of the counter-ions within the polymer layer balanced and the polymer elasticity. The integration of this equation gives the energy of interaction between the two surfaces:



$$E(D) \cong \frac{2kTN^2 f^2}{c_s s^4} \left[ \frac{1}{D} - \frac{1}{2L} \right] \quad (2)$$

where  $s$  is the distance between two grafting sites (i.e.  $1/s^2$  is the polymer grafting density),  $N$  the number of polymer monomers,  $c_s$  the salt concentration and  $L$  the layer thickness. The fraction charge  $f$ , for a given pH, are calculated from the Henderson-Hasselbalch equation, assuming a  $pK_a$  of 5.6.

Reasonable fits could be obtained (Fig. 3) when the adsorbed layer thickness and the numerical prefactor (which includes the interchain distance  $s$ ) were adjustable parameters. The absence of a well-defined exponential decay, typical of electrostatic interaction, is due to the high screening regime (0.1 M corresponding to a Debye length of 1 nm). Assuming a constant prefactor, therefore a constant grafting density, one can quantify the important collapse in the copolymer conformation. The layer thickness,  $L$ , at pH 5.4 is almost reduced by a factor of 4 compared to the one measured at pH 7.

The effect of coating liposomes with water-soluble polymers, like PEG, on their stability has been the object of numerous studies (29, 30). It was demonstrated that an important condition for the prolongation of the circulation times of liposomes *in vivo* is the decrease in opsonin adsorption onto the vesicle surface (31). The opsonization of liposomes can be prevented or slowed down by coating the liposomes with hydrophilic polymer such as PEG derivatives that are known to create a zone mobile steric hindrance near the lipid layer surface (13, 14). The presence of an effective steric barrier has been evidenced by different methods including the direct measure of the interaction between bilayers using the SFA (32, 33).

PEG is not the only hydrophilic polymer capable of providing a protein resistance character to surfaces. Indeed, it has been recently shown that amphiphilic poly(*N*-vinylpyrrolidone)s have a protective effect against serum-induced destabilization (34). Yamazaki and coworkers (11) reported that terminally-alkylated poly(NIPAM) could

reduce the adsorption of plasma proteins on 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-phosphatidylcholine (DMPC) liposomes below the LCST, whereas the steric barrier was abolished above the LCST of the polymer, as it adopts a collapsed conformation. Similarly, it has been shown that liposomes coated with poly(*N*-acryloylpyrrolidine-*co*-NIPAM) interact less with cells below the polymer LCST, whereas the uptake was more important above it (35). Blood platelets adhere on poly(NIPAM)-grafted polystyrene dish surface above the LCST whereas below the LCST, the platelet adhesion is inhibited as for PEG-grafted surfaces (36). These hydrophilic/hydrophobic properties of poly(NIPAM) depending of its conformation (random coil vs globule) have been exploited in the development of intelligent surfaces for cell culture that respond to temperature changes (37).

In this work, we demonstrate that pH-sensitive NIPAM copolymer provides, at neutral pH, a steric barrier sufficient to increase significantly the circulation time of liposomes. Furthermore, these liposomes were able to maintain their pH-sensitivity following incubation in human serum. The slight loss of pH-sensitivity that was observed after incubation in serum may be explained by stabilization resulting from protein binding and/or by partial extraction of the copolymer from the lipid bilayers. This issue is currently under investigation. To the best of our knowledge, it is the first report of the use a polymeric coating capable of simultaneously imparting pH-sensitivity to colloidal carriers and, to some extent, increase their circulation time. However, it has to be pointed out that the steric stabilization provided by the NIPAM copolymer remains marginal in comparison to PEG, where more than 20% of the injected dose can still be found in the blood after 24 h (38). Such a difference may be explained by the higher hydrophilicity and mobility of PEG. Indeed, NIPAM copolymers bear bulky and hydrophobic isopropyl side groups that may not be favorable for reducing the liposome blood clearance. Also, such a copolymer may exhibit higher van der Waals interactions with plasma proteins (39). Various strategies (such as the preparation of a NIPAM/MAA and *N*-vinylpyrrolidone diblock copolymer) are currently investigated to further improve the circulation time of pH-sensitive liposomes.

## Acknowledgments

This work was financially supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR). PM and JCL receive scholarships from the CIHR and the Fonds de la recherche en santé du Québec, respectively. Drs Drummond and Zignani are acknowledged for their helpful advices. Mrs Grondin and Dr. Brazier are acknowledged for their technical and scientific assistance.

## 3.6. References

1. Drummond DC, Zignani M, Leroux J-C. 2000. Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog Lipid Res* 39: 409-460.
2. Connor J, Yatvin MB, Huang L. 1984. pH-sensitive liposomes: acid-induced liposome fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1715-1718.
3. Ellens H, Bentz J, Szoka FC. 1984. pH-induced destabilization of phosphatidylethanolamine-containing liposomes: role of bilayer contact. *Biochemistry* 23: 1532-1538.
4. Connor J, Norley N, Huang L. 1986. Biodistribution of pH-sensitive immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta* 884: 474-481.
5. Maeda M, Kumano A, Tirrell DA. 1988. H<sup>+</sup>-induced release of contents of phosphatidylcholine vesicles bearing surface-bound polyelectrolyte chains. *J Am Chem Soc* 110: 7455-7459.
6. Kono K, Zenitani KI, Takagishi T. 1994. Novel pH-sensitive liposomes: liposomes bearing a poly(ethylene glycol) derivative with carboxyl groups. *Biochim Biophys Acta* 1193: 1-9.
7. Meyer O, Papahadjopoulos D, Leroux JC. 1998. Copolymers of N-isopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes. *FEBS Lett* 42: 61-64.

8. Matsumaru Y, Hyodo A, Nose T, Ito S, Hirano T, Ohashi S. 1996. Applications of thermosensitive polymers as a new embolic material for intravascular neurosurgery. *J Biomater Sci Polym Ed* 7: 795-804.
9. Molinaro G, Adam A, Zignani M, Taillefer J, Schwach-Abdellaoui K, Gurny R, Leroux J-C. 1999. Evaluation of the local and systemic inflammatory responses induced by the subcutaneous injection of different biopolymers. *Proceed Int'l Symp Control Rel Bioact Mater* 26: 607-608.
10. Francis MF, Dhara G, Winnik FM, Leroux J-C. 2001. In vitro evaluation of pH-sensitive polymer/niosome complexes. *Biomacromolecules* 2: 741-749.
11. Yamazaki A, Winnik FM, Cornelius RM, Brash JL. 1999. Modification of liposomes with N-sustituted polyacrylamides: identification of proteins adsorbed from plasma. *Biochim Biophys Acta* 1421: 103-115.
12. Chonn A, Cullis PR. 1992. Ganglioside GM1 and hydrophilic polymers increase liposome circulation times by inhibiting the association of blood proteins. *J Liposome Res* 2: 397-410.
13. Blume G, Cevc G. 1993. Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1146: 157-168.
14. Torchilin VP, Omelyanenko VG, Papisov MI, Bogdanov AA, Trubetskoy VS, Herron JN, Gentry CA. 1994. Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim Biophys Acta* 1195: 11-20.
15. Kitano H, Akatsuka Y, Ise N. 1991. pH-responsive liposomes which contain amphiphiles prepared by using lipophilic radical initiator. *Macromolecules* 24: 42-46.
16. Taillefer J, Brasseur N, van Lier JE, Lenaerts V, Le Garrec D, Leroux J-C. 2001. In-vitro and in-vivo evaluation of pH-responsive polymeric micelles in a photodynamic cancer therapy model. *J Pharm Pharmacol* 53: 155-166.

17. Leroux J, Roux E, Le Garrec D, Hong K, Drummond DC. 2001. N-isopropylacrylamide copolymers for the preparation of pH-sensitive liposomes and polymeric micelles. *J Controlled Release* 72: 71-84.
18. Taillefer J, Jones M-C, Brasseur N, Van Lier JE, Leroux J-C. 2000. Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs. *J Pharm Sci* 89: 52-62.
19. Israelachvili JN. 1973. Thin film studies using multiple beam interferometry. *J Colloid Interface Sci* 44: 259-272.
20. Israelachvili JN. 1992 . *Intermolecular & Surface Forces*, 2nd ed. Academic Press, London.
21. Moreau P, Lamarche L, Laflamme AK, Calderone A, Yamaguchi N, de Champlain J. 1995. Chronic hyperinsulinaemia and hypertension: the role of the sympathetic nervous system. *J Hypertens* 13: 333-40.
22. Heskins M, Guillet JE. 1968. Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Macromol Sci Chem A2*: 1441-1455.
23. Helm CA, Israelachvili JN, McGuiggan PM. 1989. Molecular mechanisms and forces involved in the adhesion and fusion of amphiphilic bilayers. *Science* 246: 919-922.
24. Roux E, Zignani M, Daigle C, Moreau P, Drummond DC, Hong K, Leroux J-C. 2000. pH-sensitive gel phase liposomes. *Proceed Int'l Symp Control Rel Bioact Mater* 27: 215.
25. Zignani M, Drummond DC, Meyer O, Hong K, Leroux J-C. 2000. In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. *Biochim Biophys Acta* 1463: 383-394.
26. Collins D, Litzinger DC, Huang L. 1990. Structural and functional comparisons of pH-sensitive liposomes composed of phosphatidylethanolamine and three different diacylsuccinylglycerols. *Biochim Biophys Acta* 1025: 234-242.

27. Abraham T, Giasson S, Gohy JF, Jérôme R. 2000. Direct measurements of interactions between hydrophobically anchored strongly charged polyelectrolyte brushes. *Langmuir* 16: 4286-4292.
28. Pincus P. 1991. Colloid stabilization with grafted polyelectrolytes. *Macromolecules* 24: 2912-2919.
29. Klibanov A, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. 1990. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 268: 235-237.
30. Lasic D, Martin FJ, Gabizon A, Huang SK, Papahadjopoulos D. 1991. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim Biophys Acta* 1070: 187-192.
31. Patel HM. 1992. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 9: 39-90.
32. Kuhl TL, Leckband DE, Lasic DD, Israelachvili JN. 1994. Modulation of interaction forces between bilayers exposing short-chained ethylene oxide headgroups. *Biophys J* 66: 1479-1488.
33. Efremova NV, Bondurant B, O'Brien DF, Leckband DE. 2000. Measurements of interbilayer forces and protein adsorption on uncharged lipid bilayers displaying poly(ethylene glycol) chains. *Biochemistry* 39: 3441-3451.
34. Torchilin VP, Levchenko TS, Wihlman KR, Yaroslavov AA, Tsatsakis AM, Rizos AK, Michailova EV, Shtilman MI. 2001. Amphiphilic poly-*N*-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification. *Biomaterials* 22: 3035-3044.
35. Kono K, Nakai R, Morimoto K, Takagishi T. 1999. Temperature-dependent interaction of thermo-sensitive polymer-modified liposomes with CV1 cells. *FEBS Lett* 456: 306-310.

36. Uchida K, Sakai K, Ito E, Kwon OH, Kikuchi A, Yamato M, Okano T. 2000. Temperature-dependent modulation of blood platelet movement and morphology on poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *Biomaterials* 21: 923-929.
37. Okano T, Yamada N, Okuhara M, Sakai H, Sakurai Y. 1995. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials* 16: 297-303.
38. Woodle MC, Newman MS, Cohen JA. 1994. Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties. *J Drug Targeting* 2: 397-403.
39. Jeon SI, Lee JH, Andrade JD, De Gennes PG. 1991. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. *J Colloid Interface Sci* 142: 149-158.

## **CHAPITRE 4**

# **POLYMER BASED PH-SENSITIVE CARRIERS AS A MEANS TO IMPROVE THE CYTOPLASMIC DELIVERY OF DRUGS**



**Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drugs [*International Journal of Pharmaceutics*, 242: 25-36, 2002]\***

Emmanuelle Roux<sup>1,2</sup>, Mira Francis<sup>1,2</sup>, Françoise M. Winnik<sup>2,3</sup> and Jean-Christophe Leroux<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Canada Research Chair in Drug Delivery, <sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, <sup>3</sup>Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

\*Corresponding author : mailing address : Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montréal (PQ), H3C 3J7, Canada. Tel. : (514) 343-6455, Fax: (514) 343-7738, [REDACTED]

\*Reproduit avec la permission d'Elsevier.

#### **4.1. Abstract**

pH-Sensitive niosomal and liposomal formulations bearing alkylated *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) copolymers were characterized with regard to vesicle-polymer interaction, pH-responsiveness and stability in human serum. The interactions between the pH-sensitive NIPAM copolymer and the vesicles were studied by spectrofluorimetry, using covalently-attached pyrene as a probe. In contrast to liposomes, where complexation of copolymer to the lipid bilayer is essentially mediated by hydrophobic interactions, the binding between niosomes and PNIPAM was mainly driven by hydrogen bonding. Both formulations were found to rapidly release their contents under mildly acidic conditions. However, the niosomes lost their pH-sensitivity after incubation in serum, whereas liposomes maintained their ability to respond to pH only when

complexed with a copolymer containing a high proportion of hydrophobic anchor. The ability of pH-sensitive liposome/polymer complexes to enhance the cytotoxicity of cytosine arabinofuranoside (ara-C) was evaluated *in vitro* using macrophage-like J774 cells. Ara-C encapsulated in pH-sensitive liposomes exhibited a higher cytotoxicity than the control formulation. This study showed that both niosomes and liposomes can be rendered pH-sensitive by anchoring a randomly-alkylated NIPAM copolymer to their surface. The interactions that take place between the polymer and the vesicles strongly depend on the vesicle nature. pH-sensitive PNIPAM-based liposomes can improve the *in vitro* efficiency of ara-C.

**Keywords.** pH-sensitivity, liposomes, niosomes, poly(*N*-isopropylacrylamide)

## 4.2. Introduction

Over the last decade, the design and synthesis of molecules that can influence the intracellular trafficking of drugs has increased in interest, especially with the advent of gene therapy. While significant progress has been made in passive tissue targeting using colloidal carriers, which exploit the so-called “enhanced permeation and retention effect” (for a review, see Maeda et al., 2000), delivering drugs to specific cellular compartments remains a major challenge. As the pH of endosomes is lower than that of extracellular fluids, this feature has been exploited in the design of systems that facilitate the delivery of active compounds to the cytoplasm *via* a pH-dependent membrane-disruptive and/or fusogenic action. For example, certain viral infections implicate membrane disruption by amphiphilic peptides that undergo conformational transition upon reduction of the pH (Carrasco, 1994). Thus, peptides and conjugates, which mimic viral fusion peptides, have been investigated for the preparation of pH-responsive/fusogenic carriers (Hahn and Kim, 1991; da Costa and Chaimovich, 1997), as well as in DNA delivery (Wagner et al., 1992; Plank et al., 1994). However, these peptides are generally less efficient than viral vectors (Schatzlein, 2001), and their potential immunogenicity may somehow restrict their systemic

administration. Accordingly, several synthetic macromolecules, which exhibit membrane-disruptive properties under mildly acidic conditions, have been proposed to increase the escape of membrane-impermeable compounds from endosomes/lysosomes. Synthetic polymers offer several advantages over peptides and proteins such as simple large-scale production, low cost and low immunogenicity.

Synthetic membrane-active polymers are generally polyelectrolytes that respond to acid titration by a change in their conformation and affinity for membranes. Poly(ethylenimine) (PEI), a polycation, has been extensively studied as a non-viral gene delivery vehicle (for a review, see Godbey et al., 1999). It has been postulated that, following endocytosis, PEI acts as a sponge for protons that are pumped into lysosomes. As the pumped protons are accompanied by an influx of chloride ions, an increase in the osmolarity occurs, inducing lysosomal swelling and bursting (Boussif et al., 1995). This buffering capacity of PEI can also lead to inactivation of lysosomal enzymes due to a pH increase. In addition, PEI can promote the fusion of negatively-charged membranes (Oku et al., 1986) and act as a permeabilizing agent at high concentrations (Godbey et al., 1999). Depending on their state of ionization, polyanions such as poly(2-ethylacrylic acid) (PEAA), can also destabilize phospholipid membranes (Thomas and Tirrell, 1992; Chung et al., 1996). Upon protonation of the carboxylic groups, PEAA undergoes coil-to-globule transition, partitions into the membrane, and eventually causes membrane disruption (Thomas and Tirrell, 1992). Similarly, poly(propylacrylic acid) and random copolymers of acrylic acid and ethyl acrylate possess membrane-destabilizing properties within narrow pH ranges (Murthy et al., 1999; Stayton et al., 2000). These polymers have recently been used in the development of non-viral carriers for gene delivery (Cheung et al., 2002).

pH-sensitive liposomes represent another category of carriers that have been designed to enhance the cytoplasmic bioavailability of drugs (for a review, see Drummond et al., 2000). The most studied class of pH-sensitive liposomes consists of non-bilayer-forming lipids (*e.g.* dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE)) that are stabilized in

bilayer structures at neutral pH by mildly acidic amphiphiles, such as oleic acid or cholesterylhemisuccinate. The protonation of the titratable amphiphile at acidic pH causes membrane destabilization and formation of fusion competent non-bilayer structures. The major concern about pH-sensitive DOPE formulations is their relative instability in plasma or serum (Connor et al., 1986), which results in premature drug leakage (Senior, 1987). Even though the stability can be increased by using double-chain amphiphiles, substantial loss in pH-sensitivity following incubation in plasma has been observed (Liu and Huang, 1989; Collins et al., 1990). Alternatively, intrinsically pH-sensitive liposomes can be prepared with pH-labile plasmalogens, which hydrolysis at acidic pH results in increased liposome permeability (Gerasimov et al., 1997). However, the addition of dihydrocholesterol to such formulations to increase the *in vivo* liposome stability leads to a significant decrease in pH-sensitivity (Gerasimov et al., 1997).

Polymers have also been investigated to confer pH-responsiveness to liposomes. One of the advantages of using stimuli-responsive polymers is the possibility to render almost any liposomal composition sensitive to pH. For example, egg phosphatidylcholine (EPC) liposomes can be destabilized at pH 6.5 by surface-bound PEAA (Maeda et al., 1988). Moreover, hydrophobically-modified PEAA has been shown to induce the fusion of EPC/cholesterol (Chol) liposomes at acidic pH (Chen et al., 1999). However, *in vivo* applications of PEAA-coated liposomes have not been investigated so far, and it may be expected that, upon intravenous injection, the abundance of the negative charges in the polymer would lead to a fast removal of liposomes by the mononuclear phagocyte system (Gabizon and Papahadjopoulos, 1992). Kono et al. (1994) have developed pH-responsive liposomes bearing succinylated poly(glycidol)s, a poly(ethylene glycol) (PEG) derivative with carboxylic groups. These liposomes undergo fusion and leakage below pH 5.5, and can efficiently deliver calcein to the cytoplasm of CV-1 kidney cells (Kono et al., 1994; Kono et al., 1997).

The use of *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) copolymers to confer pH-sensitivity to liposomes was first reported by Meyer et al. (1998). NIPAM homopolymer (PNIPAM) collapses above its lower critical solution temperature (LCST), which is about 32°C in aqueous solution (Heskins and Guillet, 1968). The addition of an ionizable moiety to PNIPAM can increase its LCST above the body temperature, and make the polymer responsive to pH (Hirotsu et al., 1987; Chen and Hoffman, 1995). Hydrophobically-modified NIPAM copolymers containing methacrylic acid (MAA) as the pH-sensitive moiety were shown to trigger the content release of EPC, EPC/Chol and EPC/Chol/1,2-distearoyl-*sn*-glycero-phosphatidylethanolamine-*N*-methoxy(PEG) liposomes under acidic conditions (Meyer et al., 1998; Zignani et al., 2000). While PEAA and succinylated poly(glycidol)s have been only used to confer pH-sensitivity to liposomes composed of fluid phase lipids, NIPAM copolymers were shown to destabilize liposomes made of high temperature phase transition lipids (distearoylphosphatidylcholine,  $T_m = 55^\circ\text{C}$ ) (Roux et al., 2000).

The possible intracellular trafficking route of polymer-based pH-sensitive liposomes following receptor-mediated internalization is illustrated in Figure 1. Following endocytosis, liposomes should be destabilized in response to polymer collapse and release rapidly their contents in the endosomes. By releasing liposomal content prior to reach the lysosomes, premature degradation by hydrolases and peptidases can be minimized (Huang et al., 1983). This may present an advantage for the delivery of labile macromolecules (*e.g.* peptides, antisense oligonucleotides) and certain anticancer drugs like cytosine arabinofuranoside (ara-C) that are degraded in lysosomes following their delivery by non pH-sensitive liposomes (Huang et al., 1983). Depending on the polymer and liposome properties, the endosomal membrane can also be destabilized, therefore facilitating the diffusion of the drug in the cytoplasm.

This manuscript summarizes our recent progress on pH-sensitive vesicles (*i.e.* liposomes and niosomes) obtained through complexation with hydrophobically-modified

NIPAM copolymers. The pH-sensitive vesicles are characterized with respect to their interaction with the copolymers, stability in plasma, pharmacokinetics and ability to release their contents under mildly acidic conditions. Most of the data presented in this manuscript is taken from previously published work

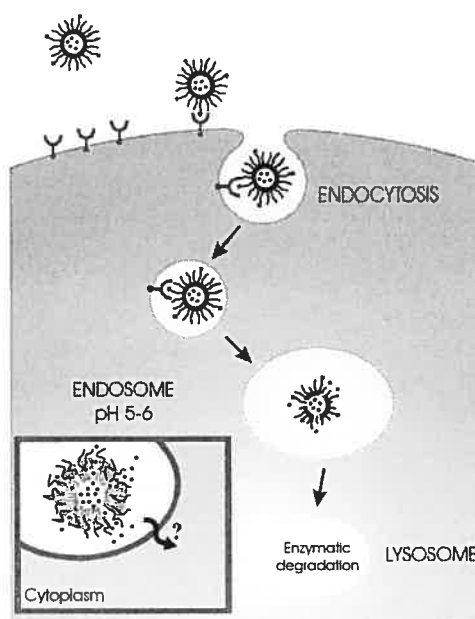


Figure 1. Potential intracellular trafficking route of polymer-based pH-sensitive vesicles following receptor-mediated internalization.

## 4.3. Materials and methods

### 4.3.1. Polymer synthesis

The randomly- and terminally-alkylated copolymers of NIPAM were prepared by free radical polymerization as described previously using either MAA (Leroux et al., 2001) or glycine acrylamide (Gly) as pH-sensitive moiety (Spafford et al., 1998). The selected hydrophobic anchors were octadecylacrylate (ODA) or octadecylacrylamide (ODAm) (randomly-alkylated polymers), and dioctadecylamide (DODAm) (terminally-alkylated

polymer). N-vinylpyrrolidone (VP) was sometimes added to increase the copolymer hydrophilicity. The fluorescently-labeled polymer was prepared by randomly introducing *N*-[4-(1-pyrenyl)butyl]-*N*-*n*-octadecylacrylamide (Py) in the polymeric chain (Spafford et al., 1998). The characteristics of the different polymers are reported in Table 1.

Table 1. Characteristics of the different pH-sensitive polymers

Entry	Formula*	Molecular weight	pH of phase transition at 37°C	Reference
A	P(NIPAM <sub>83</sub> - <i>co</i> -Gly <sub>16</sub> - <i>co</i> -Py <sub>1</sub> )	M <sub>w</sub> = 52,500	3.8	(Spafford et al., 1998)
B	P(NIPAM <sub>93</sub> - <i>co</i> -Gly <sub>5</sub> - <i>co</i> -ODAm <sub>2</sub> )	M <sub>v</sub> = 260,000	4.4	(Francis et al., 2001)
C	P(NIPAM <sub>90</sub> - <i>co</i> -VP <sub>4</sub> - <i>co</i> -MAA <sub>2</sub> - <i>co</i> -ODA <sub>4</sub> )	M <sub>w</sub> = 21,000	6.3	(Leroux et al., 2001)
D	DODAm-P(NIPAM <sub>90</sub> - <i>co</i> -MAA <sub>4</sub> )	M <sub>w</sub> = 8,200	5.6	(Roux et al., 2002)

\*Subscripts indicate mol% of each monomer

#### 4.3.2. Liposome and niosome preparation

Large unilamellar EPC or 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) liposomes were prepared by mechanical dispersion of lipids (including Chol) in the appropriate buffer or marker solution, followed by extrusion through 50-200 nm pore-size filters as described elsewhere (Szoka et al., 1980). Niosomes were prepared using either of *n*-octadecyldiethylene oxide (EO<sub>2</sub>C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>) or *n*-octadecyltriethylene oxide (EO<sub>4</sub>C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>) and Chol, by the reverse-phase evaporation procedure (Szoka and Papahadjopoulos, 1978) or by mechanical dispersion, followed by extrusion. The polymer was added during the vesicle preparation or incubated with preformed vesicles at different polymer to lipid ratios. For more details on the preparation of the vesicles please refer to the studies of Polozova and Winnik (1999), Francis et al. (2001) and Zignani et al. (2000). Cationic and anionic vesicles were prepared by adding respectively, dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB) or dioctadecyl phosphate (DP) to the lipid/surfactant mixture. For the *in vitro* release studies, untrapped marker/drug and free polymer were removed by gel permeation chromatography in HEPES/dextrose buffer, pH 7.2 (20 mM HEPES, 5% w/v dextrose)

(Zignani et al., 2000). Vesicle size was determined by dynamic light scattering (N4 Plus, Coulter Electronics, Miami, FL).

#### 4.3.3. Fluorescence measurements

Emission spectra were recorded with a SPEX Fluorolog 212 spectrometer (Edison, NJ) with an excitation wavelength of 330 nm for pyrene. The ratio  $I_E/I_M$  of the excimer emission intensity to the monomer emission intensity was calculated as the ratio of the intensity of the emission of the excimer at 480 nm to the half-sum of the emission intensities of the monomer at 377 nm and 397 nm (Polozova and Winnik, 1999).

#### 4.3.4. *In vitro* release kinetics

pH-sensitive vesicles (20 mM lipids/surfactants) containing 35 mM trisodium 8-hydroxypyrene trisulfonate (HPTS), 50 mM p-xylene-bis-pyrimidium as the collisional quencher (Molecular Probes, Eugene, OR), and 20 mM HEPES were added to 2-*N*-(morpholino)ethanesulfonic acid (MES)-saline buffer (100 mM MES, 144 mM NaCl, pH 3.0 – 7.2) or to HEPES-saline buffer (20 mM HEPES, 144 mM NaCl, pH 7.2) preheated at 37°C. The content release was calculated from the fluorescence intensity of HPTS ( $\lambda_{ex} = 413$  nm,  $\lambda_{em} = 512$  nm) over that obtained following sample lysis in 0.5% (*w/w*) Triton X-100. The *in vitro* release following incubation in serum was done by incubating first the vesicles in 75% (*v/v*) preheated human serum for 1 h at 37°C. The excess of serum components was then removed by gel permeation chromatography and the release of HPTS from the vesicles was determined as described above (Daleke et al., 1990).

#### 4.3.5. *In vitro* uptake of vesicles by macrophages and cytotoxicity assays

J774 macrophage-like cells (kind gift from professor Michel Desjardins, University of Montreal, Qc, Canada) were grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM,



Invitrogen Corp., ON, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and containing 1 U/mL penicillin G and 1  $\mu$ g/mL streptomycin (Invitrogen). J774 cells were plated in 6-well tissue culture plates (1 mL DMEM-FBS containing  $5 \times 10^5$  viable cells) and allowed to adhere and proliferate for 24 h. Empty liposomes labeled with [ $^3$ H]cholesteryl hexadecyl ether (130-160 nm, unimodal distribution) were added (200  $\mu$ L) to each well, and incubated at 37°C with the cells for 3 h in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Cells were then rinsed 3 times with 2 mL cold phosphate buffered saline (PBS). Cells were lysed by adding 1 mL of triton X-100 (1% w/w in water). Radioactivity of 800- $\mu$ L aliquots was counted to assess the liposome uptake.

The ability of pH-sensitive and non pH-sensitive liposomes to inhibit J774 cell proliferation *in vitro* was determined using cell proliferation assay. EPC/Chol liposomes (4:1 mol/mol, 40 mM lipids, 150-170 nm, unimodal distribution) containing ara-C (Sigma, St. Louis, MO) were prepared by hydrating the lipid film with a 200 mM ara-C solution spiked with [ $^3$ H]ara-C (1 nCi/mL) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Liposomes were extruded as described above. After removal of free ara-C by passage over Sephadex G-100 (column i.d. 1 cm, length 10 cm), liposomes were incubated for 20 h at 4°C with polymer C.

J774 cells were plated in 24-well tissue culture plates (500  $\mu$ L DMEM-FBS containing  $15 \times 10^3$  viable cells) and allowed to adhere and proliferate for 24 h. Liposomes (100  $\mu$ L) were added to each well, after which the cells were incubated for 4 h. Cells were then rinsed twice with 1.5 mL DMEM and then 1 mL of DMEM-FBS was added. Cell proliferation was determined by the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma) as described by Tada et al. (1986). Briefly, MTT (100  $\mu$ L, 5 mg/mL in PBS) was added to the cell cultures after 48 h, and incubation was carried-out for a further 3 h at 37°C. One mL of 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate in 0.01 M HCl was added to each well to dissolve reduced MTT, and the absorbance was measured at 570 nm after overnight incubation at 37°C.

#### 4.4. Results and discussion

The introduction of alkyl chains in PNIPAM allows its anchoring into lipid membranes, and this has been exploited for the acid- (Meyer et al., 1998) and temperature-triggered (Kim et al., 1997) destabilization of liposomes. An important consideration in the development of stimuli-responsive liposomal formulations is their stability in biological fluid, in the absence of stimulus. The physical state of the bilayer plays a critical role in the retention of liposomal content as well as in the circulation time *in vivo* (Senior and Gregoriadis, 1982). Fluid-phase liposomes are known to be leaky in serum, but the addition of Chol in the membrane increases their stability (Kirby et al., 1980). In a previous study (Zignani et al., 2000), we showed that EPC/Chol liposomes bearing a randomly-alkylated NIPAM copolymer containing 5 mol% MAA were stable at pH 7.2 but could release up to 80% of their contents at pH 4.9. We also reported that NIPAM copolymers conferred pH-sensitivity to DSPC/Chol liposomes, which are intrinsically more stable because of the presence of a high temperature phase transition lipid. However, experiments undertaken in biological fluids suggested a poor anchoring of the polymer in such liposomal membranes (Roux et al., 2000). In order to increase the retention of the polymer at the liposomal surface, 2 different approaches were considered: (1) changing the vesicle components and (2) modifying the polymer composition to increase its affinity to the lipid bilayer.

##### **Approach 1 – Evaluation of a non-phospholipid pH-sensitive vesicle formulation**

Non-phospholipid liposomes, also known as niosomes, are physically similar to phospholipid vesicles in that an aqueous core is entrapped in one or several membrane bilayers (Baillie et al., 1985). Depending on the main amphiphile which is used for their preparation (*e.g.* polyoxyethylene alkyl ether), they can form hydrogen bonds *via* ether and hydroxyl groups at their surface. The addition of Chol is usually required to avoid micelle formation and increase stability since the small hydrophilic head group of Chol compensates for the large hydrophilic group of the surfactant (Bouwstra and Junginger,

1995). The charge of the niosomes can be modulated by adding cationic or anionic amphiphiles such as DDAB or DP, respectively. As NIPAM copolymers can form hydrogen bonds through their amide and carboxylic groups, this property was examined as a possible means of increasing the affinity of the pH-sensitive polymer for the vesicles (Polozova and Winnik, 1999).

The interactions between P(NIPAM<sub>83-co</sub>-Gly<sub>16-co</sub>-Py<sub>1</sub>) and different vesicles have been studied by fluorescence spectroscopy, using covalently-attached pyrene as a probe (Polozova and Winnik, 1999). When pyrene molecules are located in close proximity to each other as in micellar assemblies, the fluorescence spectrum presents a broad signal, associated with chromophore excimers, at 480 nm, as well as more resolved signals at 377 nm and 397 nm, due to the emission of monomers that are locally set apart (Fig. 2). However, the association of the polymer with vesicles causes an increase in the intensity of the monomer emission, as the incorporation of the hydrophilic groups in the bilayers spaces pyrene molecules out from each other (Fig. 2).

One possible mechanism involved in the complexation of P(NIPAM<sub>83-co</sub>-Gly<sub>16-co</sub>-Py<sub>1</sub>) with vesicle membranes is the insertion of the alkyl chains in the bilayers *via* hydrophobic interactions. However, it has been shown that the addition of neutral POPC liposomes to P(NIPAM<sub>83-co</sub>-Gly<sub>16-co</sub>-Py<sub>1</sub>) induces only a slight change in the emission spectrum of the polymer, suggesting that relatively poor interactions take place between the polymer and liposomes (Polozova and Winnik, 1999). Figure 3 shows that the addition of increasing amount of cationic surfactant (DDAB) into POPC liposomes triggers an important decrease in the ratio of excimer to monomer intensity of P(NIPAM<sub>83-co</sub>-Gly<sub>16-co</sub>-Py<sub>1</sub>). As this effect increases with the charge density of the cationic liposomes, attractive electrostatic forces seem, in this case, to be the main driving force for the formation of the complexes. This change in the emission spectrum of the copolymer is even more significant in the presence of cationic niosomes (EO<sub>2</sub>C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>/Chol/DDAB). Moreover, the  $I_E/I_M$  ratio reaches its lowest value with a small amount of cationic component (2 wt %) and remains

unchanged with further increase of DDAB. Figure 3 also shows that, upon addition of low charge density anionic niosomes ( $\text{EO}_2\text{C}_{18}\text{H}_{37}/\text{Chol}/\text{DP}$ ), the  $I_E/I_M$  ratio reaches values close to those obtained with cationic niosomes. As the negative charge density further increases, the electrostatic repulsion forces overcome these interactions. This unusual behavior is indicative of a peculiar binding mechanism between niosomes and NIPAM copolymers.

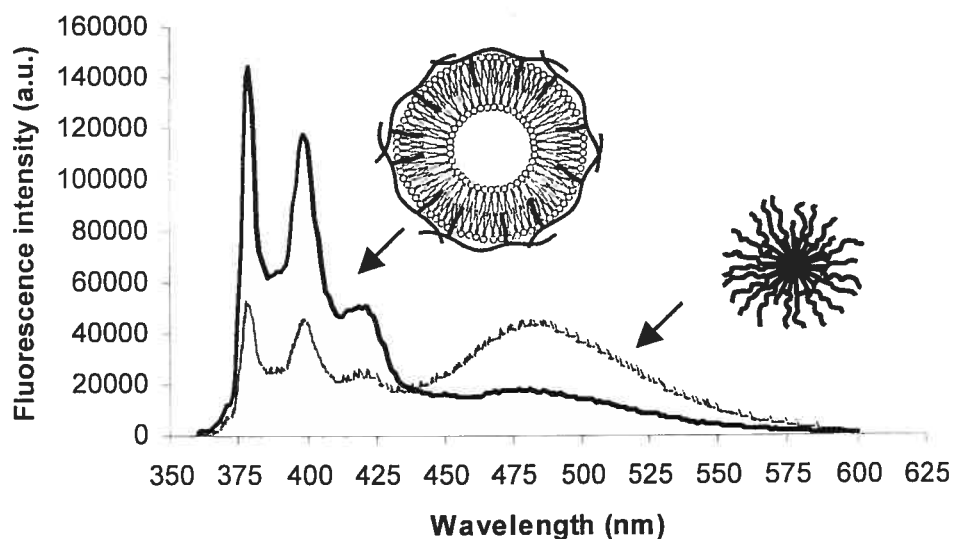


Figure 2. Variation in the fluorescence spectrum of  $\text{P}(\text{NIPAM}_{83}\text{-co-Gly}_{16}\text{-co-Py}_1)$  (polymer A) upon their complexation with cationic niosomes.  $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$ ; polymer concentration,  $0.002 \text{ g/L}$ ; total lipid concentration,  $0.1 \text{ g/L}$ ; niosome composition ( $w/w$ ), 75%  $\text{EO}_2\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ , 20% Chol, 5% DDAB. Adapted from Polozova and Winnik (1999) with permission from the American Chemical Society.

Indeed, these results and those reported by Polozova and Winnik (1999) suggest that the binding mechanism of PNIPAM to niosomes is different than liposomes. Hydrophobic interactions *via* the non-polar side group of the copolymer with neutral liposomes are relatively weak and the addition of a cationic amphiphile promotes the formation of electrostatic interactions, causing a stronger complexation. In contrast, the entire surface of

niosomes seems to participate in the formation of hydrogen bonds between the amide groups of NIPAM and the hydroxyl groups of the ethoxylated surfactant, or between the amide proton of NIPAM and the ether oxygen of the surfactant (Polozova and Winnik, 1999). Moreover, this strong interaction prevails in the control of polymer adsorption to niosomes, as it can overcome repulsive electrostatic interactions between the polymer and anionic niosomes. As stability of the formulation is a prerequisite for efficient vesicle-mediated delivery of therapeutic agents, this unique feature in the mechanism of interaction renders niosomes attractive vesicles for the preparation of pH-sensitive carriers.

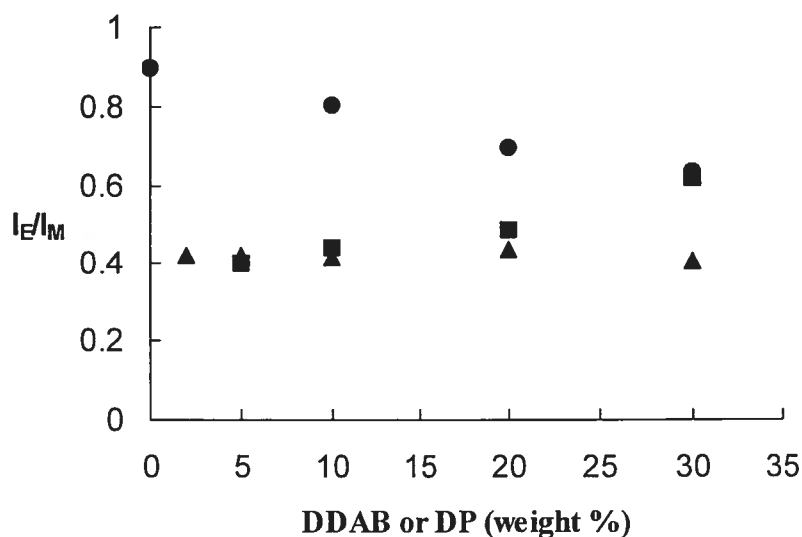


Figure 3. Change in the ratio  $I_E/I_M$  as a function of the amount of charged surfactant in mixtures of P(NIPAM<sub>83</sub>-co-Gly<sub>16</sub>-co-Py<sub>1</sub>) (polymer A) with vesicles of different types: EO<sub>2</sub>C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>/Chol/DDAB niosomes (triangles), EO<sub>2</sub>C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>/Chol/DP niosomes (squares) and POPC/DDAB liposomes (circles). Polymer concentration, 0.002 g/L; total lipid concentration, 0.01 g/L; Tris buffer (5 mM) containing 0.15 M NaCl. Reproduced from Polozova and Winnik (1999) with permission from the American Chemical Society.

As shown in Figure 4, the hydrophobically-modified NIPAM/Gly copolymer (Table 1, polymer **B**) is able to trigger the release of an encapsulated fluorescent dye (HPTS) from both niosomes and liposomes at acidic pH, whereas the vesicles remain stable at neutral pH (data not shown). However, the range of pH over which the copolymer destabilizes the vesicles is different in both cases, starting at about pH 4.5 and 5.2 for liposomes and niosomes, respectively. The difference between both formulations might be explained by the interactions that take place between the copolymer and the 2 types of vesicles. It has been previously demonstrated that binding of hydrophobically-modified NIPAM/MAA copolymer to liposomes does not significantly modify its phase transition pH (Meyer et al., 1998). The acid-triggered destabilization of the liposomes occurred at the phase transition pH of the polymer, which is about 4.4 at 37°C (Francis et al., 2001) (Table 1). However, for niosomes, destabilization took place at a higher pH than that of polymer collapse. In this case, the complex formation is predominantly controlled by hydrogen bonding, and this may affect the hydration of the isopropylacrylamide group and thus, the pH at which the polymer collapses.

We previously found that incubation of DSPC/Chol liposomes complexed with NIPAM copolymer in human serum leads to a substantial shift in the pH of destabilization, suggesting partial extraction of the copolymer from the bilayers (Roux et al., 2000). In the case of niosomal formulations, the cooperativity of hydrogen bonding in the complexation of PNIPAM to vesicles was thought to favor a more stable anchoring of the polymer. However, Figure 4 shows that, following incubation in serum, the niosomes completely lost their pH-sensitivity. This was partially attributed to premature collapse of the polymer in serum (Francis et al., 2001). It is known that some ions influence the phase transition of PNIPAM (Park and Hoffman, 1993). Indeed, niosomes complexed with hydrophobically-modified NIPAM/Gly polymer (polymer **B**) released almost 20% of their contents at pH 7.2 in the presence of 4 mM calcium ions (Francis et al., 2001). A similar loss of pH-sensitivity after incubation in serum was also observed for the control liposome formulation (Fig. 4), although in this case, the liposomes were shown to retain their contents in the

presence of calcium, as well as in serum (Francis et al., 2001). Still, for both formulations, possible extraction of the polymer by serum components or adsorption of serum proteins on the vesicle can decrease pH-responsiveness.

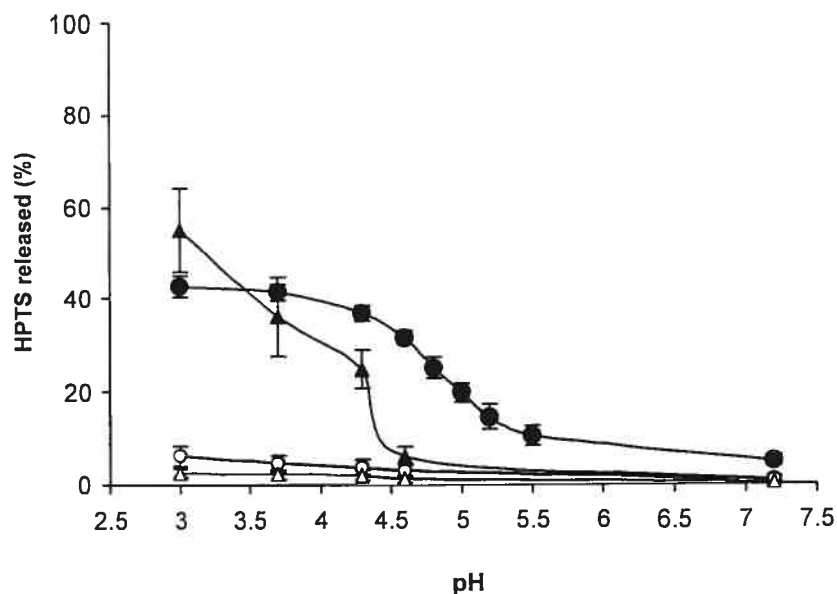


Figure 4. Percent HPTS release after 3 min at 37°C from EO<sub>4</sub>C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>/Chol niosomes (3:2 mol/mol) (circles) and POPC/Chol liposomes (3:2 mol/mol) (triangles) incubated with 0.3 (w/w) of P(NIPAM<sub>93</sub>-co-Gly<sub>5</sub>-co-ODAM<sub>2</sub>) (polymer **B**) as a function of pH (3.0 – 7.0), before (closed symbols) and after (open symbols) 1-h incubation in 75% human serum at 37°C. Adapted from Francis et al. (2001) with permission from the American Chemical Society.

The ability of these pH-sensitive vesicles to facilitate the transfer of a fluorescent marker (*i.e.* calcein) in the cytoplasm of J774 macrophage-like cells has been qualitatively assayed by fluorescence microscopy (Francis et al., 2001). Upon liposome phagocytosis, the cells displayed a weak and vesicular fluorescence reflecting the presence of the probe in

the endosomal/lysosomal compartments. Unfortunately, niosome/polymer complexes were unable to efficiently deliver calcein to macrophages cytoplasm, as demonstrated by the punctuated fluorescence pattern observed (Francis et al., 2001). This was attributed to a premature collapse of the copolymer in the incubation medium causing a release of the dye before internalization of the vesicles. In contrast, cells treated with liposome/polymer complexes displayed a more diffuse fluorescence, indicating rapid diffusion of the dye in the cell cytoplasm (Francis et al., 2001). However, these experiments were carried in the absence of serum, thus minimizing extraction of the polymer from vesicles by the incubation medium. Accordingly, even though PNIPAM can bind with strong avidity to niosomes, the overall stability of the resulting formulation remains inadequate in physiological fluids and would require further optimization.

### **Approach 2 – Adjustment of the polymer composition**

As extraction of the copolymer from the vesicle bilayer is thought to be the major limitation in the stability of liposome/copolymer complexes, another approach was to modify the polymer composition to increase its affinity to the lipid bilayer. In comparison with the first generation of P(NIPAM-*co*-MAA-*co*-ODA) typically containing 2 mol% ODA (anchor) (Meyer et al., 1998; Zignani et al., 2000; Leroux et al., 2001), the ODA content was increased to 4 mol%. The MAA content was also decreased to 2 mol%, in order to bring the phase transition pH (Table 1, polymer C) to a value close to the endosomal pH (5.5-6.5). Finally, VP was added to provide the polymer enough water-solubility. Figure 5 shows that this copolymer triggered, within 8 min, the release of 24 and 59% liposomal contents at pH 4.9, depending on whether the copolymer was simply incubated with preformed liposomes or incorporated during the liposome preparation procedure. These liposomes were stable at neutral pH. The lower content release obtained with the complexes prepared by the incubation method could be explained by a lower binding to the lipid bilayer due to the presence strong intra/interchain hydrophobic domains. Our results also demonstrate that the pH-sensitivity of the formulation prepared



by incorporating the polymer during the liposome preparation procedure was essentially preserved following 3-h incubation in human serum, with 46% of HPTS released at pH 4.9 (Fig. 5). Another method to increase the affinity of the copolymer to the lipid bilayer is to prepare a terminally-alkylated copolymer bearing 2 octadecyl chains at one extremity and a shorter PNIPAM segment (Table 1, polymer **D**). Such pH-sensitive liposomes were recently shown to maintain their pH-sensitivity in serum and exhibited, *in vivo*, a circulation time which was even higher than the control formulation (60% increase in AUC) (Roux et al., 2002). This suggests that the terminally-alkylated NIPAM copolymer can to some extent sterically-stabilize liposomes at neutral pH, although this effect remains marginal in comparison to PEG.

As the ultimate goal is to produce a pH-sensitive liposomal formulation that will facilitate the cytoplasmic delivery of drugs, the *in vitro* efficiency of the formulation was assessed on J774 macrophage-like cells using ara-C as model anticancer drug. Ara-C was chosen because of its susceptibility to degradation by lysosomal enzymes (Huang et al., 1983). First, we verified whether the randomly-alkylated polymer/liposome complexes and the control liposomes were taken up to the same extent by J774 cells. Indeed, below the LCST, it has been demonstrated that PNIPAM copolymers could reduce liposome-cell interactions (Yamazaki et al., 1999). No significant difference was observed between the uptake of the copolymer-coated liposomes versus the non-coated one (data not shown). Compared to the control formulation, a small but significant increase in the ara-C efficiency was observed when the drug was loaded into the pH-sensitive liposomes (Fig. 6). The polymer alone was not toxic at the concentrations tested (data not shown). Thus, rapid release in the endosome probably ensures more efficient delivery of ara-C to the cytoplasm. Increased drug efficacy with liposomal ara-C has been observed with other pH-sensitive formulations. Compared to pH-insensitive formulations, ara-C loaded in pH-sensitive targeted liposomes was found to be more cytotoxic to L-929 cells (Connor and Huang, 1986), CV-1 cells (Brown and Silvius, 1990) and KB cells (Rui et al., 1998).

We have to point out that ara-C is not an optimal model for evaluating the performance of this specific pH-sensitive formulation. Indeed, it turned out that in the presence of the copolymer, ara-C precipitated. Accordingly, the polymer was incorporated in the bilayer by incubation with preformed liposomes, a procedure which does not lead to maximal drug release under acidic conditions (Fig. 5).

## 4.5. Conclusion

The concept of pH-responsive vesicles was originally proposed more than 2 decades ago. Despite initial promising results, this approach is still granted with limited success. In order to be efficient, a pH-sensitive colloidal formulation should bear a number of essential properties, which include biocompatibility of the carrier, stability in serum, long circulation time *in vivo*, interaction with targeted cells and internalization, rapid release following the application of the stimulus, and finally escape of the drug from the endosomal/lysosomal compartments. To date, all these characteristics have not been combined into one formulation with great success. Still a lot of work remains to be carried out to produce a clinically viable formulation. Because of their great versatility polymer/vesicle complexes may provide a means of achieving such a goal. PNIPAM offers interesting characteristics that have not yet been fully exploited in the design of pH-sensitive carriers. Stability in serum and rapid release under acidic conditions can be achieved with PNIPAM formulations. However, it is still unknown whether the attachment of a targeting ligand will compromise pH-responsiveness. Moreover, despite the recent progress, PNIPAM liposomal formulations need to be further optimized with respect to their circulation time *in vivo* and ability to efficiently deliver their contents to the cytoplasm.

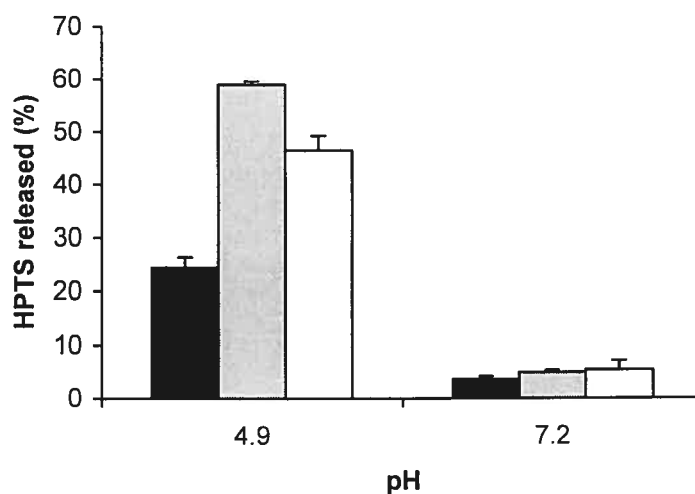


Figure 5. Percent HPTS release after 8 min at 37 °C from EPC/Chol liposomes (3:2 mol/mol) at pH 4.9 and 5.8, before (closed bars) and after (open bars) 1-h incubation in 75% human serum. P(NIPAM<sub>90</sub>-*co*-VP<sub>4</sub>-*co*-MAA<sub>2</sub>-*co*-ODA<sub>4</sub>) was either incorporated during liposome preparation (open and shaded bars) or incubated overnight at 4°C with liposomes (black bars). Mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

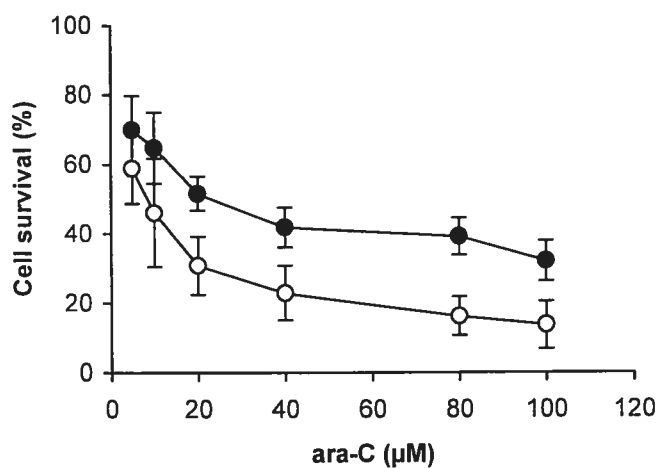


Figure 6. Toxicity of ara-C encapsulated in control (closed circles) and pH-sensitive (open circles) EPC/Chol liposomes (4:1 mol/mol) toward J774 cells. Mean  $\pm$  S.D. (n = 5).

## Acknowledgements

This work was financially supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Canada Research Chair Program. JCL acknowledges a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## 4.6. References

- Baillie, A. J., Florence, A. T., Hume, L. R., Muirhead, G. T., Rogerson, A., 1985. The preparation and properties of niosomes-non-ionic surfactant vesicles. *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 863-868.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J. P., 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7297-7301.
- Bouwstra, J. A., Junginger, H. E., 1995. Non-ionic surfactant vesicles (niosomes) for oral and transdermal administration of drugs. In: Puiseux, F., Couvreur, P., Delattre, J., Devissaguet, J.-P. (eds), *Liposomes, new systems and new trends in their applications*. Editions de Santé, Paris, pp. 99-121
- Brown, P. M., Silvius, J. R., 1990. Mechanisms of delivery of liposome-encapsulated cytosine arabinoside to CV-1 cells in vitro. *Fluorescence-microscopic and cytotoxicity studies. Biochim. Biophys. Acta* 1023, 341-335.
- Carrasco, L., 1994. Entry of animal viruses and macromolecules into cells. *FEBS Lett.* 350, 151-154.
- Chen, G., Hoffman, A. S., 1995. Graft polymers that exhibit temperature-induced phase transitions over a wide range of pH. *Nature* 373, 49-52.
- Chen, T., Choi, L. S., Einstein, S., Klippenstein, M. A., Scherrer, P., Cullis, P. R., 1999. Proton-induced permeability and fusion of large unilamellar vesicles by covalently conjugated poly(2-ethylacrylic acid). *J. Liposome Res.* 9, 387-405.

- Cheung, C. Y., Murthy, N., Stayton, P. S., Hoffman, A. S., 2002. A pH-sensitive polymer that enhances cationic lipid-mediated gene transfer. *Bioconjugate Chem.* In Press.
- Chung, J. C., Gross, D. J., Thomas, J. L., Tirrell, D. A., Opsahl-Ong, L., 1996. pH-sensitive, cation-selective channels formed by simple synthetic polyelectrolyte in artificial bilayer membranes. *Macromolecules* 29, 4636-4641.
- Collins, D., Litzinger, D. C., Huang, L., 1990. Structural and functional comparisons of pH-sensitive liposomes composed of phosphatidylethanolamine and three different diacylsuccinylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta* 1025, 234-242.
- Connor, J., Huang, L., 1986. pH-sensitive immunoliposomes as an efficient and target-specific carrier for antitumor drugs. *Cancer Res.* 46, 3431-3435.
- Connor, J., Norley, N., Huang, L., 1986. Biodistribution of pH-sensitive immunoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 884, 474-481.
- da Costa, M. H., Chaimovich, H., 1997. Structure-activity relationships in the fusion of small unilamellar phosphatidylcholine vesicles induced by a model peptide. *Biochimie* 79, 509-516.
- Daleke, D. L., Hong, K., Papahadjopoulos, D., 1990. Endocytosis of liposomes by macrophages: binding, acidification and leakage of liposomes monitored by a new fluorescence assay. *Biochim. Biophys. Acta* 1024, 352-366.
- Drummond, D. C., Zignani, M., Leroux, J.-C., 2000. Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog. Lipid Res.* 39, 409-460.
- Francis, M. F., Dhara, G., Winnik, F. M., Leroux, J.-C., 2001. In vitro evaluation of pH-sensitive polymer/niosome complexes. *Biomacromolecules* 2, 741-749.
- Gabizon, A., Papahadjopoulos, D., 1992. The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 1103, 94-100.
- Gerasimov, O. V., Schwan, A., Thompson, D. H., 1997. Acid-catalyzed plasmemylcholine hydrolysis and its effect on bilayer permeability: a quantitative study. *Biochim. Biophys. Acta* 1324, 202-214.

- Godbey, W. T., Wu, K. K., Mikos, A. G., 1999. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J. Controlled Release*. 60, 149-160.
- Hahn, K. H., Kim, H., 1991. Fusion and fragmentation of phospholipid vesicles by apohemoglobin at low pH. *J. Biochem.* 110, 635-640.
- Heskins, M., Guillet, J. E., 1968. Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Chem.* A2, 1441-1455.
- Hirotsu, S., Hirokawa, Y., Tanaka, T., 1987. Volume-phase transitions of ionized *N*-isopropylacrilamide gels. *J. Chem. Phys.* 87, 1392-1395.
- Huang, A., Kennel, S. J., Huang, L., 1983. Interactions of immunoliposomes with target cells. *J. Biol. Chem.* 258, 14034-14040.
- Kim, J. C., Bae, S. K., Kim, J. D., 1997. Temperature-sensitivity of liposomal lipid bilayers mixed with poly(*N*-isopropylacrylamide). *J. Biochem.* 121, 15-19.
- Kirby, C., Clarke, J., Gregoriadis, G., 1980. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochem. J.* 186, 591-598.
- Kono, K., Igawa, T., Takagishi, T., 1997. Cytoplasmic delivery of calcein mediated by liposomes modified with a pH-sensitive poly(ethylene glycol) derivative. *Biochim. Biophys. Acta* 1325, 143-154.
- Kono, K., Zenitani, K. I., Takagishi, T., 1994. Novel pH-sensitive liposomes: liposomes bearing a poly(ethylene glycol) derivative with carboxyl groups. *Biochim. Biophys. Acta* 1193, 1-9.
- Leroux, J., Roux, E., Le Garrec, D., Hong, K., Drummond, D. C., 2001. *N*-isopropylacrylamide copolymers for the preparation of pH-sensitive liposomes and polymeric micelles. *J. Controlled Release* 72, 71-84.
- Liu, D., Huang, L., 1989. Small, but not large, unilamellar liposomes composed of dioleoylphosphatidylethanolamine and oleic acid can be stabilized by human plasma. *Biochemistry* 28, 7700-7707.

- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Controlled Release* 65, 271-284.
- Maeda, M., Kumano, A., Tirrell, D. A., 1988. H<sup>+</sup>-induced release of contents of phosphatidylcholine vesicles bearing surface-bound polyelectrolyte chains. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7455-7459.
- Meyer, O., Papahadjopoulos, D., Leroux, J. C., 1998. Copolymers of *N*-isopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes. *FEBS Lett.* 42, 61-64.
- Murthy, N., Robichaud, J. R., Tirrell, D. A., Stayton, P. S., Hoffman, A. S., 1999. The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J. Controlled Release* 61, 137-143.
- Oku, N., Yamaguchi, N., Yamaguchi, N., Shibamoto, S., Ito, F., Nango, M., 1986. The fusogenic effect of synthetic polycations on negatively charged lipid bilayers. *J. Biochem.* 100, 935-944.
- Park, T. G., Hoffman, A. S., 1993. Sodium chloride-induced phase transition in nionic poly(*N*-isopropylacrylamide) gel. *Macromolecules* 26, 5045-5048.
- Plank, C., Oberhauser, B., Mechtler, K., Koch, C., Wagner, E., 1994. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J. Biol. Chem.* 269, 12918-12924.
- Polozova, A., Winnik, F. M., 1999. Contribution of hydrogen bonding to the association of liposomes and an anionic hydrophobically modified poly(*N*-isopropylacrylamide). *Langmuir* 15, 4222-4229.
- Roux, E., Stomp, R., Giasson, S., Pézolet, M., Moreau, P., Leroux, J.-C., 2002. Steric stabilization of liposomes by pH-responsive *N*-isopropylacrylamide copolymer. *J. Pharm. Sci.* 91, 1795-1802.

- Roux, E., Zignani, M., Daigle, C., Moreau, P., Drummond, D. C., Hong, K., Leroux, J.-C., 2000. pH-sensitive gel phase liposomes. *Proceed Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 27, 215.
- Rui, Y., Wang, S., Low, P. S., Thompson, D. H., 1998. Dimenylcholine-folate liposomes: An efficient vehicle for intracellular drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 11213-11218.
- Schatzlein, A. G., 2001. Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress. *Anti-Cancer Drugs* 12, 275-304.
- Senior, J., Gregoriadis, G., 1982. Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life Sci.* 30, 2123-2136.
- Senior, J. H., 1987. Fate and behaviour of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 3, 123-193.
- Spafford, M., Polozova, A., Winnik, F. M., 1998. Synthesis and characterization of a hydrophobically modified copolymer of *N*-isopropylacrylamide and glycyl acrylamide. *Macromolecules* 31, 7099-7102.
- Stayton, P. S., Hoffman, A. S., Murthy, N., Lackey, C., Cheung, C., Tan, P., Klumb, L. A., Chilkoti, A., Wilbur, F. S., Press, O. W., 2000. Molecular engineering of proteins and polymers for targeting and intracellular delivery of therapeutics. *J. Controlled Release* 65, 203-220.
- Szoka, F., Olson, F., Heath, T., Vail, W., Mayhew, E., Papahadjopoulos, D., 1980. Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2  $\mu\text{m}$ ) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 601, 559-571.
- Szoka, F. J., Papahadjopoulos, D., 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4194-4198.



- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K., 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* 93, 157-165.
- Thomas, J. L., Tirrell, D. A., 1992. Polyelectrolyte-sensitized phospholipid vesicles. *Acc. Chem. Res.* 25, 336-342.
- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., Birnstiel, M. L., 1992. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7934-7938.
- Yamazaki, A., Winnik, F. M., Cornelius, R. M., Brash, J. L., 1999. Modification of liposomes with N-substituted polyacrylamides: identification of proteins adsorbed from plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 1421, 103-115.
- Zignani, M., Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Leroux, J.-C., 2000. In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. *Biochim. Biophys. Acta* 1463, 383-394.

## **CHAPITRE 5**

### **ON THE CHARACTERIZATION OF PH-SENSITIVE POLYMER/LIPOSOME COMPLEXES**

## On the characterization of pH-sensitive liposome/polymer complexes [*Biomacromolecules*, 4: 240-248, 2003]\*

Emmanuelle Roux<sup>1</sup>, Michel Lafleur<sup>2</sup>, Émilie Lataste<sup>2</sup>, Pierre Moreau<sup>1</sup> and Jean-Christophe Leroux<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, <sup>2</sup>Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

<sup>3</sup>Corresponding author : mailing address : Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montréal (PQ), H3C 3J7, Canada. Tel. : (514) 343-6455, Fax: (514) 343-7738, [REDACTED] | [REDACTED]

\*Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society.

### 5.1. Abstract

A randomly-alkylated copolymer of *N*-isopropylacrylamide, methacrylic acid and *N*-vinyl-2-pyrrolidone was characterized with regard to its pH- and temperature-triggered conformational change. It was then complexed to liposomes to produce pH-responsive vesicles. Light scattering and differential scanning calorimetry experiments performed at neutral pH revealed that the polymer underwent coil-to-globule phase transition over a wide range of temperatures. At 37°C and pH 7.4, although the polymer was water-soluble, Fourier transform infrared spectroscopy analysis showed that it was partly dehydrated. At acidic pH, the decrease in the lower critical solution temperature was accompanied by an increase in cooperativity degree of the phase transition. Complexation of copolymer to liposomes did not substantially influence its phase transition. The liposome/copolymer complexes were stable at neutral pH but rapidly released their contents under acidic

conditions. The copolymer slightly increased liposome circulation time following intravenous administration to rats. The addition of poly(ethylene glycol) to the formulation had a detrimental effect on pH-sensitivity but enhanced substantially the circulation time.

**Keywords.** pH-sensitive liposomes, poly(*N*-isopropylacrylamide), sterically-stabilized liposomes.

## 5.2. Introduction

Over the past 2 decades, progress in liposome drug delivery has led to the commercialization of liposomal anticancer drug formulations (e.g., Doxil<sup>®</sup>, DaunoXome<sup>®</sup>). Encapsulating anticancer drugs in liposomes can increase their therapeutic index by decreasing the toxicity associated with non-specific drug distribution and by increasing drug localization in tumoral tissues (for a review, see Drummond *et al.* (1)). Indeed, discontinuities in the newly formed microvasculature of fast growing tumors and poor lymphatic drainage (enhanced permeation and retention effect) allow liposome extravasation from blood vessels and accumulation in neoplasms (for a review, see Maeda *et al.* (2)). However, to passively target tumors, liposomes should exhibit a prolonged systemic circulation time following intravenous (iv) administration. Such a condition is achieved with “sterically-stabilized liposomes” (SSL). These liposomes generally bear a lipid derivative of poly(ethylene glycol) (PEG) that can slow down liposomal clearance by the mononuclear phagocyte system (3-5). Following their extravasation, these so-called long-circulating liposomes act as microreservoirs in the tumor surroundings from where the free drug diffuses to the cells (6, 7). It is however believed that the efficacy of the therapeutic drug could be further improved by increasing the release rate at the tumoral site (8).

To this end, stimuli-responsive liposomes have been proposed to facilitate drug release in the targeted tissues. In particular, pH-sensitive liposomes were introduced in the

early eighties as a means of increasing drug delivery in tumors having a pH lower than the normal physiological value (9). These liposomes are designed to release their contents under mildly acidic conditions. However, the pH of the tumor interstitium rarely declines below pH 6.5, and this makes it technically difficult to engineer liposomes that become disrupted in such a narrow window of pH. Possible clinical applications of pH-sensitive liposomes were then extended to the control of the intracellular trafficking of drugs. Following receptor-mediated endocytosis, the acidic environment found in endosomes destabilizes the liposomes, which can facilitate the diffusion of the drug in the cytoplasm. This approach could be useful for the delivery of drugs that are degraded in lysosomes when delivered using non pH-sensitive liposomes. The most studied class of pH-sensitive liposomes consists of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) vesicles that are stabilized in the bilayer phase by mildly acidic amphiphiles such as oleic acid or cholesterylhemisuccinate. The protonation of the amphiphile at acidic pH triggers the formation of fusion competent non-bilayer structures, which can fuse with the endosomal membrane and release the liposomal content in the cytoplasm. However, in the presence of serum, these liposomes are either unstable (10, 11) or substantially lose their pH-sensitivity (12). Another class of pH-sensitive liposomes includes liposomes composed of "caged" lipid derivatives (13-15). Acid-induced hydrolysis of specifically engineered chemical bonds results in an increased presence of membrane-destabilizing lipid components in the liposome membrane, and thus enhanced permeability to encapsulated solutes. However, the addition of dihydrocholesterol to stabilize these liposomes *in vivo* considerably reduces the rate of acid-induced leakage.

Insufficient blood circulation time is also an important limitation to the *in vivo* use of most pH-sensitive liposomes described so far. Although inclusion of PEG-lipid derivatives in pH-sensitive DOPE-based liposomes has been shown to significantly increase their circulation time, a significant loss in pH-sensitivity of the formulation was observed (16). It has been demonstrated that PEG-lipid derivatives promote bilayer formation in mixtures of non-bilayer-forming lipids, reducing liposome fusogenicity (17,

18). Very recently, Guo and Szoka have shown that pH-sensitive PEG-diortho ester-lipid can be used in combination with DOPE to produce long circulating acid-triggerable liposomes (19).

Polymer-based pH-sensitive liposomes offer a promising alternative for overcoming the limitation associated with DOPE-based vesicles. We have already demonstrated that the complexation of pH-sensitive copolymers of *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) to phospholipid and non-phospholipid bilayers imparts pH-responsiveness to liposomes (20-22) while maintaining adequate stability in serum (23, 24). In addition, we showed that the terminally-alkylated NIPAM copolymer anchored to the liposomal surface provided a steric barrier that increased, although marginally, the liposome circulation time *in vivo* (23).

pH- and temperature-sensitive liposomal formulations bearing NIPAM copolymers have already been characterized with regard to vesicle-polymer interaction (21, 25, 26). However, the destabilization mechanism of pH-sensitive NIPAM copolymers has not been fully addressed. The aim of this study was to evaluate the effect of pH on the lower critical solution temperature (LCST) of a NIPAM copolymer and to obtain more insight on its conformational changes in the absence and presence of liposomes. As the hydrophilicity of polymeric coatings has been found to influence the liposome *in vivo* circulation time (27, 28), the hydration state of the copolymer was also studied by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Finally, the effect of further including a PEG-lipid derivative in pH-sensitive liposome/polymer complexes on pH-triggered content release, serum-stability and pharmacokinetics was investigated. These overall characterizations provide additional tools for the rational design of clinically viable pH-sensitive long-circulating liposomes.

## 5.3. Materials and methods

### 5.3.1. Chemicals

NIPAM, methacrylic acid (MAA), *N*-vinyl-2-pyrrolidone (VP), octadecylacrylate (ODA) and 1,1'-azobis(cyclohexane carbonitrile) (ACCN) were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). NIPAM was purified by recrystallization from heptane/acetone (3:2 *v/v*). MAA was purified using an inhibitor remover disposable column for hydroquinone and monomethyl hydroquinone (Aldrich). Egg phosphatidylcholine (EPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC), POPC bearing a perdeuterated palmitoyl chain (POPC-d<sub>31</sub>), cholesterol (Chol) and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-[poly(ethylene glycol)2000] (PEG-PE) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Trisodium 8-hydroxypyrene trisulfonate (HPTS) and *p*-xylene-bis-pyridinium (DPX) were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). <sup>67</sup>Ga citrate was purchased from Dupont Pharma Inc. (Mississauga, ON, Canada).

### 5.3.2. Synthesis of the copolymer

The hydrophobically-modified NIPAM copolymer was prepared by free radical polymerization using ACCN as radical initiator. Briefly, NIPAM, MAA, VP and ODA (90:4:2:4 molar ratio) were dissolved in freshly distilled 1,4-dioxane. The solution was degassed by bubbling N<sub>2</sub> for 15 min and heated at 69°C for 20 h. The polymer was recovered by precipitation in diethyl ether. It was then dissolved in water, dialyzed (molecular weight cut-off 6000-8000, Spectra/Por, Spectrum Laboratories, Laguna Hills, CA) for 48 h and freeze-dried.

The copolymer was characterized by <sup>1</sup>H-NMR spectrometry for MAA and ODA contents. <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded on a Bruker AMX600 spectrometer in deuterated

methanol solutions (29). Within the experimental error of the NMR, the composition of the copolymer corresponds to the monomer feed ratios. The weight-average molecular weight ( $M_w = 22\,600$ ) and polydispersity index ( $PI = 2.7$ ) of the polymer were determined at  $40^\circ\text{C}$  by gel permeation chromatography performed on Styragel columns (HR1, HR3 and HR4; Waters Corporation, Milford, MA) in tetrahydrofuran using polystyrene standards for calibration.

The pH-induced phase transition of the polymer was determined by  $90^\circ$  light scattering at 480 nm (Series 2 Aminco Bowman Fluorometer, Spectronics Instruments Inc. Rochester, NY) and  $37^\circ\text{C}$  in phosphate buffered saline (PBS) (53 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 13 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 75 mM NaCl) solutions of different pH value and at a concentration of  $0.025\text{ g L}^{-1}$  (20). The light scattering data are expressed as % scattered light relative to the maximal recorded value.

### 5.3.3. Differential scanning calorimetry (DSC)

The copolymer was dissolved in HEPES-saline (40 mM HEPES, 110 mM NaCl, pH 7.4) or 2-*N*-(morpholino)ethanesulfonic acid (MES)-saline buffers (200 mM MES, 110 mM NaCl, pH 5.0 or 6.0) at a concentration of 3 mg/mL. Thermograms were recorded on a microcalorimeter (VP-DSC, Microcal, LLC., Northampton, MA) from 20 to  $60^\circ\text{C}$  at a heat rate of  $1.5^\circ\text{C}/\text{min}$ . The cell volume was 0.51 mL. The thermograms were corrected for baseline drifts observed at high temperatures.

### 5.3.4. Thermal FTIR spectroscopy

The copolymer was dissolved in either HEPES-saline, HEPES/dextrose (40 mM HEPES/5% dextrose) or MES-saline buffers prepared in  $\text{D}_2\text{O}$ , at a concentration of 15 mg/mL. It was verified that using dextrose instead of NaCl to adjust tonicity did not influence the results. Multilamellar liposomes of POPC, POPC/Chol (3:2 molar ratio) and POPC/Chol/PEG-PE (3:2:0.3 molar ratio) were prepared by dissolving the lipids and



copolymer (0.3 w/w polymer/lipid ratio) in chloroform. After the formation of a dried lipid film by evaporation of the solvent, the mixture was hydrated with buffer overnight at 4°C.

FTIR analysis of the copolymer and liposome/polymer complex was carried out on an FTS-25 Bio-Rad spectrometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) equipped with a mercury-cadmium-telluride detector. An aliquot of the solution was deposited between two CaF<sub>2</sub> windows separated by a 13- $\mu$ m spacer. The cell was mounted on a temperature-controlled brass holder. Spectra were recorded at every 2°C, from 22 to 60°C. Prior to data acquisition, the sample was equilibrated for 10 min at each temperature and for each spectrum. A total of 80 scans were recorded for both the background and the sample at a resolution of 2 cm<sup>-1</sup>. After baseline correction, the amide I' band (the ' indicates that the amide group was deuterated as the consequence of using of D<sub>2</sub>O-based buffer), associated with the amide groups of the NIPAM copolymer, was curve-fitted using GRAMS software (Galactic Industry, Salem, NH).

### 5.3.5. <sup>2</sup>H-NMR spectroscopy

without copolymer were prepared as described in the previous section. Dried lipid film was hydrated with deuterium-depleted MES buffer, pH 6.0 and subjected to 5 freeze-thaw cycles. The mixture was kept at 4°C overnight before NMR analysis. <sup>2</sup>H-NMR spectra were recorded on a Bruker DSX-300 spectrometer using a Bruker static probe equipped with a 10-mm coil. A quadrupolar echo pulse sequence was used with a 90° pulse of 6  $\mu$ s and an interpulse delay of 35  $\mu$ s. Each spectrum represents the co-addition of at least 10,000 FIDs containing 8,192 points, acquired with a dwell time of 0.5  $\mu$ s. A relaxation delay of 500 ms was introduced between two successive acquisitions.

### 5.3.6. Liposome preparation for *in vitro* release and pharmacokinetic studies

Large unilamellar liposomes composed of EPC/Chol (3:2 molar ratio) and EPC/Chol/PEG-PE (3:2:0.3 or 3:2:0.15 molar ratio) were prepared by the lipid film hydration method. The polymer was added to the lipid mixture in chloroform at different weight ratios. After solvent evaporation, dried lipid films were hydrated with an isotonic aqueous solution of the appropriate marker, followed by extrusion through polycarbonate filters of varying pore sizes (50-200 nm). Untrapped marker and free polymer were removed by gel filtration chromatography over a Sepharose 2B (Sigma, St-Louis, MO) (column i.d. 1 cm, length 23 cm), equilibrated with HEPES/dextrose buffer (20 mM HEPES/5% dextrose, pH 7.4). Liposome size was obtained by dynamic light scattering (N4 Plus, Coulter Electronics, Miami, FL).

### 5.3.7. *In vitro* pH-triggered release

*In vitro* release of liposomal content was monitored using a fluorescence dequenching assay (30, 31). pH-Sensitive liposomes (20 mM lipids, 160-210 nm, unimodal distribution) containing a chromophore and a collisional quencher, HPTS-DPX-HEPES (35 mM-50 mM-20 mM), were added to MES-saline buffer (100 mM MES, 144 mM NaCl, pH 4.9 or 5.8) or to HEPES-saline buffer (20 mM HEPES, 144 mM NaCl, pH 7.4) preheated to 37° C. After 8-min incubation, the extent of content release was calculated from the fluorescence intensity of HPTS ( $\lambda_{\text{ex}} = 413 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$ ) over that obtained following sample lysis in 0.5% Triton X-100. The % leakage was corrected for initial sample fluorescence by subtracting the % HPTS release at time 0, pH 7.4. Liposomal content release was also monitored *In vitro* after incubation of the vesicles in 75% (v/v) preheated human serum (Sigma) for 1 h at 37°C. The excess serum components were then removed by passage over a Sepharose 2B column and HPTS release from the liposomes was determined as described above.

### 5.3.8. *In vivo* pharmacokinetics

*In vivo* studies were carried out using male Sprague-Dawley rats (300-350 g) (Charles River, St-Constant, QC, Canada). The rats were surgically prepared for iv administration and arterial blood sampling as previously described (32). Briefly, polyethylene catheters were inserted into the femoral vein and artery, protected with a tethering system, and the rats were allowed to recover for at least 24 h.  $^{67}\text{Ga}$  was incorporated by hydrating the lipid film with a  $^{67}\text{Ga}$  citrate solution (2 mCi/mL) that was previously neutralized (pH 7.5-8.5). After removal of the free  $^{67}\text{Ga}$ , a 400  $\mu\text{L}$  sample (10  $\mu\text{mol}$  lipids/kg) was administered *via* the venous cannula. The following formulations were investigated: EPC/Chol (3:2 molar ratio), EPC/Chol/PEG-PE (3:2:0.3 molar ratio) liposomes containing or not 0.3 *w/w* NIPAM copolymer and EPC/Chol/PEG-PE (3:2:0.15 molar ratio) liposomes containing 0.3 *w/w* NIPAM copolymer (30 mM lipids, 180-230 nm, unimodal distribution). Blood samples (400  $\mu\text{L}$ ) were collected at various time points over 24 h, and the levels of  $^{67}\text{Ga}$  were determined by  $\gamma$ -counting (Cobra II auto-gamma counting system, Packard Instrument Company, Meriden, CT). The area under the blood concentration-time curve ( $\text{AUC}_{0-\infty}$ ) of the different formulations was calculated using PK solutions 2.0 software (Summit Research Services, Montrose, CO). Measure of statistical significance between the blood concentrations at different time points as well as between the  $\text{AUC}_{0-\infty}$  of the different formulations was done using Student's *t* test.

## 5.4. Results and discussion

### 5.4.1. Phase transition of NIPAM copolymer in solution

#### 5.4.1.1. Light scattering

In previous studies, we demonstrated that liposomes complexed to pH-sensitive NIPAM copolymers released their contents at a pH corresponding to the pH of polymer

phase transition (21). Figure 1 shows the scattered light resulting from polymer phase separation at a constant temperature of 37°C. As the pH is decreased, the protonation of MAA reduces the polymer solubility, thus lowering the temperature at which coil-to-globule phase transition (LCST) occurs. This is followed by the aggregation of individual polymer chains, a phenomenon that can be detected optically (33). Indeed, these results indicate that the apparent LCST of the polymer is either equal to or below 37°C at pH values below 6.0. At neutral pH, the LCST is above 37°C and the polymer remains in solution.

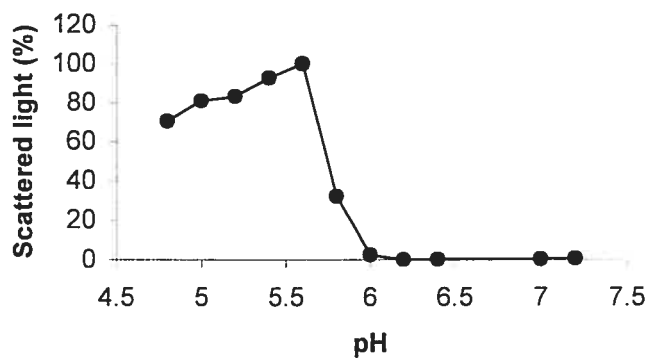


Figure 1. Phase transition pH of poly(NIPAM-*co*-MAA-*co*-VP-*co*-ODA) at a concentration of 0.025 g L<sup>-1</sup> at 37°C in PBS (53 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 mM NaCl). The data are expressed as % scattered light relative to the maximal recorded value.

#### 5.4.1.2. Differential scanning calorimetry (DSC)

To gain further insight on the phase separation thermodynamics of the copolymer, the LCST at different pH values was determined by DSC. Thermograms are shown in Figure 2, and the corresponding data are summarized in Table 1. At pH 7.4, the temperature at the maximum of the endothermic peak ( $T_p$ ) is 35°C. However, the endotherm is very broad and ranges from 23 to 68°C, which might explain why no polymer precipitation is detected by light scattering at 37°C at neutral pH. Experiments performed with high

molecular weight NIPAM homopolymers have shown that the coil-to-globule transition is not an all-or-none process (34). Macromolecules can be considered as a set of cooperative units that undergo an all-or-none temperature induced transition. Since MAA units in the copolymer are predominantly ionized at neutral pH, the cooperative domains are segmented by the charged monomers, leading to a broader transition (35). This low cooperativity, which opposes polymer collapse, may be responsible for the stability of liposome/polymer complexes at a temperature (37°C, pH 7.4) corresponding to the phase transition (*vide infra*). The effect of pH on the copolymer LCST was also studied by DSC. At pH 6.0 and 5.0, the LCST reaches values of 31 and 29°C, respectively. The downward shift of  $T_p$  can be attributed to a decrease in hydrophilicity resulting from the protonation of MAA units (36, 37). It is worth noting that the transition peak narrows as pH is decreased ( $\Delta T_{1/2}$  in Table 1). Thus, the cooperativity of the transition increases with increasing degree of protonation, a result that is consistent with the hypothesis that the cooperative units are segmented by ionized MAA, modulating the width of the transition.

The enthalpy of phase transition (integration of the endothermic peak) also depends on the solution pH, as it increases with pH (Table 1). A similar trend has been described for other NIPAM copolymers, where it was shown that the enthalpy of transition was inversely related to the LCST (37, 38). The heat of phase separation of NIPAM copolymers is mainly attributed to the breakage of water-water hydrogen bonds in the hydration shell surrounding the isopropyl hydrophobic groups. The decrease of  $\Delta H$  at higher LCST reflects the progressive loss of structured water molecules surrounding the hydrophobic groups as the temperature rises. The endothermic transition confirms that the transition associated to the LCST is essentially entropy driven, the gain in entropy being related to water molecules organized around the hydrophobic segments of the polymer.

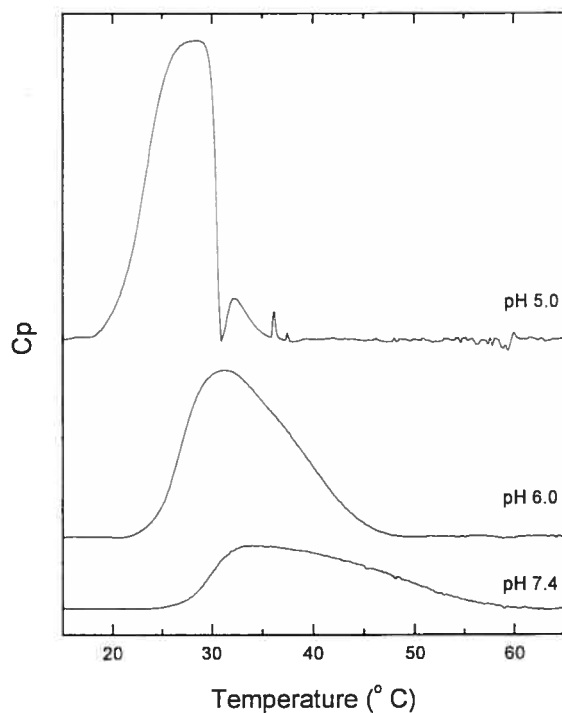


Figure 2. DSC thermograms of poly(NIPAM-*co*-MAA-*co*-VP-*co*-ODA) at different pH values.

Table 1. pH-dependencies of phase transition temperature and enthalpy of the NIPAM copolymer as determined by DSC

pH	$T_p$ (°C)	$T_{1/2}$ (°C)*	$\Delta H$ (cal/g)
5.0	29	7	7.1
6.0	31	12	6.1
7.4	35	18	3.8

\* Width at half-height

#### 5.4.1.3. Thermal FTIR spectroscopy

In order to obtain more information on the hydration state of the copolymer, the conformational change upon heating was monitored by FTIR spectroscopy at different pH values. This method was previously used to determine the LCST of NIPAM copolymers, and provide information on the bonding state of chemical groups involved in the transition (35, 39, 40). The amide I' band corresponds mainly to the carbonyl stretching mode of the amide group of NIPAM units. As shown in Figure 3, this band could be reproduced reasonably well using 2 components, an observation that is true for all the recorded data. The 2 components are assigned to C=O groups implicated in 2 types of hydrogen bonding. Based on previous work (39, 41), the first band centered around  $1623\text{ cm}^{-1}$  corresponds to hydrogen bonding with water, whereas the second band, at  $1646\text{ cm}^{-1}$ , is attributed to intramolecular hydrogen bonding. The peak area ratio of these 2 components can be considered as the molar ratio of both carbonyl species, assuming that their absorptivity coefficients are similar (39). Phase transition of the NIPAM copolymer can be monitored by the shift of the amide I' band towards higher frequencies upon heating (data not shown). The spectral deconvolution of this band provides additional insights relative to the evolution of hydrogen bonding with temperature. At low temperature ( $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and pH 7.4 (Figure 3A), a predominant fraction of carbonyl groups are involved in hydrogen bonding with water, whereas only a small proportion (less than 10%) are implicated in intramolecular bonding. At  $56^{\circ}\text{C}$  and pH 7.4 (Figure 3B), *i.e.* above the LCST of the polymer, the intramolecular interactions increase, with 35% of the carbonyl groups involved in intramolecular bonding. Figure 4A shows the peak area ratio of the component centered at  $1646\text{ cm}^{-1}$  (intramolecular hydrogen bonding) to that of the sum of the 2 components, as a function of temperature pH 5.0, 6.0 and 7.4. At any given pH, the contribution of the carbonyl groups involved in intramolecular hydrogen bonding increases with temperature. The LCST values found by FTIR spectroscopy ( $29$ ,  $33$  and  $40^{\circ}\text{C}$  at pH 5.0, 6.0 and 7.4, respectively) are comparable to the values obtained by DSC. The transition also sharpens as pH decreases, reflecting the greater cooperativity of the transition.

The influence of copolymer complexation with liposomes on the copolymer LCST was also investigated by FTIR spectroscopy. The amide I' band thermal variation studies indicate that the presence of POPC/Chol vesicles does not substantially modify the LCST of the copolymer. Only a slight displacement of the curves toward lower temperatures, which may be associated to interactions specific to the polymer-lipid bilayer interface, was obtained at every pH investigated (Figure 4B). Similar experiments were conducted with vesicles composed of POPC and POPC/Chol/PEG-PE and comparable trends were observed, even though the shift of the curves was smaller and less systematic (data not shown). It is possible that the presence of an uncomplexed polymer fraction may contribute to the amide I' band variations, therefore partially masking the effect of polymer/lipid complexation on the transition.

It has already been shown that poly(NIPAM) contains more than 50% (w/w) water after phase separation (33). Data presented in Figure 4 confirm that, even above the LCST, hydrogen bonding of the amide groups with water predominates over intramolecular hydrogen bonding. The degree of polymer dehydration at 37°C becomes more pronounced as pH is decreased. At pH 7.4, the polymer maintains a high level of hydration due to a shift of the phase transition towards higher temperature and as well as abrupt transition.



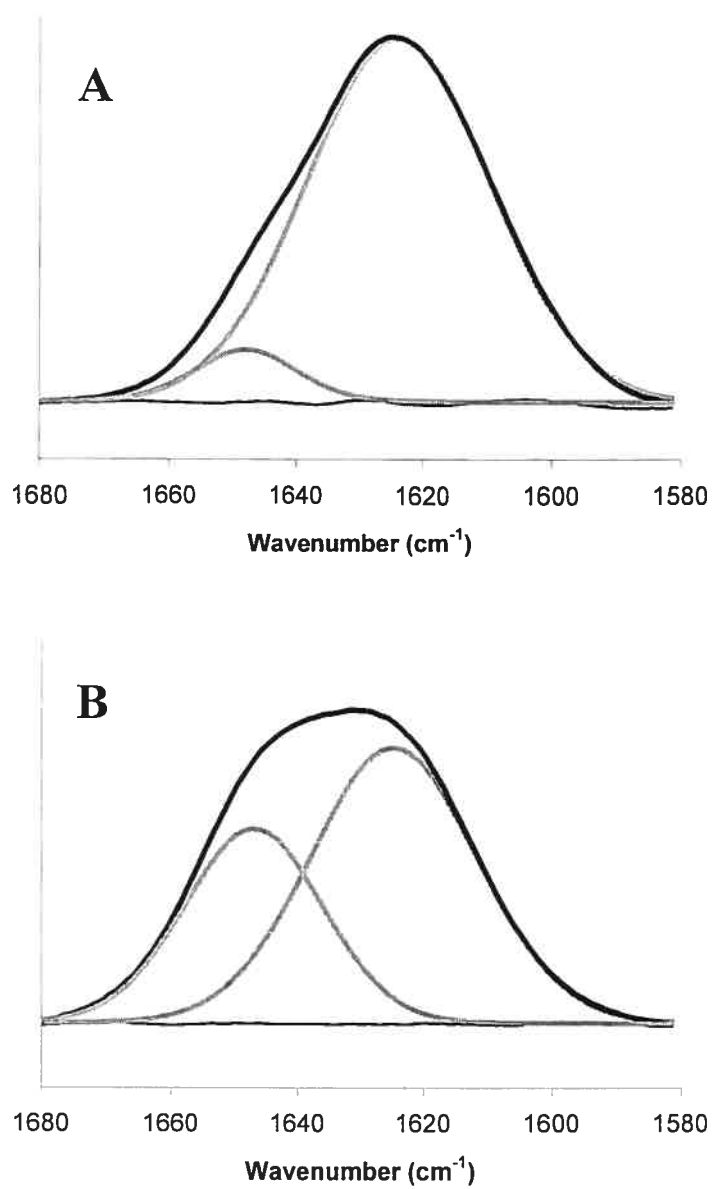


Figure 3. Changes in the amide I' band of poly(NIPAM-co-MAA-co-VP-co-ODA) in solution at 30°C (A) and 56°C (B), and pH 7.4. Solid black line: experimental spectra. Grey lines: components obtained from band fitting. Dashed line: residual curve.

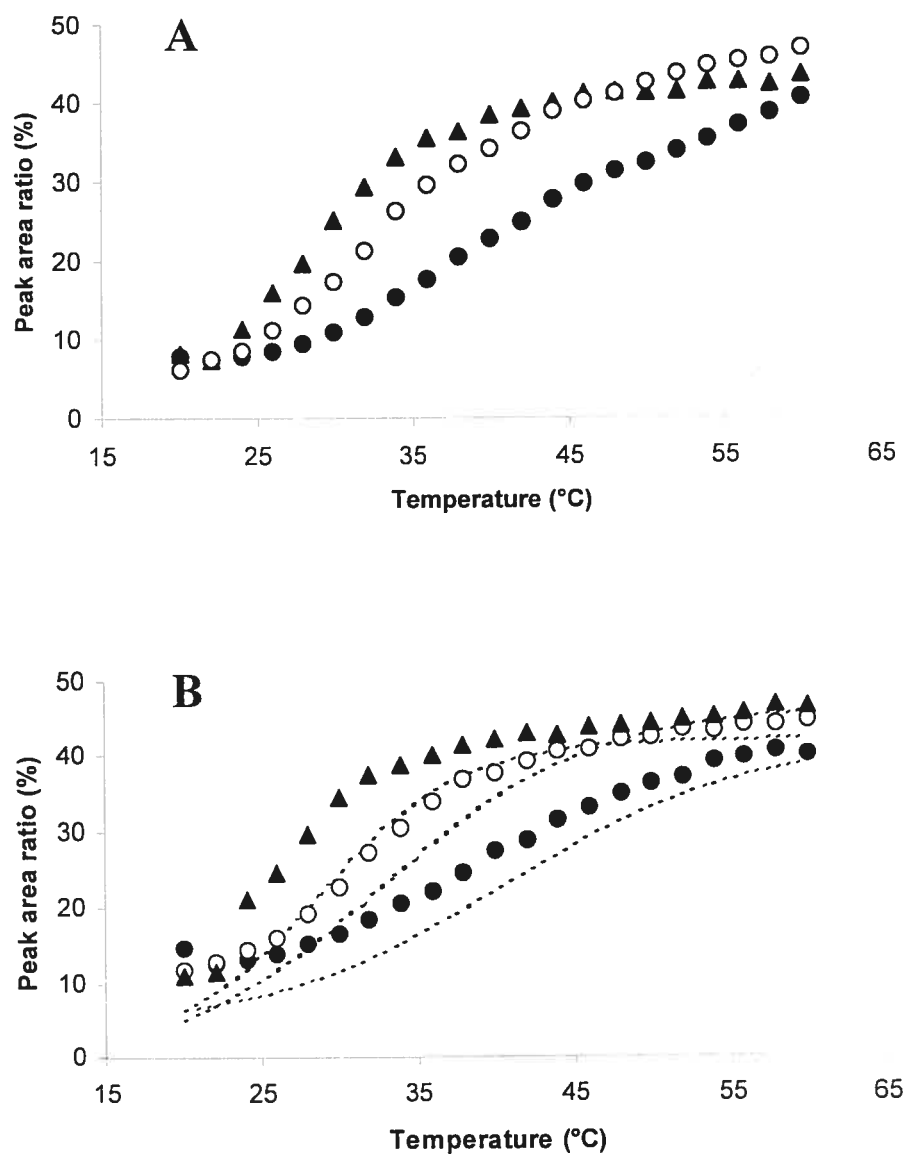


Figure 4. Increase of relative intensity of the amide I' component located at  $1646\text{ cm}^{-1}$  of poly(NIPAM-co-MAA-co-VP-co-ODA) in the absence (A) and presence (B) of POPC/Chol multilamellar liposomes as a function of temperature at pH 5.0 (closed triangles), 6.0 (open circles) and 7.4 (closed circles). For comparison, the dashed lines in (B) show the intensity of the amide I' band in the absence of liposomes.

### 5.4.2. $^2\text{H}$ -NMR spectroscopy

The effect of polymer conformational changes on phospholipid bilayers was studied by  $^2\text{H}$ -NMR. Spectra of POPC- $\text{d}_{31}$  both in the presence and absence of NIPAM copolymer were collected as a function of temperature (Figure 5). The spectra obtained for POPC- $\text{d}_{31}$ /Chol (3:2 molar ratio) mixture are typical of phospholipids in the liquid-crystalline phase, showing a superposition of powder patterns of systems with axial symmetry, associated to the deuterated methylene groups along the chain (42, 43). The central powder pattern is assigned to the terminal  $\text{CD}_3$  group. As expected, the width of the bilayer component decreased upon heating, a consequence of the increased amplitude of the acyl chain motions (42, 43). In the presence of NIPAM copolymer, 2 features are observed. First, the overall width of the bilayer signal remains similar to that measured for POPC- $\text{d}_{31}$ /Chol (3:2 molar ratio) mixture without polymer. This similarity is also observed for the narrow powder pattern associated to the terminal methyl group. Second, there is a broadening of the individual peaks associated with each  $\text{CD}_2$  group along the lipid chains, leading to a serious loss of the signal resolution (see insets). The broadening is not significant between 18 and  $50^\circ\text{C}$ , but becomes pronounced between  $55$ - $65^\circ\text{C}$ .  $^2\text{H}$ -NMR is sensitive to lipid plane curvatures leading to significant averaging of the quadrupolar interactions on the NMR time-scale (44). Such a line broadening has been observed for several systems including phosphatidylcholine bilayers in the presence of nisin, an antibacterial agent (45), rhodopsin (46) and the pulmonary protein SP-B (47). In the former case, the line broadening was associated to the formation of highly curved lipid planes in the presence of nisin. The results presented here are in fact compatible with a similar interpretation. At high temperature, when the polymer undergoes its transition from a soluble to an insoluble state, its interaction with the lipid bilayer can introduce a local curvature in the bilayer plane. Indeed, it is possible that lipid plane curvature increases progressively during the transition but this could not be detected by  $^2\text{H}$ -NMR below  $55$ - $65^\circ\text{C}$ . The similar width of the bilayer pattern in the  $^2\text{H}$ -NMR spectra indicates, on the

other hand, that the polymer does not affect the acyl chain order. Therefore, the NIPAM copolymer effect on lipid bilayers would not be at the molecular level but would instead perturb the liposome at the supramolecular level. The introduction of highly curved local lipid planes can be associated to defects resulting in the release of entrapped materials (see below).

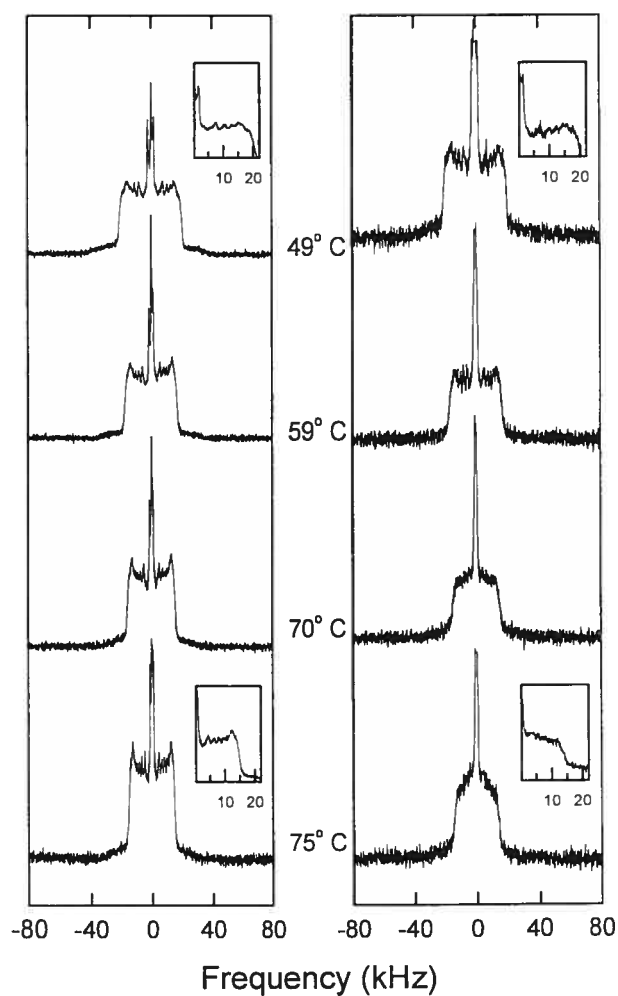


Figure 5.  $^2\text{H}$ -NMR spectra of POPC- $\text{d}_{31}$ /Chol (left panel) and POPC- $\text{d}_{31}$ /Chol/poly(NIPAM-co-MAA-co-VP-co-ODA) (right panel).

### 5.4.3. *In vitro* release of pH-sensitive liposomes

We have previously reported that a randomly-alkylated copolymer of NIPAM containing 5 mol% MAA and 2 mol% ODA ( $M_w = 29\ 000$ ) could trigger EPC/Chol liposomal content release under acidic conditions (48). However, such a polymer was suspected to rapidly desorb from the lipid bilayer upon interaction with plasma components. Kono et al. (49) reported that the binding efficiency of NIPAM copolymer to liposomes is related to the number of hydrophobic anchors. Accordingly, in order to increase polymer retention at the liposomal surface, the proportion of the hydrophobic anchor was increased to 4 mol% and VP was added to maintain the polymer's solubility in water. Figure 6 shows the percent of HPTS released from EPC/Chol liposomes prepared with different concentrations of copolymer. The incubation time was set at 8 min since afterwards, the release levels off and tends to reach a plateau. At pH 4.9 and 37°C, the content release increases from 42 to 83% as the copolymer/lipid ratio increases from 0.06 to 0.3 (w/w), respectively. All formulations were stable at neutral pH and showed a minimal content release over time (< 7% after 8 min at pH 7.4, data not shown). As stated above, under these conditions, the polymer already undergoes its coil-to-globule transition. However, the low cooperativity of the transition at this pH may hinder a complete collapse of the polymer in the liposomal membrane. Furthermore, as demonstrated by FTIR, the high degree of hydration of the polymer at neutral pH could also explain the lack of liposome destabilization at pH 7.4.

A major concern regarding the use of conventional DOPE-based pH-sensitive liposomes for *in vivo* applications is their poor stability in biological fluids (12, 50). Figure 7 shows that after 1-h incubation in human serum, liposomes/polymer complexes (polymer/lipid ratio = 0.3 w/w) partially lose their pH-sensitivity, with a decrease of 13 and 28% in HPTS released at pH 4.9 and 5.8, respectively. When a lower polymer concentration is used (0.2 w/w), a similar loss in pH-sensitivity is observed (data not shown). This overall loss of pH-sensitivity following incubation in human serum may result

from the extraction of polymer by serum components or, though less likely, from the stabilization of the bilayer by adsorbed proteins.

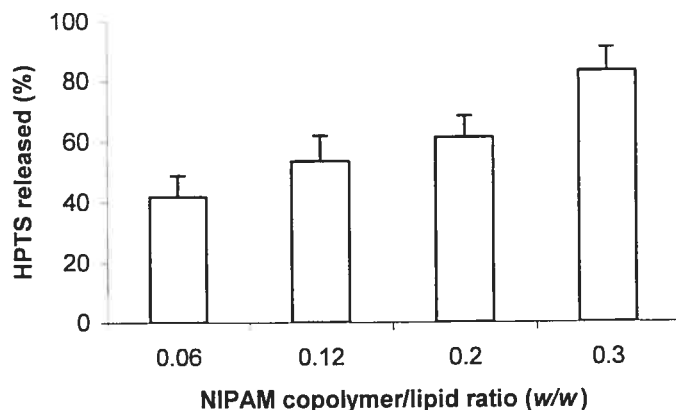


Figure 6. Percent HPTS release from EPC/Chol liposomes with different NIPAM copolymer/lipid ratios after 8-min incubation at pH 4.9 and 37°C. Liposome size: 160-210 nm (unimodal distribution). Mean  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments.

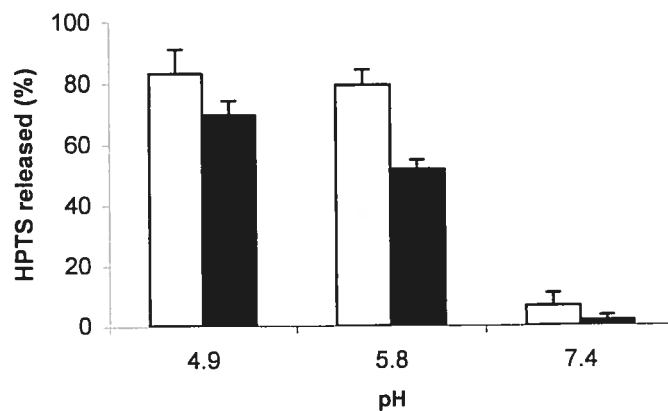


Figure 7. Percent HPTS release from EPC/Chol liposomes with a 0.3 (w/w) NIPAM copolymer/lipid ratio after 8-min incubation at 37°C, before (open bars) and after (closed bars) a 1-h incubation in 75% human serum. Liposome size: 160-210 nm (unimodal distribution). Mean  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments.

Despite the slight steric protection afforded by NIPAM copolymers (23), the pH-sensitive liposome/copolymer complexes require further optimization with respect to their circulation time *in vivo*. In order to produce long-circulating pH-sensitive liposomes, PEG-PE was added to the formulation. Figure 8 shows the effect of incorporating 3 and 6 mol% PEG on the pH-triggered content release of liposomes. An important decrease in pH-sensitivity is observed as the PEG content increases, with 55 and 11% HPTS released (pH 4.9) at 3 and 6 mol% PEG, respectively (Figure 8A). Since the presence of PEG-PE in the liposome formulation does not substantially influence the copolymer LCST, as shown by the FTIR spectroscopy experiments, this reduction of pH-sensitivity cannot be explained by a rise of the cloud point. It can reasonably be hypothesized that a smaller amount of copolymer binds to the bilayer, as PEG-PE is negatively-charged and can create electrostatic repulsion, as well as steric repulsion (21). Also, it has been demonstrated that PEG-lipid derivatives prevent aggregation and dehydration of membrane surfaces, thus reducing fusion and content release of DOPE-based pH-sensitive liposomes under acidic conditions (16, 18). Even if NIPAM copolymer-based pH-sensitive liposomes do not fuse at acidic pH (21), it is possible that PEG increases the stability of the bilayer. PEG may also prevent interchain aggregation of the NIPAM copolymer, reducing the extent of polymer collapse within the liposomal membrane.

Liposomes coated with PEG derivatives are known to slow down opsonization by creating a zone of steric hindrance around the lipid surface (28). Since the decrease in pH-responsiveness observed after incubation in serum may be related to the interaction of liposomes with serum components, the effect of PEG was also studied in this respect. Figure 8B indicates that PEG did not prevent the loss of pH-sensitivity following 1-h incubation in serum. These results support the hypothesis of polymer extraction in the presence of serum as it has been demonstrated that, even in the presence of PEG, proteins can adsorb onto liposomes (51). Thus, interactions of serum proteins with the copolymer would not be completely suppressed.

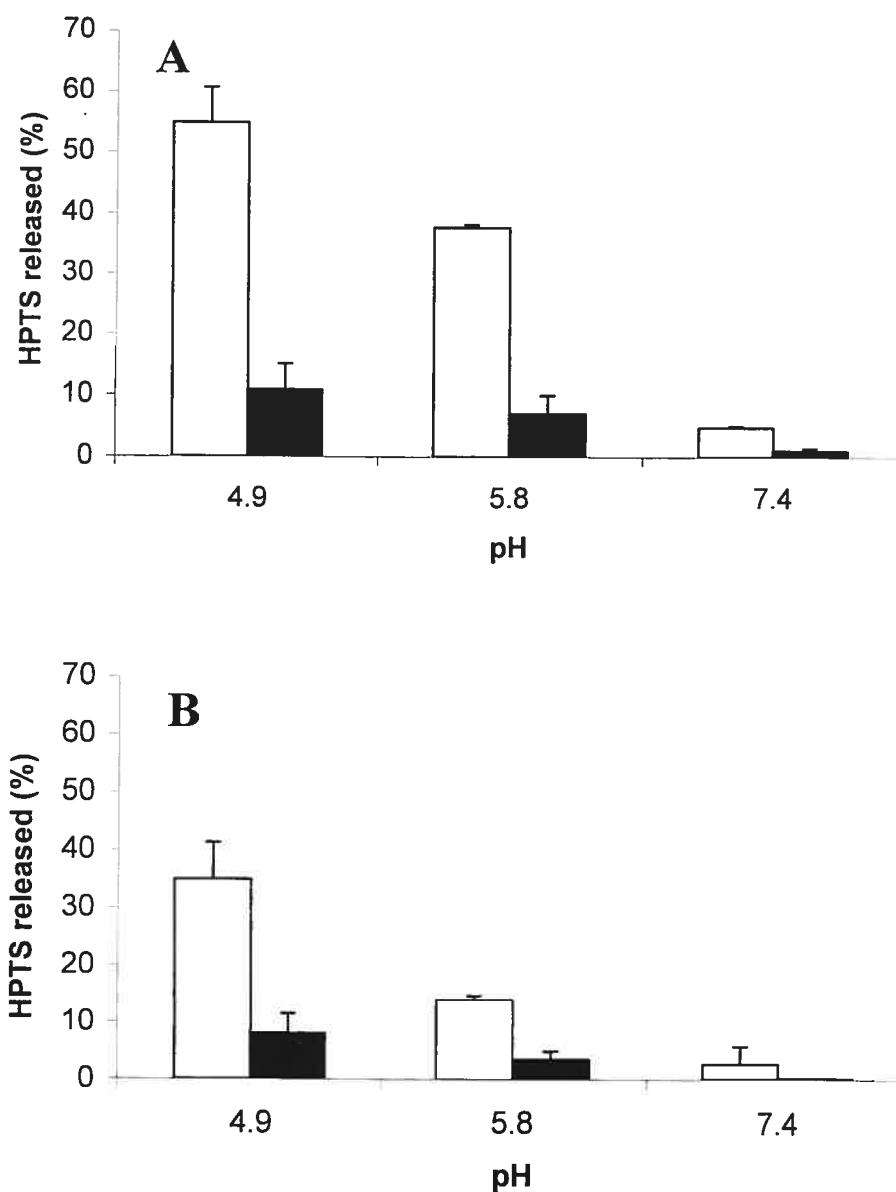


Figure 8. Percent HPTS release from pH-sensitive liposomes with a 0.3 (*w/w*) NIPAM copolymer/lipid ratio containing either 3 mol% (open bars) or 6 mol% PEG (closed bars) after 8-min incubation at 37°C before (A), and after (B) a 1-h incubation in 75% human serum. Liposome size: 160-210 nm (unimodal distribution). Mean  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments.



#### 5.4.4. Pharmacokinetics

The pharmacokinetic profiles of liposomal  $^{67}\text{Ga}$  following iv injection of the different formulations into rats are shown in Figure 9 and the corresponding  $\text{AUC}_{0-\infty}$  are reported in Table 2. The presence of the randomly-alkylated copolymer at the liposome surface slightly increases the circulation time of EPC/Chol liposomes. For time points between 15 min and 4 h, the blood concentrations of polymer-coated liposomes were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than non-coated liposomes. The  $\text{AUC}_{0-\infty}$  of the polymer-coated liposomes was 1.9-fold higher than that of the control formulation ( $p < 0.01$ ). However, both control and polymer-coated liposomes were almost completely eliminated after 12 h. These results are comparable to those obtained previously with a terminally-alkylated NIPAM copolymer (23).

The blood concentration-time curves of  $^{67}\text{Ga}$  encapsulated in pH-sensitive and non-pH-sensitive liposomes containing 6 mol% PEG-PE are nearly identical with the same amount of injected dose remaining in blood after 24 h ( $18 \pm 5$  and  $17 \pm 3\%$  injected dose/rat, respectively). Decreasing the amount of PEG-PE to 3 mol% leads to a 60% decrease in  $\text{AUC}_{0-\infty}$ . With 3 mol% PEG-PE, the liposomes partially maintain their pH-sensitivity (55% release at pH 4.9, Figure 8A) while still exhibiting an acceptable circulation time *in vivo* (52% of encapsulated  $^{67}\text{Ga}$  still in the blood 2h after injection).

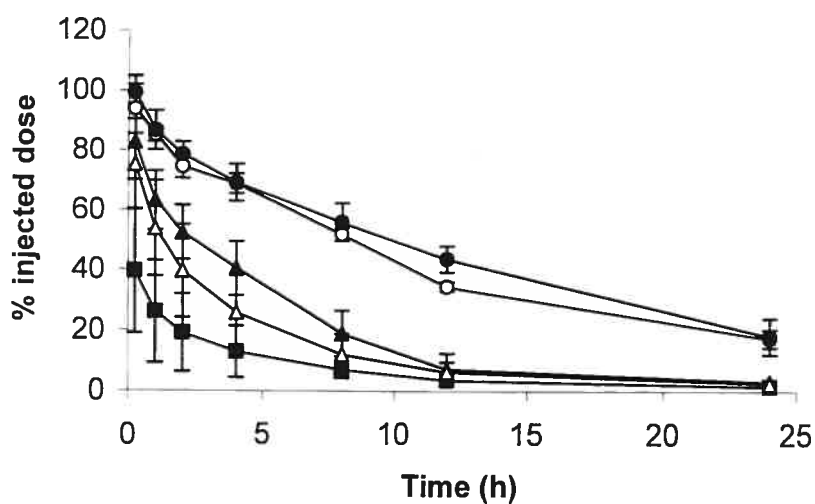


Figure 9. Pharmacokinetics of non-pH-sensitive liposomes containing 6 mol% PEG (closed circles;  $n=7$ ); pH-sensitive liposomes containing 6 mol% PEG and 0.3  $w/w$  NIPAM copolymer (open circles;  $n=4$ ); pH-sensitive liposomes containing 3 mol% PEG and 0.3  $w/w$  NIPAM copolymer (closed triangles;  $n=4$ ); pH-sensitive liposomes containing 0.3  $w/w$  NIPAM copolymer (open triangles;  $n=7$ ); and control non-pH-sensitive non-pegylated liposomes (closed squares;  $n=8$ ). All liposomes were made of EPC/Chol (3:2 molar ratio). Liposome size: 180-230 nm (unimodal distribution).

Table 2. Area under the blood concentration-time curve ( $AUC_{0-\infty}$ ) of the different liposomal formulations

Liposome formulation (mol:mol)	$AUC_{0-\infty}$ (% injected dose-h)
EPC/Chol/PEG-PE (3:2:0.3)	1493 ± 173
EPC/Chol/PEG-PE (3:2:0.3)	1208 ± 91
+ poly(NIPAM- <i>co</i> -MAA- <i>co</i> -VP- <i>co</i> -ODA)*	
EPC/Chol/PEG-PE (3:2:0.15)	476 ± 130
+ poly(NIPAM- <i>co</i> -MAA- <i>co</i> -VP- <i>co</i> -ODA)*	
EPC/Chol (3:2)	361 ± 136
+ poly(NIPAM- <i>co</i> -MAA- <i>co</i> -VP- <i>co</i> -ODA)*	
EPC/Chol (3:2)	189 ± 75

\* 0.3 w/w polymer/lipid ratio

## 5.5. Conclusion

A clinically viable pH-sensitive liposomal formulation requires several essential properties including efficient pH-triggered release, serum-stability and long-circulation time *in vivo*. While this study showed that liposomes can be rendered pH-sensitive by complexation with a NIPAM copolymer, the characterization data provided additional information for further optimizing the formulation. Yamazaki and co-workers (52) reported that the terminally-alkylated NIPAM polymer could reduce liposome protein adsorption at temperatures below the LCST, whereas this repellent effect was not observed above the LCST of the polymer. This study reveals that, at neutral pH, the copolymer is not in its random coil conformation, and thus may not provide liposomes with an optimal steric protection *in vivo*. Although the addition of PEG efficiently prolongs circulation time, it also leads to a significant decrease in liposome pH-sensitivity. As our ultimate goal is to produce a pH-sensitive formulation that will release its content in the endosomal compartment following receptor-mediated internalization, a homing device that will trigger

the uptake of the liposomes by the cells will be required. Binding and internalization of the liposomes by the cells will be achieved by grafting the targeting ligand to the extremity of the PEG chain. In order to reach the targeted cells, the pH-sensitive liposomes should exhibit a long circulation time and the presence of PEG will be needed to slow down the clearance of these ligand-targeted liposomes. Indeed, coating of liposomes with a more hydrophilic NIPAM copolymer, which would provide a higher degree of steric stabilization, in combination with low amounts of a PEG derivative such as PEG-PE or uncharged PEG-ceramide, may represent the best compromise for *in vivo* applications.

### Acknowledgements

This work was financially supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Canada Research Chair Program. PM and JCL received scholarships from the CIHR and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, respectively.

## 5.6. References

1. Drummond, D.C.; Meyer, O.; Hong, K.; Kirpotin, D.; Papahadjopoulos, D. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 691-743.
2. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 271-284.
3. Lasic, D.; Martin, F.J.; Gabizon, A.; Huang, S.K.; Papahadjopoulos, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1070*, 187-192.
4. Papahadjopoulos, D.; Allen, T.M.; Gabizon, A.; Mayhew, E.; Matthay, K.; Huang, S.K.; Lee, K.D.; Woodle, M.C.; Lasic, D.D.; Redemann, C.; Martin, F.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 11460-11464.
5. Woodle, M.C.; Lasic, D.D. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1113*, 171-199.
6. Horowitz, A.T.; Barenholz, Y.; Gabizon, A.A. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1109*, 203-209.

7. Vaage, J.; Donovan, D.; Working, P.; Uster, P., *Medical Applications of Liposomes*, D.D. Lasic and D. Papahadjopoulos, Editors. 1998, Elsevier Science BV: New York. p. 275-282.
8. Kirchmeier, M.J.; Ishida, T.; Chevrette, J.; Allen, T.M. *J. liposome Research* **2001**, *11*, 15-29.
9. Yatvin, M.B.; Kreutz, W.; Horwitz, B.A.; Shinitzky, M. *Science* **1980**, *210*, 1253-1255.
10. Connor, J.; Norley, N.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *884*, 474-481.
11. Liu, D.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *981*, 254-260.
12. Collins, D.; Litzinger, D.C.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1025*, 234-242.
13. Gerasimov, O.V.; Schwan, A.; Thompson, D.H. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1324*, 200-214.
14. Drummond, D.C.; Daleke, D.L. *Biophys. J.* **1997**, *72*, A13.
15. Rui, Y.; Wang, S.; Low, P.S.; Thompson, D.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11213-11218.
16. Slepushkin, V.A.; Simoes, S.; Dazin, P.; Newman, M.S.; Guo, L.K.; Pedroso de Lima, M.C.; Düzgünes, N. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2382-2388.
17. Holland, J.W.; Cullis, P.R.; Madden, T.D. *Biochemistry* **1996**, *35*, 2610-2617.
18. Holland, J.W.; Hui, C.; Cullis, P.K.; Madden, T.D. *Biochemistry* **1996**, *35*, 2618-2624.
19. Guo, X.; Szoka Jr., F.C. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 291-300.
20. Meyer, O.; Papahadjopoulos, D.; Leroux, J.C. *FEBS Lett.* **1998**, *42*, 61-64.
21. Zignani, M.; Drummond, D.C.; Meyer, O.; Hong, K.; Leroux, J.-C. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1463*, 383-394.
22. Francis, M.F.; Dhara, G.; Winnik, F.M.; Leroux, J.-C. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 741-749.

23. Roux, E.; Stomp, R.; Giasson, S.; Pézolet, M.; Moreau, P.; Leroux, J.-C. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1795-1802.
24. Roux, E.; Francis, M.; Winnik, F.M.; Leroux, J.-C. *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 25-36.
25. Kono, K.; Hayashi, H.; Takagishi, T. *J. Controlled Release* **1994**, *30*, 69-75.
26. Hayashi, H.; Kono, K.; Takagishi, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1280*, 127-134.
27. Blume, G.; Cevc, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1146*, 157-168.
28. Torchilin, V.P.; Omelyanenko, V.G.; Papisov, M.I.; Bogdanov, A.A.; Trubetskoy, V.S.; Herron, J.N.; Gentry, C.A. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1195*, 11-20.
29. Taillefer, J.; Jones, M.-C.; Brasseur, N.; Van Lier, J.E.; Leroux, J.-C. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 52-62.
30. Ellens, H.; Bentz, J.; Szoka, F.C. *Biochemistry* **1984**, *23*, 1532-1538.
31. Daleke, D.L.; Hong, K.; Papahadjopoulos, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1024*, 352-366.
32. Moreau, P.; Lamarche, L.; Laflamme, A.K.; Calderone, A.; Yamaguchi, N.; de Champlain, J. *J. Hypertens.* **1995**, *13*, 333-340.
33. Heskins, M.; Guillet, J.E. *J. Macromol. Sci. Chem.* **1968**, *A2*, 1441-1455.
34. Tiktopulo, E.I.; Bychkova, V.E.; Ricka, J.; Ptitsyn, O.B. *Macromolecules* **1994**, *27*, 2879-2882.
35. Maeda, Y.; Yamamoto, H.; Ikeda, I. *Langmuir* **2001**, *17*, 6855-6859.
36. Taylor, L.D.; Cerankowski, L.D. *J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed.* **1975**, *13*, 2551-2570.
37. Feil, H.; Bae, Y.H.; Feijen, J.; Kim, S.W. *Macromolecules* **1993**, *26*, 1496-2500.
38. Otake, K.; Inomata, H.; Konno, M.; Saito, S. *Macromolecules* **1990**, *23*, 283-289.
39. Percot, A.; Zhu, X.X.; Lafleur, M. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* **2000**, *38*, 907-915.
40. Maeda, Y.; Higuchi, T.; Ikeda, I. *Langmuir* **2001**, *17*, 7535-7539.
41. Lin, S.-Y.; Chen, K.-S.; Run-Chu, L. *Polymer* **1999**, *40*, 2619-2624.
42. Davis, J.H. *Biophys. J.* **1979**, *27*, 339-358.

43. Lafleur, M.; Cullis, P.R.; Bloom, M. *Eur. Biophys. J.* **1990**, *19*, 55-62.
44. Fenske, D.B.; Cullis, P.R. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 1482-1491.
45. El Jastimi, R.; Edwards, K.; Lafleur, M. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 842-52.
46. Bienvenue, A.; Bloom, M.; Davis, J.H.; Devaux, P.F. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 3032-3038.
47. Dico, A.S.; Hancock, J.; Morrow, M.R.; Stewart, J.; Harris, S.; Keough, K.M. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4172-4177.
48. Leroux, J.-C.; Roux, E.; Le Garrec, D.; Hong, K.; Drummond, D.C. *J. Controlled Release* **2001**, *72*, 71-84.
49. Kono, K.; Nakai, R.; Morimoto, K.; Takagishi, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1416*, 239-250.
50. Chu, C.J.; Dijkstra, J.; Lai, M.Z.; Hong, M.Z.; Szoka, F.C. *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 824-834.
51. Harvie, P.; Desormeaux, A.; Bergeron, M.C.; Tremblay, M.; Beauchamp, D.; Poulin, L.; Bergeron, M.G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 225-229.
52. Yamazaki, A.; Winnik, F.M.; Cornelius, R.M.; Brash, J.L. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1421*, 103-115.

## **CHAPITRE 6**

# **STIMULI-RESPONSIVE LIPOSOME-POLYMER COMPLEXES. TOWARDS THE DESIGN OF INTELLIGENT DRUG CARRIERS**



**Stimuli-responsive liposome-polymer complexes. Towards the design of intelligent drug carriers [In: Svenson S. (Ed) *Carrier based drug delivery*. American Chemical Society: Washington, DC. *Sous presse*]**

Emmanuelle Roux<sup>1,2</sup>, Mira Francis<sup>1,2</sup>, Françoise M. Winnik<sup>2,3</sup> and Jean-Christophe Leroux<sup>1,2\*</sup>

\*Corresponding author. Mailing address: Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montréal (PQ), H3C 3J7, Canada. Tel. : (514) 343-6455, Fax: (514) 343-7738, Email: jean-christophe.leroux@umontreal.ca.

\*Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society.

## **6.1. Abstract**

Drug delivery systems capable of releasing active compounds in response to stimuli such as pH or temperature changes have attracted increasing interest in recent years. Among these systems, pH-sensitive liposomes have been studied extensively. These vesicles are generally stable at neutral pH and become leaky and/or fusogenic under acidic conditions. In this work, we describe the preparation of pH-sensitive phospholipid (liposomes) and non-phospholipid vesicles (niosomes) through the formation of pH-sensitive polymer/bilayer complexes. The vesicles are characterized with respect to their pH-sensitivity, stability in serum, pharmacokinetics and *in vitro* ability to deliver a model compound to the cytoplasm.

## 6.2. Introduction

Liposomes are widely studied as drug delivery systems in many biomedical applications, such as anticancer and gene/antisense therapies. Liposomes are phospholipid vesicles that can encapsulate either hydrophilic or amphiphilic drugs in their inner core or lipophilic drugs within their bilayers. The encapsulation of drugs in such carriers presents several advantages, among which one can cite sustained delivery, passive accumulation at certain disease sites, and the possibility of active targeting through ligand-mediated systems. Progress in this field has led to the approval of anthracycline liposomal formulations for cancer treatment, such as Doxil<sup>®</sup>, Evacet<sup>™</sup> and DaunoXome<sup>®</sup>. In these cases, enhanced therapeutic index derives from the reduction of drug distribution volume and passive carrier accumulation at the tumor site by the so-called “enhanced permeation and retention” effect (1). However, the development of a more effective liposomal formulation is still needed in order to achieve better drug availability at the target site. While amphiphilic drugs such as anthracyclines are able to cross cell membranes, highly hydrophilic and high molecular weight compounds, which cannot diffuse freely through biological membranes, may benefit from internalization by cells. Specific targeting to cell surface receptors having the ability to trigger the internalization of liposomes by endocytosis has been shown to improve the efficacy of liposomal drugs (2). Such systems could be further improved by targeting specific cell compartments. Genetic material and highly water-soluble drugs remain generally sequestered in the endocytic compartment and are ultimately delivered to lysosomes where they can be degraded by different enzymes (3). As the endosomal pH (5.0-6.5) is more acidic than that of extracellular fluids, the control of intracellular drug trafficking can be achieved with pH-responsive carriers. pH-Sensitive liposomes are colloidal vesicles that become destabilized in an acidic environment, releasing their content prior to reaching the lysosomes. In addition, these liposomes may facilitate cytoplasmic delivery of the drug by fusing with and/or destabilizing the

endosomal membrane. The fate of pH-sensitive liposomes upon receptor-mediated endocytosis are illustrated in Figure 1.

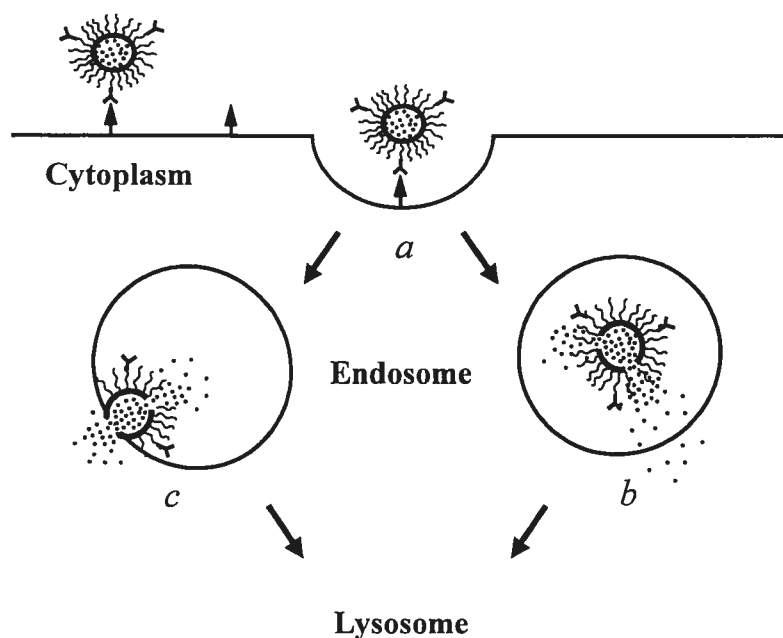


Figure 1. After receptor-mediated internalization (a), polymer-based, pH-sensitive vesicles are destabilized in the endosome and release their contents (b). Vesicles can also fuse with the endosomal membrane and/or destabilize it (c).

The first generation of pH-sensitive liposomes was obtained through the use of non-bilayer-forming lipids, such as dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), that are stabilized in the lamellar phase by the addition of mildly acidic amphiphiles (*e.g.* oleic acid). Upon protonation of the negatively charged headgroup of the amphiphile in an acidic environment, DOPE reverts to non-bilayer structures, causing the release of the liposomal content. However, the instability of such vesicles constitutes a major drawback for possible *in vivo* applications, as rapid content leakage (4) or substantial loss of pH-sensitivity (5) has been observed in biological fluids.

An alternative approach to intrinsically pH-sensitive liposomes consists of coating conventional liposomes with pH-responsive polymers. Such polymers are generally weak acid polyelectrolytes, and their ability to destabilize liposome membranes depends, among other things, on their degree of ionization. One of the advantages of polymer-based systems is that almost any liposomal formulation can acquire pH-sensitive properties. This is an important feature since, in theory, liposomal compositions demonstrating high stability and prolonged circulation times *in vivo* can be rendered pH-sensitive.

We have already shown that copolymers of *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) bearing randomly-distributed hydrophobic alkyl chains and pH-sensitive units, such as methacrylic acid (MAA) (6, 7) or glycine acrylamide (Gly) (8), can confer pH-sensitivity to intrinsically-stable liposomes. Indeed, NIPAM copolymer-modified egg phosphatidylcholine (EPC), EPC/cholesterol (Chol) and EPC/Chol/distearoylphosphatidylethanolamine-*N*-methoxy poly(ethylene glycol) (DSPE-PEG) liposomes can efficiently release their content under mildly acidic conditions (6, 7).

The versatility of NIPAM copolymers has also been exploited to prepare pH-sensitive niosomes (9). Niosomes are vesicles that are structurally-related to liposomes but consist mainly of non-ionic surfactants. They were first introduced for cosmetic applications (10). Because surfactants are less susceptible to hydrolysis than phospholipids (11), the use of niosomes in drug delivery may offer an interesting alternative to liposomes. Moreover, some amphiphiles in niosome formulation (e.g. polyoxyethylene alkyl ether) may be involved in hydrogen bonding with the structural units of the polymer chain, a characteristic that can be exploited to strengthen the polymer affinity to the vesicle surface (12).

The ultimate goal is to produce a serum-stable, long-circulating vesicle/polymer complex that will efficiently deliver its content to the cytoplasm after endocytosis. This chapter summarizes some of our recent progress in the design, preparation and assessment of pH-sensitive vesicles (liposomes and niosomes) modified with NIPAM copolymers.

## 6.3. Experimental section

### 6.3.1. Polymer synthesis

Randomly- and terminally-alkylated copolymers of NIPAM were prepared by free radical polymerization, as described previously, using MAA (13) or Gly (14) as pH-sensitive moieties. The selected hydrophobic anchors were octadecylacrylate (ODA), octadecylacrylamide (ODAM) (randomly-alkylated polymers), and dioctadecylamide (DODA) (terminally-alkylated polymer). *N*-vinylpyrrolidone (VP) was added in some polymers to maintain their water solubility. The terminally-alkylated polymer was prepared by initiating the polymerization with 4,4'-azobis(4-cyano-*N,N*-dioctadecyl)pentanamide (DODA-501) as lipophilic initiator (15), which was prepared by reaction of dioctadecylamine with disuccinimidyl 4,4'-azobis(4-cyanovalerate) as described previously (16). The chemical structures of the polymers and their composition are shown in Figure 2 and Table I, respectively.

### 6.3.2. *In vitro* release kinetics

Unilamellar distearoylphosphatidylcholine (DSPC)/Chol and EPC/chol (3:2 molar ratio) liposomes were prepared by mechanical dispersion of lipids in buffer, followed by repeated extrusion through polycarbonate filters of varying pore sizes (50-200 nm). The fluorescent marker trisodium 8-hydroxypyrene trisulfonate (HPTS) and the collisional fluorescence quencher *p*-xylene-bis-pyridinium bromide (Molecular Probes) were co-encapsulated in the liposomes. The copolymers were incubated overnight at 4°C with the liposomes. Free copolymer was removed by size exclusion chromatography over Sepharose 2B (column i.d. 1 cm, length 23 cm) equilibrated in Hepes-saline buffer (20 mM Hepes, 144 mM NaCl). Release of the entrapped fluorescent dye was measured as described elsewhere (6). The loss of liposomal pH-sensitivity after 1-h incubation in 75% (v/v) human

serum at 37°C was also investigated after separation of the liposomes from excess serum components, using a Sepharose 2B column.

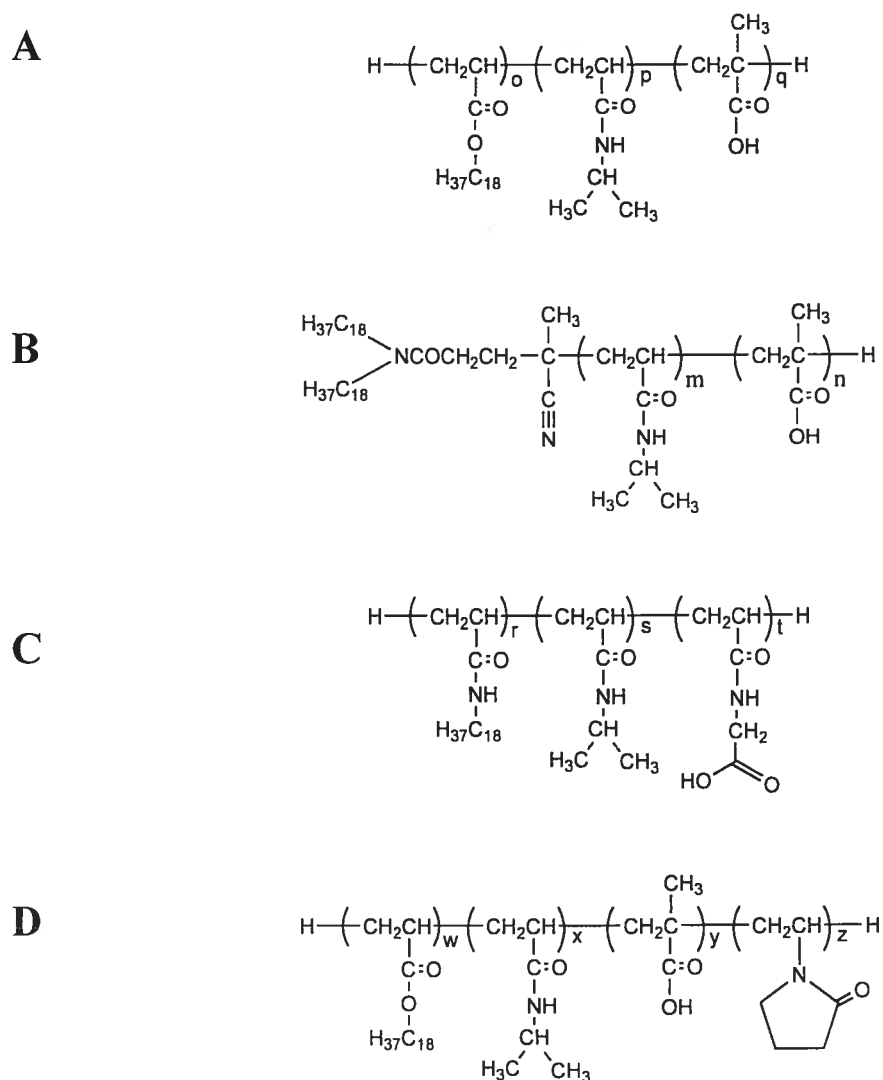


Figure 2. Structures of random copolymers P(NIPAM-co-MAA-co-ODA) (A), DODA-P(NIPAM-co-MAA) (B), P(NIPAM-co-Gly-co-ODAM) (C), and P(NIPAM-co-MAA-co-ODA-co-VP) (D).

Table 1. Characteristics of different pH-sensitive formulations and AUC after their i.v. administration in rats

Entry	Liposome formulation <sup>a</sup>	Polymer composition <sup>b</sup>	Molecular weight <sup>c</sup>	AUC <sub>∞</sub> ± S.D. (% injected dose]h/mL)	Reference
A	DSPC/Chol	-		36 ± 4	
B	DSPC/Chol	DODA-P(NIPAM <sub>95</sub> -co-MAA <sub>5</sub> )	29,000	37 ± 10	
C	EPC/Chol	-		8 ± 3	(20)
D	EPC/Chol	DODA-P(NIPAM <sub>95</sub> -co-MAA <sub>5</sub> )	8,200	12 ± 4	(20)
E	EPC/Chol	P(NIPAM <sub>94</sub> -co-MAA <sub>4</sub> -co-ODA <sub>2</sub> -co-VP <sub>4</sub> )	22,600	15 ± 5	(21)
F	EPC/Chol/PEG-PE (3:2:0.3)	P(NIPAM <sub>94</sub> -co-MAA <sub>4</sub> -co-ODA <sub>2</sub> -co-VP <sub>4</sub> )	22,600	50 ± 4	(21)
G	EPC/Chol/PEG-PE (3:2:0.15)	P(NIPAM <sub>94</sub> -co-MAA <sub>4</sub> -co-ODA <sub>2</sub> -co-VP <sub>4</sub> )	22,600	20 ± 4	(21)

<sup>a</sup>Liposome size: 180-230 nm, unimodal size distribution.

<sup>b</sup>Numbers in subscript refer to the molar proportion of each unit.

<sup>c</sup>The weight-average molecular weight of the polymers was determined by gel permeation chromatography performed in tetrahydrofuran using polystyrene standards for calibration.

### 6.3.3. Cytoplasmic delivery of calcein

J774 murine macrophage-like cells (a generous gift from Professor Alain Petit, Lady Davis Institute for Medical Research, Montréal, Qc, Canada) were grown in RPMI 1640 medium (Invitrogen Corp.) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and containing 100 units/mL penicillin G and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen). J774 cells were plated in 6-well tissue culture plates (1 mL RPMI-FBS containing  $3 \times 10^5$  viable cells) and allowed to adhere and proliferate for 24 h. They were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and incubated for 1 h in RPMI. Liposomes composed of 1-palmitoyl-2-oleyl-phosphatidylcholine/Chol (POPC/Chol, 3:2 molar ratio) and loaded with 120 mM calcein were prepared as described above. The copolymer was added during the liposome preparation process at a polymer/lipid ratio of 0.3 *w/w*. After solvent evaporation, the dried lipid/polymer film was hydrated in an isotonic calcein solution. The untrapped marker was removed by passage over Sephadex G100 column equilibrated with Hepes/Dextrose buffer (20 mM Hepes/5% dextrose *w/v*). The cells were incubated with 0.5 mM liposomes for 4 h at 37 °C, rinsed twice with cold PBS, and viewed with an Axiovert inverted microscope equipped with a fluorescence illuminator ( $\lambda_{\text{ex}}=435\text{-}485$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=515\text{-}555$  nm, Zeiss). Photographs were obtained with a 1310C DVC digital camera (DVC Company, Inc.).

### 6.3.4. Pharmacokinetics

*In vivo* studies were performed on male Sprague-Dawley rats (300-350 g, Charles River), which were prepared surgically for intravenous administration and arterial blood sampling. Polyethylene catheters, inserted into the femoral vein and artery, were protected with a tethering system, and the rats were allowed to recover for at least 24 h. Liposomes (30 mM lipids, 180-230 nm, unimodal size distribution) containing  $^{67}\text{Ga}$  were prepared by hydrating the lipid film with a  $^{67}\text{Ga}$  citrate solution (2 mCi/mL) that was previously neutralized (pH 7.5-8.5). After removal of the free  $^{67}\text{Ga}$ , a 400-µL sample (10 µmol



lipids/kg) was administered via the venous cannula. Blood samples (400  $\mu$ L) were collected, and  $^{67}\text{Ga}$  levels were measured by  $\gamma$ -counting (Cobra II auto-gamma counting system, Packard Instrument Company). Areas under the curve of blood concentration versus time ( $\text{AUC}_{\infty}$ ) were calculated for the different formulations using PK Solutions 2.0 software (Summit Research Services). These animal studies were approved by the Canadian Council on Animal Care and in-house ethics committee.

## 6.4. Results and discussion

### 6.4.1. *In vitro* pH-triggered release of vesicle/polymer complexes

#### 6.4.1.1. Liposomes composed of high phase transition lipids

PNIPAM are characterized in water by a lower critical solution temperature (LCST) of about 32°C, at which the polymer solution undergoes phase separation (17). By adding an acidic comonomer, such as MAA or Gly, it is possible to achieve pH-dependency of the LCST. Complexation to vesicles of randomly-alkylated NIPAM copolymers containing MAA (Figure 2A) have been shown to trigger the content release of various fluid phase liposomal formulations and the pH-content release of such vesicles has been correlated with the phase transition pH of the copolymer (6, 7). However, liposomes constituted of low phase transition lipids, such as EPC, generally have a lower stability in biological fluids than those composed of high phase transition lipids, such as DSPC ( $T_m = 55^\circ\text{C}$ ) (18). As serum stability is a prerequisite for the development of a viable liposomal drug delivery system, we attempted to confer pH-sensitivity to DSPC/Chol liposomes with a terminally-alkylated NIPAM copolymer (Figure 2B and Table 1, B). As shown in Figure 3, it was possible to trigger the release of HPTS from these liposomes coated with copolymer B at pH 4.9. Maximum release (53%) at acidic pH was obtained with the copolymer anchored to 200-nm liposomes. When the liposome size was reduced to 100 nm, the dye release was less pronounced despite faster kinetics. The higher release observed with large liposomes

may be explained by a difference in specific surface area. At a same copolymer/lipid ratio surface coverage is expected to be higher with the large size liposomes which exhibit a lower specific surface area.

Liposomes were found to be stable in 90% human serum in the presence or absence of the copolymer (data not shown). Some pH-sensitivity was lost after incubation in serum. At pH 4.9, only 15% of HPTS was released from 200-nm liposomes vs 53% before incubation in serum. There was a shift in the destabilization pH with 37% of HPTS released at pH 4.3 (Figure 4). These results suggest that part of the polymer may be extracted from the liposome surface by serum components. A pKa shift of the polymer in serum is unlikely since the *in vitro* triggered release is barely affected by the presence of divalent cations and nature of the buffer (data not shown).

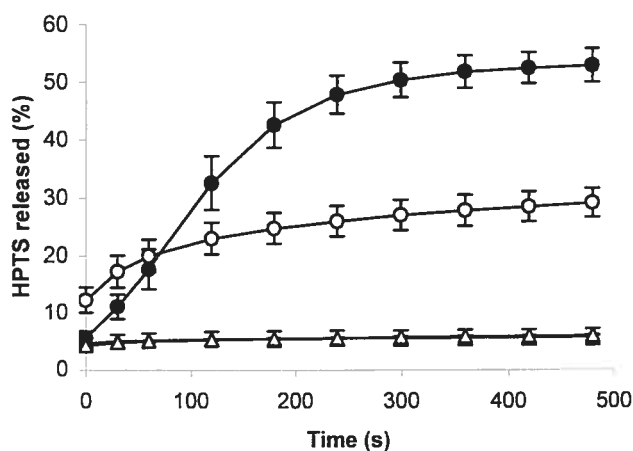


Figure 3. Percent HPTS release from DSPC/Chol liposomes bearing DODA-P(NIPAM<sub>95</sub>-co-MAA<sub>5</sub>) over time at 37°C at pH 7.4 (triangles) and 4.9 (circles). Solid symbols: 200-nm liposomes; empty symbols: 100-nm liposomes.

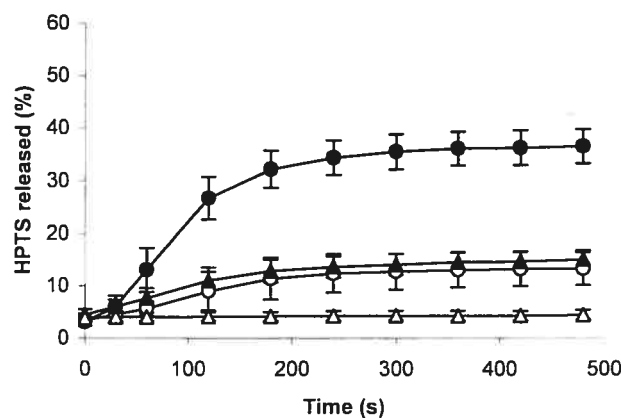


Figure 4. Percent HPTS release from 200-nm liposomes bearing DODA-P(NIPAM<sub>95</sub>-*co*-MAA<sub>5</sub>) over time at 37°C at pH 7.4 (empty triangles), 4.9 (empty circles), 4.6 (solid triangles), and 4.3 (solid circles) after 1-h (37°C) incubation in human serum.

#### 6.4.1.2. Niosomes

Since poor retention of the copolymer into the liposome bilayers seems to limit the stability of liposome/polymer complexes, niosomes (*n*-octadecyldiethylene oxide/Chol) were evaluated for the preparation of pH-sensitive vesicles with increased affinity for the copolymer. Indeed, Polozova and Winnik (12) have reported that randomly-alkylated NIPAM copolymers interacted differently with non-phospholipid vesicles *vs* liposomes. It was demonstrated that although the addition of a cationic amphiphile in niosomes (dimethyldioctadecylammonium bromide) increased their affinity to the copolymer by means of attractive electrostatic forces, the main driving force for polymer binding involved hydrogen bonding. Complexation with niosomes also involved the entire surface of the vesicles. Indeed, the hydroxyl and ether groups of the main amphiphile used in the niosome formulation participate in hydrogen bonding with the amide group of NIPAM units. Figure 5 displays possible interactions between a randomly-alkylated, pH-sensitive NIPAM copolymer and the niosome bilayer. In contrast, complexation between the

copolymer and liposomes was mainly driven by hydrophobic interactions between the alkyl chains (anchor) and the bilayers.

Niosomes (*n*-octadecyltriethylene oxide/Chol) modified with an alkylated NIPAM/Gly copolymer (Figure 2C, NIPAM/Gly/ ODAM; 93:5:2 molar ratio) were also shown to release their content under acidic conditions. However, the destabilization pH was higher than the pH at which the polymer collapsed in solution (9) in contrast to the case of the polymer-coated liposomes. It is believed that hydrogen bonding with niosomes changed the pH of coil-to-globule transition of the copolymer, presumably by changing its hydration state.

The strong interactions that occur between niosomes and the copolymer were expected to provide better anchoring of the polymer in bilayers and, consequently, greater stability of this system in biological fluids. Unfortunately, niosome/polymer complexes were found to be leaky in serum and did not maintain their pH-sensitivity (9).

#### **6.4.1.3. Liposomes composed of low phase transition lipids**

To increase the affinity of the copolymer for the liposome bilayer, its composition was modified to strengthen anchoring in liposomal membranes. Thus, the proportion of hydrophobic anchoring (ODA) was increased from 2 to 4 mol%. Also, VP was added as a comonomer in order to increase the water-solubility of the polymer (Figure 2D). We have shown that this copolymer (NIPAM/ODA/VP/MAA; 90:4:4:2 molar ratio) triggered, within 8 min, the release of 24 and 59% liposomal contents at pH 4.9, depending on whether the copolymer was simply incubated with preformed liposomes or incorporated during the liposome preparation procedure. The lower content release obtained with the complexes prepared by the incubation method could be explained by a lower binding to the lipid bilayer due to the presence strong intra/interchain hydrophobic domains. Moreover, the pH-sensitivity of the formulation prepared by incorporating the polymer during the liposome

preparation procedure was essentially preserved following 1-h incubation in human serum, with 46% of HPTS released at pH 4.9 (19).

#### 6.4.2. *In vitro* cytoplasmic delivery

Intracellular delivery of calcein encapsulated in liposomes coated with the above-mentioned copolymer was studied using J774 macrophage-like cells. Figure 6 shows that liposomes bearing NIPAM copolymer can increase cytoplasmic delivery of the fluorescent dye as cells treated with pH-sensitive liposomes present a diffuse fluorescence (Figure 6B). However, cells treated with the non-pH-sensitive control formulation display more punctuated fluorescence (Figure 6A), suggesting sequestration of the liposomes in endosomes/lysosomes.

The ability of this polymer to increase the cytoplasmic delivery of liposomal content was also demonstrated with cytosine arabinofuranoside (ara-C), an anticancer drug that is susceptible to degradation by lysosomal enzymes. Rapid release of ara-C in endosomes is expected to enhance its efficiency (3). Indeed, compared to non-pH-sensitive liposomes, ara-C was found to be more toxic toward J774 cells when delivered with EPC/Chol liposomes (4:1 molar ratio) coated with the pH-sensitive copolymer ( $LD_{50} = 23$  vs  $8 \mu\text{M}$ , respectively) (19).

#### 6.4.3. Pharmacokinetics

Since long circulation time is a prerequisite for the passive accumulation of liposomal carriers at tumoral sites, the pharmacokinetics of different pH-sensitive formulations was investigated. The  $AUC_{\infty}$  obtained are summarized in Table I. Coating of DSPC/Chol liposomes with terminally-alkylated NIPAM copolymer did not change their circulation time (Table I, A and B). This might result from fast removal of the polymer in blood, as confirmed by the loss of pH-sensitivity of liposomes observed after incubation in serum (see above section). Fluid phase liposomes are known to be less stable *in vivo*, and

this is apparent from the  $AUC_{\infty}$  of EPC/Chol liposomes, which is 4 times lower than DSPC/Chol  $AUC_{\infty}$  (Table 1, A and C). However, the presence of a terminally- or randomly-alkylated copolymer (Table 1, D and E) on the liposome surface slightly increased the circulation time of EPC/Chol liposomes (50 and 88% increase in the  $AUC_{\infty}$ , respectively). In the case of the terminally-alkylated copolymer, we showed that the polymer anchored at the liposomal surface provides a steric barrier below its LCST (20). As NIPAM copolymers had marginal effect on liposome pharmacokinetics, a poly(ethylene glycol)-phosphatidylethanolamine lipid (PEG-PE) was added to the formulation (21). The presence of PEG at the liposome surface is known to slow liposomal clearance by the mononuclear phagocyte system (22, 23). PEG efficiently prolonged liposome circulation time but a significant decrease in the liposome pH-sensitivity was also observed (21) (Table 1, F and G). PEG was found to produce a similar effect on DOPE-based liposomes (24).

## 6.5. Conclusion

This study shows that liposomes made with low or high phase transition temperature lipids as well as niosomes can be rendered pH-sensitive by coating with NIPAM copolymers. Binding of the polymer to niosomes probably occurs *via* hydrogen bonding. However, in serum, niosome/polymer complexes were found to be leaky and to lose their pH-sensitivity. NIPAM copolymers could facilitate the cytoplasmic transfer of liposomal contents, but alone did not provide liposomes with a circulation time long enough for passive tumor targeting. Future work will consist in designing a liposomal formulation with a long half-life and good pH-responsiveness. This could be achieved by coating the liposomes with a more hydrophilic NIPAM copolymer (which would provide a higher degree of steric stabilization) in combination with low amounts of a PEG derivative.

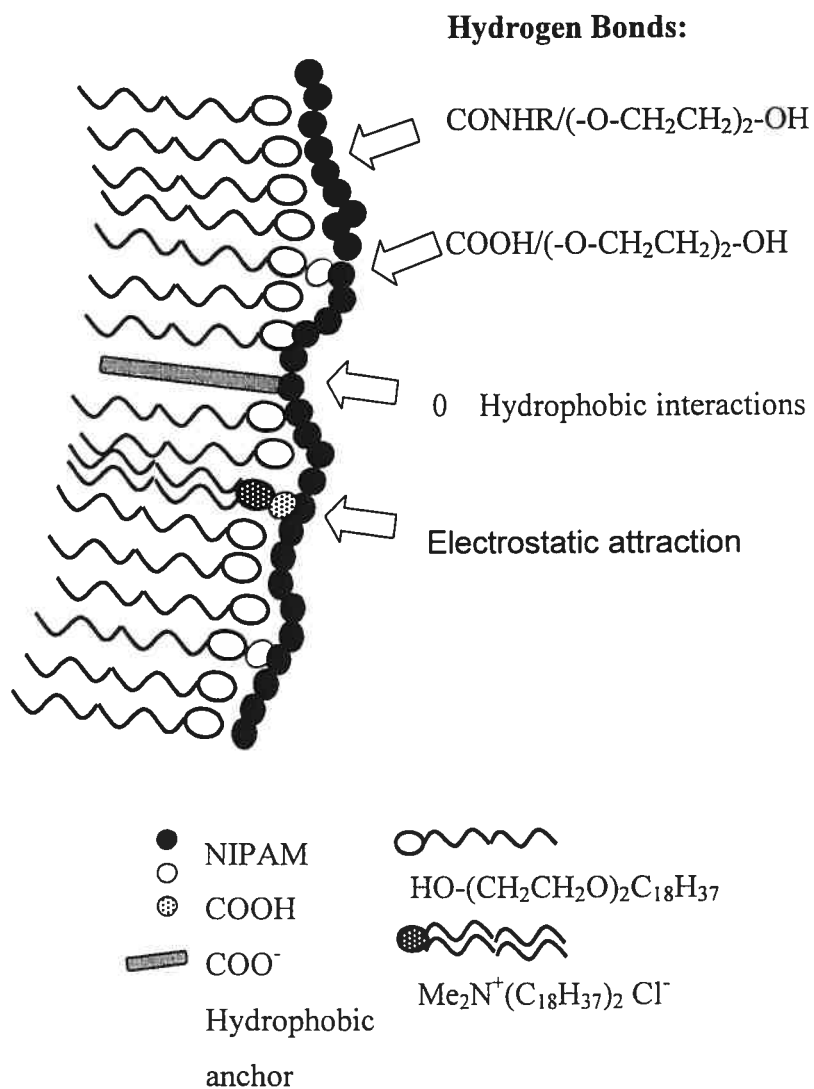


Figure 5. Representation of the interactions between a cationic niosome and a pH-sensitive, randomly-alkylated NIPAM copolymer (for clarity only half a bilayer is shown and cholesterol has been omitted). Reproduced from Polozova and Winnik (12) with permission from the American Chemical Society.

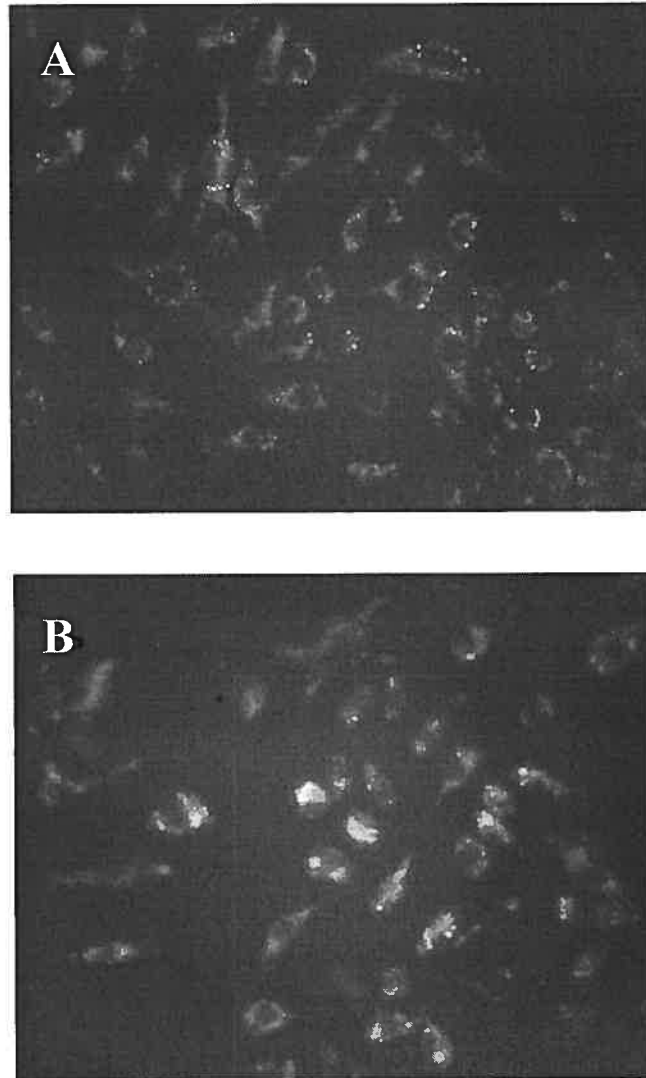


Figure 6. Fluorescence micrographs of J774 macrophage-like cells treated with vesicles containing calcein. (A) Naked POPC/Chol liposomes; (B) POPC/Chol liposomes coated with P(NIPAM<sub>90</sub>-co-VP<sub>4</sub>-co-MAA<sub>2</sub>-co-ODA<sub>4</sub>).



## Acknowledgements

This work was supported financially by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (JCL), the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (FMW) and the Canada Research Chair Program. JCL acknowledges a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## 6.6. References

1. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 271-284.
2. Park, J.W.; Hong, K.; Kirpotin, D.B.; Papahadjopoulos, D.; Benz, C.C. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *40*, 399-435.
3. Huang, A.; Kennel, S.J.; Huang, L. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 14034-14040.
4. Senior, J.H. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1987**, *3*, 123-193.
5. Collins, D.; Litzinger, D.C.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1025*, 234-242.
6. Meyer, O.; Papahadjopoulos, D.; Leroux, J.C. *FEBS Lett.* **1998**, *42*, 61-64.
7. Zignani, M.; Drummond, D.C.; Meyer, O.; Hong, K.; Leroux, J.-C. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1463*, 383-394.
8. Winnik, F.M.; Principi, T., *Stimuli-responsive water soluble and amphiphilic polymers*, C.L. McCormick, Editor. 2000, American Chemical Society: Washington, DC. p. 277-297.
9. Francis, M.F.; Dhara, G.; Winnik, F.M.; Leroux, J.-C. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 741-749.
10. Handjani-Vila, R.M.; Ribier, A.; Rondot, B.; Vanlerberghe, G. *Int. J. Cos. Sci.* **1979**, *1*, 303-314.
11. Kemps, J.M.A.; Crommelin, D.J.A. *Pharm. Weekbl.* **1988**, *123*, 355-363.
12. Polozova, A.; Winnik, F.M. *Langmuir* **1999**, *15*, 4222-4229.

13. Leroux, J.-C.; Roux, E.; Le Garrec, D.; Hong, K.; Drummond, D.C. *J. Controlled Release* **2001**, *72*, 71-84.
14. Spafford, M.; Polozova, A.; Winnik, F.M. *Macromolecules* **1998**, *31*, 7099-7102.
15. Taillefer, J.; Brasseur, N.; van Lier, J.E.; Lenaerts, V.; Le Garrec, D.; Leroux, J.-C. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, (In Press).
16. Kitano, H.; Akatsuka, Y.; Ise, N. *Macromolecules* **1991**, *24*, 42-46.
17. Heskins, M.; Guillet, J.E. *J. Macromol. Sci. Chem.* **1968**, *A2*, 1441-1455.
18. Senior, J.; Gregoriadis, G. *Life Sci.* **1982**, *30*, 2123-2136.
19. Roux, E.; Francis, M.; Winnik, F.M.; Leroux, J.-C. *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 25-36.
20. Roux, E.; Stomp, R.; Giasson, S.; Pézolet, M.; Moreau, P.; Leroux, J.-C. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1795-1802.
21. Roux, E.; Lafleur, M.; Lataste, E.; Moreau, P.; Leroux, J.-C. *Biomacromolecules* **2003**, *In Press*, .
22. Lasic, D.; Martin, F.J.; Gabizon, A.; Huang, S.K.; Papahadjopoulos, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1070*, 187-192.
23. Papahadjopoulos, D.; Allen, T.M.; Gabizon, A.; Mayhew, E.; Matthey, K.; Huang, S.K.; Lee, K.D.; Woodle, M.C.; Lasic, D.D.; Redemann, C.; Martin, F.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 11460-11464.
24. Slepushkin, V.A.; Simoes, S.; Dazin, P.; Newman, M.S.; Guo, L.K.; Pedroso de Lima, M.C.; Düzgünes, N. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2382-2388.

## **CHAPITRE 7**

### **SERUM-STABLE AND LONG-CIRCULATING, PEGYLATED, PH-SENSITIVE LIPOSOMES**

## Serum-stable and long circulating, PEGylated, pH-sensitive liposomes [*Journal of controlled release, Sous presse*]

Emmanuelle Roux<sup>1</sup>, Catherine Passirani<sup>2</sup>, Stefanie Scheffold<sup>2</sup>, Jean-Pierre Benoit<sup>2</sup> and Jean-Christophe Leroux<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, <sup>2</sup>Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

<sup>2</sup>INSERM ERIT-M0104, Ingénierie de la vectorisation particulaire, Université d'Angers, 10 Rue André Bocquel 49100 Angers, France.

\*Corresponding author : mailing address : Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montréal (PQ), H3C 3J7, Canada. Tel. : (514) 343-6455, Fax: (514) 343-7738, [REDACTED]

### Technical Note

Reproduit avec la permission d'Elsevier.

### 7.1. Abstract

pH-Sensitive liposomes were prepared using a terminally-alkylated copolymer of *N*-isopropylacrylamide and methacrylic acid and poly(ethylene glycol) phospholipid derivative. The pH-triggered content release was evaluated before and after incubation in serum. Pharmacokinetic profiles of the formulations were established in rats. This study showed that a pH-sensitive, serum-stable and long-circulating liposomal formulation can be produced.

**Keywords.** pH-sensitive liposomes, poly(*N*-isopropylacrylamide), poly(ethylene glycol).

## 7.2. Introduction

pH-Sensitive liposomes have been suggested as a means to increase the cytoplasmic delivery of drugs. After receptor-mediated endocytosis, liposomes transit via endosomes where acidic pH can induce their destabilization. The release of material encapsulated in endosomes has been shown to enhance intracellular bioavailability, especially when the drug is metabolized in lysosomes. The most studied class of pH-sensitive liposomal formulations consists of unsaturated phosphatidylethanolamine (PE) combined with mildly acidic amphiphiles, such as oleic acid or cholesterylhemisuccinate [1, 2]. Although pH-sensitive, PE-based liposomes have been shown to efficiently deliver diverse molecules to the cytoplasm [3], their *in vivo* applications have been limited by their moderate stability [4, 5] and/or rapid removal by the mononuclear phagocyte system (MPS) after intravenous administration [6].

pH-Sensitive vesicles can also be produced by coating liposomes with pH-responsive polymers [7, 8]. Over the past 5 years, we have been particularly interested in pH-sensitive formulations bearing hydrophobically-modified copolymers of *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) and methacrylic acid (MAA) [9, 10]. To design a clinically-viable formulation, we focused our work on important issues, such as serum-stability and *in vivo* half-life. We demonstrated that terminally-alkylated pH-sensitive NIPAM copolymers could provide, at neutral pH, a steric barrier sufficient enough to significantly increase circulation time of the liposomes [11]. However, steric stabilization provided by the NIPAM copolymer remained marginal in comparison to poly(ethylene glycol) (PEG) [12]. To prolong the circulation time of pH-sensitive liposomes, PEG-PE was later added to a formulation containing a randomly-alkylated NIPAM copolymer [13]. Unfortunately, although the addition of PEG-PE efficiently prolonged liposome circulation time, it also led to a significant decrease in liposome pH-sensitivity. This report describes our recent

progress in the development of serum-stable and long-circulating, pH-sensitive formulations.

## 7.3. Materials and methods

### 7.3.1. Synthesis and characterization of the copolymer

The terminally-alkylated copolymer dioctadecylamide (DODA)-P(NIPAM-*co*-MAA) (NIPAM/MAA 95:5 mol/mol) was synthesized as described previously [11]. The weight-average molecular weight ( $M_w = 14\,700$ ) and polydispersity index (1.83) of the polymers were measured by gel permeation chromatography [11]. At 37°C, this polymer undergoes phase transition at pH 5.6, as ascertained by turbidimetry at 480 nm [9]. Thermograms of the copolymer (3 mg/mL) with or without PEG(2000) methyl ether (3 mg/mL) were obtained by differential scanning calorimetry (DSC) (VP-DSC, Microcal, LLC.) at a heating rate of 1.5°C/min [13]. At pH 7.4, the polymer's lower critical solution temperature (LCST) is 65°C (maximum of the endothermic peak).

### 7.3.2. Liposome preparation

Liposomes of either egg phosphatidylcholine (EPC)/Cholesterol (Chol) (3:2 molar ratio), EPC/Chol/1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-[poly(ethylene glycol)2000] (PEG(2000)-PE) (3:2:0.3) or EPC/Chol/PEG(5000)-PE (3:2:0.3) (Avanti Polar Lipids) were prepared by the lipid film hydration method, followed by extrusion through polycarbonate filters. The NIPAM copolymer was added to the lipid mixture at a ratio of 0.3 *w/w* prior to the hydration step. Untrapped marker and free polymer were removed by gel exclusion chromatography over Sepharose 2B (Sigma).

### 7.3.3. *In vitro* release kinetics

Content release was monitored by fluorescence dequenching assays using trisodium 8-hydroxypyrene trisulfonate (HPTS) and *p*-xylene-bis-pyridinium (Molecular Probes) as encapsulated probe and quencher, respectively [13]. The release assay was carried out before and after incubation in 75% human serum (HS) (1 h at 37°C). Excess serum components were removed by passage over Sepharose 2B prior to content release evaluation. Statistically significant differences between the content releases of the formulations at a given pH were evaluated according to the Kruskal-Wallis test. A paired *t* test was used to calculate the difference between HPTS release before and after serum treatment. For both tests, a *p* value of <0.05 was considered significant.

### 7.3.4. *In vivo* pharmacokinetics and biodistribution

Liposomes containing <sup>67</sup>Ga-citrate (Bristol-Myers Squibb) were administered, *via* a venous cannula (0.55 μmol lipids/rat), to male Sprague-Dawley rats (300-350 g) (Charles River), as described previously [11]. <sup>67</sup>Ga levels in blood and organ samples were measured by γ-counting. Statistically significant differences between the area under the curve of blood concentration *versus* time (AUC<sub>0-∞</sub>) were calculated according to the Kruskal-Wallis test, followed by the *post-hoc* Dunn's test for individual comparisons. Statistical differences between the <sup>67</sup>Ga levels found in the MPS organs were evaluated using the ANOVA test, followed by the *post-hoc* Scheffé's test for individual comparisons. A *p* value of <0.05 was considered significant.

## 7.4. Results and discussion

### 7.4.1. *In vitro* release of pH-sensitive liposomes

Figure 1A shows the percent of HPTS released from liposomes decorated with DODA-P(NIPAM-*co*-MAA). This polymer can efficiently trigger, within 8 min, the release of 84% and 58% of liposomal content at pH 4.9 and 5.8, respectively. To produce long-circulating, pH-sensitive liposomes, 6 mol% PEG(2000)-PE or PEG(5000)-PE was added to the formulation. We have reported previously that the addition of PEG-PE to formulations containing a randomly-alkylated NIPAM copolymer had a detrimental effect on pH-sensitivity [10, 13]. However, with this terminally-alkylated polymer, the presence of either PEG(2000)-PE or PEG(5000)-PE did not reduce the extent of content leakage at acidic pH. Though not significantly different, a slight increase in pH-sensitivity was observed in the case of PEG(2000)-PE at both pH 4.9 and pH 5.8. This higher content release at acidic pH could not be explained by a lowering of the polymer cloud point as DSC experiments revealed that PEG in solution did not affect the copolymer's LCST (data not shown).

An important consideration in the development of pH-sensitive liposomes is their stability in biological fluids. Most copolymer-coated liposomes that we prepared in the past exhibited a partial loss of pH-sensitivity (15 to 25%) following incubation in serum [11, 13, 14]. Stabilization resulting from protein binding and/or partial extraction of the copolymer from the lipid bilayers were put forward as likely explanations to rationalize the effect of serum [14]. Similarly, Figure 1B shows that the liposomes slightly lost some pH-sensitivity after a 1-h incubation in serum, as indicated by the decrease in HPTS released at acidic pH. It should be noted that only the loss observed at pH 5.8 was statistically significant ( $p < 0.05$ ). However, liposomes coated with PEG(2000)-PE or PEG(5000)-PE fully preserved their pH-responsiveness. PEG derivatives are known to create a zone of steric



hindrance that slows down the opsonization of liposomes [15]. These results suggest that PEG co-anchored at the bilayer prevents protein adsorption and/or copolymer desorption.

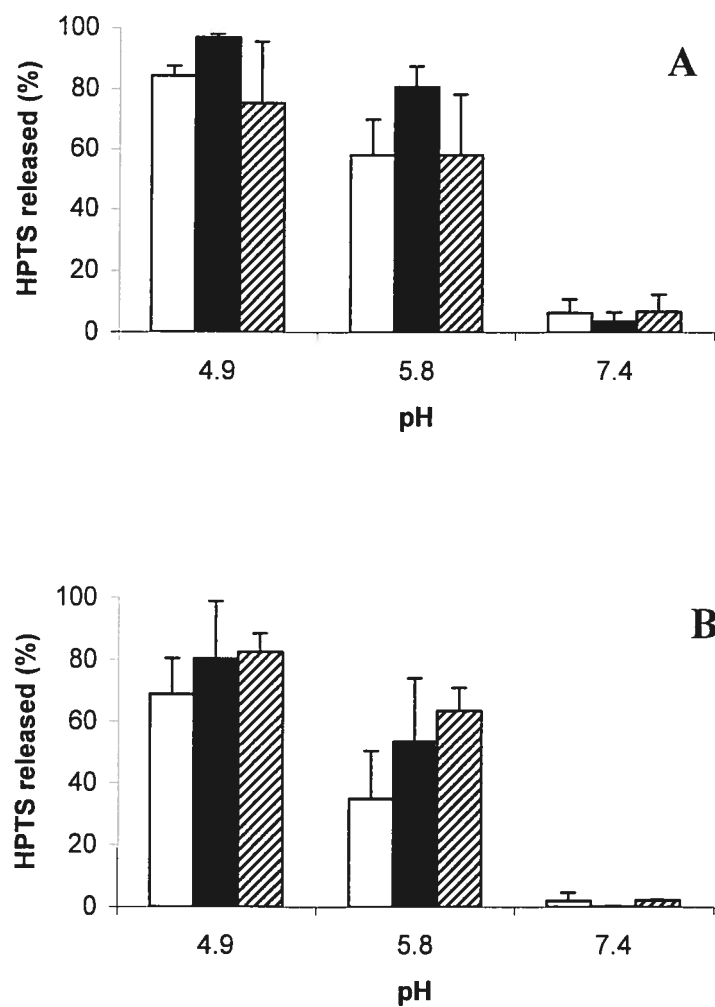


Figure 1. Percent HPTS release from pH-sensitive liposomes with a 0.3 (*w/w*) NIPAM copolymer/lipid ratio containing either no PEG-PE (open bars), PEG(2000)-PE (closed bars) or PEG(5000)-PE (striped bars) after 8-min incubation at 37°C before (A), and after (B) a 1-h incubation in 75% human serum. Liposome size: 115-165 nm.

### 7.4.2. Pharmacokinetics

The pharmacokinetics of liposomal  $^{67}\text{Ga}$  after intravenous injection of the different formulations are illustrated in Figure 2. Coating liposomes with DODA-P(NIPAM-co-MAA) resulted in a slight increase in the  $\text{AUC}_{0-\infty}$  which was not statistically significant. This result correlates the inability of the NIPAM copolymer alone to suppress activation of complement by liposomes (unpublished data). Further augmentation of circulation time could be obtained by the addition of PEG(2000)-PE, the  $\text{AUC}_{0-\infty}$  being 3-fold higher than that of the control formulation ( $p < 0.05$ ). The effect of PEG(2000)-PE on liposome circulation time was somehow inferior to that previously observed with liposomes coated with a randomly-alkylated NIPAM copolymer (6.3-fold increase in the  $\text{AUC}_{0-\infty}$ ) [13]. However, despite its greater AUC, the latter formulation suffered from insufficient pH-sensitivity. As shown in Figure 2, a 5-fold increase in the  $\text{AUC}_{0-\infty}$  could be obtained by incorporating a longer PEG ( $M_w$  5,000) into liposomes bearing the terminally-alkylated NIPAM copolymer. This prolonged circulation time was also correlated with a lesser uptake of the liposomes by the MPS most remarkably indicated by the  $^{67}\text{Ga}$  level found in the liver after 24 h (Figure 3). The total accumulation of  $^{67}\text{Ga}$  in the MPS organs (liver and spleen) was similar for pH-sensitive liposomes/PEG(2000)-PE, pH-sensitive liposomes and control liposomes with  $62 \pm 9$ ,  $54 \pm 8$  and  $61 \pm 1\%$  injected dose, respectively, compared to  $26 \pm 5\%$  injected dose for pH-sensitive liposomes/PEG(5000)-PE ( $p < 0.05$ ). Indeed, while the length of the PEG added to the formulation had no effect on their *in vitro* serum stability, the use of a longer PEG provided liposomes with extended circulation time.

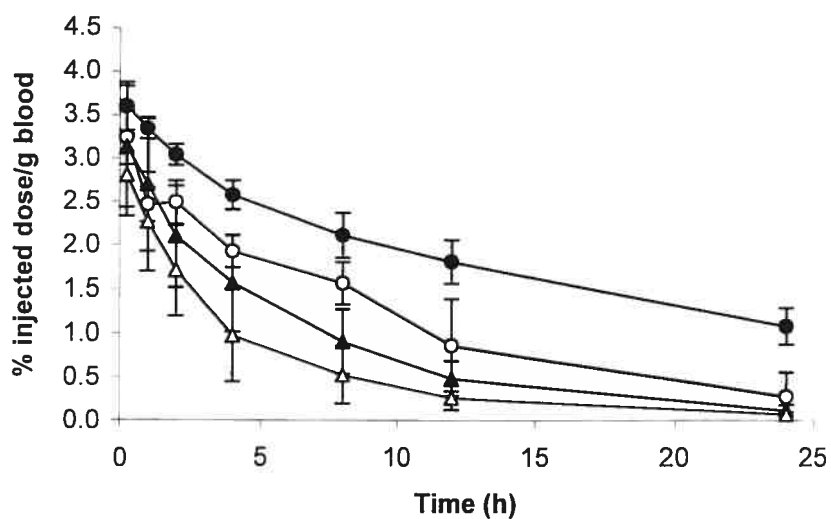


Figure 2. Pharmacokinetics of pH-sensitive liposomes containing PEG(5000)-PE (closed circles;  $n=5$ ;  $AUC_{0-\infty}=74.2\pm 12.5$  [%injected dose/g blood]h/mL); pH-sensitive liposomes containing PEG(2000)-PE (open circles;  $n=5$ ;  $AUC_{0-\infty}=44.2\pm 19.5$  [%injected dose/g blood]h/mL); pH-sensitive liposomes (closed triangles;  $n=8$ ;  $AUC_{0-\infty}=21.6\pm 6.9$  [%injected dose/g blood]h/mL); and control non-pH-sensitive non-PEGylated liposomes (open triangles;  $n=7$ ;  $AUC_{0-\infty}=14.7\pm 5.2$  [%injected dose/g blood]h/mL). Liposome size: 100-130 nm.

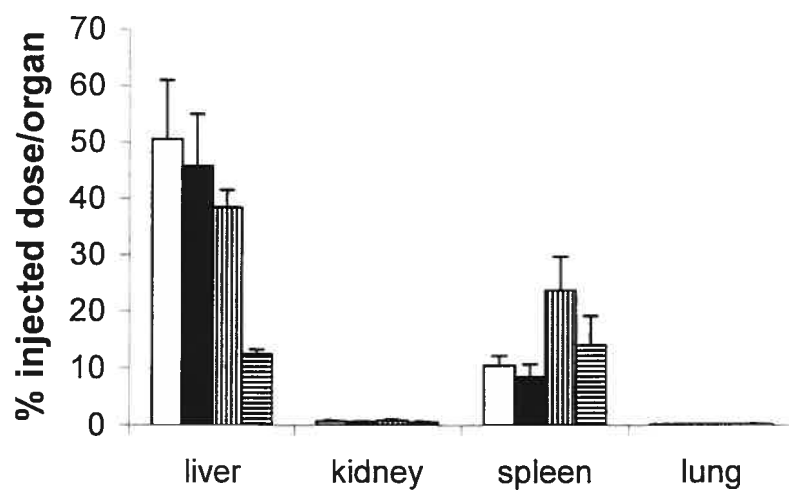


Figure 3. Percent injected  $^{67}\text{Ga}$  dose found in different organs 24 h post-injection of the different liposomal formulations. pH-Sensitive liposomes containing PEG(5000)-PE (horizontal stripes); pH-sensitive liposomes containing PEG(2000)-PE (vertical stripes); pH-sensitive liposomes (black bars); and control non-pH-sensitive non-PEGylated liposomes (open bars).

## 7.5. Conclusion

This study demonstrated that PEGylated liposomes can be rendered pH-responsive by anchoring DODA-P(NIPAM-*co*-MAA) at their surface. PEG(5000)-PE did not impair pH-sensitivity, and the properties were maintained after incubation in serum. Also, PEG(5000)-PE efficiently increased the circulation time of pH-sensitive liposomes. This formulation is by far the most efficient system we designed to date with regard to pH-sensitivity, serum stability and *in vivo* circulation time. To promote the binding and internalization of liposomes by cells, we are now investigating the grafting of an anti-CD33 antibody to the extremity of the PEG chain. CD33 is an antigen expressed on the cell surface of more than 80% of leukemia isolates from patients with acute myeloid leukemia [18], and it is not expressed on normal pluripotent stem cells [19].

## Acknowledgments

This work was supported financially by the Canadian Institutes of Health Research and the Canada Research Chair Program.

## 7.6. References

1. J. Connor, M.B. Yatvin, and L. Huang. pH-sensitive liposomes: acid-induced liposome fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984) 1715-1718.
2. H. Ellens, J. Bentz, and F.C. Szoka. pH-induced destabilization of phosphatidylethanolamine-containing liposomes: role of bilayer contact. *Biochemistry*, 23 (1984) 1532-1538.
3. D.C. Drummond, M. Zignani, and J.-C. Leroux. Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog. Lipid Res.*, 39 (2000) 409-460.
4. J.H. Senior. Fate and behaviour of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 3 (1987) 123-193.

5. D. Collins, D.C. Litzinger, and L. Huang. Structural and functional comparisons of pH-sensitive liposomes composed of phosphatidylethanolamine and three different diacylsuccinylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta*, 1025 (1990) 234-242.
6. J. Connor, N. Norley, and L. Huang. Biodistribution of pH-sensitive immunoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 884 (1986) 474-481.
7. T. Chen, L.S. Choi, S. Einstein, M.A. Klippenstein, P. Scherrer, and P.R. Cullis. Proton-induced permeability and fusion of large unilamellar vesicles by covalently conjugated poly(2-ethylacrylic acid). *J. Liposome Res.*, 9 (1999) 387-405.
8. K. Kono, K.I. Zenitani, and T. Takagishi. Novel pH-sensitive liposomes: liposomes bearing a poly(ethylene glycol) derivative with carboxyl groups. *Biochim. Biophys. Acta*, 1193 (1994) 1-9.
9. O. Meyer, D. Papahadjopoulos, and J.C. Leroux. Copolymers of *N*-isopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes. *FEBS Lett.*, 42 (1998) 61-64.
10. M. Zignani, D.C. Drummond, O. Meyer, K. Hong, and J.-C. Leroux. In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. *Biochim. Biophys. Acta*, 1463 (2000) 383-394.
11. E. Roux, R. Stomp, S. Giasson, M. Pérolet, P. Moreau, and J.-C. Leroux. Steric stabilization of liposomes by pH-responsive *N*-isopropylacrylamide copolymer. *J. Pharm. Sci.*, 91 (2002) 1795-1802.
12. M.C. Woodle, M.S. Newman, and J.A. Cohen. Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties. *J. Drug Targeting*, 2 (1994) 397-403.
13. E. Roux, M. Lafleur, E. Lataste, P. Moreau, and J.-C. Leroux. On the characterization of pH-sensitive liposome/polymer complexes. *Biomacromolecules*, 14 (2003) 240-248.
14. E. Roux, M. Francis, F.M. Winnik, and J.-C. Leroux. Polymer-based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drugs. *Int. J. Pharm.*, 242 (2002) 25-36.

15. V.P. Torchilin, V.G. Omelyanenko, M.I. Papisov, A.A. Bogdanov, V.S. Trubetskoy, J.N. Herron, and C.A. Gentry. Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1195 (1994) 11-20.
16. D.A. Scheinberg, M. Tanimoto, S. McKenzie, A. Strife, L.J. Old, and B.D. Clarkson. Monoclonal antibody M195: a diagnostic marker for acute myelogenous leukemia. *Leukemia*, 3 (1989) 440-445.
17. J.D. Griffin, D. Linch, K. Sabbath, P. Larcom, and S.F. Schlossman. A monoclonal antibody reactive with normal and leukemic human myeloid progenitor cells. *Leuk. Res.*, 8 (1984) 521-534.

## **CHAPITRE 8**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE**



## 8.1. Sensibilité au pH des complexes liposome/polymère

Les travaux effectués dans le cadre de ce projet de doctorat avaient pour but la mise au point d'une formulation liposomale sensible au pH dans laquelle un polymère provoquerait la libération de son contenu à pH acide. De surcroît, cette formulation se devait d'être stable en présence de fluides biologiques et de montrer un temps de circulation prolongé. Afin de concevoir des liposomes ayant ces caractéristiques, diverses approches ont été abordées. D'une part, différentes compositions liposomales ont été évaluées et, d'autre part, la structure du polymère a été modifiée.

### 8.1.1. Utilisation de lipides possédant des transitions de phase différentes

Les premières études rapportant la déstabilisation de vésicules par un copolymère de NIPAM à pH acide ont été effectuées sur des liposomes constitués d'EPC/Chol (3:2) (Meyer *et al.*, 1998; Zignani *et al.*, 2000). Par ailleurs, les liposomes composés de lipides dont la  $T_m$  est inférieure à 37 °C, tels que l'EPC, ont généralement une plus faible stabilité dans les fluides biologiques que ceux constitués de lipides dont la  $T_m$  est élevée, tels que la DSPC (Senior & Gregoriadis, 1982). Ainsi, nous avons tenté de conférer une sensibilité au pH à des vésicules de DSPC/Chol (3:2) en les complexant avec un copolymère de NIPAM alkylé en bout de chaîne dont la structure est DODA-P(NIPAM<sub>95</sub>-*co*-MAA<sub>5</sub>). Bien que les complexes DSPC/Chol/polymère aient démontré une sensibilité au pH initiale adéquate (53% du contenu en HPTS libéré à pH 4,9 en 8 min; Chapitre 5, Figure 3), leur incubation dans du sérum a grandement réduit cette dernière, ce que nous attribuons à une extraction du polymère par les composantes sériques. Cette hypothèse est appuyée par les résultats de pharmacocinétique. En effet, le temps de circulation des liposomes de DSPC/Chol n'a pas été modifié par la présence du copolymère, ce qui suggère son détachement rapide de la surface.

Puisque l'utilisation de liposomes de haute température de transition n'a pas amélioré les caractéristiques des complexes liposome/polymère, toutes les autres formulations mises au point l'ont été à partir de liposomes d'EPC/Chol, qui permettent une plus grande versatilité quant au choix du polymère utilisé. En effet, les liposomes de DSPC/Chol, qui doivent être chauffés au-dessus de 55 °C lors de leur préparation, demandent que les copolymères de NIPAM soient incorporés par incubation avec les liposomes préformés afin d'éviter une précipitation du polymère à haute température. De plus, l'incubation des polymères avec les liposomes préformés peut résulter en un faible taux de fixation aux vésicules. Ainsi, la présence de PEG dans la formulation procure une barrière stérique qui réduit l'adsorption du polymère (Zignani *et al.*, 2000). Par ailleurs, les liposomes d'EPC/Chol peuvent être préparés à température ambiante, ce qui permet d'obtenir une incorporation plus importante des copolymères en les incluant lors de la fabrication des liposomes.

### **8.1.2. Influence de la composition des copolymères sur les propriétés de libération**

Afin de développer une formulation optimale, plusieurs types de copolymères de NIPAM ont été complexés à des liposomes d'EPC/Chol. Les chaînes alkyles permettant l'ancrage du polymère dans la membrane lipidique ont été positionnées soit à l'extrémité du polymère, soit de façon aléatoire dans la chaîne. Dans ce dernier cas, différentes quantités d'ancre hydrophobe ont été incorporées dans le polymère. Des polymères contenant différentes proportions d'unités MAA (monomère sensible au pH) ont été testés.

#### **8.1.2.1. Effet de la position de l'ancre hydrophobe dans le polymère**

L'étude comparative de l'effet de la position de l'ancre hydrophobe au sein de la chaîne polymère sur les propriétés de libération des complexes n'a été conduite qu'une seule fois et ne figure pas dans cette thèse (Leroux *et al.*, 2001). Ces travaux montrent

toutefois que dans le cas de copolymères de NIPAM et de MAA de masse molaire identique ( $M_w = 29\ 000$ ) ayant un pH de transition similaire, une déstabilisation plus importante des liposomes d'EPC/Chol à pH acide est obtenue lorsque le polymère est alkylé de façon aléatoire plutôt qu'en bout de chaîne ( $\approx 25\%$  de plus du contenu liposomal est libéré à pH 4,9). Ces résultats ont été obtenus en incorporant les polymères par incubation avec les liposomes préformés. Néanmoins, en réduisant la masse molaire du polymère alkylé en bout de chaîne de 29 000 à 14 700 ou 8 200 et en l'incorporant à la formulation durant la préparation des liposomes, il nous a été possible d'obtenir des libérations d'environ 80% du contenu liposomal à pH 4,9, ce qui représente un des meilleurs résultats obtenus avec un copolymère de NIPAM. Ainsi, bien que la position de l'ancre hydrophobe semble avoir un effet sur la capacité des copolymères de NIPAM à déstabiliser les liposomes à pH acide, l'impact de la masse molaire du polymère et/ou de son mode d'incorporation à la formulation apparaît plus important.

La modification des propriétés de surface des liposomes par l'ajout de polymères hydrophiles, tels que le PEG, a fait l'objet de nombreuses études (Klibanov *et al.*, 1990; Lasic *et al.*, 1991). Il a été suggéré que la mobilité de la chaîne de polymère est l'un des facteurs importants contribuant à la furtivité des liposomes PEGylés (Blume & Cevc, 1993; Torchilin *et al.*, 1994). Ainsi, l'utilisation d'un polymère alkylé en bout de chaîne plutôt qu'alkylé de façon statistique devrait procurer une plus grande stabilité aux liposomes. Les premiers polymères ont, en théorie, une plus grande mobilité que les seconds qui ont plus d'un point d'ancrage. Toutefois, aucun de nos résultats ne semble indiquer que les polymères alkylés en position terminale réduisent les interactions des liposomes avec le sérum de façon plus importante que leur équivalent alkylé de façon statistique. En effet, la perte de sensibilité au pH des liposomes suite à leur incubation dans le sérum est attribuée à l'extraction du polymère par les composantes sériques et/ou à l'absorption de protéines qui stabiliseraient les bicouches. Or, pour toutes les formulations, la quantité d'HPTS libéré des vésicules à pH acide s'est vue réduite de 13 à 20% après leur exposition au sérum et aucune

tendance n'est ressortie quant à l'effet de la position de l'ancre sur cette perte de sensibilité au pH.

#### **8.1.2.2. Effet de la proportion d'ancre hydrophobe et d'acide méthacrylique dans le polymère**

L'extraction du copolymère des vésicules ayant été perçue comme la principale entrave à la stabilité des complexes liposome/copolymère, la composition du polymère a été modifiée afin d'accroître son affinité pour la membrane lipidique. Le contenu en ODA a été doublé en comparaison à la première génération de P(NIPAM-*co*-MAA-*co*-ODA) qui contenait typiquement 2 mol% de ODA (Leroux *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 1998; Zignani *et al.*, 2000). Le contenu en MAA a été ajusté entre 2 et 4 mol% et de la VP a été également ajoutée pour assurer la solubilité du polymère en milieu aqueux. Aucune étude systématique de l'effet de la proportion de chaînes alkyles dans la chaîne polymère sur la stabilité des formulations n'a toutefois été conduite et l'introduction de plusieurs variables (*i.e.* %MAA, %VP, position de l'ancre, masse molaire) rend l'interprétation des résultats difficile. Les polymères P(NIPAM<sub>90</sub>-*co*-ODA<sub>4</sub>-*co*-MAA<sub>4</sub>-*co*-VP<sub>2</sub>) et P(NIPAM<sub>90</sub>-*co*-ODA<sub>4</sub>-*co*-MAA<sub>2</sub>-*co*-VP<sub>4</sub>) provoquent respectivement la libération de 83 et 59% du contenu liposomal à pH 4,9. Or, l'incubation de ces liposomes dans le sérum conduit à une perte de sensibilité au pH similaire à celle observée pour les formulations contenant un polymère alkylé en position terminale, qui n'ont qu'un seul point d'ancrage. Ces résultats semblent, à première vue, indiquer que l'augmentation du nombre de points d'ancrage dans la chaîne n'augmente pas la rétention du polymère à la surface des liposomes. Toutefois, ils doivent être interprétés avec circonspection car afin de maintenir la solubilité du polymère, la nature et la proportion des monomères ont du être variées.

Les polymères contenant une proportion plus importante de ODA (4 mol%) présentent de forts domaines hydrophobes intra/interchaînes qui réduisent leur interaction avec les membranes de lipides lorsqu'ils sont incubés avec les liposomes. Ceci résulte en

une très faible sensibilité au pH des complexes liposome/polymère obtenus (24% du contenu liposomal libéré des complexes EPC/Chol/P(NIPAM<sub>90-co</sub>-ODA<sub>4-co</sub>-MAA<sub>2-co</sub>-VP<sub>4</sub>) à pH 4,9; Chapitre 3, Figure 5). Ainsi, ces polymères doivent être ajoutés durant la préparation des liposomes pour maximiser la déstabilisation à pH acide et cette technique d'incorporation peut s'avérer inappropriée selon les technologies liposomales impliquées. En effet, les méthodes d'encapsulation des médicaments par gradient de pH ou de sulfate d'ammonium, ou l'hydratation de lipides de température de transition élevée peuvent engendrer la précipitation du polymère. De plus, des problèmes d'incompatibilité peuvent aussi survenir, comme dans le cas de l'ara-C, où une précipitation du médicament a parfois été observée en présence de polymère.

Par ailleurs, il est à noter que les complexes liposome/P(NIPAM<sub>90-co</sub>-ODA<sub>4-co</sub>-MAA<sub>2-co</sub>-VP<sub>4</sub>) sont ceux qui ont démontré la plus faible sensibilité au pH parmi toutes les formulations et ce, quelle que soit la technique d'incorporation du polymère utilisée. Ainsi, l'utilisation d'un copolymère qui possède un pH de transition légèrement plus élevé (pH 6,3), obtenu par l'ajout d'une proportion plus faible de MAA, ne semble pas favoriser une libération plus importante du contenu liposomal à pH acide.

### 8.1.3. Effet de l'incorporation de PEG-PE dans la formulation

Dans l'optique de produire des liposomes sensibles au pH démontrant un temps de circulation prolongé, de la PEG-PE a été ajoutée aux formulations. Lors des premiers essais de la PEG(2000)-PE a été utilisée, ce dérivé lipidique du PEG entrant dans la formulation du Doxil<sup>®</sup>. Une expérience similaire avait été conduite par Zignani *et al.* (2000) où un P(NIPAM<sub>93-co</sub>-MAA<sub>5-co</sub>-ODA<sub>2</sub>) avait été ajouté à une formulation de liposomes de EPC/Chol/ PEG(2000)-PE (3:2:0,3 ratio molaire). La présence de PEG-PE dans la formulation avait alors affecté la sensibilité au pH des liposomes, le pourcentage du contenu liposomal libéré à pH 4,9 étant passé de 82% en l'absence de PEG-PE à 40%. Lors de notre étude, l'ajout de 6 mol% de PEG-PE a aussi diminué de façon importante la

sensibilité au pH des complexes liposome/P(NIPAM<sub>90-co</sub>-ODA<sub>4-co</sub>-MAA<sub>4-co</sub>-VP<sub>2</sub>). En effet, la libération du contenu liposomal à pH 4,9 s'est vue réduite de 83% à aussi peu que 11%. Par ailleurs, un effet moins drastique a été observé avec l'ajout de 3 mol% de PEG-PE, où une libération de 55% du contenu liposomal a été obtenue à pH 4,9 (Chapitre 4, figures 7 et 8). Cette baisse de sensibilité au pH ne serait pas expliquée par une augmentation du pH de transition de phase du polymère, comme nous l'avons démontré par FTIR. Il est possible que le PEG-PE réduise la quantité de copolymère qui se lie à la membrane liposomale car il peut créer, d'une part, une répulsion électrostatique due à sa charge négative et, d'autre part, une répulsion stérique (Zignani *et al.*, 2000). Il a aussi été démontré que les dérivés lipidiques du PEG pouvaient prévenir l'agrégation et la déshydratation des membranes, réduisant ainsi la fusion et la libération du contenu à pH acide de liposomes à base de DOPE (Slepushkin *et al.*, 1997; Straubinger *et al.*, 1983). Bien que les liposomes sensibles au pH à base de copolymères de NIPAM ne fusionnent pas à pH acide (Zignani *et al.*, 2000), il est possible que le PEG ait un effet stabilisant sur les bicouches de lipides.

Les dérivés du PEG sont connus pour ralentir l'opsonisation des liposomes qu'ils recouvrent en créant une zone d'encombrement stérique autour de la surface lipidique (Torchilin *et al.*, 1994). Comme la diminution de la sensibilité au pH de nos formulations après incubation dans le sérum peut être reliée à l'interaction des liposomes avec les composantes sériques, une réduction de ce phénomène en présence de PEG était attendue. Or, une perte de sensibilité au pH similaire a aussi été observée lorsque 3 ou 6 mol% de PEG(2000)-PE étaient ajoutées aux complexes liposome/P(NIPAM<sub>90-co</sub>-ODA<sub>4-co</sub>-MAA<sub>4-co</sub>-VP<sub>2</sub>) (Chapitre 4, Figure 8). Comme il a déjà été démontré que même en présence de PEG les protéines pouvaient s'adsorber à la surface des liposomes (Harvie *et al.*, 1996), ces résultats pourraient s'expliquer par la présence d'interactions entre les protéines sériques et le copolymère que le PEG n'inhibe pas complètement.

L'impact négatif du PEG sur les propriétés de libération a pu être limité par l'utilisation d'un polymère alkylé en bout de chaîne (DODA-P(NIPAM<sub>95</sub>-*co*-ODA<sub>5</sub>);  $M_w = 14\ 700$ ). Dans ce cas, l'ajout de 6 mol% de PEG(2000)-PE à la formulation lui a même conféré une sensibilité au pH légèrement plus importante qu'en absence de PEG(2000)-PE, avec 97% du contenu en HPTS libéré en 8 min à pH 4,9 (vs 84% sans PEG(2000)-PE) (Chapitre 6, Figure 1). D'autre part, l'ajout de 6% PEG(5000)-PE n'a pas modifié la sensibilité au pH de la formulation de façon significative. Après incubation dans le sérum, toutes les formulations (avec ou sans PEG-PE) ont libéré approximativement la même fraction de leur contenu à pH 4,9. Les libérations à pH 5,8 démontrent que les formulations sans PEG-PE et contenant du PEG(2000)-PE ont tout de même subi une perte de sensibilité au pH, avec une diminution de l'HPTS libéré de 23 et 27%, respectivement. Par ailleurs, l'addition de PEG(5000)-PE a permis une conservation totale de la sensibilité au pH de la formulation, tant à pH 4,9 qu'à 5,8 (Chapitre 6, Figure 1).

Ainsi, si l'on compare les résultats obtenus avec les 2 types de polymères, il apparaît que l'utilisation d'une ancre hydrophobe unique située en bout de chaîne, plutôt que plusieurs ancres distribuées sur la chaîne, permette une incorporation d'une proportion plus élevée de polymère dans la formulation en présence de PEG-PE. D'autre part, la protection de la sensibilité au pH que procure le PEG(5000)-PE lors de l'incubation dans le sérum suggère que, en présence de polymère, le segment de PEG doit être suffisamment long pour modifier les propriétés de surface du liposome et ainsi créer une barrière stérique efficace.

## **8.2. Caractérisation physico-chimique de la LCST des copolymères de NIPAM**

Le changement de conformation d'un copolymère de NIPAM [P(NIPAM<sub>90</sub>-*co*-ODA<sub>4</sub>-*co*-MAA<sub>4</sub>-*co*-VP<sub>2</sub>)] a été étudié par turbidimétrie, DSC et spectroscopies FTIR et

RMN afin d'acquérir des informations nous permettant de concevoir une formulation sensible au pH qui puisse être cliniquement viable.

Lors d'une étude précédente (Zignani *et al.*, 2000), il avait été démontré que les liposomes complexés à des copolymères de NIPAM libéraient leur contenu à un pH correspondant à leur pH de transition, lui-même déterminé par turbidimétrie. Lorsque le pH est abaissé, la protonation du MAA diminue la solubilité du polymère, ce qui réduit la LCST. Ceci est suivi d'une agrégation des chaînes individuelles, un phénomène qui se détecte optiquement (Heskins & Guillet, 1968). Dans le cas du P(NIPAM<sub>90-co</sub>-ODA<sub>4-co</sub>-MAA<sub>4-co</sub>-VP<sub>2</sub>), à 37 °C, une précipitation du polymère est observable à un pH inférieur à 6,0 alors qu'il reste en solution à pH neutre (Chapitre 4, Figure 1). Par ailleurs, les études calorimétriques ont montré qu'à un pH de 7,4, le maximum du pic endothermique de la transition de phase du copolymère est à 35 °C. L'endotherme est toutefois très large (de 23 à 68 °C), ce qui peut expliquer pourquoi la transition n'est pas détectée par diffusion de la lumière à pH 7,4 et 37 °C (Chapitre 4, Figure 2 et Tableau 1). Une valeur de LCST semblable a été obtenue par spectroscopie FTIR (40 °C) (Chapitre 4, Figure 4). Ces résultats révèlent donc qu'à pH neutre, le polymère n'est pas sous sa forme de pelote statistique et ne peut probablement pas procurer une stabilisation stérique optimale, tel qu'il le sera décrit dans la section sur la pharmacocinétique.

L'étude des spectres IR d'une solution du copolymère à pH 7,4 montre que, même au-dessus de la LCST, les ponts hydrogènes entre les groupements amide du polymère et l'eau sont prédominants comparés aux ponts hydrogène intramoléculaires. D'autre part, le degré de déshydratation du polymère à 37 °C devient plus important lorsque le pH est abaissé. De façon similaire à ce qui avait été observé par DSC, la spectroscopie FTIR révèle qu'à pH 7,4, la transition s'étend sur une large plage de température, signe de sa faible coopérativité. La faible coopérativité de la transition et le niveau important d'hydratation du polymère à pH neutre peuvent expliquer pourquoi il ne déstabilise pas les liposomes à 37 °C. Par ailleurs, les études de spectroscopie FTIR ont aussi révélé que la



complexation des liposomes avec le polymère n'avait pas d'influence marquée sur sa LCST (Chapitre 4, Figure 4).

L'effet du changement de conformation du polymère sur les membranes de phospholipides a été étudié par RMN du  $^2\text{H}$  d'un mélange de POPC- $d_{31}$ /Chol (3:2) à pH 6,0. Les spectres de la POPC- $d_{31}$  ont été acquis en fonction de la température. En présence de polymère, un élargissement des pics associés avec chacun des groupements  $\text{CD}_2$  disposés le long de la chaîne de la POPC- $d_{31}$  a été observé, menant à une perte de résolution du signal. Cet élargissement des pics n'est pas significatif entre 18 et 50°C mais devient prononcé entre 55 et 65 °C. La RMN du  $^2\text{H}$  est sensible aux plans de courbure menant à la moyenne des interactions quadrupolaires dans son échelle de temps (Fenske & Cullis, 1993). Ces résultats suggèrent donc qu'à haute température, lorsque le polymère devient insoluble, son interaction avec la membrane puisse introduire une courbure locale dans le plan de la bicouche. Toutefois, il est possible que le plan de courbure augmente progressivement durant la transition mais ne puisse être détecté avant 55 – 65°C avec cette technique. Par ailleurs, la largeur du patron de la bicouche étant similaire en présence ou en l'absence de polymère, il semble que sa présence dans le mélange lipidique n'affecte pas l'ordre des chaînes acyles. L'effet du polymère sur les bicouches de lipides ne serait donc pas à un niveau moléculaire mais perturberait plutôt les liposomes à un niveau supramoléculaire. Ainsi, des défauts structuraux associés à l'introduction locale de plans de lipides hautement courbés seraient responsables de la libération du contenu liposomal induite par la précipitation du polymère.

### 8.3. Libération cytoplasmique de l'ara-C

L'efficacité d'une des formulations [EPC/Chol/P(NIPAM $_{90-co}$ -ODA $_{4-co}$ -MAA $_{2-co}$ -VP $_4$ )] *in vitro* a été évaluée sur des cellules de type macrophage (J774) en utilisant l'ara-C comme modèle de médicament anticancéreux. Une toxicité plus importante de l'ara-C a été observée lorsqu'il était chargé dans les liposomes sensibles au pH plutôt que dans une

formulation contrôle (Chapitre 3, Figure 6). Par ailleurs, il est à noter que la formulation choisie pour réaliser cette expérience n'était pas optimale, ce qui peut expliquer la faible augmentation de toxicité observée. Parmi tous les polymères synthétisés par la suite, il est celui qui procure la plus faible sensibilité au pH aux liposomes de EPC/Chol. De plus, son incompatibilité avec l'ara-C nous a contraint à l'incorporer dans la formulation après formation des liposomes, ce qui diminue l'ampleur de la déstabilisation liposomale à pH acide (Chapitre 3, Figure 5). Il est à noter que le dernier polymère développé [DODA-P(NIPAM<sub>95-co</sub>-MAA<sub>5</sub>);  $M_w = 14\ 700$ ], bien qu'il n'ait pas été encore testé sur un modèle cellulaire *in vitro*, présente l'avantage de ne pas provoquer la précipitation de l'ara-C.

#### 8.4. Pharmacocinétiques

Des études pharmacocinétiques ont été conduites afin d'évaluer le temps de circulation de différentes formulations sensibles au pH. Nous avons montré que la présence de 2 copolymères de NIPAM, soit le DODA-P(NIPAM<sub>95-co</sub>-MAA<sub>5</sub>) ( $M_w = 8\ 200$ ) et le P(NIPAM<sub>90-co</sub>-ODA<sub>4-co</sub>-MAA<sub>4-co</sub>-VP<sub>2</sub>) ( $M_w = 22\ 600$ ), pouvait augmenter le temps de circulation systémique des liposomes d'EPC/Chol après injection par voie i.v. En effet, ces deux copolymères ont augmenté l'aire sous la courbe concentration-temps ( $AUC_\infty$ ) des liposomes respectivement de 50% et de 80%. Même si cet effet « furtif » demeure faible en comparaison de celui que procure normalement le PEG, il démontre la capacité des PNIPAM à stabiliser les liposomes de façon stérique. Ces observations corroborent indirectement les résultats d'une étude précédente où il avait été démontré qu'un PNIPAM alkylé en position terminale, à une température inférieure à la LCST, pouvait réduire l'adsorption de protéines plasmatiques sur des vésicules de DMPC (Yamazaki *et al.*, 1999). En effet, une diminution de l'adsorption protéique à la surface de colloïdes, telle que procurée par le PEG, a déjà été mise en corrélation avec une augmentation du temps de circulation observé *in vivo* (Chonn & Cullis, 1992). Nous avons aussi montré, en utilisant un SFA, que le DODA-P(NIPAM<sub>95-co</sub>-MAA<sub>5</sub>) ( $M_w = 29\ 000$ ) procurait une barrière stérique à la surface liposomale lorsqu'il était en pelote statistique (pH 7,0; T = 22 °C).

D'autre part, cette barrière est considérablement réduite lorsque le pH est abaissé. L'effet de la conformation du polymère sur ses propriétés stériques a déjà été investigué. Ainsi, il a déjà été montré que des liposomes recouverts d'un poly(*N*-acryloylpyrrolidine-*co*-NIPAM) interagissaient moins avec des cellules à des températures inférieures à la LCST du polymère alors que leur capture par les cellules était plus importante au-dessus de la LCST (Kono *et al.*, 1999a). De façon similaire, les plaquettes sanguines adhèrent aux surfaces de polystyrène recouvertes de PNIPAM lorsqu'il est en globule, alors que l'adhésion plaquettaire est inhibée sous la LCST, de la même manière que peut le faire le PEG (Uchida *et al.*, 2000).

Afin de palier à la faible augmentation du temps de circulation conférée par les copolymères de NIPAM, de la PEG-PE a été ajoutée à certaines formulations. L'ajout de 3 ou de 6 mol% PEG(2000)-PE aux complexes liposome/P(NIPAM<sub>90-*co*</sub>-ODA<sub>4-*co*</sub>-MAA<sub>4-*co*</sub>-VP<sub>2</sub>) a permis de prolonger efficacement leur temps de circulation (Chapitre 4, Figure 9) mais, tel que décrit précédemment, une perte importante de la sensibilité au pH a été observée. L'ajout de 6 mol% PEG(2000)-PE aux liposomes EPC/Chol/DODA-P(NIPAM<sub>95-*co*</sub>-MAA<sub>5</sub>) ( $M_w = 14\ 700$ ) n'a pas réduit leur sensibilité au pH, mais son effet sur le temps de circulation des liposomes s'est montré beaucoup plus modeste. Toutefois, le PEG(5000)-PE a permis d'obtenir une  $AUC_\infty$  5 fois plus grande que celle des liposomes contrôle. Cette dernière étude pharmacocinétique confirme les résultats de stabilité en présence de sérum. En effet, le copolymère de NIPAM formant aussi une brosse autour du liposome, le segment de PEG se doit d'être suffisamment long pour exercer sa protection stérique. Ainsi, parmi les formulations mises au point, les complexes EPC/Chol/PEG(5000)-PE/DODA-P(NIPAM<sub>95-*co*</sub>-MAA<sub>5</sub>) ( $M_w = 14\ 700$ ), sont les plus performants quant à leur sensibilité au pH, leur stabilité dans le sérum et leur temps de circulation.

## **CHAPITRE 9**

## **CONCLUSION**

## Conclusion

Il y a plus de 20 ans que les liposomes sensibles au pH ont été proposés afin d'augmenter la biodisponibilité intracytoplasmique de médicaments. Malgré l'obtention de certains résultats prometteurs, cette approche n'a toutefois connu qu'un succès limité. Pour être efficace, un tel système devrait démontrer un certain nombre de qualités essentielles, telles qu'une bonne stabilité dans le sérum et un temps de circulation prolongé *in vivo*. De plus, le système doit interagir favorablement avec les cellules cibles de façon à être internalisé et doit libérer rapidement son contenu en réponse à la baisse de pH rencontrée dans les compartiments endosomaux/lysosomaux. En dernier lieu, le médicament libéré des vésicules doit diffuser de ces compartiments vers le cytoplasme. À ce jour, aucune formulation ne regroupe toutes ses qualités. En raison de la grande versatilité des complexes liposome/polymère sensibles au pH, nous avons tenté de mettre au point une telle formulation. Ainsi, au cours des différentes expériences, il a été démontré que :

- Il est possible de rendre des liposomes de différentes compositions lipidiques sensibles au pH par leur complexation avec des copolymères de NIPAM/MAA modifiés avec une ou plusieurs ancras hydrophobes.
- L'ampleur de la déstabilisation des liposomes à pH acide dépend de la composition des vésicules, de celle du polymère et du mode d'incorporation de ce dernier dans les vésicules. Une libération maximale du contenu liposomal à pH acide peut être obtenue par l'emploi d'une formulation d'EPC/Chol à laquelle est ajoutée, durant la préparation des liposomes, le DODA-P(NIPAM<sub>95</sub>-*co*-MAA<sub>5</sub>) ( $M_w = 14\ 700$ ). L'ajout de PEG(5000)-PE assure une plus grande stabilité en présence de sérum.
- Les copolymères de NIPAM peuvent faciliter la libération cytoplasmique du contenu liposomal. Cette propriété a permis d'augmenter la cytotoxicité de l'ara-C chez un modèle cellulaire *in vitro*.

- Les copolymères de NIPAM peuvent offrir une barrière stérique à la surface des liposomes qui permet de prolonger leur temps de circulation, bien que cet effet demeure modeste. L'ajout de PEG peut procurer un temps de circulation prolongé bien qu'il puisse, dans certains cas, compromettre la sensibilité au pH de la formulation.

Les différentes formulations caractérisées d'un point de vue physico-chimique et testées pour leurs comportements tant *in vitro* qu'*in vivo* ont mené à la mise au point d'une formulation réunissant un grand nombre des caractéristiques recherchées. En effet, les complexes EPC/Chol/PEG(5000)-PE/DODA-P(NIPAM<sub>95-co</sub>-MAA<sub>5</sub>) ( $M_w = 14\ 700$ ) libèrent efficacement leur contenu à pH acide, sont stables et conservent leur sensibilité au pH après incubation dans le sérum. Ils présentent un temps de circulation prolongé après administration par la voie. i.v.

L'étape suivante consiste à ajouter un ligand qui permettra leur ciblage actif et leur internalisation par une population cellulaire donnée. Un anticorps anti-CD33 a été choisi afin de poursuivre ces travaux. Le CD33 est exprimé sur la surface cellulaire de plus de 80% des cellules leucémiques isolées de patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (LMA). Bien qu'il soit exprimé sur les cellules myéloïdes normales, il n'est pas exprimé sur les cellules souches immatures pluripotentes (Griffin *et al.*, 1984). Cette cible offre l'avantage d'être principalement située dans le compartiment vasculaire, ce qui la rend plus accessible aux immunoliposomes. De plus, l'anti-CD33 est internalisé suite à sa liaison à l'antigène (Scheinberg *et al.*, 1991), ce qui est nécessaire à l'exploitation des caractéristiques de notre système. Enfin, la thérapie standard d'induction d'une rémission de la LMA consiste à traiter avec une anthracycline donnée en combinaison avec l'ara-C. Le taux de réponse à ce traitement est particulièrement faible chez les patients âgés notamment en raison de l'importante mortalité associée au traitement (Menzin *et al.*, 2002; Stone, 2002). Tel que nous l'avons démontré, l'efficacité thérapeutique de l'ara-C pourrait

être augmentée par encapsulation dans des immunoliposomes sensibles au pH. Ainsi, ce modèle tumoral est tout indiqué pour établir la preuve de concept de notre système.

## Bibliographie

- Agrewala, J.N., Owais, M., Gupta, C.M. & Mishra, G.C. (1996). Antigen incorporation into liposomes results in the enhancement of IL-4 and IgG1 secretion: evidence for preferential expansion of Th-2 cells. *Cytokines Mol. Ther.*, **2**, 59-65.
- Ahmad, I., Longenecker, M., Samuel, J. & Allen, T.M. (1993). Antibody-targeted delivery of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung cancer in mice. *Cancer Res.*, **53**, 1484-1488.
- Allen, T.M. (1981). A study of phospholipid interactions between high-density lipoproteins and small unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 385-397.
- Allen, T.M. (1994). The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **13**, 285-309.
- Allen, T.M. (1997). Liposome targeting in animal models: problems and opportunities. *J. Liposome Res.*, **7**, 315-329.
- Allen, T.M. (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 750-763.
- Allen, T.M., Austin, G.A., Chonn, A., Lin, L. & Lee, K.C. (1991). Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposomes composition and size. *Biochim. Biophys. Acta*, **1061**, 56-64.
- Allen, T.M., Brandeis, E., Hansen, C.B., Kao, G.Y. & Zalipsky, S. (1995). A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1237**, 99-108.
- Allen, T.M. & Chonn, A. (1987). Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.*, **223**, 42-46.
- Allen, T.M., Hong, K. & Papahadjopoulos, D. (1990). Membrane contact, fusion, and hexagonal ( $H_{II}$ ) transitions in phosphatidylethanolamine liposomes. *Biochemistry*, **29**, 2976-2985.



- Allen, T.M., Romans, A.Y., Kercret, H. & Segrest, J.P. (1980). Detergent removal during membrane reconstitution. *Biochim. Biophys. Acta*, **601**, 328-342.
- Anderson, V.C. & Thompson, D.H. (1992). Triggered release of hydrophilic agents from plasmalogen liposomes using visible light or acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **1109**, 33-42.
- Ansell, S.M., Tardi, P.G. & Buchkowsky, S.S. (1996). 3-(2-pyridyldithio)propionic acid hydrazide as a cross-linker in the formation of liposome-antibody conjugates. *Bioconjugate chem.*, **7**, 490-496.
- Bailey, A.L., Monck, M.A. & Cullis, P.R. (1997). pH-Induced destabilization of lipid bilayers by a lipopeptide derived from influenza hemagglutinin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1324**, 232-244.
- Bangham, A.D., Standish, M.M. & Watkins, J.C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-252.
- Barbet, J., Machy, P. & Leserman, L.D. (1981). Monoclonal antibody covalently coupled to liposomes: specific targeting to cells. *J. Supramol. Struct. Cell Biochem.*, **16**, 243-258.
- Barry, J.A., Lamparski, H., Shyamsunder, E., Osterberg, F., Cerne, J., Brown, M.F. & O'Brien, D.F. (1992). <sup>31</sup>P NMR and X-ray diffraction study of the effect of photopolymerization on lipid polymorphism. *Biochemistry*, **31**, 10114-10120.
- Bennett, D.E. & O'Brien, D.F. (1995). Photoactivated enhancement of liposome fusion. *Biochemistry*, **34**, 3102-3113.
- Benoit J.P. (1985) In *Drug Targeting*, Proceedings of the Symposium on Drug Targeting, Buri P. & Gumma A., (eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp.95-117.
- Benoit, J.P., Couvreur, P., Devissaguet, J.P., Fessi, H., Puisieux, F. & Roblot-Treupel, L. (1986). Les formes vectorisées ou à distribution modulée, nouveaux systèmes d'administration des médicaments. *J. Pharm. Belg.*, **41**, 319-329.
- Bisby, R.H., Mead, C., Mitchell, A.C. & Morgan, C.G. (1999a). Fast laser-induced solute release from liposomes sensitized with photochromic lipid: effects of temperature, lipid host, and sensitizer concentration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **262**, 406-410.

- Bisby, R.H., Mead, C. & Morgan, C.G. (1999b). Photosensitive liposomes as 'cages' for laser-triggered solute delivery: the effect of bilayer cholesterol on kinetics of solute release. *FEBS Lett.*, **463**, 165-168.
- Bisby, R.H., Mead, C. & Morgan, C.G. (2000a). Active uptake of drugs into photosensitive liposomes and rapid release on UV photolysis. *Photochem. Photobiol.*, **72**, 57-61.
- Bisby, R.H., Mead, C. & Morgan, C.G. (2000b). Wavelength-programmed solute release from photosensitive liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**, 169-173.
- Blok, M.C., van der Neut-Kok, E.C., van Deenen, L.L. & de Gier, J. (1975). The effect of chain length and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **406**, 187-196.
- Blume, G. & Cevc, G. (1993). Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, **1146**, 157-168.
- Boggs, J.M. (1987). Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochim. Biophys. Acta*, **906**, 353-404.
- Boggs, J.M., Rangaraj, G. & Koshy, K.M. (1986). Effect of hydrogen-bonding and non-hydrogen-bonding long chain compounds on the phase transition temperatures of phospholipids. *Chem. Phys. Lip.*, **40**, 23-34.
- Bondurant, B., Mueller, A. & O'Brien, D.F. (2001). Photoinitiated destabilization of sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1511**, 113-122.
- Borden, K.A., Eum, K.M., Langley, K.H. & Tirrell, D.A. (1987). On the mechanism of polyelectrolyte-induced structural reorganization in thin molecular films. *Macromolecules*, **20**, 454-456.
- Boucher, Y. & Jain, R.K. (1992). Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse. *Cancer Res.*, **52**, 5110-5114.
- Brigger, I., Dubernet, C. & Couvreur P. (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 631-651.
- Brown, P.M. & Silvius, J.R. (1990). Mechanisms of delivery of liposome-encapsulated cytosine arabinoside to CV-1 cells in vitro. Fluorescence-microscopic and cytotoxicity studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**, 341-35.

- Chang, J.S., Choi, M.J., Cheong, H.S. & Kim, K. (2001). Development of Th1-mediated CD8<sup>+</sup> effector T cells by vaccination with epitope peptides encapsulated in pH-sensitive liposomes. *Vaccine*, **19**, 3608-3614.
- Chang, J.S., Choi, M.J., Kim, T.Y., Cho, S.Y. & Cheong, H.S. (1999). Immunogenicity of synthetic HIV-1 V3 loop peptides by MPL adjuvanted pH-sensitive liposomes. *Vaccine*, **17**, 1540-1548.
- Chen, G. & Hoffman, A.S. (1995). A new temperature- and pH-responsive copolymer for possible use in protein conjugation. *Macromol. Chem. Phys.*, **196**, 1251-1259.
- Chen, T., Choi, L.S., Einstein, S., Klippenstein, M.A., Scherrer, P. & Cullis, P.R. (1999). Proton-induced permeability and fusion of large unilamellar vesicles by covalently conjugated poly(2-ethylacrylic acid). *J. Liposome Res.*, **9**, 387-405.
- Cheung, C.Y., Murthy, N., Stayton, P.S. & Hoffman, A.S. (2001). A pH-sensitive polymer that enhances cationic lipid-mediated gene transfer. *Bioconjugate Chem.*, **12**, 906-910.
- Chonn, A. & Cullis, P.R. (1992). Ganglioside GM1 and hydrophilic polymers increase liposome circulation times by inhibiting the association of blood proteins. *J. Liposome Res.*, **2**, 397-410.
- Chu, C.J., Dijkstra, J., Lai, M.Z., Hong, M.Z. & Szoka, F.C. (1990). Efficiency of cytoplasmic delivery by pH-sensitive liposomes to cells in culture. *Pharm. Res.*, **7**, 824-834.
- Chua, M.M., Fan, S.T. & Karush, F. (1984). Attachment of immunoglobulin to liposomal membrane via protein carbohydrate. *Biochim. Biophys. Acta*, **800**, 291-300.
- Chung, J.C., Gross, D.J., Thomas, J.L., Tirrell, D.A. & Opsahl-Ong, L. (1996). pH-sensitive, cation-selective channels formed by simple synthetic polyelectrolyte in artificial bilayer membranes. *Macromolecules*, **29**, 4636-4641.
- Clague, M.J., Knutson, J.R., Blumenthal, R. & Herrmann, A. (1991). Interaction of influenza hemagglutinin amino-terminal peptide with phospholipid vesicles: a fluorescence study. *Biochemistry*, **30**, 5491-5497.
- Collins, D., Connor, J., Ting-Beall, H.P. & Huang, L. (1990a). Proton and divalent cations induce synergistic but mechanistically different destabilizations of pH-sensitive

liposomes composed of dioleoyl phosphatidylethanolamine and oleic acid.

*Chem. Phys. Lipids*, **55**, 339-349.

- Collins, D. & Huang, L. (1987). Cytotoxicity of diphtheria toxin A fragment to toxin-resistant murine cells delivered by pH-sensitive immunoliposomes. *Cancer Res.*, **47**, 735-739.
- Collins, D., Litzinger, D.C. & Huang, L. (1990b). Structural and functional comparisons of pH-sensitive liposomes composed of phosphatidylethanolamine and three different diacylsuccinylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta*, **1025**, 234-242.
- Collins, D., Maxfield, F. & Huang, L. (1989). Immunoliposomes with different acid sensitivities as probes for the cellular endocytic pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, **987**, 47-55.
- Connor, J. & Huang, L. (1985). The effect of pH and divalent cations on the phase behavior of liposomes composed of phosphatidylethanolamine and fatty acid. *Biophys. J.*, **47**, 428a.
- Connor, J. & Huang, L. (1986). pH-sensitive immunoliposomes as an efficient and target-specific carrier for antitumor drugs. *Cancer Res.*, **46**, 3431-3435.
- Connor, J., Norley, N. & Huang, L. (1986). Biodistribution of pH-sensitive immunoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **884**, 474-481.
- Connor, J., Sullivan, S. & Huang, L. (1985). Monoclonal antibody and liposomes. *Pharmacol. Ther.*, **28**, 341-365.
- Connor, J., Yatvin, M.B. & Huang, L. (1984). pH-sensitive liposomes: acid-induced liposome fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1715-1718.
- Cornali, E., Zietz, C., Benelli, R., Weninger, W., Masiello, L., Breier, G., Tschachler, E., Albini, A. & Sturzl, M. (1996). Vascular endothelial growth factor regulates angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma. *Am. J. Pathol.*, **149**, 1851-1869.
- Cullis, P.R. & de Kruijff, B. (1978). The polymorphic phase behaviour of phosphatidylethanolamines of natural and synthetic origin. A <sup>31</sup>P NMR study. *Biochim Biophys Acta*, **513**, 31-42.

- Damen, J., Dijkstra, J., Regts, J. & Scherphof, G. (1980). Effect of lipoprotein-free plasma on the interaction of human plasma high density lipoprotein with egg yolk phosphatidylcholine liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **620**, 90-99.
- De Gier, J., Mandersloot, J.G., Hupkes, J.V., McElhaney, R.N. & Van Beek, W.P. (1970). On the mechanism of non-electrolyte permeation through lipid bilayers and through biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 610-618.
- de Kruif, J., Storm, G., van Bloois, L. & Logtenberg, T. (1996) Biosynthetically lipid-modified human scFv fragments from phage display libraries as targeting molecules for immunoliposomes. *FEBS Lett.*, **399**, 232-236.
- Deber, C.M. & Li, S.C. (1995). Peptides in membranes - Helicity and hydrophobicity. *Biopolymers*, **37**, 295-318.
- Derksen, J.T., Morselt, H.W. & Scherphof, G.L. (1987). Processing of different liposome markers after in vitro uptake of immunoglobulin-coated liposomes by rat liver macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, **931**, 33-40.
- Dong, L.C. & Hoffman, A.S. (1991). A novel approach for preparation of pH-sensitive hydrogels for enteric drug delivery. *J. Controlled Release*, **15**, 141-152.
- Drummond, D.C. (1997). Novel "caged" liposomes composed of reversibly modified pH- and photo-sensitive aminophospholipids. *Ph.D. thesis, Indiana University*.
- Drummond, D.C. & Daleke, D.L. (1997). Development of pH-sensitive liposomes composed of a novel "caged" dioleoylphosphatidylethanolamine. *Biophys. J.*, **72**, A13.
- Drummond, D.C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D. & Papahadjopoulos, D. (1999). Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.*, **51**, 691-743.
- Drummond, D.C., Zignani, M. & Leroux, J.-C. (2000). Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog. Lipid Res.*, **39**, 409-460.
- Duncan, R. (1999) Polymer conjugates for tumour targeting and intracytoplasmic delivery. The EPR effect as a common gateway? *PSTT*, **2**, 441-449.

- Düzgünes, N., Straubinger, R.M., Baldwin, P.A., Friend, D.S. & Papahadjopoulos, D. (1985). Proton-induced fusion of oleic acid-phosphatidylethanolamine liposomes. *Biochemistry*, **24**, 3091-3098.
- Efremova, N.V., Bondurant, B., O'Brien, D.F. & Leckband, D.E. (2000). Measurements of interbilayer forces and protein adsorption on uncharged lipid bilayers displaying poly(ethylene glycol) chains. *Biochemistry*, **39**, 3441-3451.
- Ellens, H., Bentz, J. & Szoka, F.C. (1984). pH-induced destabilization of phosphatidylethanolamine-containing liposomes: role of bilayer contact. *Biochemistry*, **23**, 1532-1538.
- Ellens, H., Bentz, J. & Szoka, F.C. (1985).  $H^+$  and  $Ca^{2+}$ -induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochemistry*, **24**, 3099-3106.
- Endoh, H., Suzuki, Y. & Hashimoto, Y. (1981). Antibody coating of liposomes with 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimide and the effect on target specificity. *J. Immunol. Methods*, **44**, 79-85.
- Epanand, R.M., Shai, Y.C., Segrest, J.P. & Anantharamaiah, G.M. (1995). mechanisms for the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides. *Biopolymers*, **37**, 319-338.
- Félix, M.M., Umakoshi, H., Shimanouchi, T., Yoshimoto, M. & Kuboi, R. (2002). Characterization and control of stimuli-induced membrane fusion of liposomes in the presence of proteins and stimuli responsive polymers. *Biochem Eng J*, **12**, 7-19.
- Fenske, D.B. & Cullis, P.R. (1993). Acyl chain orientational order in large unilamellar vesicles: comparison with multilamellar liposomes: a  $^2H$  and  $^{31}P$  nuclear magnetic resonance study. *Biophys. J.*, **64**, 1482-1491.
- Fidler, I.J., Barnes, Z., Fogler, W.E., Kirsh, R., Bugelski, P. & Poste, G. (1982). Involvement of macrophages in the eradication of established metastases following intravenous injection of liposomes containing macrophage activators. *Cancer Res.*, **42**, 496-501.
- Francis, M.F., Dhara, G., Winnik, F.M. & Leroux, J.-C. (2001). In vitro evaluation of pH-sensitive polymer/niosome complexes. *Biomacromolecules*, **2**, 741-749.

- Freise, J., Muller, W.H., Brotsch, C. & Schmidt, F.W. (1980). "In vivo" distribution of liposomes between parenchymal and non parenchymal cells in rat liver. *Biomedicine*, **32**, 118-1123.
- Gaber, M.H. (1998). Effect of bovine serum on the phase transition temperature of cholesterol-containing liposomes. *J. Microencapsul.*, **15**, 207-214.
- Gaber, M.H., Hong, K., Huang, S.K. & Papahadjopoulos, D. (1995). Thermosensitive sterically stabilized liposomes: formulation and *in vitro* studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma. *Pharm. Res.*, **12**, 1407-1416.
- Gabizon, A., Price, D.C., Huberty, J., Bresalier, R.S. & Papahadjopoulos, D. (1990). Effect of liposome composition and other factors on the targeting of liposomes to experimental tumors: biodistribution and imaging studies. *cancer Res.*, **50**, 6371-6378.
- Geisert, E.E., Del Mar, N.A., Owens, J.L. & Holmberg, E.G. (1995). Transfecting neurons and glia in the rat using pH-sensitive immunoliposomes. *Neurosci. Lett.*, **184**, 40-43.
- Gerasimov, O.V., Schwan, A. & Thompson, D.H. (1997). Acid-catalyzed plasmemylcholine hydrolysis and its effect on bilayer permeability: a quantitative study. *Biochim. Biophys. Acta*, **1324**, 200-214.
- Gerasimov, O.V., Wymer, N., Miller, D., Rui, Y. & Thompson, D.H. (1999). Intracellular delivery of liposomal contents using pH- and light-activated plasmemyl-type liposomes. In *Intelligent materials for controlled release*, Dinh, S.M., De Nuzzio, J.D. & Comfort, A.R. (eds). ACS symposium series. American Chemical Society: Washington.
- Godbey, W.T., Wu, K.K. & Mikos, A.G. (1999). Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J. Controlled Release*, **60**, 149-160.
- Goren, D., Horowitz, A.T., Zalipsky, S., Woodle, M.C., Yarden, Y. & Gabizon, A. (1996). Targeting of stealth liposomes to erbB-2 (Her/2) receptor: in vitro and in vivo studies. *Br. J. Cancer*, **74**, 1749-1756.

- Gottschalk, S., Sparrow, J.T., Hauer, J., Mims, M.P., Leland, F.E., Woo, S.L. & Smith, L.C. (1996). A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther.*, **3**, 48-57.
- Gray, A.G., Morgan, J., Linch, D.C. & Huehns, E.R. (1988). Uptake of antibody directed cytotoxic liposomes by CD3 on human T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, **72**, 168-173.
- Greenberg, J.P., Packham, M.A., Guccione, M.A., Rand, M.L., Reimers, H.J. & Mustard J.F. (1979) Survival of rabbit platelets treated in vitro with chymotrypsin, plasmin, trypsin, or neuraminidase. *Blood*, **53**, 916-927.
- Gregoriadis, G. (1976) The carrier potential of liposomes in biology and medicine. *New Engl. J. Med.*, **295**, 704-710 et 765-770.
- Gregoriadis, G. & Ryman, B.E. (1972a). Fate of protein-containing liposomes injected into rats. An approach to the treatment of storage diseases. *Eur. J. Biochem.*, **24**, 485-491.
- Gregoriadis, G. & Ryman, B.E. (1972b). Lysosomal localization of fructofuranosidase-containing liposomes injected into rats. *Biochem. J.*, **129**, 123-133.
- Griffin, J.D., Linch, D., Sabbath, K., Larcom, P. & Schlossman, S.F. (1984). A monoclonal antibody reactive with normal and leukemic human myeloid progenitor cells. *Leuk. Res.*, **8**, 521-534.
- Gruner, S.M., Cullis, P.R., Hope, M.J. & Tilcock, C.P. (1985). Lipid polymorphism: the molecular basis of nonbilayer phases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **14**, 211-238.
- Guo, X. & Szoka Jr., F.C. (2001). Steric stabilization of fusogenic liposomes by a low-pH sensitive PEG-diortho ester-lipid conjugate. *Bioconjugate Chem.*, **12**, 291-300.
- Haensler, J. & Francis C. Szoka, F.C., Jr. (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjugate Chem.*, **4**, 372-379.
- Hafez, I.M., Ansell, S. & Cullis, P.R. (2000). Tunable pH-sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids. *Biophys. J.*, **79**, 1438-46.
- Hafez, I.M. & Cullis, P.R. (2000). Cholesteryl hemisuccinate exhibits pH sensitive polymorphic phase behavior. *Biochim. Biophys. Acta*, **1463**, 107-114.



- Hansen, C.B., Kao, G.Y., Moase, E.H., Zalipsky, S. & Allen, T.M. (1995). Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. *Biochim. Biophys. Acta*, **1239**, 133-144.
- Harasym, T.O., Bally, M.B. & Tardi, P. (1998). Clearance properties of liposomes involving conjugated proteins for targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **32**, 99-118.
- Harasym, T.O., P., T., Longman, S.A., Ansell, S.M., Bally, M.B., Cullis, P.R. & Choi, L.S.L. (1995). Poly(ethylene glycol)-modified phospholipids prevent aggregation during covalent conjugation of proteins to liposomes. *Bioconjugate Chem.*, **6**, 187-194.
- Harding, C.V., Collins, D.S., Slot, J.W., Geuze, H.J. & Unanue, E.R. (1991). Liposome-encapsulated antigens are processed in lysosomes, recycled, and presented to T cells. *Cell*, **64**, 393-401.
- Harding, J.A., Engbers, C.M., Newman, M.S., Goldstein, N.I. & Zalipsky, S. (1997). Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1327**, 181-192.
- Harvie, P., Desormeaux, A., Bergeron, M.C., Tremblay, M., Beauchamp, D., Poulin, L. & Bergeron, M.G. (1996). Comparative pharmacokinetics, distributions in tissue, and interactions with blood proteins of conventional and sterically stabilized liposomes containing 2',3'-dideoxyinosine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 225-229.
- Hashimoto, Y., Sugawara, M., Masuko, T. & Hojo, H. (1983). Antitumor effect of actinomycin D entrapped in liposomes bearing subunits of tumor-specific monoclonal immunoglobulin M antibody. *Cancer Res.*, **43**, 5328-5334.
- Hauser, H., Pascher, I., Pearson, R.H. & Sundell, S. (1981). Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta*, **650**, 21-51.
- Hayashi, H., Kono, K. & Takagishi, T. (1996). Temperature-controlled release property of phospholipid vesicles bearing a thermo-sensitive polymer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1280**, 127-134.

- Hayashi, H., Kono, K. & Takagishi, T. (1998). Temperature-dependent associating property of liposomes modified with a thermosensitive polymer. *Bioconjugate Chem.*, **9**, 382-389.
- Hayashi, H., Kono, K. & Takagishi, T. (1999). Temperature sensitization of liposomes using copolymers of *N*-isopropylacrylamide. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 412-418.
- Heskins, M. & Guillet, J.E. (1968). Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A2**, 1441-1455.
- Hirotsu, S., Hirokawa, Y. & Tanaka, T. (1987). Volume-phase transitions of ionized *N*-isopropylacrilamide gels. *J. Chem. Phys.*, **87**, 1392-1395.
- Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P. & Jain, R.K. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 4607-12.
- Holmberg, E.G., Reuer, Q.R., Geisert, E.E. & Owens, J.L. (1994). Delivery of plasmid DNA to glial cells using pH-sensitive immunoliposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 888-893.
- Hong, M.-S., Lim, S.-J., Oh, Y.-K. & Kim, C.-K. (2002). pH-sensitive, serum-stable and long-circulating liposomes as a new drug delivery system. *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 51-58.
- Hopc, M.J. & Cullis, P.R. (1979). The bilayer stability of inner monolayer lipids from the human erythrocyte. *FEBS Lett.*, **107**, 323-326.
- Huang, A., Huang, L. & Kennel, S.J. (1980). Monoclonal antibody covalently coupled with fatty acid. A reagent for in vitro liposome targeting. *J. Biol. Chem.*, **255**, 8015-8018.
- Huang, A., Kennel, S.J. & Huang, L. (1983). Interactions of immunoliposomes with target cells. *J. Biol. Chem.*, **258**, 14034-14040.
- Huang, S.K., Stauffer, P.R., Hong, K., Guo, J.W.H., Phillips, T.L., Huang, A. & Papahadjopoulos, D. (1994). Liposomes and hyperthermia in mice: increased tumor uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Cancer Res.*, **54**, 2186-2191.
- Huwlyer, J., Cerletti, A., Fricker, G., Eberle, A.N. & Drewe, J. (2002) By-passing of P-glycoprotein using immunoliposomes. *J. Drug Target.*, **10**, 73-79.

- Ipsen, J.H., Karlstrom, G., Mouritsen, O.G., Wennerstrom, H. & Zuckermann, M.J. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta*, **905**, 162-172.
- Ishida, T., Kirchmeier, M.J., Moase, E.H., Zalipsky, S. & Allen, T.M. (2001). Targeted delivery and triggered release of liposomal doxorubicin enhances cytotoxicity against human B lymphoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1515**, 144-158.
- Ishiguro, R., Matsumoto, M. & Takahashi, S. (1996). Interaction of fusogenic synthetic peptide with phospholipid bilayers: orientation of the peptide  $\alpha$ -helix and binding isotherm. *Biochemistry*, **35**, 4976-4983.
- Israelachvili, J.N., Marcelja, S. & Horn, R.G. (1980) Physical principles of membrane organization. *Q. Rev. Biophys.* **13**, 121-200.
- Jain, R.K. (1990). Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res.*, **50**, 814s-819s.
- Jain, R.K. (1997). Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **26**, 71-90.
- Jinbao, Z., Kimura, S. & Imanishi, Y. (1996). Fusion of liposomes due to transient and lasting perturbation induced by synthetic amphiphilic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, **1283**, 37-44.
- Jizomoto, H., Kanaoka, E. & Hirano, K. (1994). pH-Sensitive liposomes composed of tocopherol hemisuccinate and of phosphatidylethanolamine including tocopherol hemisuccinate. *Biochim. Biophys. Acta*, **1213**, 343-348.
- Joshi, S.V., Vaidya, S.G., Nerurkar, V.R. & Soman, C. (1993). Treatment of gamma radiation-induced transplanted leukemia in ICRC mice by liposomally encapsulated 5-fluoro uracil. *Leuk. Res.*, **17**, 601-617.
- Juliano, R.L. & Stamp, D. (1975). The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 651-658.
- Kamen, B.A., Smith, A.K. & Anderson, R.G. (1991). The folate receptor works in tandem with a probenecid-sensitive carrier in MA104 cells in vitro. *J. Clin. Invest.*, **87**, 1442-1449.

- Kamps, J.A., Morselt, H.W., Swart, P.J., Meijer, D.K. & Scherphof, G.L. (1997). Massive targeting of liposomes, surface-modified with anionized albumins, to hepatic endothelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 11681-11685.
- Kawakami, S., Wong, J., Sato, A., Hattori, Y., Yamashita, F. & Hashida, M. (2000). Biodistribution characteristics of mannosylated, fucosylated, and galactosylated liposomes in mice. *Biochim. Biophys. Acta*, **1524**, 258-65.
- Kim, J.C., Bae, S.K. & Kim, J.D. (1997). Temperature-sensitivity of liposomal lipid bilayers mixed with poly(*N*-isopropylacrylamide). *J. Biochem.*, **121**, 15-19.
- Kirpotin, D., Hong, K., Mullah, N., Papahadjopoulos, D. & Zalipsky, S. (1996). Liposomes with detachable polymer coating: destabilization and fusion of dioleoylphosphatidylethanolamine vesicles triggered by cleavage of surface-grafted poly(ethylene glycol). *FEBS Lett.*, **388**, 115-118.
- Kirpotin, D., Park, J.W., Hong, K., Zalipsky, S., Li, W.L., Carter, P., Benz, C. & Papahadjopoulos, D. (1997). Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells *in vitro*. *Biochemistry*, **36**, 66-75.
- Kitano, H., Maeda, Y., Takeuchi, S., Ieda, K. & Aizu, Y. (1994). Liposomes containing amphiphiles prepared by using a lipophilic chain transfer reagent: responsiveness to external stimuli. *Langmuir*, **10**, 403-406.
- Kleinerman, E.S., Meyers, P.A., Raymond, A.K., Gano, J.B., Jia, S.F. & Jaffe, N. (1995). Combination therapy with ifosfamide and liposome-encapsulated muramyl tripeptide: tolerability, toxicity, and immune stimulation. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, **17**, 181-193.
- Klibanov, A., Maruyama, K., Beckerleg, A.M., Torchilin, V. & Huang, L. (1991). Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposomes binding to target. *Biochim. Biophys. Acta*, **1062**, 142-148.
- Klibanov, A., Maruyama, K., Torchilin, V.P. & Huang, L. (1990). Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.*, **268**, 235-237.

- Kobayashi, T., Kataoka, T., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. (1977). Enhancement of anti-tumor activity of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine by encapsulation in liposomes. *Int. J. Cancer*, **20**, 581-587.
- Kong, G., Anyarambhatla, G., Petros, W.P., Braun, R.D., Colvin, O.M., Needham, D. & Dewhirst, M.W. (2000). Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release. *Cancer Res.*, **60**, 6950-6957.
- Kong, G. & Dewhirst, M.W. (1999). Hyperthermia and liposomes. *Int. J. Hyperthermia*, **15**, 345-370.
- Kono, K. (2001). Thermosensitive polymer-modified liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **53**, 307-319.
- Kono, K., Hayashi, H. & Takagishi, T. (1994a). Temperature-sensitive liposomes: liposomes bearing poly(*N*-isopropylacrylamide). *J. Controlled Release*, **30**, 69-75.
- Kono, K., Henmi, A. & Takagishi, T. (1999a). Temperature-controlled interaction of thermosensitive polymer-modified cationic liposomes with negatively charged phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1421**, 183-187.
- Kono, K., Henmi, A., Yamashita, H., Hayashi, H. & Takagishi, T. (1999b). Improvement of temperature-sensitivity of poly(*N*-isopropylacrylamide)-modified liposomes. *J. Controlled Release*, **59**, 63-75.
- Kono, K., Igawa, T. & Takagishi, T. (1997). Cytoplasmic delivery of calcein mediated by liposomes modified with a pH-sensitive poly(ethylene glycol) derivative. *Biochim. Biophys. Acta*, **1325**, 143-154.
- Kono, K., Nakai, R., Morimoto, K. & Takagishi, T. (1999c). Temperature-dependent interaction of thermo-sensitive polymer-modified liposomes with CV1 cells. *FEBS Lett.*, **456**, 306-310.
- Kono, K., Nakai, R., Morimoto, K. & Takagishi, T. (1999d). Thermosensitive polymer-modified liposomes that release contents around physiological temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, **1416**, 239-250.
- Kono, K., Nishii, H. & Takagishi, T. (1993). Fusion activity of an amphiphilic polypeptide having acidic amino acid residues: generation of fusion activity by alpha-helix formation and charge neutralization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1164**, 81-90.

- Kono, K., Torikoshi, Y., Mitsutomi, M., Itoh, T., Emi, N., Yanagie, H. & Takagishi, T. (2001). Novel gene delivery systems: complexes of fusigenic polymer-modified liposomes and lipoplexes. *Gene Ther.*, **8**, 5-12.
- Kono, K., Yoshino, K. & Takagishi, T. (2002). Effect of poly(ethylene glycol) grafts on temperature-sensitivity of thermosensitive polymer-modified liposomes. *J. Controlled Release*, **80**, 321-332.
- Kono, K., Zenitani, K.I. & Takagishi, T. (1994b). Novel pH-sensitive liposomes: liposomes bearing a poly(ethylene glycol) derivative with carboxyl groups. *Biochim. Biophys. Acta*, **1193**, 1-9.
- Kyriakides, T.R., Cheung, C.Y., Murthy, N., Bornstein, P., Stayton, P.S. & Hoffman, A.S. (2002). pH-sensitive polymers that enhance intracellular drug delivery in vivo. *J. Controlled Release*, **78**, 295-303.
- Lai, M.Z., Vail, W.J. & Szoka, F.C. (1985). Acid- and calcium-induced structural changes in phosphatidylethanolamine membranes stabilized by cholesteryl hemisuccinate. *Biochemistry*, **24**, 1654-1661.
- Lamarre, A. & Talbot, P.J. (1995). Protection from lethal coronavirus infection by immunoglobulin fragments. *J. Immunol.*, **154**, 3975-3984.
- Lamparski, H., Liman, U., Barry, J.A., Frankel, D.A., Ramaswami, V., Brown, M.F. & O'Brien, D.F. (1992). Photoinduced destabilization of liposomes. *Biochemistry*, **31**, 685-694.
- Lasic, D., Martin, F.J., Gabizon, A., Huang, S.K. & Papahadjopoulos, D. (1991). Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 187-192.
- Laukkanen, M.L., Alfthan, K. & Keinanen, K. (1994) Functional immunoliposomes harboring a biosynthetically lipid-tagged single-chain antibody. *Biochemistry*, **33**:11664-11670.
- Leamon, C.P. & Low, P.S. (1991). Delivery of macromolecules into living cells: A method that exploits folate receptor endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5572-5576.

- Le Garrec, D., Taillefer, J., Van Lier, J.E., Lenaerts, V. & Leroux, J.C. (2002) Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model. *J. Drug Target.*, **10**, 429-437.
- Lee, A.G. (1977). Lipid phase transitions and phase diagrams. I. Lipid phase transitions. *Biochim. Biophys. Acta*, **472**, 237-281.
- Lee, E.S., Na, K. & Bae, Y.H. (2003a) Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting. *J. Controlled Release*, **91**, 103-113.
- Lee, E.S., Shin, H.J., Na, K & Bae, Y.H. (2003b) Poly(L-histidine)-PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization. *J. Controlled Release*, **90**, 363-374.
- Lee, K.Y., Chun, E. & Seong, B.L. (2002). Investigation of antigen delivery route in vivo and immune-boosting effects mediated by pH-sensitive liposomes encapsulated with K(b)-restricted CTL epitope. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 682-688.
- Lee, R.J. & Low, P.S. (1994). Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 3198-3204.
- Legendre, J.-Y. & Szoka, F.C. (1992). Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharm. Res.*, **9**, 1235-1242.
- Leopold, K.A., Oleson, J.R., Clarke-Pearson, D., Soper, J., Berchuck, A., Samulski, T.V., Page, R.L., Blivin, J., Tomberlin, J.K. & Dewhirst, M.W. (1993). Intraperitoneal cisplatin and regional hyperthermia for ovarian carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **27**, 1245-1251.
- Leroux, J.-C., Roux, E., Le Garrec, D., Hong, K. & Drummond, D.C. (2001). N-isopropylacrylamide copolymers for the preparation of pH-sensitive liposomes and polymeric micelles. *J. Controlled Release*, **72**, 71-84.
- Leserman, L.D., Machy, P. & Barbet, J. (1984). Covalent coupling of monoclonal antibodies and protein A to liposomes: specific interaction with cells in vivo and in vitro. In *Liposome Technology*, Gregoriadis, G. (ed), Vol. 3. pp. 29-40. CRC Press: Boca Raton, Florida.

- Leu, A.J., Berk, D.A., Lymboussaki, A., Alitalo, K. & Jain, R.K. (2000). Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res.*, **60**, 4324-4327.
- Leventis, R., Diacovo, T. & Silvius, J.R. (1987). pH-dependent stability and fusion of liposomes combining protonatable double-chain amphiphiles with phosphatidylethanolamine. *Biochemistry*, **26**, 3267-3276.
- Lewis, R.N., Mannock, D.A., McElhaney, R.N., Turner, D.C. & Gruner, S.M. (1989). Effect of fatty acyl chain length and structure on the lamellar gel to liquid-crystalline and lamellar to reversed hexagonal phase transitions of aqueous phosphatidylethanolamine dispersions. *Biochemistry*, **28**, 541-8.
- Li, C. (2002) Poly(L-glutamic acid)--anticancer drug conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 695-713.
- Liang, E. & Hughes, J. (1998). Characterization of a pH-sensitive surfactant, dodecyl-2-(1'imidazolyl)propionate (DIP), and preliminary studies in liposome mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1369**, 39-50.
- Litzinger, D.C. & Huang, L. (1992). Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. *Biochim. Biophys. Acta*, **1113**, 201-227.
- Liu, D. & Huang, L. (1989a). Role of cholesterol in the stability of pH-sensitive, large unilamellar liposomes prepared by the detergent-dialysis method. *Biochim. Biophys. Acta*, **981**, 254-260.
- Liu, D. & Huang, L. (1989b). Small, but not large, unilamellar liposomes composed of dioleoylphosphatidylethanolamine and oleic acid can be stabilized by human plasma. *Biochemistry*, **28**, 7700-7707.
- Liu, D. & Huang, L. (1990). pH-sensitive, plasma-stable liposomes with relatively prolonged residence in circulation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1022**, 348-354.
- Liu, D., Liu, F. & Song, Y.K. (1995a). Monosialoganglioside GM1 shortens the blood circulation time of liposomes in rats. *Pharm. Res.*, **12**, 508-51.
- Liu, D., Song, Y.K. & Liu, F. (1995b). Antibody dependent, complement mediated liver uptake of liposomes containing GM1. *Pharm. Res.*, **12**, 1775-1780.



- Longman, S.A., Cullis, P.R., Choi, L., de Jong, G. & Bally, M.B. (1995). A two-step targeting approach for delivery of doxorubicin-loaded liposomes to tumour cells in vivo. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **36**, 91-101.
- Lopes de Menezes, D.E., Kirchmeier, M.J., Gagne, J.F., Pilarski, L.M. & Allen, M.T. (1999). Cellular trafficking and cytotoxicity of anti-CD19-targeted liposomal doxorubicin in B lymphoma cells. *J. Liposome Res.*, **9**, 199-228.
- Lopes de Menezes, D.E., Pilarski, L.M. & Allen, T.M. (1998). *In vitro* and *in vivo* targeting of immunoliposomal doxorubicin to human B-cell lymphoma. *Cancer Res.*, **58**, 3320-3330.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Controlled Release*, **65**, 271-284.
- Maeda, M., Kumano, A. & Tirrell, D.A. (1988). H<sup>+</sup>-induced release of contents of phosphatidylcholine vesicles bearing surface-bound polyelectrolyte chains. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7455-7459.
- Magin, R.L. & Niesman, M.R. (1984). Temperature-dependent permeability of large unilamellar liposomes. *Chem. Phys. Lip.*, **34**, 245-256.
- Martin, S., Niedermann, G., Leipner, C., Eichmann, K. & Weltzien, H.U. (1993). Intracellular processing of hapten-modified protein for MHC class I presentation: cytoplasmic delivery by pH-sensitive liposomes. *Immunol. Lett.*, **37**, 97-102.
- Maruyama, K., Ishida, O., Takizawa, T. & Moribe, K. (1999). Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40**, 89-102.
- Maruyama, K., Takahashi, N., Tagawa, T., Nagaike, K. & Iwatsuru, M. (1997a). Immunoliposomes bearing polyethyleneglycol-coupled Fab' fragment show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors in vivo. *FEBS Lett.*, **413**, 177-180.
- Maruyama, K., Takizawa, T., Takahashi, N., Tagawa, T., Nagaike, K. & Iwatsuru, M. (1997b). Targeting efficiency of PEG-immunoliposome-conjugated antibodies at PEG terminals. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **24**, 235-242.

- Mastrobattista, E., Koning, G.A. & Storm, G. (1999). Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40**, 103-127.
- Mechtler, K. & Wagner, E. (1997). Gene transfer mediated by influenza virus peptides - The role of peptide sequences. *New J. Chem.*, **71**, 3288-3301.
- Menzin, J., Lang, K., Earle, C.C., Kerney, D. & Mallick, R. (2002). The outcomes and costs of acute myeloid leukemia among the elderly. *Arch. Int. Med.*, **162**, 1597-1603.
- Merdan, T., Kopecek, J. & Kissel, T. (2002). Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 715-758.
- Merlin, J.L. (1991). Encapsulation of doxorubicin in thermosensitive small unilamellar vesicle liposomes. *Eur. J. Cancer*, **27**, 1026-1030.
- Meyer, O., Papahadjopoulos, D. & Leroux, J.C. (1998). Copolymers of N-isopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes. *FEBS Lett.*, **42**, 61-64.
- Miller, C.R., Bennett, D.E., Chang, D.Y. & O'Brien, D.F. (1996). Effect of liposomal composition on photoactivated liposome fusion. *Biochemistry*, **35**, 11782-11790.
- Miller, C.R., Clapp, P.J. & O'Brien, D.F. (2000). Visible light-induced destabilization of endocytosed liposomes. *FEBS Lett.*, **467**, 52-56.
- Mills, J.K., Eichenbaum, G. & Needham, D. (1999). Effect of bilayer cholesterol and surface grafted poly(ethylene glycol) on pH-induced release of contents from liposomes by poly(2-ethylacrylic acid). *J. Liposome Res.*, **9**, 275-290.
- Mizoue, T., Horibe, T., Maruyama, K., Takizawa, T., Iwatsuru, M., Kono, K., Yanagie, H. & Moriyasu, F. (2002). Targetability and intracellular delivery of anti-BCG antibody-modified, pH-sensitive fusogenic immunoliposomes to tumor cells. *Int. J. Pharm.*, **237**, 129-137.
- Moghimi, S.M. & Hunter, A.C. (2001). Recognition by macrophages and liver cells of opsonized phospholipid vesicles and phospholipid headgroups. *Pharm. Res.*, **18**, 1-8.

- Morgan, C.G., Bisby, R.H., Johnson, S.A. & Mitchell, A.C. (1995). Fast solute release from photosensitive liposomes: an alternative to 'caged' reagents for use in biological systems. *FEBS Lett.*, **375**, 113-116.
- Morgan, C.G., Thomas, E.W., Sandhu, S.S., Yianni, Y.P. & Mitchell, A.C. (1987). Light-induced fusion of liposomes with release of trapped marker dye is sensitised by photochromic phospholipid. *Biochim. Biophys. Acta*, **903**, 504-509.
- Mori, A., Klibanov, A.L., Torchilin, V.P. & Huang, L. (1991). Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly(ethylene glycol) and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo. *FEBS Lett.*, **284**, 263-266.
- Mouritsen, O.G. & Zuckermann, M.J. (1987). Model of interfacial melting. *Phys. Rev. Lett.*, 389-392.
- Mueller, A., Bondurant, B. & O'Brien, D.F. (2000). Visible-light-stimulated destabilization of PEG-liposomes. *Macromolecules*, **33**, 4799-4804.
- Murthy, N., Robichaud, J.R., Tirrell, D.A., Stayton, P.S. & Hoffman, A.S. (1999). The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J. Controlled Release*, **61**, 137-43.
- Na, K., Lee, E.S. & Bae, Y.H. (2003) Adriamycin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH: pH-dependent cell interaction, internalization and cytotoxicity in vitro. *J. Controlled Release*, **87**, 3-13.
- Nag, A. & Ghosh, P.C. (1999). Assessment of targeting potential of galactosylated and mannosylated sterically stabilized liposomes to different cell types of mouse liver. *J. Drug Target.*, **6**, 427-438.
- Nayar, R. & Schroit, A.J. (1985). Generation of pH-sensitive liposomes: Use of large unilamellar vesicles containing N-succinyldioleoylphosphatidylethanolamine. *Biochemistry*, **24**, 5967-5971.
- Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G. & Dewhirst, M.W. (2000). A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res.*, **60**, 1197-1201.

- Needham, D. & Dewhirst, M.W. (2001). The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **53**, 285-305.
- Nicol, F., Nir, S. & Szoka, F.C., Jr. (1996). Effect of cholesterol and charge on pore formation in bilayer vesicles by a pH-sensitive peptide. *Biophys. J.*, **71**, 3288-3301.
- Nir, S., Nicol, F. & Szoka, F.C., Jr. (1999). Surface aggregation and membrane penetration by peptides: relation to pore formation and fusion. *Mol. Membr. Biol.*, **16**, 95-101.
- Nir, S. & Nieva, J.L. (2000). Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion. *Prog. Lipid Res.*, **39**, 181-206.
- Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M., Sakai, H. & Sakurai, Y. (1995). Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*, **16**, 297-303.
- Oku, N., Shibamoto, S., Ito, F., Gondo, H. & Nango, M. (1987). Low pH induced membrane fusion of lipid vesicles containing proton-sensitive polymer. *Biochemistry*, **26**, 8145-8150.
- Papahadjopoulos, D., Cowden, M. & Kimelberg, H. (1973a). Role of cholesterol in membranes. Effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **330**, 8-26.
- Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S. & Isac, T. (1973b). Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 330-348.
- Papahadjopoulos, D. & Miller, N. (1967). Phospholipid model membrane. I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals. *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 624-638.
- Parente, R.A., Nir, S. & Szoka, F.C., Jr. (1988). pH-dependent fusion of phosphatidylcholine small vesicles. Induction by a synthetic amphipathic peptide. *J. Biol. Chem.*, **263**, 4724-4730.
- Parente, R.A., Nir, S. & Szoka, F.C., Jr. (1990). Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. *Biochemistry*, **29**, 8720-8728.

- Park, J.W., Hong, K., Carter, P., Asgari, H., Guo, L.Y., Keller, A., Wirth, C., Shalaby, R., Kotts, C., Wood, W.I., Papahadjopoulos, D. & Benz, C.C. (1995). Development of anti-p185<sup>HER2</sup> immunoliposomes for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1327-1331.
- Park, J.W., Hong, K., Kirpotin, D.B., Colbern, G., Shalaby, R., Baselga, J., Shao, Y., Nielsen, U.B., Marks, J.D., Moore, D., Papahadjopoulos, D. & Benz, C.C. (2002) Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res.*, **8**, 1172-1181.
- Park, J.W., Hong, K., Kirpotin, D., Meyer, O., Papahadjopoulos, D. & Benz, C.C. (1997a). Anti-HER2 immunoliposomes for targeted therapy of human tumors. *Cancer Lett.*, **118**, 153-160.
- Park, J.W., Hong, K., Kirpotin, D.B., Papahadjopoulos, D. & Benz, C.C. (1997b). Immunoliposomes for cancer treatment. *Adv. Pharmacol.*, **40**, 399-435.
- Park, Y.S., Maruyama, K. & Huang, L. (1992). Some negatively charged phospholipid derivatives prolong the liposome circulation in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, **1108**, 257-260.
- Patel, H.M. (1992). Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **9**, 39-90.
- Phillips, N.C. & Dahman, J. (1995). Immunogenicity of immunoliposomes: reactivity against species-specific IgG and liposomal phospholipids. *Immunol Lett.*, **45**, 149-152.
- Pimm, M.V.(1994) Possible consequences of human antibody responses on the biodistribution of fragments of human, humanized or chimeric monoclonal antibodies: a note of caution. *Life Sci.*, 55:PL45-PL49.
- Polozova, A. & Winnik, F.M. (1999). Contribution of hydrogen bonding to the association of liposomes and an anionic hydrophobically modified poly(*N*-isopropylacrylamide). *Langmuir*, **15**, 4222-4229.
- Polozova, A., Yamazaki, A., Brash, J.L. & Winnik, F.M. (1999). Effect of polymer architecture on the interactions of hydrophobically-modified poly(*N*-

- isopropylacrylamide) and liposomes. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, **147**, 17-25.
- Ponnappa, B.C., Dey, I., Tu, G.C., Zhou, F., Aini, M., Cao, Q.N. & Israel, Y. (2001). In vivo delivery of antisense oligonucleotides in pH-sensitive liposomes inhibits lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor-alpha in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **297**, 1129-1136.
- Ponnappa, B.C., Dey, I., Tu, G.C., Zhou, F., Garver, E., Cao, Q.N. & Israel, Y. (1998). In vivo delivery of antisense oligodeoxynucleotides into rat Kupffer cells. *J. Liposome Res.*, **8**, 521-535.
- Putnam, D. & J. Kopecek, J. (1995) Polymer conjugates with anticancer activity. *Adv. Polym. Sci.*, **122**, 55-123.
- Puyal, C., Maurin, L., Miquel, G., Bienvenue, A. & Philippot, J. (1994). Design of a short membrane-destabilizing peptide covalently bound to liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1195**, 259-266.
- Qualls, M.M. & Thompson, D.H. (2001). Chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate delivered via acid-labile diplasmenylcholine-folate liposomes: intracellular localization and synergistic phototoxicity. *Int. J. Cancer*, **93**, 384-392.
- Rafalski, M., Ortiz, A., Rockwell, A., van Ginkel, L.C., Lear, J.D., DeGrado, W.F. & Wilschut, J. (1991). Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin: interaction of HA2 N-terminal peptides with phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **30**, 10211-10220.
- Rahman, A., More, N. & Schein, P.S. (1982). Doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity and its protection by liposomal administration. *Cancer Res.*, **42**, 1817-1825.
- Reddy, J.A. & Low, P.S. (2000). Enhanced folate receptor mediated gene therapy using a novel pH- sensitive lipid formulation. *J. Controlled Release*, **64**, 27-37.
- Reddy, R., Zhou, F., Huang, L., Carbone, F., Bevan, M. & Rouse, B.T. (1991). pH-sensitive liposomes provide an efficient means of sensitizing target cells to class I restricted CTL recognition of a soluble protein. *J. Immunol. Methods*, **141**, 157-163.
- Richardson, S.C.W., Patrick, N.G., Stella Man, Y.K., Ferruti, P. & Duncan, R. (2001). Poly(amidoamine)s as potential nonviral vectors: Ability to form

- interpolyelectrolyte complexes and to mediate transfection in vitro (2001). *Biomacromolecules*, **2**, 1023-1028.
- Ringsdorf, H., Venzmer, J. & Winnik, F.M. (1991). Interaction of hydrophobically-modified poly-*N*-isopropylacrylamides with model membranes - or playing a molecular accordion. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**, 315-318.
- Rodrigues, P.C.A., Beyer, U., Schumacher, P., Roth, T., Fiebig, H.H., Unger, C., Messori, L., Orioli, P., Paper, D.H., Mulhaupt, R. & Kratz, F. (1999) Acid-sensitive polyethylene glycol conjugates of doxorubicin: Preparation, in vitro efficacy and intracellular distribution. *Bioorg. & Med. Chem.*, **7**, 2517-2524.
- Roerdink, F., Dijkstra, J., Hartman, G., Bolscher, B. & Scherphof, G. (1981). The involvement of parenchymal, Kupffer and endothelial liver cells in the hepatic uptake of intravenously injected liposomes. Effects of lanthanum and gadolinium salts. *Biochim. Biophys. Acta*, **677**, 79-89.
- Ropert, C., Lavignon, M., Dubernet, C., Couvreur, P. & Malvy, C. (1992). Oligonucleotides encapsulated in pH sensitive liposomes are efficient toward friend retrovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 879-885.
- Rui, Y., Wang, S., Low, P.S. & Thompson, D.H. (1998). Dimethylcholine-folate liposomes: An efficient vehicle for intracellular drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11213-11218.
- Rüppel, D. & Sackmann, E. (1983). On defects in different phases of two-dimensional lipid bilayers. *J. Physique*, **44**, 1025-1034.
- Rustum, Y.M., Dave, C., Mayhew, E. & Papahadjopoulos, D. (1979). Role of liposome type and route of administration in the antitumor activity of liposome-entrapped 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine against mouse L1210 leukemia. *Cancer Res.*, **39**, 1390-1395.
- Scheinberg, D.A., Lovett, D., Divgi, C.R., Graham, M.C., Berman, E., Pentlow, K., Feirt, N., Finn, R.D., Clarkson, B.D., Gee, T.S. & et al. (1991). A phase I trial of monoclonal antibody M195 in acute myelogenous leukemia: specific bone marrow targeting and internalization of radionuclide. *J. Clin. Oncol.*, **9**, 478-490.

- Schuber, F. & Frisch, B. (1993). Réactions de conjugaison de ligands aux liposomes. In *Les liposomes. Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, Delattre, J., Couvreur, P., Puiseux, F., Phillipot, J.R. & Schuber, F. (eds) pp. 113-136. Les éditions INSERM: Paris.
- Ségot-Chicq, S., Teillaud, E. & Peppas, N.A. (1985). Les dispositifs à libération contrôlée pour la délivrance des principes actifs médicamenteux. I. Intérêts et applications. *S.T.P. Pharma*, **1**, 25-36.
- Senior, J. & Gregoriadis, G. (1982). Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life Sci.*, **30**, 2123-2136.
- Senior, J.H. (1987). Fate and behaviour of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **3**, 123-193.
- Shi, G., Guo, W., Stephenson, S.M. & Lee, R.J. (2002). Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations. *J. Controlled Release*, **80**, 309-319.
- Siegal, T., Horowitz, A. & Gabizon, A. (1995). Doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes for the treatment of a brain tumor model: biodistribution and therapeutic efficacy. *J. Neurosurg.*, **83**, 1029-1037.
- Siegel, D.P. (1993). Energetics of intermediates in membrane fusion: comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms. *Biophys. J.*, **65**, 2124-2140.
- Simoës, S., Slepishkin, V., Pires, P., Gaspar, R., de Lima, M.P. & Duzgunes, N. (1999a). Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides. *Gene Ther.*, **6**, 1798-1807.
- Simoës, S., Slepishkin, V., Pretzer, E., Dazin, P., Gaspar, R., Pedroso de Lima, M.C. & Duzgunes, N. (1999b). Transfection of human macrophages by lipoplexes via the combined use of transferrin and pH-sensitive peptides. *J. Leukoc. Biol.*, **65**, 270-279.
- Singer, S. J. & Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175** : 720-731.



- Singh, M. (1999). Transferrin as a targeting ligand for liposomes and anticancer drugs. *Curr. Pharm. Des.*, **5**, 443-451.
- Skalko-Basnet, N., Tohda, M. & Watanabe, H. (2002). Uptake of liposomally entrapped fluorescent antisense oligonucleotides in NG108-15 cells: conventional versus pH-sensitive. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1583-1587.
- Slepushkin, V.A., Simoes, S., Dazin, P., Newman, M.S., Guo, L.K., Pedroso de Lima, M.C. & Düzgünes, N. (1997). Sterically stabilized pH-sensitive liposomes. Intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo. *J. Biol. Chem.*, **272**, 2382-2388.
- Spratt, T., Bondurant, B. & O'Brien, D.F. (2003). Rapid release of liposomal contents upon photoinitiated destabilization with UV exposure. *Biochim. Biophys. Acta*, **1611**, 35-43.
- Stohrer, M., Boucher, Y., Stangassinger, M. & Jain, R.K. (2000). Oncotic pressure in solid tumors is elevated. *Cancer Res.*, **60**, 4251-4255.
- Stone, R.M. (2002). The difficult problem of acute myeloid leukemia in the older adult. *CA Cancer J. Clin.*, **52**, 363-371.
- Straubinger, R.M., Düzgünes, N. & Papahadjopoulos, D. (1985). pH-sensitive liposomes mediate cytoplasmic delivery of encapsulated macromolecules. *FEBS Lett.*, **179**, 148-154.
- Straubinger, R.M., Hong, K., Friend, D.S. & Papahadjopoulos, D. (1983). Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated molecules: encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles. *Cell*, **32**, 1069-1079.
- Struck, D.K., Hoekstra, D. & Pagano, R.E. (1981). Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry*, **20**, 4093-4099.
- Subbarao, N.K., Parente, R.A., Szoka, F.C., Nadasdi, L. & Pongracz, K. (1987). pH-dependent bilayer destabilization by an amphipathic peptide. *Biochemistry*, **26**, 2964-2972.
- Sudimack, J.J., Guo, W., Tjarks, W. & Lee, R.J. (2002). A novel pH-sensitive liposome formulation containing oleyl alcohol. *Biochim. Biophys. Acta*, **1564**, 31-37.

- Suh, W., Chung, J.K., Park, S.H. & Kim, S.W. (2001). Anti-JL1 antibody-conjugated poly (L-lysine) for targeted gene delivery to leukemia T cells. *J. Controlled Release*, **72**, 171-178.
- Taillefer, J., Brasseur, N., van Lier, J.E., Lenaerts, V., Le Garrec, D. & Leroux, J.-C. (2001). In-vitro and in-vivo evaluation of pH-responsive polymeric micelles in a photodynamic cancer therapy model. *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 155-166.
- Takahashi, S. (1990). Conformation of membrane fusion-active 20-residue peptides with or without lipid bilayers. Implication of alpha-helix formation for membrane fusion. *Biochemistry*, **29**, 6257-6264.
- Thierry, A.R., Vige, D., Coughlin, S.S., Belli, J.A., Dritschilo, A. & Rahman, A. (1993). Modulation of doxorubicin resistance in multidrug-resistant cells by liposomes. *FASEB J.*, **7**, 572-579.
- Thomas, J.A., Chain, Y.C. & Jung, C.H. (1994a). Protein-S thiolation and dethiolation. In *Methods in Enzymology*, Packer, L. (ed), Vol. 233. pp. 385-395. Academic Press: San Diego, California.
- Thomas, J.L., Barton, S.W. & Tirrell, D.A. (1994b). Membrane solubilization by a hydrophobic polyelectrolyte: surface activity and membrane binding. *Biophys. J.*, **67**, 1101-1106.
- Thompson, J.A. Jr. (1980) Phospholipid. In *The regulation of membrane lipid metabolism*. CRC Press, Boca Raton., Fla. p.175.
- Thompson, D.H., Gerasimov, O.V., Wheeler, J.J., Rui, Y. & Anderson, V.C. (1996). Triggerable plasmalogen liposomes: improvement of system efficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, **1279**, 25-34.
- Tirrell, D.A., Takigawa, D.Y. & Seki, K. (1985). pH sensitization of phospholipid vesicles via complexation with synthetic poly(carboxylic acid). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **446**, 237-248.
- Torchilin, V.P. (1994). Immunoliposomes and PEGylated immunoliposomes: possible use for targeted delivery of imaging agents. *Immunomethods*, **4**, 244-258.

- Torchilin, V.P., Khaw, B.A., Smirnov, V.N. & Haber, E. (1979). Preservation of antimyosin antibody activity after covalent coupling to liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1114-1119.
- Torchilin, V.P., Omelyanenko, V.G., Papisov, M.I., Bogdanov, A.A., Trubetskoy, V.S., Herron, J.N. & Gentry, C.A. (1994). Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1195**, 11-20.
- Turk, M.J., Reddy, J.A., Chmielewski, J.A. & Low, P.S. (2002). Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs. *Biochim. Biophys. Acta*, **1559**, 56-68.
- Uchida, K., Sakai, K., Ito, E., Kwon, O.H., Kikuchi, A., Yamato, M. & Okano, T. (2000). Temperature-dependent modulation of blood platelet movement and morphology on poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *Biomaterials*, **21**, 923-929.
- Vingerhoeds, M.H., Steerenberg, P.A., Hendriks, J.J., Dekker, L.C., Van Hoesel, Q.G., Crommelin, D.J. & Storm, G. (1996). Immunoliposome-mediated targeting of doxorubicin to human ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer*, **74**, 1023-1029.
- Vist, M.R. & Davis, J.H. (1990). Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry*, **29**, 451-464.
- Vogel, A.W. (1965). Intratumoral vascular changes with increased size of a mammary adenocarcinoma : New methods and results. *J. Natl Cancer Inst.*, **34**, 571-578.
- Vogel, K., Wang, S., Lee, R.J., Low, P.S. & Chmielewski, J. (1996). Peptide-Mediated Release of Folate-Targeted Liposome Contents from Endosomal Compartments. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1581-1586.
- Wagner, E. (1998). Effects of membrane-active agents in gene delivery. *J. Controlled Release*, **53**, 155-158.
- Wagner, E. (1999). Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **38**, 279-289.

- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M. & Birnstiel, M.L. (1992). Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7934-7938.
- Walter, A., Steer, C. & Blumenthal, R. (1986). Polylysine induces pH-dependent fusion of acidic phospholipid vesicles: a model for polycation-induced fusion. *Biochim. Biophys. Acta*, **861**, 319-330.
- Wang, C.Y. & Huang, L. (1987). pH-sensitive immunoliposomes mediate target-cell-specific delivery and controlled expression of a foreign gene in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7851-7855.
- Wang, C.Y. & Huang, L. (1989). Highly efficient DNA delivery mediated by pH-sensitive immunoliposomes. *Biochemistry*, **28**, 9508-9514.
- Wang, S. & Low, P.S. (1998). Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. *J. Controlled Release*, **53**, 39-48.
- Warren, B.A. (1968). In vivo and electron microscopy study of vessels in a hemangiopericytoma of the hamster. *Angiologica*, **5**, 230-249.
- Warren, B.A. & Chauvin, W.J. (1977). Transmission and scanning electron microscopy of renal adenocarcinoma. *Ann. Royal. Con. Phys. Surg. Can.*, **10**, 74.
- Warren, B.A. & Shubik, P. (1966). The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch chamber. *Lab. Invest.*, **15**, 464-478.
- Weinstein, J.N., Eger, R.R., Covell, D.G., Black, C.D., Mulshine, J., Carrasquillo, J.A., Larson, S.M. & Keenan, A.M. (1987). The pharmacology of monoclonal antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **507**, 199-210.
- Weinstein, J.N., Klausner, R.D., Innerarity, T., Ralston, E. & Blumenthal, R. (1981). Phase transition release, a new approach to the interaction of proteins with lipid vesicles. Application to lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **647**, 270-284.
- Wiley, J.S., Jones, S.P., Sawyer, W.H. & Paterson, A.R. (1982). Cytosine arabinoside influx and nucleoside transport sites in acute leukemia. *J. Clin. Invest.*, **69**, 479-489.
- Winnik, F.M., Adronov, A. & Kitano, H. (1995). Pyrene-labeled amphiphilic poly-(*N*-isopropylacrylamides) prepared by using a lipophilic radical initiator: synthesis,

- solution properties in water, and interactions with liposomes. *Can. J. Chem.*, **73**, 2030-2040.
- Woodle, M.C., Matthay, K.K., Newman, M.S., Hidayat, J.E., Collins, L.R., Redemann, C., Martin, F.J. & Papahadjopoulos, D. (1992). Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1105**, 193-200.
- Wu, X., Lee, K.H. & Li, Q.T. (1996). Stability and pH sensitivity of sulfatide-containing phosphatidylethanolamine small unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **1284**, 13-19.
- Wymer, N.J., Gerasimov, O.V. & Thompson, D.H. (1998). Cascade liposomal triggering: light-induced Ca<sup>2+</sup> release from diplasmethylcholine liposomes triggers PLA<sub>2</sub>-catalyzed hydrolysis and contents leakage from DPPC liposomes. *Bioconjugate Chem.*, **9**, 305-308.
- Yakushiji, T., Sakai, K., Kikuchi, A., Aoyagi, T., Sakurai, Y. & Okano, T. (1998). Graft architectural effects on thermoresponsive wettability changes of poly(N-isopropylacrylamide)-modified surfaces. *Langmuir*, **14**, 4657-4662.
- Yamazaki, A., Song, J.M., Winnik, F.M. & Brash, J.L. (1998). Synthesis and solution properties of fluorescently labeled amphiphilic (N-alkylacrylamide) oligomers. *Macromolecules*, **31**, 109-115.
- Yamazaki, A., Winnik, F.M., Cornelius, R.M. & Brash, J.L. (1999). Modification of liposomes with N-substituted polyacrylamides: identification of proteins adsorbed from plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, **1421**, 103-115.
- Yatvin, M.B., Kreutz, W., Horwitz, B.A. & Shinitzky, M. (1980). pH-sensitive liposomes: possible clinical implications. *Science*, **210**, 1253-1255.
- Yatvin, M.B., Weinstein, J.N., Dennis, W.H. & Blumenthal, R. (1978). Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science*, **202**, 1290-1293.
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D.A., Torchilin, V.P. & Jain, R.K. (1995). Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.*, **55**, 3752-3756.

- Yuan, F., Leunig, M., Huang, S.K., Berk, D.A., Papahadjopoulos, D. & Jain, R.K. (1994). Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res.*, **54**, 3352-6.
- Zalipsky, S., Mullah, N., Harding, J.A., Gittelman, J., Guo, L. & Defrees, S.A. (1997). poly(ethylene glycol)-grafted liposomes with oligopeptide or oligosaccharide ligands appended to the termini of the polymer chains. *Bioconjugate Chem.*, **8**, 111-118.
- Zhang, R.D., Price, J.E., Fujimaki, T., Bucana, C.D. & Fidler, I.J. (1992). Differential permeability of the blood-brain barrier in experimental brain metastases produced by human neoplasms implanted into nude mice. *Am. J. Pathol.*, **141**, 1115-1124.
- Zhang, Z.-Y. & Smith, B.D. (1999). Synthesis and characterization of NVOC-DOPE, a caged photoactivatable derivative of dioleoylphosphatidylethanolamine. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 1150-1152.
- Zhou, F. & Huang, L. (1994). Liposome-mediated cytoplasmic delivery of proteins: an effective means of accessing the MHC class I-restricted antigen presentation pathway. *Immunomethods*, **4**, 229-235.
- Zhou, F., Watkins, S.C. & Huang, L. (1994). Characterization and kinetics of MHC class I-restricted presentation of a soluble antigen delivered by liposomes. *Immunobiology*, **190**, 35-52.
- Zhu, J., Munn, R.J. & Nantz, M.H. (2000). Self-cleaving ortho ester lipids: A new class of pH-vulnerable amphiphiles. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2645-2646.
- Zignani, M., Drummond, D.C., Meyer, O., Hong, K. & Leroux, J.-C. (2000). In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1463**, 383-394.