

Université de Montréal

**Étude de l'activité antivirale des oligodésoxynucléotides  
synthétiques contre le VIH-1 à l'aide du système de  
transport lipidique DLS**

par

Carole Lavigne

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de  
l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Virologie

Décembre, 1997

©Carole Lavigne, 1997



W  
4  
058  
1998  
v. 118

Université de Montréal

Étude de l'activité antivirale des oligodésoxynucleotides  
synthétisés contre le VIH-1 à l'aide du système de  
transport lipidique DLS

par  
Carole Lavigne

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de  
l'obtention du grade de  
Philosophie Docteur (Ph.D.)  
en Virologie

Décembre 1997

Carole-Lavigne\_1997

---

**Université de Montréal**  
**Faculté des études supérieures**

**Cette thèse intitulée :**

**Étude de l'activité antivirale des oligodésoxynucléotides  
synthétiques contre le VIH-1 à l'aide du système de transport  
lipidique DLS**

**présentée par :**  
**Carole Lavigne**

**a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :**

<b>Président rapporteur :</b>	<b>Dr Dominique Bergeron</b>
<b>Directeur de recherche :</b>	<b>Dr Max Arella</b>
<b>Co-directeur de recherche :</b>	<b>Dr Jocelyn Yelle</b>
<b>Membre du jury :</b>	<b>Dr François Coutlée</b>
<b>Examineur externe :</b>	<b>Dr Michel Tremblay</b>

**Thèse acceptée le \_\_\_\_\_**

---

## SOMMAIRE



Une nouvelle approche consistant à utiliser des oligodésoxynucléotides (ODN) synthétiques pour moduler l'expression des gènes a suscité beaucoup d'intérêt ces dernières années dans le domaine de la thérapie du SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise). Des études ont montré qu'il était possible d'inhiber la réplication virale par cette nouvelle approche et certains oligonucléotides sont présentement à l'essai chez des patients infectés par le VIH. Cependant certains problèmes restent encore à surmonter avant que les ODNs n'obtiennent le statut d'agents thérapeutiques. En effet, les ODNs naturels sont rapidement dégradés dans le sérum et les milieux biologiques, traversent difficilement la membrane cellulaire, pénètrent très peu dans le noyau des cellules et peuvent agir de façon non-spécifique. De plus, les mécanismes d'action de ces composés sont très complexes et encore mal connus.

Ce projet de recherche a pour but d'augmenter l'efficacité de la stratégie antisens comme approche antivirale contre le virus VIH-1. Dans ce projet, nous nous sommes concentrés principalement sur quatre aspects : 1) choix de nouvelles séquences originales, 2) mieux comprendre les mécanismes responsables de l'activité anti-VIH des ODNs, 3) améliorer le taux de pénétration des ODNs dans la cellule et, 4) évaluer l'efficacité d'une stratégie basée sur l'utilisation de combinaisons d'oligonucléotides en thérapie antisens.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des ODNs antisens et d'évaluer l'efficacité d'une stratégie de combinaison, nous avons d'abord synthétisé deux nouvelles molécules antisens originales nommées DIS et Pac dirigées contre deux séquences distinctes situées dans la région 5' non-codante (région « leader ») du génome du VIH. Ces séquences sont hautement conservées d'un isolat à l'autre et sont reconnues comme étant essentielles pour les processus d'encapsidation et de dimérisation du génome du virus. Pour évaluer l'efficacité de nos séquences oligonucléotidiques nous avons comparé leur activité anti-VIH avec celle de d'autres séquences bien connues : anti-*rev*, GEM 91 et T30177 (aussi nommée AR177) dans différents modèles cellulaires

et nous avons vérifié le niveau de spécificité de leur activité antivirale en utilisant des contrôles appropriés.

De plus, pour améliorer l'efficacité de la pénétration des ODNs dans la cellule ainsi que leur distribution intracellulaire et leur résistance aux nucléases nous avons utilisé le système de transport lipidique DLS récemment développé par le Dr Alain Thierry dans le laboratoire du Dr Robert Gallo. Le système DLS s'est avéré être un transporteur très efficace permettant aux ODNs d'exercer leur activité à des concentrations de l'ordre du picomolaire. Ce système de transport nous a permis de comparer l'activité antivirale de plusieurs ODNs chimiquement modifiés (phosphorothioates) ou non-modifiés (naturels) dans différents modèles cellulaires contre divers isolats du VIH. Cette étude nous a permis entre autres d'analyser certains facteurs importants à considérer lors d'essais *in vitro* de molécules antisens.

Finalement, pour évaluer l'utilité d'une approche basée sur la multiplicité des cibles en thérapie antisens nous avons testé nos molécules antisens en combinaison avec d'autres ODNs. À l'aide du système de transport DLS, nous avons pu comparer l'activité anti-VIH de différentes combinaisons incluant des oligonucléotides naturels et phosphorothioates. Dans le cadre de ce projet nous avons pu identifier, entre autres, un cocktail de trois ODNs phosphorothioates (Srev-SDIS-SPac) qui s'est avéré efficace pour inhiber la réplication du VIH dans différents modèles cellulaires et qui a démontré certains avantages sur l'utilisation individuelle des oligonucléotides lors d'une infection *de novo*.

L'élaboration de systèmes de transport non-viraux efficaces et une meilleure compréhension du mécanisme d'action des oligonucléotides deviennent de plus en plus une nécessité à l'application de la thérapie antisens *in vivo*. Nous sommes convaincus que nos résultats seront d'une grande utilité pour l'avancement de nos connaissances dans le domaine de l'application de la stratégie antisens pour le traitement du SIDA.

# TABLE DES MATIÈRES

## PAGE

PAGE TITRE.....	i
IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
DÉDICACE.....	xvii
REMERCIEMENTS.....	xviii

## CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1.0 Le virus de l'immunodéficience humaine(VIH).....	2
1.1 Historique et classification.....	2
1.2 Morphologie du VIH .....	4
1.3 Structure du génome et protéines virales.....	6
1.4 Cycle de réplication du VIH.....	10
1.5 Traitement du SIDA .....	12
2.0 Définition de la thérapie antisens.....	13
3.0 Expression des gènes en protéines chez les eucaryotes.....	16
4.0 Régulation de l'expression des gènes par des transcrits antisens naturels.....	17
5.0 Mécanisme d'action des oligonucléotides synthétiques.....	19
6.0 Thérapie antisens et VIH.....	25
7.0 Applications thérapeutiques des oligonucléotides antisens.....	27
7.1 Activité antivirale des oligonucléotides antisens.....	28
7.2 Activité antitumorale des oligonucléotides antisens.....	31

8.0	Problèmes spécifiques reliés à la thérapie antisens.....	32
8.1	Stabilité.....	33
8.2	Taux de pénétration et distribution intracellulaire.....	36
8.3	Nature de l'activité antisens.....	42
9.0	Pharmacocinétique et toxicologie des oligonucléotides phosphorothioates.....	46
10.0	But du projet et hypothèses de travail.....	50

## **CHAPITRE 2**

ARTICLE 1	Inhibition of HIV-1 replication by two novel antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides directed against the packaging signal region.....	53
-----------	---	----

## **CHAPITRE 3**

ARTICLE 2	Enhanced antisense inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in cell cultures by DLS delivery system.....	92
-----------	--	----

## **CHAPITRE 4**

ARTICLE 3	On the specificity of antisense activity for the inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in cell culture.....	99
-----------	--	----

## **CHAPITRE 5**

ARTICLE 4	Combinations of oligodeoxynucleotides delivered by the DLS carrier system : A new approach for the treatment of HIV-1 infection.....	145
-----------	--	-----

## **CHAPITRE 6**

DISCUSSION GÉNÉRALE.....	184
--------------------------	-----

---

**CHAPITRE 7****CONCLUSION.....205****CHAPITRE 8****BIBLIOGRAPHIE.....210**

## LISTE DES TABLEAUX

	PAGE
<b>CHAPITRE 1</b>	
TABLEAU I: Oligonucléotides phosphorothioates présentement à l'essai chez l'humain pour une application antivirale.....	29
TABLEAU II: Méthodes pour augmenter la pénétration et la distribution intracellulaire des oligonucléotides antisens.....	38
<b>CHAPITRE 2</b>	
TABLEAU I: Sequence of the oligonucleotides used for the treatment of HIV-1 infection <i>in vitro</i> .....	84
TABLEAU II: Evaluation of cell survival in HIV-infected MOLT-3 cells treated with ODNs at 0.1 $\mu$ M.....	85
TABLEAU III: Cytotoxicity of phosphorothioate oligonucleotide in MOLT-3 cell line and PBMC cultures.....	86
<b>CHAPITRE 4</b>	
TABLEAU I: Sequence of the oligonucleotides used for the treatment of HIV-1 infection <i>in vitro</i> .....	138

---

TABLEAU II: Antiviral activity of phosphorothioate-modified or unmodified ODNs added either free in solution or delivered by DLS-liposomes in a short-term assay using MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1 (IIIB).....	139
TABLEAU III: Comparison of antiviral activity of phosphorothioate ODNs added either free or complexed with DLS-liposomes on acutely infected MOLT-3 cells with HIV-1 (IIIB) in a long-term assay.....	140
TABLEAU IV: Antiviral activity of phosphorothioate-modified or unmodified ODNs delivered by DLS-liposomes in a short-term assay on PBMCs acutely infected with HIV-1 (IIIB).....	141
TABLEAU V: Comparison of antiviral activity of phosphorothioate-modified or unmodified ODNs added either free in solution or complexed with DLS-liposomes on chronically infected H9/HTLV-IIIB cells.....	142
TABLEAU VI: Cytotoxicity of phosphorothioate-modified or unmodified ODNs added free in solution or delivered by DLS-liposomes in MOLT-3 and H9/HTLV-IIIB cell lines.....	143
TABLEAU VII: Summary of sequence-specificity and anti-HIV activity of oligonucleotides.....	144

---

**CHAPITRE 5**

TABLEAU I: Sequence of the oligonucleotides used in combination for the treatment of HIV-1 infection <i>in vitro</i> .....	176
TABLEAU II: Viability of H9 cell cultures chronically infected with HIV-1 (IIIB) treated with DLS-associated antisense oligonucleotides used individually or in combination at 100 pM dose.....	177



## LISTE DES FIGURES

	PAGE
<b>CHAPITRE 1</b>	
FIGURE 1: Structure morphologique d'une particule virale.....	5
FIGURE 2: Représentation schématique du génome du VIH-1.....	7
FIGURE 3: Cycle de réplication du VIH.....	11
FIGURE 4: Mécanismes d'action des trois sous-classes d'oligonucléotides thérapeutiques.....	20
FIGURE 5: Mécanismes d'action des oligonucléotides antisens.....	22
FIGURE 6: Résumé des sites pouvant être la cible de l'action des oligonucléotides dans une cellule eucaryote.....	24
FIGURE 7: Modifications chimiques des oligonucléotides utilisés dans la stratégie antisens.....	34
<b>CHAPITRE 2</b>	
FIGURE 1: Inhibition of syncytia formation in MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1 (IIIB).....	87
FIGURE 2: Antiviral effects of phosphorothioate oligonucleotides in acutely infected cells in long-term cultures.....	88

FIGURE 3: Antiviral effects of phosphorothioate antisense ODNs in chronically infected cells.....	89
FIGURE 4: Antiviral effects of phosphorothioate ODNs in HIV-1-infected PBMCs.....	90
FIGURE 5: Short-term inhibition of the replication of a HIV-1 clinical isolate in acutely infected peripheral blood mononuclear cells by a combination of three antisense sequences.....	91

### CHAPITRE 3

FIGURE 1: Long-term assay in MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1(IIIB).....	95
FIGURE 2: Short-term assay in acutely infected peripheral blood mononuclear cells with HIV-1 (IIIB).....	95
FIGURE 3: Short-term assay in chronically infected H9 cells with HIV-(IIIB).....	96

### CHAPITRE 5

FIGURE 1: Long-term anti-HIV assay in acutely infected MOLT-3 cells.....	178
FIGURE 2: Long-term culture of HIV-1-infected MOLT-3 cells treated with antisense oligonucleotides added either individually or in combination delivered by the DLS carrier system.....	179

---

FIGURE 3: Short-term assay in H9 cells chronically infected with HIV-1 (IIIB).....	180
FIGURE 4: Comparison of the anti-HIV activity of various oligonucleotide combinations in acutely infected MOLT-3 cells.....	181
FIGURE 5: Long-term inhibition of HIV-1 strain IIIB by different oligonucleotide combinations in acutely infected MOLT-3 cells.....	182
FIGURE 6: Cell survival of MOLT-3 cell cultures treated with antisense drugs delivered by the DLS carrier system.....	183

## CHAPITRE 6

FIGURE 1: Modèle de prédiction de la structure secondaire de l'ARN du VIH-1 dans la région du signal d'encapsidation.....	186
---	-----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
AZT	zidovudine ou 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine
BHIVA	<i>British HIV Association</i>
C	cytosine
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
dAMP	désoxyadénosine mono-phosphate
dGMP	désoxyguanine mono-phosphate
G	guanine
GEM 91	<i>gene modulator expression 91</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> , ou en français VIH
IC <sub>50</sub>	concentration inhibitrice 50% ou concentration requise pour une inhibition de 50%
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MBO	<i>mixed-backbone oligonucleotide</i> ou oligonucléotide possédant un squelette mixte
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
mL	millilitre
mM	millimolaire
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nM	nanomolaire
OD	<i>optical density</i> ou densité optique
ODN	oligodésoxynucléotide
PBS	<i>primer binding site</i> ou site d'attachement de l'amorce

---

PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> ou cellule mononucléée du sang périphérique
pM	picomolaire
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
PO	phosphodiester
PS	phosphorothioate
φ	psi
RMN	résonance magnétique nucléaire
RNase H	ribonucléase H
S	phosphorothioate
SD	<i>standard deviation</i> ou déviation standard
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
SRE	système réticuloendothélial
T	thymine
TAR	<i>trans-activation response</i>
TCID <sub>50</sub>	<i>50% tissue culture infective dose</i> ou dose requise pour infecter 50% des cellules
μM	micromolaire
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
γ	gamma

---

À mon époux Ronald.

À ma fille Gabrielle.

À mon fils Francis.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier le Dr Gilles Sauvé, professeur-chercheur à l'Institut Armand-Frappier, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, m'avoir donné l'occasion de présenter mes résultats à des congrès scientifiques et pour ses encouragements prodigués tout au long de mes études. Je voudrais remercier le Dr Max Arella, également professeur-chercheur à l'Institut Armand-Frappier, pour avoir accepté d'être mon directeur de recherche et pour ses judicieux conseils et encouragements. J'aimerais également remercier le Dr Jocelyn Yelle, attaché de recherche à l'Institut Armand-Frappier, pour avoir accepté de co-diriger mes travaux de doctorat, pour sa grande disponibilité, pour toute l'énergie et le temps qu'il a consacrés et pour son aide si précieuse tout au long de mes études.

Je tiens à remercier particulièrement le Dr Alain Thierry d'abord pour m'avoir permis de faire un stage au *Laboratory of Tumor Cell Biology* dirigé par le Dr Robert Gallo et d'avoir accepté de superviser mes travaux de recherche aux  tats-Unis. De plus, j'aimerais le remercier pour son aide inestimable et sa grande disponibilité qu'il a su prodiguer tout au long de mon stage et jusqu'à la fin de mes études. J'aimerais le remercier pour ses précieux conseils, pour les nombreuses discussions que nous avons pu échanger, pour ses encouragements, pour son enthousiasme et son dynamisme qui ont été des éléments de motivation. Une collaboration sincère et enrichissante est n e, et je veux le remercier pour avoir cru en mon potentiel de chercheuse et m'avoir amenée à me surpasser constamment.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance à madame Micheline Fauvel et madame Christiane Claessens qui m'ont accueillie chaleureusement dans leur laboratoire et m'ont permis d'utiliser leurs installations de confinement pour les manipulations avec le virus. Je remercie également toute leur équipe de

recherche pour leur aide apportée tout au long de mon séjour au Laboratoire de Santé Publique du Québec.

J'aimerais remercier de façon particulière mon époux et mes enfants pour leur soutien et leur aide. Je voudrais souligner l'extraordinaire patience et flexibilité que mon époux a su démontrer tout au long de ces quatre années ainsi que son dévouement auprès des enfants. Je lui suis également très reconnaissante pour son implication financière, sans laquelle il m'aurait été impossible d'entreprendre de telles études. J'aimerais également remercier mes parents pour leur aide et pour m'avoir permis à l'occasion de me consacrer à 100% dans mes études.

J'aimerais remercier le Dr Louis Flamand pour ses précieux conseils et encouragements ainsi que mes collègues de travail : Khampoune Sayasith et Benoît Ochiatti pour leur sincère amitié, leur assistance technique et leur soutien moral.

Finalement, j'aimerais remercier le Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR) pour son soutien financier et pour m'avoir permis de vivre cette expérience très enrichissante qu'a été mon stage de recherche aux NIH à Bethesda.



---

**CHAPITRE 1**  
**REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## 1.0 Le virus de l'immunodéficience humaine(VIH)

### 1.1 Historique et classification

Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) a été décrit pour la première fois en 1981 aux États-Unis suite à l'apparition de quelques cas d'infections opportunistes rares chez de jeunes hommes homosexuels jusque là en bonne santé (Gottlieb *et al.*, 1981). Chez ces personnes, des cas inhabituels de pneumonie causée par le protozoaire *Pneumocystis carinii*, de candidase mucosale, et de tumeur peu commune du tissu conjonctif nommée le sarcome de Kaposi étaient fréquemment diagnostiqués. Les observations épidémiologiques accumulées en 1982 permettaient à cette époque de prédire que l'agent étiologique du SIDA était un microorganisme pathogène infectieux qui pouvait se transmettre par les produits sanguins, lors des relations sexuelles et de mère à enfant. En 1983, l'agent responsable de la maladie a été identifié par l'équipe du Dr Montagnier à l'Institut Pasteur en France sous le nom de LAV (Lymphadenopathy-associated virus ; Barré-Sinoussi *et al.*, 1983) et un peu plus tard confirmé par l'équipe du Dr Gallo aux *National Institutes of Health* aux États-Unis sous le nom de HTLV-III (Human T-cell lymphotropic virus type III ; Gallo *et al.*, 1984). On nomma définitivement ce rétrovirus « HIV » pour Human Immunodeficiency Virus, traduit en français par « VIH » pour Virus de l'Immunodéficience Humaine. Plus tard, un deuxième sérotype du VIH était identifié en Afrique de l'Ouest et fut nommé VIH-2.

Le VIH appartient à la famille des *Retroviridae* et à la sous-famille des *Lentivirinae*. On retrouve deux types de VIH, le VIH-1 et le VIH-2 qui se distinguent par la séquence nucléotidique de leur génome. Les rétrovirus sont classés en trois sous-familles selon des critères de pathogénicité dont les *Oncovirinae*, les *Lentivirinae* et les *Spumavirinae*. Les oncovirus sont des virus

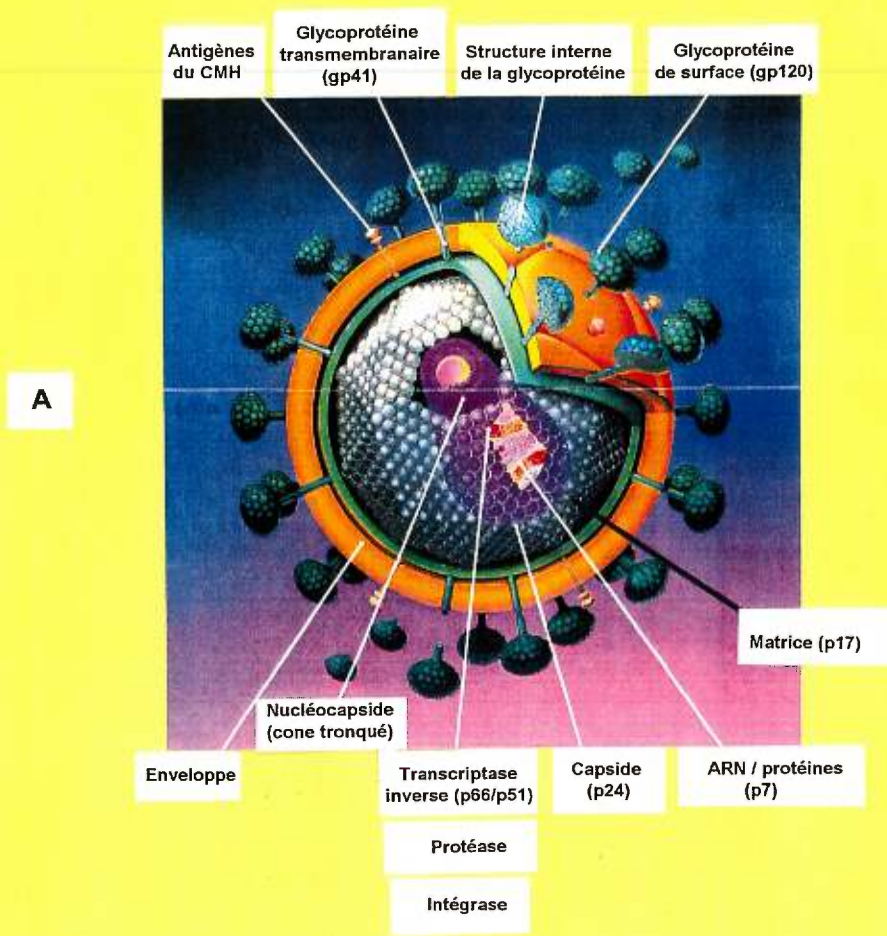
exogènes ou endogènes pouvant contenir ou non un oncogène et causant dans certains cas des leucémies et des sarcomes. Les lentivirus sont des virus exogènes responsables d'une variété de maladies neurologiques et immunologiques mais qui, par opposition aux oncovirus, ne sont pas impliqués directement dans des processus de transformation cellulaire ou de tumorigénicité (Coffin, 1991). Les spumavirus ou « foamy viruses » sont caractérisés *in vitro* par la formation de vacuoles dans les cultures cellulaires et ne semblent pas être associés à une pathologie quelconque.

Il y a deux groupes de rétrovirus humains : les virus de la leucémie humaine de type I et de type II appelés HTLV-I et HTLV-II qui appartiennent à la sous-famille des *Oncovirinae* et qui causent des leucémies et des lymphomes assez rares, et les virus de l'immunodéficience humaine, VIH-1 et VIH-2 qui appartiennent à la sous-famille des *Lentivirinae* et qui sont responsables du SIDA. Les deux groupes infectent principalement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Cependant, les HTLV transforment ces cellules *in vitro* et conduisent au développement de leucémies *in vivo* alors que les VIH sont plutôt cytopathiques et induisent *in vitro* la formation de cellules géantes multinucléées, ou syncytia, conduisant à la lyse cellulaire. Les deux groupes sont caractérisés par la présence d'une longue période (plusieurs années) entre le début de l'infection et l'apparition des symptômes cliniques, mais on ne peut parler de vraie période de latence dans le cas du VIH puisqu'il a été démontré récemment que le VIH se répliquait de façon très active durant cette période, et ce, spécialement dans les ganglions lymphatiques (Pantaleo *et al.*, 1993 ; Ho *et al.*, 1995).

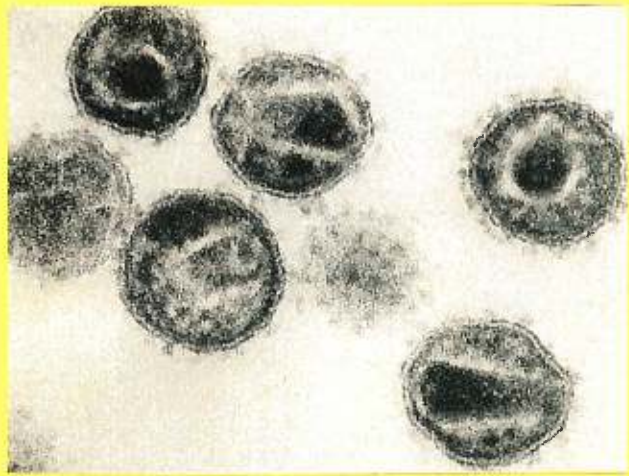
## 1.2 Morphologie du VIH

L'analyse au microscope électronique de coupes ultra-minces de cellules infectées par le VIH nous révèle que la particule virale d'un diamètre d'environ 110 nm est constituée d'une enveloppe, d'un nucléoïde et d'une matrice séparant l'enveloppe et le nucléoïde (Figure 1). L'enveloppe provient de la membrane cellulaire de la cellule-hôte suite au bourgeonnement de la particule virale. Elle est constituée d'une bicouche de phospholipides avec des projections en forme de boutons qui varient légèrement en forme et en taille d'une projection à l'autre (Nakai and Goto, 1996). Les projections elles-mêmes se divisent en trois parties : la tête, la tige et la base. Les projections sont composées de deux glycoprotéines : la gp120 retrouvée en surface et la gp41 qui est transmembranaire. La matrice est la partie située entre l'enveloppe et le nucléoïde et est formée de la protéine de matrice p17. Le nucléoïde est en forme de cône tronqué et est constitué de la protéine de la capsid p24 qui entoure les deux copies d'ARN viral lié à la protéine de la nucléocapsid p9. Dans le noyau on retrouve également les produits du gène *pol* incluant la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. Dans l'espace apparaissant clair au microscope électronique, situé entre la protéine de la matrice p17 et la protéine de la capsid p24, se retrouveraient les protéines p6 et Vpr. Le virion entraînerait aussi avec lui quelques protéines cellulaires telles que la  $\beta 2$  microglobuline, l'actine, l'ubiquitine et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui, pour certaines, feraient partie de l'enveloppe virale.

Une étude récente de particules virales au microscope électronique a permis d'identifier deux types de morphologie de virions immatures : la structure en forme de croissant et la structure en forme de beignes (Öhagen *et al.*, 1997). Les particules en forme de croissant possèdent une couche de matériel dense



A



B

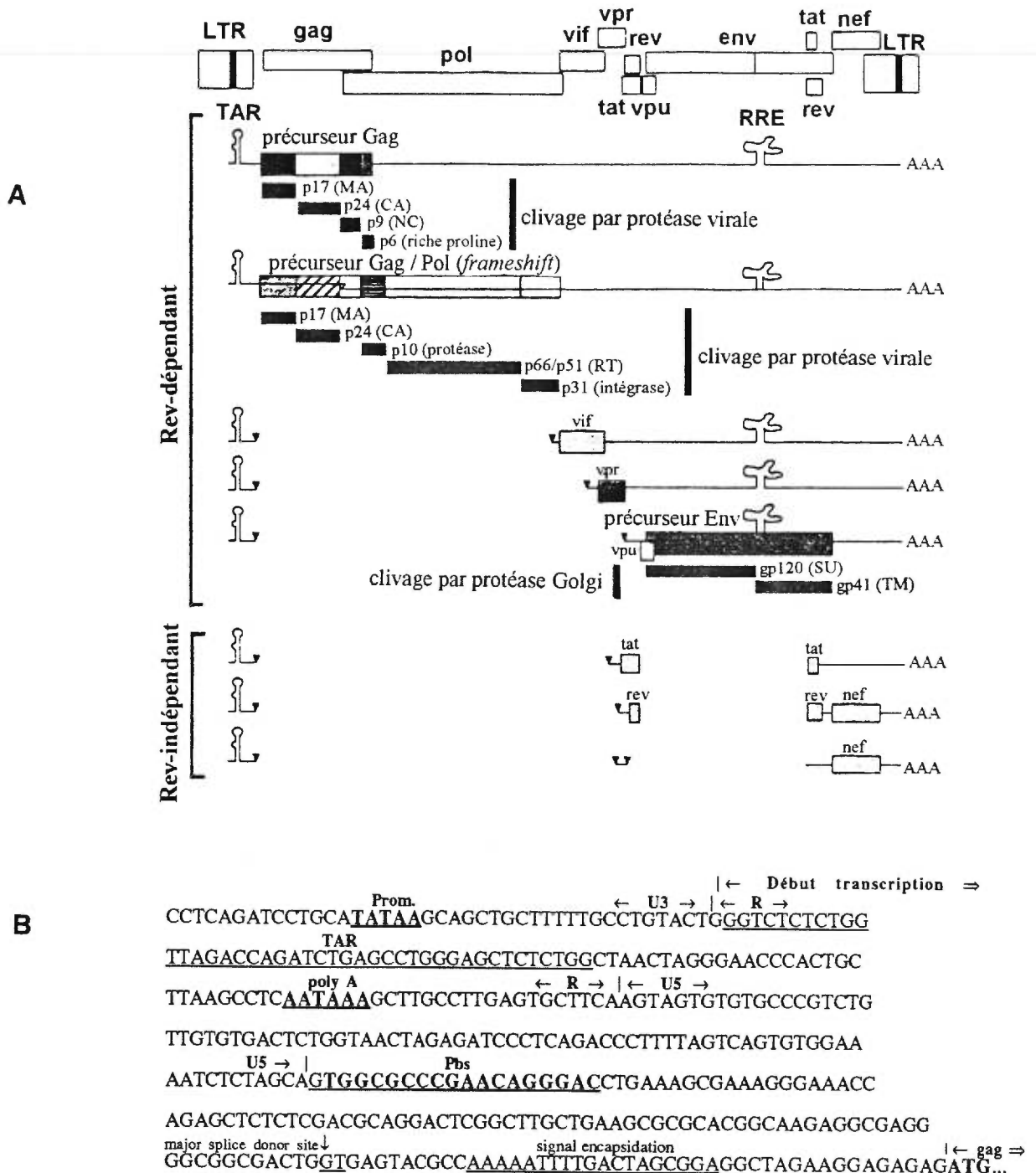
**Figure 1. Structure morphologique d'une particule virale.**

A) Représentation schématique du virion VIH. L'architecture structurale du VIH est composée de quatre éléments : l'enveloppe, la matrice, la capside et l'ARN génomique. B) Coupe ultramince de particules virales provenant d'une culture de cellules infectées (Gallo and Montagnier, 1988).

qui recouvre partiellement l'intérieur de l'enveloppe virale et dans lesquelles le centre est translucide aux électrons. Dans les particules en forme de beignes, la couche de matériel dense forme un anneau sous l'enveloppe virale entourant un centre qui est translucide aux électrons. Ces deux types de morphologies représenteraient des particules immatures en période de réarrangement accompagnant possiblement l'étape de clivage par la protéase et la maturation finale.

### 1.3 Structure du génome et protéines virales

Le génome du VIH est constitué de deux copies identiques d'ARN simple-brin positif d'une longueur variant de 9174 à 9749 nucléotides selon les isolats (Ratner *et al.*, 1985 ; Li *et al.*, 1992). L'ARN viral est rétrotranscrit en ADN par l'enzyme transcriptase inverse du virus. Le VIH possède la même organisation génomique de base que les autres rétrovirus : les gènes *gag*, *pol*, et *env* codant pour différentes protéines (protéines de structure et enzymes) et, à chaque extrémité de l'ADN viral, des éléments répétitifs (LTR : *long terminal repeat*) qui ne codent habituellement pas pour des protéines mais qui sont essentiels pour l'intégration et pour la régulation de l'expression des gènes viraux (Figure 2). Les extrémités LTR sont composées de trois régions différentes nommées U3, R et U5. Dans la région U3 on retrouve les éléments promoteurs et activateurs, dans la région R, les éléments pour initier la transcription de l'ARN comme l'élément TAR (*Trans-Activation Response*) et, dans la région U5, les signaux pour la polyadénylation des messagers viraux. En aval de la région U5, on retrouve une séquence de 18 nucléotides nommée le *primer binding site* (PBS) complémentaire à l'extrémité 3' de l'ARNt de la lysine servant d'amorce pour la transcriptase inverse lors de la première phase de rétrotranscription. Dans cette même partie du génome débute la transcription de l'ADN en ARNm.



**Figure 2. Représentation schématique du génome du VIH.** A) Organisation spatiale du génome viral et les différentes espèces d'ARN messagers avec leurs produits. B) Séquence nucléotidique de la région 5' « leader » non traduite du VIH-1 (IIIB) et localisation de certains éléments *cis* associés. Le schéma représenté en A) est tiré de Hahn *et al.*, 1994 et la séquence nucléotidique en B) est adaptée de Ratner *et al.*, 1985.



Entre le PBS et le codon d'initiation de la traduction du gène *gag* se retrouve une région dite *leader* qui contient le site donneur de l'épissage (*major splice donor*) à partir duquel sont générés les ARN sous-génomiques épissés, et le site du signal d'encapsidation permettant l'incorporation de l'ARN viral dans le virion. Plusieurs études ont tenté de localiser précisément les séquences faisant partie du signal d'encapsidation. Cette région du signal d'encapsidation serait composée de plusieurs structures en forme de stem-loop (Harrison and Lever, 1992 ; Clever *et al.*, 1995 ; McBride and Panganiban, 1996). Dernièrement, une étude a démontré que le site du signal d'encapsidation est un élément « multipartite » composé de structures secondaires spécifiques et fonctionnelles (McBride and Panganiban, 1996). Les auteurs de cette étude ont pu identifier deux sous-régions importantes pour l'encapsidation de l'ARN viral dont l'une est située près du PBS et l'autre entre le *major splice donor* et le codon d'initiation AUG du gène *gag*. Cette dernière jouerait un rôle dans la distinction entre les ARN viraux génomiques et sous-génomiques.

En plus des trois gènes énumérés plus haut, le VIH contient six autres gènes additionnels : les gènes *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vif* et *vpu* dont les trois premiers codent pour des protéines de régulation (Figure 2). L'expression du VIH-1 est essentiellement régulée par deux protéines virales, Tat et Rev qui sont de puissants *trans*-activateurs. Tat affecte quantitativement l'expression des protéines virales alors que Rev l'affecte plutôt qualitativement (Rosen et Pavlakis, 1990). La principale fonction de Tat est d'activer la transcription virale alors que Rev serait responsable de l'apparition dans le cytoplasme des ARNms non-épissés ou incomplètement épissés permettant ainsi la production des protéines de structure et des enzymes virales (Cullen, 1995). Tat et Rev sont indispensables pour la réplication virale. Nef a été initialement décrit comme étant un régulateur négatif (*negative factor*) de l'expression génique



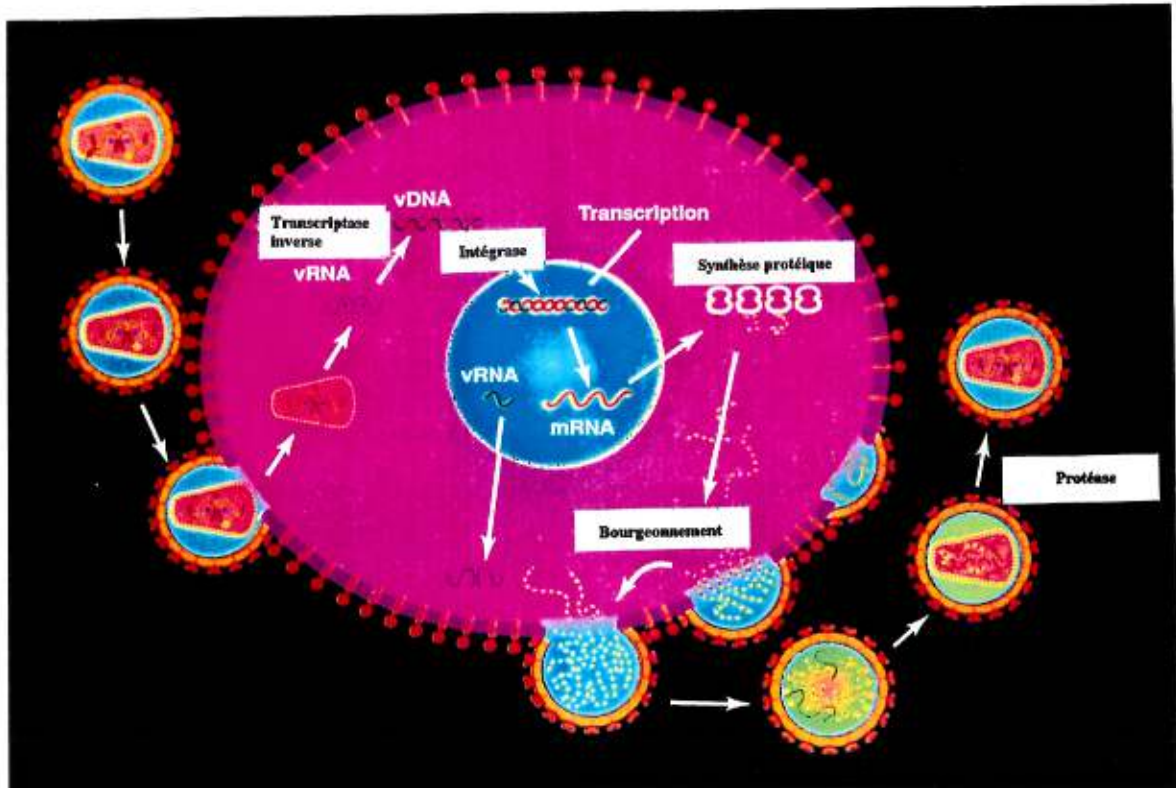
virale, cependant cette fonction demeure controversée. Nef, tout comme Vpu, réduit *in vitro* l'expression du récepteur cellulaire CD4 à la surface de la cellule. Bien que non essentiel à la réplication virale *in vitro*, Nef jouerait un rôle plus important dans la pathogénèse du virus *in vivo* (Kestler *et al.*, 1991). Vpu (*viral protein U*) est une protéine dite accessoire tout comme Vpr (*viral protein R*) et Vif (*viral infectivity factor*). Vpu faciliterait la libération des virions lors du bourgeonnement et assurerait l'assemblage adéquat et la maturation des particules virales (Subbramanian and Cohen 1994). Vif augmenterait l'infectivité des virions en agissant au niveau des stades tardifs de l'assemblage des particules virales. Des études ont démontré qu'en l'absence de Vif, les virions produits voient leur capacité d'établir une infection diminuée de 100 à 1000 fois (Strebel *et al.*, 1987). Vpr est une protéine que l'on retrouve associée au virion et qui favoriserait l'incorporation de l'ADN proviral dans le noyau des cellules qui ne se divisent pas comme les macrophages (Yao *et al.*, 1995). De plus, Vpr exercerait *in vitro* une activité de transactivation modérée et non-spécifique sur le LTR du VIH et sur d'autres promoteurs hétérologues (Cohen *et al.*, 1990). Vpr serait également impliquée dans la prévention de l'établissement *in vitro* de lignées cellulaires chroniquement infectées par le VIH apparemment en bloquant la division cellulaire par un arrêt du cycle mitotique en phase G<sub>2</sub>/M (He *et al.*, 1995).

Le produit du gène *gag* est synthétisé sous forme d'une polyprotéine précurseur qui, une fois incorporée dans le virion est clivée par la protéase virale en quatre sous-unités distinctes soit : la protéine de la matrice (MA) p17, la protéine de la capsid (CA) p24, la protéine de la nucléocapsid (NC) p9 reconnue comme étant importante pour l'encapsidation de l'ARN viral et la protéine riche en proline p6 qui serait importante pour l'assemblage et la libération des particules virales (Hahn, 1994). Le gène *pol* code pour trois enzymes fonctionnelles : la protéase (p10) impliquée dans les processus de

maturation des virions, la réverse transcriptase (p66/p51) incluant l'activité d'une polymérase ADN et d'une ribonucléase H responsable de la synthèse de l'ADN viral et l'intégrase (p32) responsable de l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule-hôte. Le produit du gène *pol* est une protéine de fusion gag-pol qui est ensuite clivée par la protéase virale. Finalement, le produit du gène *env* est une protéine précurseur (gp160) qui est clivée dans l'appareil de Golgi par une protéase cellulaire (probablement la furine) en deux sous-unités : gp120 (SU) et gp41 (TM) qui sont les glycoprotéines de l'enveloppe virale.

#### 1.4 Cycle de réplication du VIH

Le cycle de réplication du VIH débute par l'attachement du virus à la surface cellulaire par une interaction entre la gp120 de l'enveloppe virale et le récepteur cellulaire CD4 présent à la surface de certaines cellules du système immunitaire (Figure 3). Pour entrer dans la cellule, le VIH doit interagir avec un cofacteur membre de la famille des récepteurs de chimiokines. Un cofacteur requis pour l'infection avec des virus ayant un tropisme pour les cellules T a été identifié et nommé « fusine » (CXCR4) (Feng *et al.*, 1996). Un autre cofacteur requis pour l'entrée des virus ayant un tropisme pour les macrophages vient d'être identifié comme étant le récepteur CC-CKR-5 des  $\beta$ -chimiokines (Deng *et al.*, 1996). Dernièrement, des études ont montré que d'autres récepteurs de chimiokines pourraient également servir de co-récepteurs et que différentes souches de VIH utilisent différents récepteurs de chimiokines pour entrer dans la cellule (Berger, 1997). Une fois à l'intérieur de la cellule, l'ARN viral simple brin est converti en ADN viral double brin par la transcriptase inverse virale aussi appelée ADN polymérase ARN-dépendante. L'ADN viral nouvellement produit pénètre sous forme de complexe acide nucléique-protéines dans le noyau de la cellule infectée et peut s'intégrer dans le génome de la cellule à



**Figure 3. Cycle de réplication du VIH.** Le cycle débute par l'attachement du virus au récepteur cellulaire CD4. Le code génétique du virus (ARN) est converti en ADN par la transcriptase inverse virale. L'ADN viral est intégré dans le génome de la cellule par l'enzyme virale intégrase. Par la suite, le virus utilise les enzymes de transcription de la cellule-hôte pour synthétiser ses protéines et son ARN génomique qui serviront à former de nouveaux virus. Les virions sortent de la cellule par bourgeoisement et subissent une étape de maturation contrôlée par la protéase virale. Les virions sont alors infectieux et peuvent infecter une cellule voisine et ainsi répéter le cycle de réplication.

Diagramme de Upjohn

l'aide de l'intégrase du virus. L'ADN proviral peut être transcrit par l'ARN polymérase II de la cellule-hôte et produire les ARNm servant à la production des protéines virales ou les ARN génomiques qui seront encapsidés dans les nouvelles particules virales. L'assemblage des protéines et de l'ARN viral a lieu au niveau de la membrane cellulaire. Les virions sortent de la cellule par bourgeonnement et entrent dans une étape de maturation contrôlée par la protéase avant de devenir infectieux et de pouvoir commencer un nouveau cycle en infectant une autre cellule.

## 1.5 Traitement du SIDA

Le cycle de réplication du VIH comprend plusieurs étapes qui peuvent servir de cibles pour une intervention chimiothérapeutique. Même si les différentes étapes du cycle de réplication du VIH ont inspiré le développement de nombreux médicaments (De Clercq, 1995), seuls des agents inhibant l'étape de la transcription inverse comme l'AZT et le 3TC et la maturation des virions, comme les inhibiteurs de la protéase, ont été approuvés comme agents thérapeutiques pour le traitement du SIDA. Il y a présentement 11 médicaments approuvés par le *US Food and Drug Administration* (FDA) américain dont 7 inhibiteurs de la transcriptase inverse incluant 5 analogues de nucléosides : zidovudine (AZT), didanosine (ddl), zalcitabine (ddC), stavudine (D4T) et lamivudine (3TC), et 2 autres inhibiteurs qui ne sont pas des analogues de nucléosides : nevirapine et delavirdine. Les quatre inhibiteurs de la protéase approuvés par le FDA sont : le saquinavir, le ritonavir, l'indinavir et le nelfinavir (AIDS Treatment Data Network, 1997).

Cependant, l'utilisation de ces médicaments comporte des limitations dues à leurs différents effets toxiques, leur inefficacité à long terme et

l'émergence de souches résistantes de virus (Johnson, 1996). Pour ces raisons, il est maintenant admis que tout traitement initial doit inclure une combinaison d'au moins deux médicaments (BHIVA Guidelines Co-ordinating Committee, 1997) et de préférence une combinaison simultanée de deux analogues de nucléosides et d'un inhibiteur de protéase (AIDS Treatment Data Network, 1997). Les bénéfices immunologiques et virologiques d'un traitement utilisant deux ou trois médicaments en combinaison comparativement à l'utilisation d'un médicament en monothérapie ont été démontrés dans plusieurs études cliniques (Schooley *et al.*, 1996 ; AIDS Clinical Trials Group, 1996 ; Staszewski *et al.*, 1997). Cependant les effets secondaires reliés à ces traitements sont nombreux et souvent très désagréables : anémie, neutropénie, atteinte des nerfs périphériques, pancréatites, lithuases urinaires, maux de tête, diarrhées, vomissements, sans compter la complexité de la posologie (AIDS Treatment Data Network, 1997). Récemment, une nouvelle approche faisant appel à l'utilisation d'oligonucléotides synthétiques pour moduler l'expression des gènes a été explorée comme stratégie antivirale contre le VIH et plusieurs études ont démontré le potentiel anti-VIH de ces composés.

## **2.0 Définition de la thérapie antisens**

En général, il est nécessaire de synthétiser et d'évaluer environ 10 000 nouveaux produits afin de découvrir une nouvelle substance active qui pourrait éventuellement être intéressante pour une application thérapeutique. La plupart des médicaments présentement sur le marché ont été généralement développés pour interagir avec des protéines de structure, des enzymes ou des récepteurs (Uhlmann and Peyman, 1990). Quelques médicaments ont pour cible le matériel génétique, comme les agents intercalants utilisés en chimiothérapie antitumorale, mais ces anticancéreux exercent leurs effets via l'inhibition d'enzymes qui interviennent précisément sur l'ADN, comme les

topoisomérases (Hélène, 1997). Dans le cas de certains stéroïdes, l'expression des gènes est visée en agissant sur des protéines de contrôle telles que les facteurs de transcription (Hélène and Saison-Behmoaras, 1994).

La thérapie antisens réfère à l'utilisation d'oligonucléotides synthétiques pour moduler sélectivement l'expression des gènes en agissant directement sur les acides nucléiques. Ces composés sont conçus de manière à être complémentaires à une séquence cible d'un ARN messager ou d'un ARN viral afin de bloquer la traduction ou la transcription inverse s'il y a lieu. L'interaction entre un oligodésoxynucléotide (ODN) et une séquence complémentaire d'un acide nucléique monocaténaire dépend de la formation de liaisons hydrogène entre les bases des deux brins complémentaires et repose sur les règles du code génétique tel que décrit par Watson et Crick en 1953. Ainsi, basée sur la spécificité de l'appariement des bases, il est donc possible de synthétiser des ODNs pouvant s'associer sélectivement avec une séquence d'acide nucléique et alors d'agir spécifiquement sur un gène donné. Des calculs statistiques montrent qu'un oligodésoxynucléotide d'une longueur de 15-17 nucléotides correspondrait à une séquence unique dans tout le génome humain ( $\sim 3 \times 10^9$  paires de bases), suggérant qu'une intervention extrêmement sélective peut être envisagée par l'utilisation d'ODNs antisens (Stein and Cheng, 1993).

Les oligonucléotides synthétiques peuvent être synthétisés pour s'apparier de façon spécifique à une séquence complémentaire sur un ARN selon l'appariement des bases de Watson-Crick (stratégie antisens, ribozymes) ou à un ADN double brin pour former une triple hélice dans les régions polypurine-polypyrimidine selon les règles d'appariement des bases de Hoogsteen (stratégie antigène). Dans le cas de la stratégie antigène, les bases T, A, C avec un proton additionnel ( $C^+$ ) et G de l'oligodésoxynucléotide se lient



au brin purine composé des bases A et G de la double hélice dans le grand sillon par deux liaisons hydrogènes pour former des triplets de bases (T × A-T, C<sup>+</sup> × G-C, G × G-C, A × A-T).

On peut synthétiser un oligonucléotide-leurre pour contrôler l'expression d'un gène sans se fixer sur le gène lui-même (Hélène, 1997). Dans ce cas, des séquences d'oligonucléotides en doubles brins sont utilisées pour agir comme des ligands compétitifs pour des protéines qui se fixent naturellement à l'ADN ou à l'ARN sur des séquences spécifiques, comme des facteurs de transcription et des enzymes de réplication (stratégie sens) (Blumenfeld and Vasseur, 1994). Lorsque les oligonucléotides-leures sont dirigés contre les protéines d'un virus ou d'un autre parasite pathogène, cette approche devient alors sélective. Les oligonucléotides peuvent également se lier à une protéine dont l'activité biologique normale n'implique pas une interaction avec les acides nucléiques, comme les récepteurs et les facteurs de croissance, pour former des complexes très stables et ainsi bloquer leur fonction (approche aptamère).

Un autre avantage de l'approche antisens est la relative simplicité avec laquelle les médicaments oligonucléotidiques peuvent être rationnellement conceptualisés. Les stratégies de conceptualisation des drogues conventionnelles reposent souvent sur l'identification des fonctions d'une protéine et de ses interactions avec un récepteur ciblé. Or, la complexité de la structure tri-dimensionnelle des médicaments et des récepteurs, et souvent, le peu d'information disponible sur la relation structure-fonction font en sorte que la conception de ces médicaments est un processus long et difficile (Rojanasakul, 1996) nécessitant de grandes quantités de protéines cibles ainsi que l'utilisation d'appareils coûteux et difficilement accessibles pour effectuer des analyses de structure par cristallographie (rayons X) ou à l'aide d'un

spectromètre de RMN. De plus, les protéines possèdent plusieurs domaines qui ont des fonctions variées, et différentes protéines partagent des domaines communs. Alors, l'identification des interactions est relativement empirique et la spécificité des interactions souvent limitée. Dans l'approche antisens, il s'agit de connaître la séquence nucléotidique de l'acide nucléique que l'on veut cibler pour synthétiser l'inhibiteur à partir de réactifs de bases disponibles commercialement. Des réactifs de plus en plus nombreux et versatiles ont été développés au cours des dernières années ainsi que des appareils de synthèse de plus en plus abordables financièrement et performants.

### **3.0 Expression des gènes en protéines chez les eucaryotes**

Les gènes sont transmis sous forme de séquences d'acides nucléiques et leur fonction par l'expression sous forme de protéines. La réplication est le phénomène par lequel l'information génétique est retransmise et consiste en la duplication de l'acide nucléique double-brin résultant en une copie identique au brin original. L'information génétique emmagasinée et transmise par l'ADN, s'exprime en deux étapes : la transcription et la traduction. La transcription génère un ARN simple-brin (ARNm) avec une séquence identique (excepté que la base thymidine est remplacée par l'uracile) à un des brins du duplex d'ADN. La traduction consiste en la conversion de la séquence nucléotidique de l'ARNm en séquence d'acides aminés formant la protéine. L'ARNm transporte des messages spécifiques et précis du noyau vers les sites de synthèse protéique situés dans le cytoplasme.

L'expression des gènes est contrôlée par différentes stratégies de régulation intervenant à différents niveaux. Le premier niveau de régulation a lieu avant la transcription et dépend de la configuration locale de l'ADN, de



l'interaction de la chromatine avec la matrice nucléaire et du degré de méthylation. Le deuxième niveau de régulation se situe au niveau de la transcription-même par la présence de séquences dites promoteurs-enhanceurs et par l'intervention de protéines régulatrices, appelées facteurs de transcription, qui peuvent agir soit comme activateurs ou comme répresseurs de l'expression génétique. La structure de l'ARNm produit détermine la demi-vie de ce dernier dans la cellule et ainsi peut également représenter un facteur important dans l'expression des gènes. De même, l'épissage différentiel des ARN précurseurs hétérogènes qui a lieu dans le noyau, permet la production de différents ARN messagers à partir d'un même gène et constitue une autre stratégie employée par la cellule pour agir au niveau de l'expression génétique. Lors de l'exportation de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme, d'autres mécanismes de contrôle peuvent également intervenir. Finalement, un troisième niveau de régulation a lieu au niveau de la traduction par la présence entre autres de boucles (*pseudoknots*) qui provoquent un changement dans le cadre de lecture du ribosome (*frameshift*) (Cann, 1993).

#### **4.0 Régulation de l'expression des gènes par des transcrits**

##### **antisens naturels**

La première démonstration de la suppression de la traduction par un antisens ARN a été produite en 1963 dans des extraits acellulaires par l'équipe de Singer *et al.* (1963). Ils ont démontré que la synthèse de polyphénylalanine en réponse à l'acide polyuridylique comme amorce dans les extraits cellulaires était complètement bloquée si l'acide polyadénylique était présent dans le mélange de réaction de la traduction. Plusieurs années plus tard, d'autres études décrivaient également l'arrêt de la traduction par des ARN complémentaires à différents ARN cellulaires (Daugherty *et al.*, 1989). Le fait que la traduction des ARNm pouvait être bloquée par des ARN

complémentaires a été utilisé par Paterson *et al.* en 1977 et par Hastie and Held en 1978 pour effectuer le criblage de clones par une technique désignée la traduction arrêtée par des hybrides (*hybrid arrested translation*). Par la suite, il est apparu que les ARN complémentaires étaient capables de moduler les événements cellulaires et qu'ils consistaient en un important mécanisme de régulation *in vivo*. L'utilisation de transcrits antisens naturels pour la régulation de l'expression des gènes a beaucoup été décrite chez les procaryotes. Par exemple il s'est avéré que la réplication et le nombre de copies plasmidiques étaient contrôlés par des transcrits d'ARN complémentaires des plasmides ColE1 de *Escherichia coli* (Lacatena and Cesareni, 1981 ; Nordstrom, 1990). De même, les plasmides IncF11 de *E. coli* (Brady *et al.*, 1983) et les plasmides pT181 de *Staphylococcus aureus* (Kumar and Novick, 1985) possèdent un mécanisme de contrôle par des ARN complémentaires. L'inhibition de la traduction de l'ARNm de la transposase Tn10 de *E. coli* a également été démontrée comme résultant de la présence d'un ARN complémentaire à son extrémité 5' (Simons *et al.*, 1983). Shine and Delgarno (1974) démontraient que l'expression du gène OmpF chez *E. coli* était régulée par un antisens ARN complémentaire au site d'attachement du ribosome et au codon d'initiation.

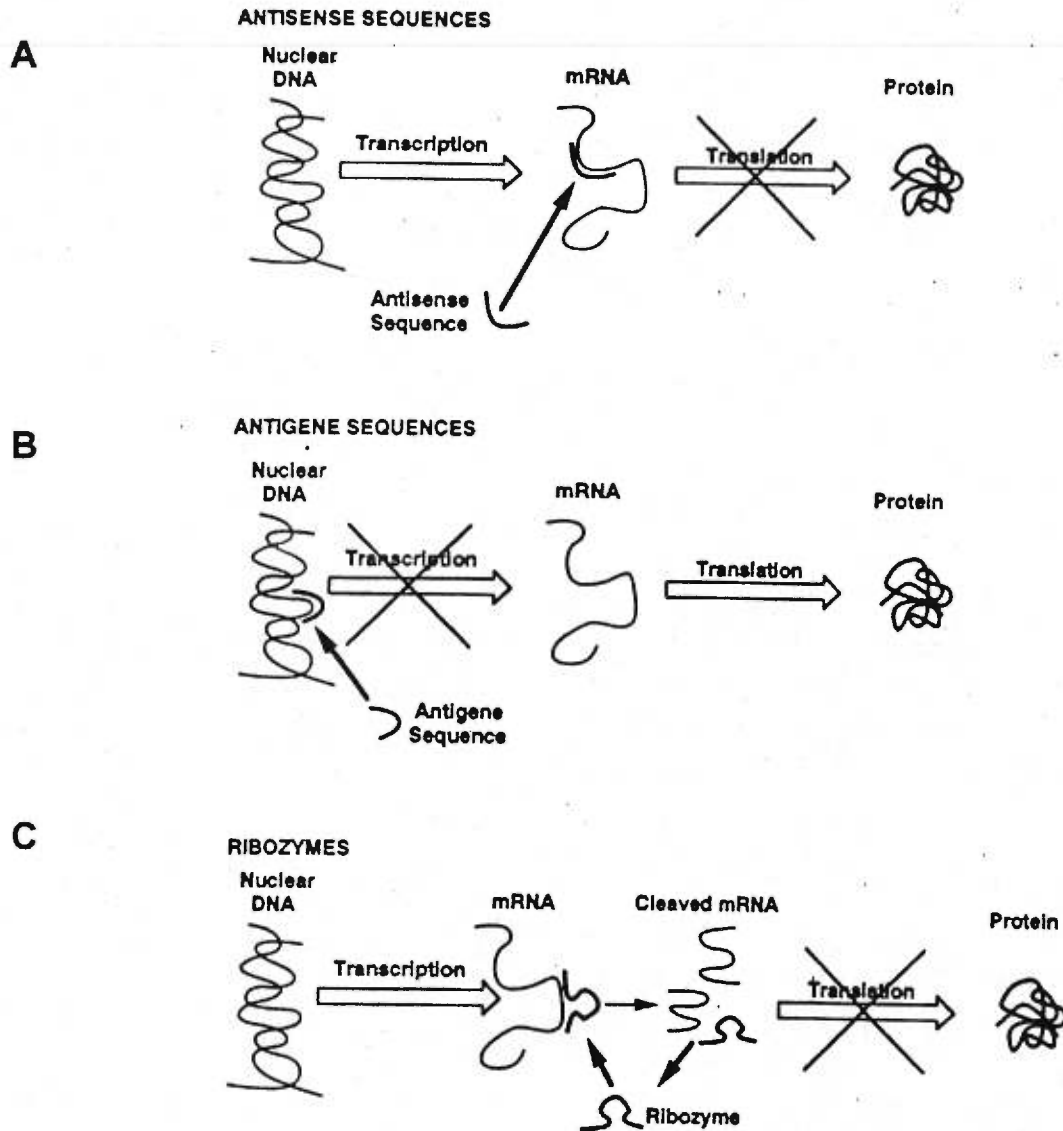
Récemment, la régulation de l'expression génétique par des ARN antisens a également été décrite chez les eucaryotes. On a noté la présence de petits ARN nucléaires (snRNAs) comprenant des séquences complémentaires situées à la jonction intron-exon de l'ARN non-épissé (Lerner *et al.*, 1980) et de petits ARN nucléolaires (snoRNAs) comprenant des séquences complémentaires à certaines séquences dans l'ARN ribosomal mature (Bachellerie *et al.*, 1995). Des ARN antisens peuvent être produits directement à l'intérieur d'une cellule à l'aide d'une construction génétique dans laquelle tout ou une partie d'un gène (ou d'un ADNc) est placé, dans une orientation opposée à celle du gène lui-même, sous le contrôle d'un promoteur, inducible

ou non, qui règle l'expression de l'ARN antisens (Hélène and Saison-Behmoaras, 1994). Des constructions artificielles d'ARN antisens se sont avérées également efficaces pour réguler l'expression des gènes dans différents systèmes cellulaires procaryotiques et eucaryotiques. Ces résultats ont donné naissance à l'élaboration de l'approche antisens utilisant de courts fragments d'ADN (oligodésoxynucléotides antisens).

## 5.0 Mécanismes d'action des oligonucléotides synthétiques

On peut classer les oligonucléotides synthétiques en trois principales sous-classes d'agents thérapeutiques (séquence ARN et ADN antisens, séquences antigènes et ribozymes) selon leur mécanisme d'action (Figure 4). À cette classification nous pourrions ajouter une quatrième catégorie : les séquences sens, qui exercent leur mécanisme au niveau des protéines et qui peuvent être des oligonucléotides simple-brin ou double-brin. La stratégie antisens fait appel à différentes approches incluant l'utilisation des ARN antisens, des oligonucléotides ADN antisens et des ribozymes. Cependant l'utilisation des oligonucléotides ADN antisens est de loin la technologie antisens la plus étudiée.

Les oligonucléotides antisens sont des dérivés d'acides nucléiques qui se lient principalement aux ARN messagers cytosoliques et sont habituellement de courtes séquences d'acides désoxynucléiques. Ils agissent principalement au niveau de la traduction en bloquant l'initiation de la traduction ou en formant

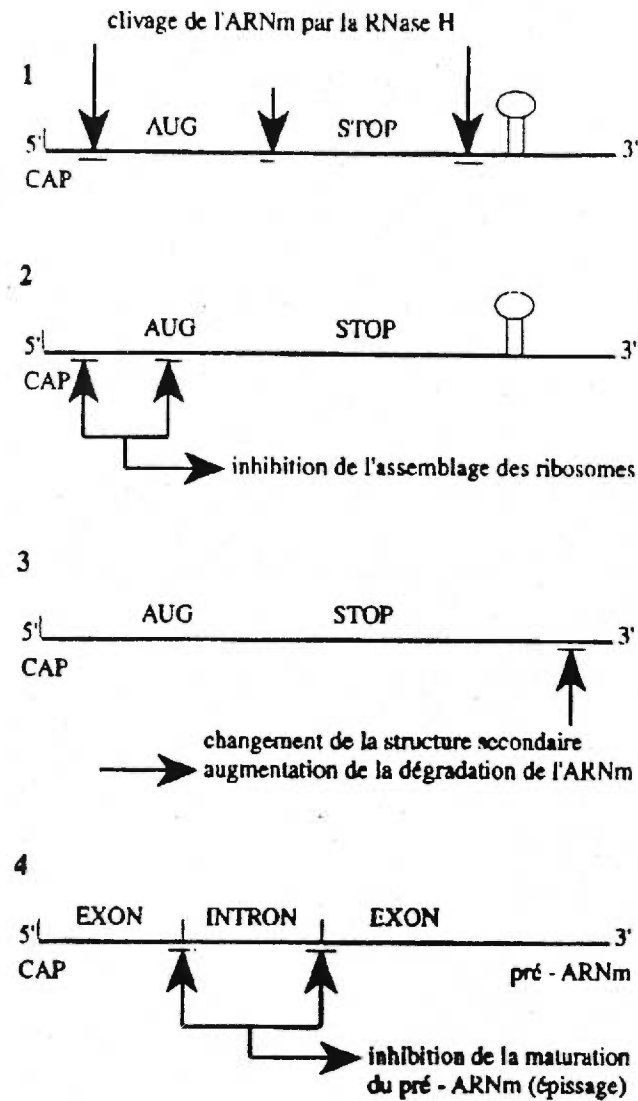


**Figure 4. Mécanismes d'action des trois sous-classes d'oligonucléotides thérapeutiques.** A) Les séquences antisens reconnaissent et se lient à un ARN messenger pour inhiber la synthèse protéique. B) Les séquences antigènes reconnaissent et se lient à l'ADN génomique pour inhiber la synthèse de l'ARN messenger et par conséquent la synthèse protéique. C) Les ribozymes reconnaissent et se lient à un ARN messenger et catalysent son clivage inhibant ainsi la synthèse protéique. Schéma tiré de Putnam *et al.*, 1996.

un hybride ADN/ARN reconnu comme substrat par la RNase H cellulaire résultant en une inhibition de la synthèse de la protéine (Figure 5). Les oligonucléotides antisens peuvent également causer une augmentation de la dégradation de l'ARNm en modifiant la structure secondaire de l'ARN ciblé. Finalement, ils peuvent agir aussi au niveau de l'épissage des ARNm et bloquer ainsi la maturation du pré-ARNm.

Les ARN antisens sont souvent produits à l'intérieur de la cellule par transfection de gènes antisens qui seront par la suite transcrits. Dans ce cas, l'hybridation entre l'ARN antisens et l'ARN messenger peut avoir lieu dans le noyau et peut mener à l'inhibition de l'expression des gènes avant les processus de traduction. Les ARN antisens peuvent aussi être injectés dans la cellule et dans ce cas, ils interfèrent plutôt avec les événements dans le cytoplasme (Hélène and Toulmé, 1990). Les ARN antisens sont en général de longs fragments d'ARN et ont surtout été utilisés en recherche pour mieux comprendre le mécanisme des processus post-transcriptionnels dans l'expression des gènes et leur importance biologique (Cirullo *et al.*, 1992). Les ARN antisens se lient aux ARN messagers ou aux pré-ARN messagers pour former des hybrides ARN/ARN et peuvent donc agir au niveau des processus d'épissage, de transport des ARNs vers le cytoplasme et de la traduction.

Lorsque les oligonucléotides sont dirigés contre l'ADN, on parle de stratégie antigène. Les oligonucléotides ADN peuvent intervenir au niveau de la transcription en s'hybridant à l'ADN double-brin pour former une triple hélice dans les régions riches en liaisons A-T ou G-C (Figure 4 B). L'hybridation résulte en une inhibition de la transcription soit en empêchant la liaison de protéines spécifiques se liant à l'ADN qui sont requises pour la transcription, ou en bloquant directement la transcription en ARNm. Ces molécules ne

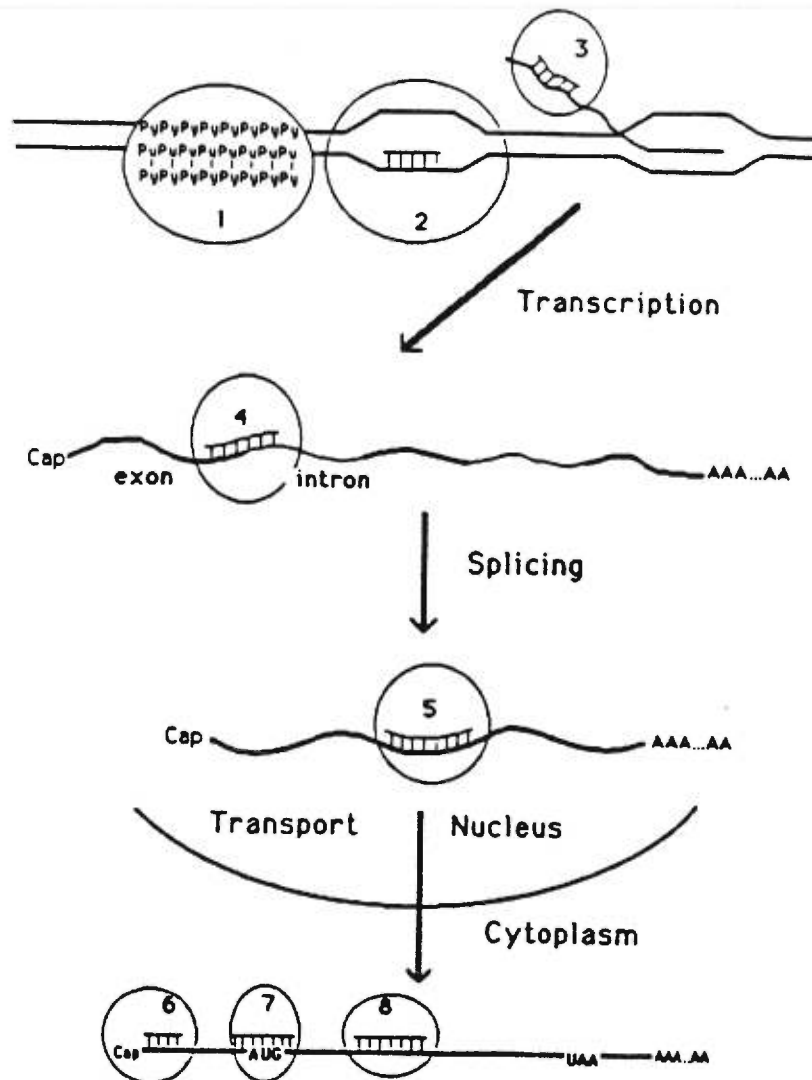


**Figure 5. Mécanismes d'action des oligonucléotides antisens.** Les oligonucléotides sont représentés par de petites barres. 1) Induction de clivages de l'ARNm grâce à la RNase H ; 2) Inhibition de l'assemblage correct de la machinerie de traduction ; 3) Augmentation de la dégradation de l'ARN en altérant la structure secondaire de l'ARNm ; 4) Inhibition de la maturation du pré-ARNm. Schéma tiré de Hélène, 1997.

présentent donc pas un potentiel de spécificité aussi élevé que les molécules antisens (Maher III, 1989).

Finalement, les ribozymes sont des ARN possédant une structure tridimensionnelle particulière dotés d'une activité catalytique qui peuvent induire des coupures dans un ARN choisi pour cible (Figure 4 C). Ces catalyseurs ou ribozymes, peuvent, comme les ARN antisens, être produits *in situ* à l'aide de constructions génétiques (Taira and Nishikawa, 1992) ou être introduits dans la cellule. On ajoute de chaque côté du site catalytique des séquences antisens qui serviront à reconnaître l'ARN ciblé selon le principe de l'appariement des bases. Quatre principaux types de ribozymes ont été identifiés : tetrahymena group 1, RNaseP, hammerhead et hairpin. Les ribozymes « hammerhead » proviennent de viroïdes et de virusoïdes de plantes et sont les plus utilisés. Les ribozymes sont classés selon leurs origines biologiques et leurs motifs catalytiques.

La figure 6 résume les différentes cibles pouvant faire l'objet de l'action des oligonucléotides synthétiques (Hélène and Toulmé, 1990). Ainsi, les oligonucléotides ADN peuvent intervenir au niveau de la transcription en s'hybridant à l'ADN double-brin pour former une triple-hélice (1), à la boucle ouverte par l'ARN polymérase II (2) ou sur l'ARN nouvellement synthétisé (3). Les oligonucléotides ADN antisens, ainsi que les ARN antisens, peuvent bloquer les processus d'épissage en s'appariant à une séquence située à la jonction intron-exon (4) ou bloquer le transport des ARNm du noyau vers le cytoplasme (5). Le mécanisme d'action le plus connu est sans doute l'inhibition de la traduction. Les molécules antisens (ODNs et ARN antisens) peuvent agir au niveau de la traduction par différents mécanismes. L'inhibition de la traduction peut survenir par un blocage physique au niveau de l'ARNm. La fixation d'une molécule antisens entre la coiffe (CAP) et le codon d'initiation



**Figure 6. Résumé des sites pouvant faire l'objet de l'action des oligonucléotides dans une cellule eucaryote.** Les oligonucléotides antisens peuvent interférer à différents niveaux lors de l'expression génique. Voir les explications dans le texte. Schéma tiré de Hélène and Toulmé, 1990.



AUG (6), ou dans une région recouvrant ce codon d'initiation (7), empêche l'assemblage correct de la machinerie de traduction (protéines spécifiques de la coiffe, fixation des sous-unités ribosomales, ou glissement de la sous-unité 40S du ribosome le long de la région 5' non codante). Si la molécule antisens se fixe au niveau de la région codante (8), elle peut empêcher le glissement du ribosome le long de l'ARNm ou provoquer une dégradation de l'hybride par des enzymes.

Dans le cas des oligonucléotides antisens, c'est l'enzyme cellulaire ribonucléase H qui, après avoir reconnu les hybrides ADN/ARN, hydrolysera les liaisons phosphodiester de la partie ARN. Cette activité enzymatique est présente dans toutes les cellules puisqu'elle est nécessaire pour éliminer les amorces ARN utilisées lors de la réplication de l'ADN (Hélène and Saison-Behmoaras, 1994). Pour ce qui est des antisens ARN, il semble, du moins dans certaines cellules, qu'ils exposent les ARN auxquels ils se lient à de puissantes enzymes de dégradation. Par exemple, dans des cellules d'embryon de souris, des nucléases cellulaires coupent notamment les ARN messagers aux points de liaison avec les ARN antisens (Weintraub, 1991). Un mécanisme particulier aux ARN antisens est la substitution, par la cellule, des adénines en inosines de l'ARN messager auquel il se lie, modifiant ainsi le message génétique de l'ARN messager ce qui pourrait l'empêcher de coder une protéine.

## 6.0 Thérapie antisens et VIH

L'utilisation des oligonucléotides antisens comme agents anti-VIH a été démontrée pour la première fois il y a déjà plus de dix ans (Zamecnik *et al.*, 1986). Depuis, plusieurs approches ont été évaluées dans différents modèles cellulaires. C'est l'approche antisens qui a été la plus utilisée et de nombreuses

publications faisant mention d'une inhibition de la réplication virale par des oligonucléotides antisens ont été écrites (voir section 7.1). Ces dernières années, un effort a été porté particulièrement sur la compréhension des mécanismes d'action de ces molécules antisens sur le VIH. Deux études récentes portant sur les multiples mécanismes d'inhibition de GEM 91 (Yamaguchi *et al.*, 1997) et un ODN anti-rev (Zelphati *et al.*, 1994) démontrent la complexité des effets des oligonucléotides antisens sur la réplication du VIH.

D'autres approches ont été utilisées avec succès pour inhiber la réplication du VIH. Par exemple, des ribozymes dirigés contre différentes régions du génome du VIH ont démontré une activité antivirale *in vitro* (Ojwang *et al.*, 1992 ; Yamada *et al.*, 1994 ; Sun *et al.*, 1995a ; 1995b ; Yu *et al.*, 1995 ; Akhtar and Rossi, 1996). L'équipe de Flossie Wong-Staal s'est intéressée de façon particulière à l'utilisation des ribozymes comme agents anti-VIH et ils ont débuté des essais cliniques avec une de leurs constructions. Leurs expériences *in vitro* avaient démontré qu'il était possible de protéger des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> provenant du sang périphérique contre une infection par le VIH en transfectant des constructions rétrovirales exprimant un ribozyme dirigé contre une séquence dans la région U5 du génome du VIH (Yamada *et al.*, 1994). De même, des résultats encourageants ont été obtenus dans des cellules différenciées à partir de cellules-souches/progénitrices CD34<sup>+</sup> provenant de sang de cordon foetal humain exprimant un ribozyme dirigé contre le VIH (Yu *et al.*, 1995). Ces cellules, après avoir été infectées par la souche HIV-1/Bal, montraient une réduction dans la réplication virale comparativement aux contrôles.

L'utilisation d'antisens ARN a également été étudiée pour bloquer la réplication du VIH. Des antisens ARN dirigés contre différentes cibles ( gènes

*gag, tat, rev, env,...*) exprimés par des constructions plasmidiques ont été capables d'inhiber la réplication du VIH dans des lignées cellulaires humaines (Jurkat : lymphocytes T) pendant 2 semaines lorsque la dose virale était élevée et jusqu'à 5 semaines avec des doses virales plus faibles (Sczakiel and Pawlita, 1991). De même, dans une autre étude, la réplication virale a été bloquée jusqu'à 5 semaines post-infection dans les cellules Jurkat exprimant de façon stable des ARN antisens dirigés contre *tat* et *rev* (Sczakiel *et al.*, 1992). Un ARN antisens dirigé contre la séquence correspondant à l'élément TAR dans le 5'-LTR et une partie du signal de polyadénylation dans le 3'-LTR a aussi été introduit dans des lignées cellulaires hématopoïétiques par un vecteur viral (parvovirus) (Chatterjee *et al.*, 1992). Dans les cellules exprimant l'ARN antisens, une diminution de la quantité d'ARNm viral a été observée ainsi qu'une inhibition atteignant 94 à 98 % pendant 20 jours. Une baisse du titre infectieux de plus de 99 % a également été notée. Dans cette approche, ainsi que celle des ribozymes, les facteurs limitants sont l'introduction et l'expression des ARN ou ribozymes dans les cellules et les problèmes liés à l'utilisation de vecteurs viraux.

## **7.0 Applications thérapeutiques des oligonucléotides antisens**

Les oligonucléotides antisens se sont avérés d'intéressants outils en biologie cellulaire et moléculaire pour étudier le rôle de gènes particuliers ou de protéines dans la physiologie cellulaire. Mais c'est surtout à cause de leur potentiel thérapeutique que les oligonucléotides antisens ont attiré beaucoup d'intérêt au cours des dernières années. Ils ont surtout été synthétisés pour cibler un ARN messager ou un ARN viral. Les infections virales et le cancer sont les deux principaux champs d'application pour ces nouveaux médicaments. Néanmoins, les oligonucléotides synthétiques ont également été évalués comme agents thérapeutiques pour d'autres maladies comme l'arthrite

rhumatoïde, la resténose (Bennett and Schwartz, 1995), les allergies, l'hypertension, certaines maladies du système nerveux (Chiasson *et al.*, 1996) et certaines infections parasitaires (Hélène and Saison-Behmoaras, 1994 ; Askari and McDonnell, 1996 ; Putnam, 1996).

## 7.1 Activité antivirale des oligonucléotides antisens

La première expérience démontrant clairement le potentiel thérapeutique des oligonucléotides antisens a été réalisée sur le virus du sarcome de Rous (RSV) par Zamecnick and Stephenson en 1978. Ils ont été capables avec un oligomère de 13 nucléotides complémentaire à l'extrémité 3' de l'ARN viral, d'inhiber la croissance du virus dans des cultures cellulaires. La réussite de ces essais a ouvert la porte à l'utilisation des ODNs pour d'autres infections virales. Ainsi, il a été possible de bloquer l'effet cytopathique du virus de la grippe de type A et C sur des cellules en culture (Leiter *et al.*, 1990), d'inhiber la réplication du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1 ; Poddevin *et al.*, 1994), du virus du papillome humain (HPV-6 et HPV-11 ; Cowser *et al.*, 1993), du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1 ; Agrawal and Tang, 1992), du cytomégalovirus humain (Anderson *et al.*, 1996), du virus Epstein-Barr (Pagano *et al.*, 1992), du virus respiratoire syncytial (RSV ; Jairath *et al.*, 1997), du virus de l'hépatite B humain (HBV ; Korba et Gerin, 1995) et de l'hépatite C humain (HCV ; Vidalin *et al.*, 1996). L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'infection virale qui a été le plus ciblée par les oligonucléotides antisens. Certains oligos sont présentement évalués en essais cliniques (Tableau I).

La première étude rapportant l'activité antivirale des oligonucléotides antisens contre le VIH a été publiée en 1986 par Zamecnick et son équipe. Par

Tableau I

Oligonucléotides phosphorothioates présentement à l'essai chez l'humain pour une application antivirale

Nom de l'oligonucléotide	Cible virale	Application	Essai clinique	Compagnie
ISIS 2922	cytomégalovirus humain (CMV)	rétinite causée par CMV chez les patients sidéens	phase III	ISIS Pharmaceuticals, Carlsbad, CA, USA
ISIS 2105	virus du papillome humain (VPH)	condylomes génitaux	phase II	ISIS Pharmaceuticals, Carlsbad, CA, USA
GEM 91	virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1)	SIDA	phase II	Hybridon Inc., Worcester, MA, USA
GPI2A	VIH-1	SIDA	phase I	Novapharm
AR177*	intégrase du VIH-1	SIDA	phase I	Aronex Pharmaceuticals Inc., USA
Gps0193*	VIH-1	SIDA	phase I	

\* Ces oligonucléotides fonctionnent comme aptamères et n'agissent donc pas au niveau de l'ARN messenger.

Tiré de : Akhtar and Rossi, 1996 et Akhtar and Agrawal, 1997.

la suite, de nombreux oligonucléotides ADN antisens ont été évalués contre l'ARN du VIH dans différents systèmes cellulaires incluant des lignées lymphocytaires humaines ou des cultures cellulaires primaires qui étaient infectées *de novo* ou chroniquement par différents isolats du VIH. Plusieurs sites du génome viral ont été ciblés dont les principaux sont des régions codantes pour les protéines de régulation Rev (Matsukura *et al.*, 1989) et Tat (Liszewicz *et al.*, 1992), et les protéines de structure Gag, dont GEM 91 (Agrawal and Tang, 1992) et GPI 2A (Anazodo *et al.*, 1995a) et Env (Kinchington *et al.*, 1992). Certains travaux ont porté sur l'inhibition de la réplication du VIH *in vitro* à l'aide d'ODN antisens dirigés contre l'ARN codant pour une protéine accessoire comme Nef (Poulin *et al.*, 1994) ou l'ARN Pol qui code pour les enzymes virales (Kinchington *et al.*, 1992). Des régions non-codantes dans la partie 5' du LTR (Bordier *et al.*, 1992), la région de l'élément TAR (Vickers *et al.*, 1991) ou du *Rev-Responsive Element* (Li *et al.*, 1993) ont aussi été ciblées.

Deux séquences antisens se sont avérées très efficaces pour inhiber la réplication virale *in vitro* : un oligomère de 28 nucléotides dirigé contre l'extrémité 5' de l'ARNm codant pour la protéine Rev et un oligomère de 25 nucléotides, nommé GEM 91 pour *Gene Expression Modulator 91*, dirigé contre le site d'initiation de la traduction de l'ARNm codant pour la protéine Gag. Parmi toutes les séquences antisens évaluées, seul GEM 91 a été évalué dans des modèles animaux et dernièrement dans des essais cliniques chez des sujets infectés par le VIH (Zhang *et al.*, 1995). Les études pharmacocinétiques de ce composé sont décrites plus en détail dans la section 9.0 de ce chapitre.

## 7.2 Activité antitumorale des oligonucléotides antisens

La transformation de cellules normales en cellules malignes passe par plusieurs étapes et implique l'activation de proto-oncogènes ainsi que l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et de gènes de réparation des dommages de l'ADN (Lewin, 1994). Les proto-oncogènes sont des gènes faisant partie du génome humain qui, lorsqu'ils subissent certaines mutations ou échappent aux mécanismes de régulation de leur expression, peuvent causer la transformation cellulaire. On parle alors d'oncogènes. Les proto-oncogènes jouent un rôle important dans la croissance normale et la différenciation des cellules. Ils ont le potentiel de coder, ou de réguler des gènes qui codent, pour des produits qui peuvent transformer les cellules normales en cellules malignes. Dans les cellules malignes, les proto-oncogènes peuvent être exprimés en excès ou être mutés ce qui conduit à une multiplication cellulaire continue et à un niveau de faible différenciation cellulaire. En théorie, si l'expression d'un proto-oncogène dans une cellule maligne pouvait être empêchée, il devrait y avoir un retour de l'état cancéreux à l'état normal. De par leur rôle, les proto-oncogènes constituent donc des cibles de choix pour une intervention thérapeutique dans les processus de transformation cellulaire.

La mise au point de nouveaux médicaments anti-cancéreux ayant comme cibles les proto-oncogènes, suppose alors qu'on puisse disposer de molécules chimiques capables de reconnaître un oncogène ou son produit et espérer que la molécule exercera de manière spécifique une action de blocage de l'activité du gène ou de la protéine qui en dérive (Le Doan *et al.*, 1996). La technologie antisens fait partie des nouvelles approches qui ont été utilisées en chimiothérapie antitumorale afin d'intervenir au niveau des oncogènes. De

nombreux proto-oncogènes ont été la cible des agents thérapeutiques antisens dont les principaux sont ceux appartenant à la famille *myc* (incluant *c-myc* et *N-myc*), *c-myb*, *c-fos*, la famille *ras* (incluant *N-ras* et *c-H-ras*), *BCL-2*, *c-raf-1*, *cdc-2* et *c-mos* (Putnam, 1996). Plusieurs publications décrivent l'effet d'oligonucléotides antisens sur la croissance cellulaire et tumorale dans différents modèles cellulaires et animaux. Ces travaux démontrent qu'il est possible d'inhiber de façon spécifique l'expression de certains de ces oncogènes et de diminuer la croissance des tumeurs chez des animaux qui ont subi une greffe de cellules cancéreuses (Hélène and Saison-Behmoaras, 1994 ; Putnam, 1996). Quelques oligonucléotides sont présentement à l'étude dans des essais cliniques comme l'oligomère MYB utilisé pour traiter les patients atteints de leucémie myéloïde chronique (Gewirtz, 1994) et l'oligomère ISIS 3521 utilisé chez les patients avec un cancer ovarien (Roush, 1997).

## **8.0 Problèmes spécifiques reliés à la thérapie antisens**

Les résultats obtenus au cours des dix dernières années démontraient que l'approche antisens était prometteuse pour le traitement du cancer, de certaines infections virales et autres maladies. De nombreuses compagnies pharmaceutiques et biotechnologiques se sont créées, en particulier aux États-Unis, pour développer les applications thérapeutiques des oligonucléotides et la plupart des grands groupes pharmaceutiques ont également mis sur pied des programmes de recherche et de développement dans ce domaine. Cependant, assez tôt dans le développement de ces nouveaux médicaments, les chercheurs ont dû faire face à certains problèmes, ce qui est inhérent à toute nouvelle technologie. D'abord, au tout début, les coûts de synthèse des oligonucléotides étaient élevés, mais avec le temps des méthodes de synthèse à grande échelle ont pu être mises au point ce qui a réduit les coûts de

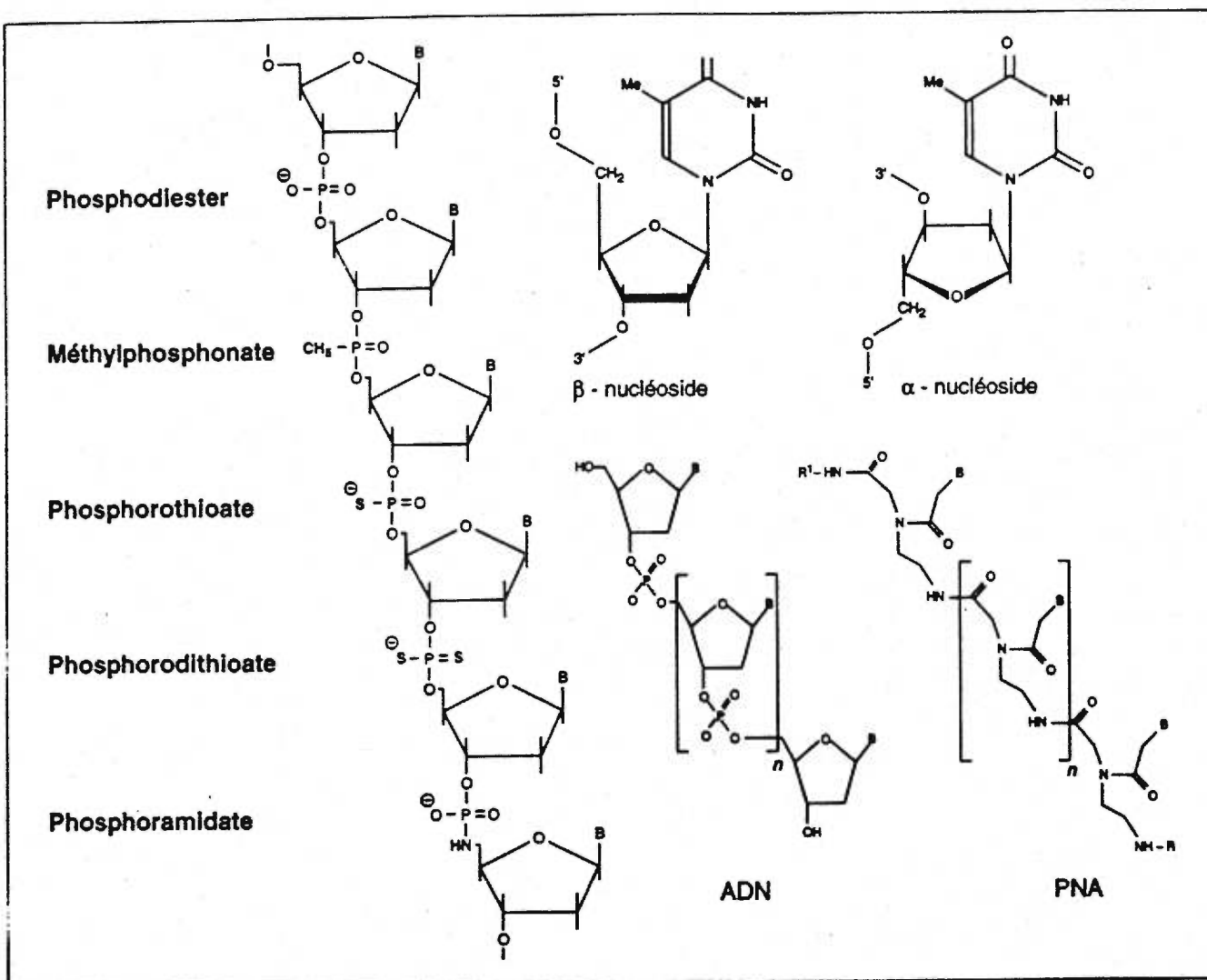


production. Une fois cet obstacle surmonté, d'autres limitations non moins importantes sont apparues.

En effet, pour exercer leurs effets, les oligonucléotides doivent d'abord traverser la membrane cytoplasmique pour atteindre ensuite leur cible dans le cytoplasme ou dans le noyau. Une fois à l'intérieur de la cellule, ils doivent résister à la dégradation enzymatique par les nucléases endogènes et doivent être capables de se lier spécifiquement à leur cible afin d'inhiber l'expression du gène en cause. Ils doivent de plus, éviter de se lier à d'autres sites non ciblés afin de ne pas causer d'effets secondaires non-désirés.

## 8.1 Stabilité

Dès le début, il est apparu que les oligonucléotides naturels (phosphodiester) étaient sensibles à la dégradation par des nucléases présentes dans le sérum et dans les cellules. Dans des conditions optimales, le clivage enzymatique et la dégradation des oligonucléotides naturels peuvent être complétés à l'intérieur de 30 minutes dans le sérum (Akhtar *et al.*, 1991). Ainsi, les ODNs phosphodiester se sont avérés de pauvres candidats comme agents thérapeutiques. Afin d'améliorer la stabilité de ces composés, de nombreux efforts ont été consacrés par des chimistes pour développer des ODNs qui seraient plus résistants aux nucléases tout en conservant leur capacité d'hybridation avec leur cible. Diverses modifications chimiques du squelette phosphodiester ont été réalisées (Figure 7). Dans cette première génération d'analogues, les phosphorothioates (PS) et les méthylphosphonates sont les deux modifications qui ont été le plus couramment utilisées.



**Figure 7. Modifications chimiques des oligonucléotides utilisés dans la stratégie antisens.** Pour protéger l'oligonucléotide contre les endonucléases, il est nécessaire de modifier l'enchaînement phosphodiester. Les phosphorothioates sont actuellement les plus utilisés car leur synthèse est facile. La substitution du sucre en position 2' (2'-O-alkyl, 2'-fluoro...) confère également une résistance vis-à-vis des nucléases. Il en est de même des oligométhylphosphonates qui possèdent un squelette non chargé, des oligo- $\alpha$ -désoxynucléotides dans lesquels l'anomère  $\beta$  naturel des nucléotides est remplacé par l'anomère  $\alpha$ , et des PNA dans lesquels le squelette phosphodiester est remplacé par un enchaînement polyamide. Schéma tiré de Hélène et Saison-Behmoaras, 1994.

Les phosphorothioates possèdent un atome de soufre à la place d'un oxygène dans la liaison phosphodiester et les méthylphosphonates un groupement méthyl. Les phosphorothioates conservent leur charge négative et la capacité d'induire l'activité de la ribonucléase H et sont résistants aux nucléases. Cependant, ils ont une plus faible affinité de liaison pour leurs séquences-cibles comparativement aux phosphodiesters (Rojanasakul, 1996) et ont démontré une faible spécificité dans leur activité. Les méthylphosphonates sont électriquement neutres, sont résistants aux nucléases mais ils sont incapables d'induire l'activité de la RNase H et ne sont actifs qu'à fortes doses (50-100  $\mu\text{M}$ ) d'où un intérêt moindre pour ces composés. De plus, étant hydrophobes, donc insolubles dans des solutions aqueuses, leur production en masse est d'autant plus difficile (Cohen and Hogan, 1994). D'autres modifications sont en cours de recherche pour améliorer l'efficacité des oligonucléotides et une autre génération d'analogues a commencé à voir le jour. Des oligonucléotides dans lesquels les sucres sont liés entre eux par des liaisons ne contenant pas d'atome de phosphore mais différents groupes ou atomes de substitution conférant à l'oligo une charge neutre et l'apparition entre autres des PNA (*peptide nucleic acid*) dans lesquels les liaisons phosphodiesters sont remplacées par des liaisons de nature peptidique en sont des exemples (De Maesmaker *et al.*, 1995). Récemment, des oligonucléotides avec un squelette comportant un mélange de modifications chimiques (segments phosphorothioates au milieu desquels différents segments sont incorporés tels que des segments méthylphosphonates ou phosphoramidates) ont été testés *in vitro* et *in vivo* pour leur activité antisens (Agrawal *et al.*, 1997). Les résultats obtenus avec ces nouveaux analogues d'ODNs sont encourageants et démontrent certains avantages sur les ODNs phosphorothioates.

## 8.2 Taux de pénétration cellulaire et localisation intracellulaire

De par leur nature chargée, les oligonucléotides phosphodiester sont hydrophiles et traversent donc mal la bi-couche lipidique des membranes cellulaires. Malgré ce fait, les oligonucléotides pénétreraient dans les cellules beaucoup plus facilement que prévu. Ainsi, Zamecnik *et al.* (1986) ont montré que la concentration dans des lignées lymphocytaires peut atteindre une valeur de 1.5  $\mu\text{M}$  en 15 minutes pour un ODN phosphodiester de 20-mère marqué en 5' par le  $^{32}\text{P}$  utilisé à la concentration de 20  $\mu\text{M}$ . Les mécanismes de transport des ODNs dans la cellule sont encore mal connus et sont en partie dépendants de la structure et de la composition chimique de l'ODN, de sa longueur et de sa séquence mais aussi du type cellulaire étudié. Des études ont montré l'existence de récepteurs d'ADN (Bennett *et al.*, 1985) et d'ODNs (Yakubov *et al.*, 1989) à la surface de nombreux types cellulaires. Les oligonucléotides pénétreraient dans la cellule par endocytose (endocytose par adsorption et endocytose *via* les récepteurs d'ODNs) et probablement aussi par pinocytose (Le Doan *et al.*, 1996). En effet, il a été démontré que les ODNs phosphodiester et phosphorothioates entrent dans la cellule par un processus d'endocytose *via* les récepteurs d'ODNs après s'être liés à des protéines de surface (Yakubov *et al.*, 1989). Dernièrement, il a été démontré à l'aide d'ODNs phosphorothioates qu'à des concentrations inférieures à 1  $\mu\text{M}$ , l'endocytose *via* les récepteurs d'ODNs est le mécanisme prédominant alors qu'à des concentrations plus élevées, ce serait plutôt l'endocytose par adsorption qui dominerait (Beltinger *et al.*, 1995).

Les oligonucléotides qui entrent dans la cellule par endocytose se retrouvent piégés dans les vésicules endosomales et lysosomales et sont sujets à la dégradation par les nucléases lysosomales. Ainsi, après avoir franchi la

barrière cytoplasmique, ils doivent maintenant échapper à ces compartiments intracellulaires afin de pouvoir exercer leur activité dans le cytoplasme et/ou dans le noyau. De plus, il a été démontré récemment qu'il existe un mécanisme d'exportation active (exocytose) des ODNs vers l'extérieur de la cellule diminuant ainsi la concentration intracellulaire (Thierry and Dritschilo, 1992). Plusieurs approches ont été suggérées pour améliorer le taux de pénétration et la distribution intracellulaire des ODNs, dont la conjugaison chimique à différents ligands comme les intercalateurs d'ADN, la poly L-lysine, des acides gras ou le cholestérol, ou l'utilisation de liposomes ou de nanoparticules polymériques (Tableau II). Les ligands peuvent servir à favoriser l'ancrage des ODNs à la membrane (ligands membranaires) comme la polylysine et le cholestérol, ou à cibler les ODNs vers des récepteurs spécifiques présents sur la cellule-cible (ligands spécifiques) comme la biotine, pour cibler vers les cellules hépatiques (Le Doan *et al.*, 1996).

Les liposomes, par définition, sont des structures sphériques qui peuvent être constitués d'une seule bi-couche de phospholipides membranaires entourant un espace interne aqueux (unilamellaire) ou d'une superposition de plusieurs bi-couches de phospholipides arrangée de façon à créer une alternance de bandes hydrophobiques et hydrophiliques (multilamellaires). Les drogues solubles dans l'eau peuvent être encapsulées dans cet espace aqueux tandis que les drogues solubles dans les lipides peuvent être intercalées dans la membrane même (Thierry and Takle, 1995). Certains ligands ou anticorps peuvent être incorporés pour diriger plus spécifiquement les ODNs vers leur cellule-cible. Différentes sortes de liposomes (anioniques, cationiques, fusogéniques, sensibles au pH et immunoliposomes) ont été largement utilisés, avec succès, pour transporter et augmenter la pénétration cellulaire des ODNs. D'entre tous, ce sont les liposomes cationiques qui ont été les plus utilisés. Ces liposomes diffèrent des liposomes dits conventionnels par le fait qu'ils peuvent

## Tableau II

Méthodes pour augmenter la pénétration et la distribution intracellulaire des oligonucléotides antisens

Système de transport	Mécanisme
<b>Liposomes</b>	
Cationiques	Endocytose par adsorption
Sensibles au pH	Endocytose non-spécifique / fusion avec la membrane endosomale
Immunoliposomes	Endocytose via des récepteurs
Liposomes dérivés du virus Sendai	Fusion avec la membrane cytoplasmique
Poly (L-lysine)	Endocytose par adsorption
Cholestérol	Inconnu
Phospholipides	Inconnu
Avidine	Endocytose par adsorption
Acridine	Intercalation
Streptolysine O	Formation de pores
Cations divalents	Neutralisation des charges (?)

Tiré de: Rojanasakul, Y. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996, 18: 115-131.

former des complexes stables avec les ODNs polyanioniques par l'interaction électrostatique entre les charges négatives du groupement phosphate des sucres des ODNs et les charges positives présentes à leur surface. Les liposomes cationiques ont été décrits pour la première fois en 1987 par l'équipe de Felgner pour le transfert d'ADN plasmidique (DOTMA/DOPE ; Lipofectine). Depuis, plusieurs formulations ont été évaluées dont certaines sont maintenant vendues commercialement. Les liposomes cationiques ont surtout été utilisés pour la transfection d'ADN et ont démontré une grande capacité de transport dans différents modèles biologiques.

La plupart des liposomes cationiques sont composés de lipides cationiques comme le DOTMA, DOTAP et DOGS qui sont responsables de la formation du complexe ADN/lipide et de l'interaction complexe-cellule, et d'un lipide neutre « helper » comme le DOPE qui serait important dans les mécanismes de fusion entre les liposomes cationiques et la membrane cytoplasmique. Certains facteurs influençant le transport des ODNs par des lipides cationiques ont été identifiés et incluent le rapport des charges, le temps d'incubation et la composition du lipide neutre.

Le complexe ADN/lipide entrerait dans la cellule principalement par endocytose dans des vésicules non-tapissées de clatine (*uncoated vesicles*) après s'être lié électrostatiquement *via* ses charges positives avec la membrane cytoplasmique (Zelphati and Szoka, 1996) comparativement aux liposomes libres qui entreraient dans la cellule par fusion. Dans le cas du complexe ADN/lipide, les mécanismes de fusion auraient lieu plutôt pendant le processus d'endocytose et non à la surface de la cellule (Wrobel and Collins, 1995). Une fois à l'intérieur des endosomes, le complexe ADN/lipide doit échapper aux endosomes avant d'atteindre les lysosomes où l'ADN et les

lipides seraient dégradés. Les ODNs seraient libérés des endosomes par un processus de dissociation et/ou de fusion au niveau des puits non-tapissés (*uncoated pits*) ou dans les premiers stades de l'endocytose (Wrobel and Collins, 1995 ; Zelphati and Szoka, 1996).

Des études ont démontré que l'utilisation de liposomes augmentait la disponibilité intracellulaire des ODNs. En présence de lipides cationiques, les oligonucléotides se retrouvaient concentrés dans le noyau après 4 heures d'incubation. On pouvait les trouver encore associés aux noyaux et dans le cytoplasme sous forme de structures denses 48 heures après incubation (Bennett *et al.*, 1993). Les auteurs suggèrent que les préparations lipides-ODNs pénètrent dans la cellule par deux voies différentes : 1) par l'accumulation dans des structures cytoplasmiques denses, et 2) par une introduction directe dans le cytoplasme d'où ils diffusent vers le noyau évitant donc la route endosomale. De plus, ils ont noté que les ODNs étaient exclus des nucléoles et étaient concentrés près des domaines dans le noyau où l'ARN serait épissé. En absence de liposomes, les ODNs s'accumulaient dans le cytoplasme sous forme de structures distinctes.

Dans une autre étude faisant appel à des liposomes conventionnels (MVE liposomes : *minimum volume entrapment*) l'augmentation de l'accumulation intracellulaire des oligonucléotides phosphodiesteres et phosphorothioates a été également démontrée dans des cellules MOLT-3 (Thierry and Dritschilo, 1992). Après 4 heures d'incubation avec des ODNs phosphorothioates libres et 24 heures avec des ODNs phosphorothioates encapsulés dans les liposomes, un même patron de distribution intracellulaire était observé: accumulation principalement dans le cytoplasme sous forme de structures granulaires et une faible accumulation dans le noyau ;



cependant l'accumulation était plus importante dans les cellules exposées aux ODNs encapsulés. Après une incubation additionnelle de 24 heures dans un milieu exempt d'ODNs, les ODNs encapsulés étaient retrouvés dans le cytoplasme et le noyau sous forme diffuse, et après un autre 24 heures additionnel, ils se retrouvaient principalement dans le noyau sous forme diffuse. Quant aux ODNs libres, dans les deux cas d'incubation prolongée, ils présentaient le même patron de distribution intracellulaire qu'après 4 heures d'incubation.

Ces résultats démontrent donc d'une part qu'il est possible d'augmenter l'accumulation et la distribution intracytoplasmique et intranucléaire des ODNs par des transporteurs liposomaux, et d'autre part d'échapper en partie à l'accumulation dans les vésicules endosomales et lysosomales. Le prochain défi consiste maintenant à démontrer leur efficacité *in vivo*. Les premières formulations de liposomes cationiques présentaient une grande instabilité dans le sérum et une certaine cytotoxicité ce qui constituait des facteurs de limitation importants pour une application thérapeutique. Dernièrement, quelques travaux ont démontré l'efficacité des lipides cationiques comme transporteurs de gènes *in vivo* et certaines formulations sont présentement à l'étude chez l'humain pour le transport d'ADN plasmidique chez des patients atteints de fibrose kystique (Caplen *et al.*, 1995 ; McLachlan *et al.*, 1995) et des patients porteurs de mélanomes (Nabel *et al.*, 1993).

Une autre limitation à laquelle les liposomes sont confrontés *in vivo*, est leur désactivation par le système réticuloendothélial (SRE) notamment par les monocytes et les macrophages du foie et de la rate (Putnam, 1996). Par contre, si le site ciblé se trouve à l'intérieur de ces cellules du SRE, alors les liposomes deviennent d'excellents transporteurs. Cependant lorsque la cible est située

ailleurs dans l'organisme, on a avantage à échapper au SRE. Une façon d'éviter la reconnaissance des liposomes par le SRE est de camoufler les liposomes en ajoutant à leur surface du polyéthylène-glycol afin d'augmenter leur temps de circulation (Allen *et al.*, 1991). Ces liposomes modifiés sont connus sous le nom de liposomes *Stealth*.

### 8.3 Nature de l'activité antisens

Dans plusieurs essais *in vitro* il a été possible de noter un effet spécifique des oligonucléotides antisens. Par exemple, la croissance des cellules d'un lymphome de Burkitt exprimant *c-myc* à cause d'une séquence mutée dans le promoteur était spécifiquement inhibée par un oligonucléotide antisens de 21-mère. Seules les cellules contenant ce promoteur anormal étaient inhibées par cet oligo complémentaire à la séquence mutée (McManaway *et al.*, 1990). De même, un oligomère de 7 nucléotides dirigé contre l'extrémité 3' des ARN du virus influenza de type A inhibait de façon spécifique l'effet cytopathique de ce virus et tout en n'ayant aucun effet sur un virus de type B dont la séquence 3' ciblée diffère de 3 nucléotides (Zerial *et al.*, 1987). De plus, un oligonucléotide antisens de 12 nucléotides dirigé contre un gène *Ha-ras* comportant une mutation au niveau d'un seul nucléotide a été capable d'inactiver seulement le gène muté sans affecter le gène normal *c-ras* (Hélène, 1991). Également, des effets spécifiques ont été rapportés lors de l'utilisation d'ODNs antisens contre la réplication du VIH, du virus du papillome humain, du cytomégalovirus humain, et lors d'autres essais sur différentes protéines cellulaires et virales (Agrawal and Akhtar, 1995).

Malgré ces retentissants succès, il reste encore beaucoup de problèmes à résoudre avant que les oligonucléotides atteignent le statut de substances

thérapeutiques. Après les premières années d'études sur la thérapie antisens, les problèmes de non-spécificité ont commencé à surgir et depuis les 5 dernières années les chercheurs se sont concentrés de plus en plus sur les mécanismes d'action de ces composés. C'est que les oligonucléotides antisens ne fonctionnent tout simplement pas comme on avait pensé, et leur mécanisme d'action est beaucoup plus complexe que prévu.

Souvent, pour démontrer que les ODNs agissent de façon spécifique, l'effet de deux oligonucléotides différents est comparé. Les contrôles les plus fréquemment utilisés sont, soit un ODN de séquence inversée par rapport à celle de l'ODN antisens (la séquence est la même mais dans le sens contraire 5' vers 3'), soit un ODN dont quelques nucléotides ont été modifiés par rapport à l'ODN antisens (*mismatch*), soit un ODN de séquence complémentaire à l'ODN antisens (appelé ODN « sens »), soit un ODN contenant une distribution au hasard des mêmes nucléotides que l'ODN antisens (*scrambled*), soit un ODN dont la synthèse provient d'un mélange des quatre bases et dont la composition est faite au hasard (*random*) ou enfin, un ODN formé d'une séquence dirigée contre un autre acide nucléique. Une autre façon utilisée pour démontrer un effet spécifique est de comparer l'effet de l'ODN antisens sur deux cibles qui ne diffèrent que par une ou plusieurs bases. Les chercheurs ont commencé à réaliser que des séquences contrôles fonctionnaient aussi bien que les séquences antisens et une emphase a été mise pour comprendre ces résultats. Wagner et son équipe ont été préoccupés par ce problème et en analysant les premières publications ils se sont rendus compte que dans certaines études, les séquences contrôles étaient absentes (Gura, 1995). Par la suite, plusieurs publications relatant les problèmes rencontrés avec les oligonucléotides antisens, particulièrement avec les phosphorothioates, ont été écrites et des recommandations pour les essais avec des oligonucléotides

phosphorothioates ont été élaborées (Stein and Cheng, 1993 ; Stein and Krieg, 1994 ; Wagner, 1994 ; Gura, 1995 ; Stein, 1995 ; Stein, 1996).

Les phosphorothioates sont des polyanions tout comme l'héparine, et de ce fait, sont capables de se lier à différentes protéines telles que certains facteurs de croissance des fibroblastes (bFGF, aFGF, FGF-4), les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF) (Guvakova *et al.*, 1995), les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\delta$  et  $\varepsilon$  de la protéine kinase C (Yakubov *et al.*, 1993), la phospholipase A2 (Bennett *et al.*, 1994), les molécules solubles recombinantes CD4 (Yabubov *et al.*, 1993), la boucle V3 de la glycoprotéine gp120 de l'enveloppe du VIH (Stein and Cheng, 1993) et la transcriptase inverse du VIH (Majumdar *et al.*, 1989). Ces liaisons sont principalement basées sur des interactions de charges. Cependant les liaisons pourraient également dépendre de la séquence (dans ce cas on parlerait d'un effet aptamère).

Les effets non-spécifiques peuvent être divisés en deux groupes : les effets qui dépendent d'un motif (ex. G-quartet) et ceux qui ne dépendent pas d'un motif particulier. Dans le premier cas on parle d'effet non-antisens mais spécifique de séquence et on pense alors aux oligonucléotides qui contiennent quatre résidus désoxyguanosines consécutifs (G-quartet). Ces ODNs peuvent être anti-prolifératifs pour les cellules ou exercer une activité antivirale car ils ont une plus grande affinité pour certaines protéines comme la gp120 et la bFGF. En les comparant à des séquences contrôles qui ne contiennent pas de motifs G-quartet, on ne peut distinguer les effets reliés à ces motifs des effets antisens et un effet antisens peut être proclamé à tort (Stein and Krieg, 1994). Ce n'est pas uniquement la présence de motifs G-quartet qui produit des effets non-spécifiques mais les séquences de chaque côté du G-quartet sont également importantes (Maltese *et al.*, 1995). Des effets non-spécifiques de

séquence ont également été rapportés avec des ODNs phosphorothioates ne contenant pas de motifs G-quartet mais la nature de ces effets est encore inconnue (Stein, 1996).

La démonstration d'effets spécifiques dans des essais *in vivo* peut également être difficile à faire. En effet, les ODNs phosphodiester et phosphorothioates contenant les motifs de dinucléotides non-méthylés CpG sont hautement immunostimulateurs. Un ODN phosphorothioate antisens dirigé contre le gène *rev* du VIH a provoqué une augmentation de la sécrétion d'immunoglobulines, une activation de la prolifération des lymphocytes B et leur différenciation lorsqu'injecté chez la souris ( Branda *et al.*, 1996). De même, ils induiraient la production d'interférons  $\alpha$  et  $\gamma$ , augmenteraient l'activité des cellules NK (natural killer), augmenteraient l'expression de certains marqueurs d'activation des cellules B comme les molécules du CMH de classe II et stimuleraient la sécrétion de plusieurs interleukines par les cellules T (Stein, 1996). De plus, les produits de dégradation des oligos, particulièrement les mononucléotides dAMP et dGMP, pourraient avoir des effets cytotoxiques et cytostatiques sur les cellules, surtout celles d'origine hématopoïétique (Milligan *et al.*, 1993). Tous ces effets non-spécifiques peuvent affecter sérieusement les observations faites *in vivo* et mener à de fausses conclusions quant au mécanisme d'action des ODNs.

Pour réduire les effets non-spécifiques des oligonucléotides synthétiques, les ODNs peuvent être encapsulés dans des liposomes afin de diminuer les interactions avec les protéines du sérum tout en permettant l'utilisation de doses plus faibles. Le développement de nouvelles modifications de l'enchaînement phosphodiester entre les nucléotides est également un domaine à explorer afin d'obtenir des ODNs qui démontreront moins d'effets

secondaires et qui répondront à des besoins bien spécifiques. Les phosphorothioates représentent la première génération d'ODNs antisens qui ait été étudiée d'un point de vue pharmacocinétique et toxicologique et les informations qui découlent de ces premières études vont permettre l'élaboration de nouveaux protocoles mieux adaptés pour l'étude de ces molécules et de nouvelles modifications chimiques plus performantes (Hélène, 1997). Par exemple, la compagnie Hybridon aurait développé une deuxième version de leur molécule GEM 91 qu'ils ont nommée GEM 92 et qui serait plus stable, moins toxique et moins immunostimulatrice que sa contrepartie phosphorothioate (Agrawal, 1997). De plus, les chercheurs ne voient plus d'une façon aussi négative les interactions des ODNs et on pense même profiter de cet aspect pour développer un autre domaine de recherche sur les oligonucléotides i.e la technologie aptamère qui consiste à inhiber la fonction d'une protéine (Bonn, 1996). Finalement, le développement de nouveaux transporteurs et vecteurs oligonucléotidiques est un domaine de recherche qui prend de plus en plus d'ampleur et qui pourrait conduire à l'utilisation d'oligonucléotides naturels (phosphodiesters) comme agents thérapeutiques.

## **9.0 Pharmacocinétique et toxicologie des oligonucléotides phosphorothioates**

Des études pharmacocinétiques ont été entreprises sur des oligonucléotides phosphorothioates de différentes longueurs et de composition variée chez la souris, le rat, le singe et l'humain (Toulmé, 1994 ; Crooke, 1997). Ces études ont démontré que les ODNs phosphorothioates avaient une demi-vie plasmatique d'environ 1 heure chez l'animal (0.53 heure chez la souris ; 0.83-1.11 heure chez le rat ; 0.6-1 heure chez les singes) et de 0.18 heure chez l'humain (Agrawal *et al.*, 1995a). La clairance sanguine et plasmatique est multiexponentielle avec une phase d'élimination terminale dont la demi-vie varie

entre 33.45 et 56.3 heures chez l'animal (Crooke, 1997). L'élimination des ODNs phosphorothioates a lieu principalement par voie urinaire et la majeure partie des ODNs sont dégradés. Les ODNs sont retrouvés dans la plupart des tissus mais accumulés préférentiellement dans le foie et les reins (Srinivasan and Iversen, 1995). Ces composés ne semblent pas traverser la barrière hémato-encéphalique ni celle au niveau des testicules. Ce n'est pas cependant une règle absolue puisqu'un ODN antisens de 24-mère dirigé contre *c-myb* a montré une accumulation dans le cerveau après injection chez la souris.

À de faibles doses les ODNs ne présentent pas de toxicité chez les souris mais à des concentrations plus élevées (> 100 mg/kg) ils peuvent causer des dommages au rein, au foie ou à la moelle osseuse dont une thrombocytopénie au niveau des cellules sanguines (Crooke, 1997). Chez le singe, l'administration de l'ODN phosphorothioate GEM 91 par infusions intraveineuses d'une durée de 10 minutes à des doses de 5 mg/kg et plus a provoqué une diminution de la pression sanguine ainsi qu'une réduction dans le nombre total de leucocytes périphériques, dans le nombre de neutrophiles et le nombre de plaquettes sanguines (Galbraith *et al.*, 1994). Les auteurs suggèrent que ces effets hémodynamiques observés chez le singe seraient reliés probablement à une activation du complément telle qu'observée par une augmentation dans le sérum du produit de clivage C5a.

Chez l'humain, un ODN phosphorothioate de 20-mère (ISIS 2105) dirigé contre le papillomavirus humain qui cause des condylomes génitaux a été administré une fois par semaine par voie intradermique à des doses aussi élevées que 3 mg par condylomes pendant trois semaines (L. Grillone, données non-publiées). Chez ces personnes, aucune toxicité ou inflammation locale n'a pu être observée suite au traitement. De plus, après administration d'un ODN

phosphorothioate de 20-mère dirigé contre la molécule d'adhésion ICAM-1 (ISIS 2302) par infusions intraveineuses d'une durée de 2 heures à tous les deux jours à des doses aussi élevées que 2 mg/kg, aucun effet toxique significatif d'immunosuppression ou d'hypotension n'ont été observés (Glover *et al.*, 1997).

Dans certains cas, des effets toxiques spécifiques de la séquence de l'ODN ont été rapportés chez la souris et le rat. En effet une séquence sens dirigée contre le codon d'initiation du facteur de transcription NF- $\kappa$ Bp65 causait une splénomégalie massive chez la souris alors que la séquence antisens n'avait aucun effet ( Akhtar and Agrawal, 1997).

Des études pharmacocinétiques de l'oligonucléotide GEM 91 ont été menées chez six patients infectés par le VIH (Zhang *et al.*, 1995). Après administration de GEM 91 marqué par le  $^{35}\text{S}$  à une dose de 0.1 mg/kg par infusion intraveineuse d'une durée moyenne de 2 heures, les ODNs présentaient un profil d'élimination biphasique avec une première phase de 0.18 heure et une deuxième phase de 26.7 heures en moyenne, et 49 % de la dose administrée était éliminée par excrétion urinaire en 24 heures et 70 % après 96 heures. Pendant les 30 premières minutes, les plus hautes doses étaient observées dans les reins, le foie, la rate, les poumons et le coeur. Les ODNs étaient retenus plus longtemps dans les reins, le foie, le coeur et les intestins. La présence de GEM 91 intact ainsi que des métabolites de plus faible poids moléculaire ont été détectés dans le plasma. Dans cette étude aucune toxicité n'était notée après un suivi de 30 jours. Cependant les études cliniques avec GEM 91 ont dû être arrêtées tout récemment (automne 97) suite à des résultats préliminaires provenant d'études cliniques de phase II (Agrawal, 1997). L'administration de GEM 91 chez plus de 250 patients infectés avec le



VIH (patients avec progression de la maladie) était bien tolérée jusqu'à des doses de 4.4 mg/kg/jour pendant huit jours. Cependant, une baisse dans le nombre de plaquettes sanguines a été notée chez trois patients après 10 jours de traitements. De plus, les réponses au traitement n'étaient pas consistantes et une réduction de la virémie cellulaire n'était pas toujours observée.

Récemment, les propriétés pharmacocinétiques d'une nouvelle génération d'oligonucléotides antisens composés de segments possédant différentes modifications chimiques nommés MBO (*mixed-backbone oligonucleotides*), ont été analysées chez le rat (Agrawal *et al.*, 1995b ; 1997). L'incorporation de segments possédant une modification chimique autre que la modification phosphorothioate, aux extrémités d'un ODN phosphorothioate ou au centre de celui-ci a significativement amélioré la stabilité *in vivo*, le profil de toxicité et l'activité biologique dans certains cas comparativement à un ODN phosphorothioate contrôle (GEM 91). Ces résultats démontrent qu'il est possible de produire de nouveaux ODNs antisens possédant des propriétés thérapeutiques améliorées.

## 10.0 But du projet et hypothèses de travail

Le but de ce projet de recherche est d'approfondir nos connaissances sur la stratégie antisens afin d'améliorer son efficacité comme approche antivirale contre le VIH-1. Dans le but d'augmenter la spécificité de l'activité des oligonucléotides antisens nous synthétiserons deux nouvelles molécules antisens dirigées contre des séquences hautement conservées dans la région 5' du génome viral. Comme ces séquences sont reconnues comme étant essentielles pour l'encapsidation et la dimérisation de l'ARN viral nous croyons que l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre ces séquences impliquées dans le signal d'encapsidation permettra de bloquer l'encapsidation et/ou la dimérisation de l'ARN viral produisant ainsi des particules virales non-infectieuses et, par le fait même, pourrait être une bonne stratégie antivirale contre le VIH. Dans cette partie du projet, nous tenterons de répondre à certaines questions comme : Ces séquences seront-elles plus spécifiques que d'autres séquences déjà étudiées? Permettront-elles de minimiser les mutants aux antirétroviraux ou aux oligonucléotides?

L'utilisation de préparations liposomales pour augmenter le taux de pénétration cellulaire et la distribution intracellulaire des oligonucléotides commence à intéresser les chercheurs concernés et quelques études démontrent les bienfaits d'une telle approche. Peu d'études ont utilisé les liposomes pour transporter des oligonucléotides *in vitro* dans le contexte d'une infection par le VIH. Un nouveau système de transport lipidique nommé DLS vient d'être développé par le Dr Alain Thierry lors de son séjour dans le laboratoire du Dr Robert Gallo. Nous proposons donc dans ce projet de recherche de vérifier l'efficacité de ce nouveau système de transport des oligonucléotides antisens dirigés contre le VIH, dans des cellules infectées. Nous croyons qu'une fois associés aux liposomes DLS, les ODNs antisens

seront protégés contre la dégradation par les nucléases cellulaires et que le taux de pénétration cellulaire et la distribution intracellulaire seront favorisés augmentant ainsi l'efficacité des oligonucléotides.

Une fois les deux hypothèses de travail précédentes confirmées nous pourrions alors envisager d'entreprendre une étude plus approfondie sur le mécanisme d'action des oligonucléotides antisens en comparant l'activité antivirale de différentes séquences antisens entre elles et avec celle de diverses séquences contrôles. Très peu d'études font mention du mécanisme par lequel les oligos antisens agissent et lorsque c'est le cas, souvent une seule séquence est étudiée à la fois. Ainsi, nous voulons aborder la question par une approche plus globale en regroupant dans la même étude plusieurs séquences et plusieurs conditions différentes afin de mieux cerner le problème. Nous voulons vérifier l'impact de certains facteurs sur l'activité *in vitro* des oligonucléotides. Notre hypothèse de départ est que plusieurs facteurs peuvent influencer l'activité des oligonucléotides observée *in vitro* et qu'un meilleur contrôle de ces facteurs pourrait nous aider à mieux déterminer la nature de l'activité de ces composés. Pour cette étude, nous utiliserons le système DLS afin de pouvoir comparer d'une part, l'activité des oligonucléotides phosphodiesters (non-modifiés) avec celle des oligonucléotides phosphorothioates et d'autre part, de pouvoir vérifier dans quelles parties du cycle de réplication virale se manifeste l'activité antivirale. Nous tenterons de répondre à différentes questions : 1) dans quelle mesure l'association avec les liposomes DLS permettra-t-elle d'éliminer les effets non-spécifiques des oligonucléotides en les rendant peu disponibles pour interagir avec les processus d'adsorption et d'entrée du virus ? ; 2) les ODNs phosphorothioates présenteront-ils plus d'effets non-spécifiques et seront-ils plus efficaces que les ODNs phosphodiesters une fois complexés aux liposomes DLS ? ; 3) dans notre système expérimental quels sont les facteurs déterminants que l'on doit

prendre en considération dans l'évaluation *in vitro* de l'activité des oligonucléotides ? ; 4) quelle est la portion de l'activité des oligonucléotides qui peut être attribuée à un effet spécifique de séquence ? ; 5) l'activité d'une séquence donnée varie-t-elle par exemple selon le modèle cellulaire ? et 6) le choix des séquences contrôles peut-il influencer le niveau de spécificité de l'activité des oligonucléotides antisens ?

Finalement, nous vérifierons les avantages d'une approche basée sur la multiplicité des cibles en thérapie antisens. Très peu d'études abordent cet aspect pour le traitement *in vitro* des infections par le VIH et aucune ne l'a fait d'une façon approfondie tenant compte de divers facteurs. Nous voulons alors vérifier si l'utilisation de plusieurs oligonucléotides différents simultanément procureraient certains avantages par rapport à l'utilisation d'un seul ODN à la fois. Pour ce faire nous évaluerons l'activité antivirale associée à une telle approche dans des infections *de novo* et chronique avec la souche de laboratoire IIIIB et un isolat clinique. De plus, en comparant différentes combinaisons d'oligonucléotides nous pourrions déterminer les facteurs importants pouvant influencer l'efficacité *in vitro* d'une stratégie de combinaison utilisant des oligonucléotides et identifier une combinaison intéressante. Les résultats de cette étude serviront de base pour l'élaboration d'une stratégie de combinaison en thérapie antisens.

Notre projet de recherche présente donc plusieurs aspects originaux qui contribueront grandement à faire avancer nos connaissances sur le potentiel des oligonucléotides synthétiques comme agents thérapeutiques pour le traitement des personnes infectées par le VIH.

---

**CHAPITRE 2**

**ARTICLE 1**

**Inhibition of HIV-1 Replication by Two Novel Antisense  
Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides Directed Against the  
Packaging Signal Region**

CAROLE LAVIGNE<sup>1,3</sup>, ALAIN R. THIERRY<sup>2</sup>, JOCELYN YELLE<sup>3\*</sup>, and GILLES  
SAUVÉ<sup>3</sup>

*<sup>1</sup>Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de  
Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7 ;*

*<sup>2</sup>Laboratory of Tumor Cell Biology, National Cancer Institute, National Institutes of  
Health, Bethesda, MD 20892 ;*

*<sup>3</sup>Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada H7V 1B7*

**Running title :** Inhibition of HIV-1 by two novel antisense oligos

<sup>2</sup>Present address : Biovector Therapeutics, S.A., Chemin du Chêne Vert, BP 169, 31676  
Labège Cedex, France

\*Correspondent Author. Mailing Address : Institut Armand-Frappier, Université du  
Québec, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Québec Canada, H7V 1B7. Phone : (514) 687-  
5010 ext. 4578. Fax : (514) 686-5619.

## SUMMARY

We designed two phosphorothioate-modified ODNs, SDIS and SPac, complementary to a portion of the 5'-end of HIV-1 genome. Antisenses SDIS and SPac are directed against highly conserved sequences essential for efficient viral RNA packaging. Their inhibitory effects on HIV-1 replication were examined in different *in vitro* treatment models using acutely and chronically infected cell lines and primary cells. We compared the activity of SDIS and SPac with the two well known antisense sequences *Srev* and GEM 91 which have been already reported to be potent inhibitors against HIV replication *in vitro*. We found that antisenses SDIS and SPac can efficiently block HIV-1 (IIB) replication and syncytia formation in acutely infected MOLT-3 cells as well as *Srev* and GEM 91 for up to 21 days. The replication of HIV-1 clinical isolate VR2846A in primary cells, and viral replication in chronically infected cells was also inhibited by our antisense molecules in a manner similar to *Srev*. A combination of three antisense molecules was tested in acutely infected primary cells with clinical isolate VR2844A. At low concentrations, the three-drug combination was found to be more effective than each antisense molecule used individually. No cytotoxic effects were observed in cell cultures treated for up to 14 days with the ODNs at concentrations that showed antiviral activity.

## Introduction

Antisense technology based on the use of synthetic oligodeoxynucleotides (ODNs) to modulate gene expression has been thoroughly investigated in a variety of systems and offers a new potential avenue for the treatment of HIV infection [28]. Synthetic oligonucleotides can be engineered to bind in a sequence-specific way with complementary RNA through Watson-Crick base pairing (antisense strategy, ribozymes), with duplex DNA to form a triple helix in polypurine-polypyrimidine regions through Hoogsteen pairing (antigene approach), or directly with proteins (sense strategy or aptamers) [6, 11]. Early in the development of nucleic acid therapeutics, it was recognized that natural oligonucleotides were poor drug candidates, because of their instability in biological environments, their relative inefficiency to cross cell membranes, and their occasional lack of specificity [16, 35, 36]. To overcome the problems associated with natural oligonucleotides, several types of chemically modified ODNs have been developed [1, 11, 21]. The most widely used modifications are substitution of a backbone oxygen with sulfur to form phosphorothioate oligodeoxynucleotides (PS-ODNs) which are resistant to nuclease degradation, have good water-solubility and show enhanced cellular uptake and intracellular trafficking developed [7, 34, 38]. Furthermore, phosphorothioate ODNs form reasonably stable duplexes with specific target mRNAs and can catalyze mRNA cleavage by eliciting the activity of RNase H [36].

Phosphorothioate-modified ODNs have been proven to be potent inhibitors of replication of several HIV-1 isolates when evaluated in different *in vitro* cell systems [1,



2, 5, 14, 18, 19, 20, 31, 34, 40, 41] . Anti-HIV activity of GEM 91, a 25-mer phosphorothioate oligodeoxynucleotide directed against the translation initiation site of HIV-1 *gag* mRNA, has been demonstrated in different cell assays against HIV-1 strain IIB and clinical isolates [2, 3]. GEM 91 was the first genetic antisense drug undergoing phase II clinical trials in AIDS patients. Pharmacokinetic and clinical studies of phosphorothioate oligonucleotides have demonstrated that these compounds are well tolerated and safe, that they are well absorbed from parenteral sites and can be distributed broadly to all peripheral tissues [10].

In order to develop a multitargeting strategy by using a combination of antisense oligonucleotides, we have developed two novel antisense phosphorothioate sequences designated SDIS and SPac which are directed to well conserved regions of the 5'-end of the HIV-1 genome. Here, we compared our two novel phosphorothioate antisense molecules to the well known antisense sequences anti-*rev* [22] and GEM 91 [2] for their ability to inhibit HIV-1 replication in different *in vitro* treatment models. We also evaluated the anti-HIV activity of a continuous three-drug regimen with phosphorothioate-modified ODNs comprising SDIS, SPac and anti-*rev* against a clinical isolate in acutely infected peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

## Materials and methods

### *Antisense oligodeoxynucleotides*

Phosphorothioate oligodeoxynucleotides were synthesized by an automated DNA synthesizer (BioServe Biotechnologies, MD, USA) with a sulfur atom introduced at each phosphodiester linkage. Synthesis was carried out on a 1  $\mu$ M scale. The oligonucleotides were deblocked, desalted and purified by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The ODNs were quantitated by UV absorbance at 260 nm (1 OD  $\approx$  33  $\mu$ g of DNA). In this study, two novel antisense oligonucleotides, SDIS and SPac, complementary to a portion of the 5'-long terminal repeat of HIV-1 (IIIB) genome were compared to the two well known antisense sequences anti-*rev* (Matsukura et al., 1989) and GEM 91 [2]. Sequences of these ODNs and combination regimen are shown in Table 1. The 26-mer phosphorothioate antisense molecule SDIS, is complementary to a highly conserved sequence localized between the primer binding site and the major splice donor site spanning nucleotides +245 to +270 [29]. This sequence is considered to be essential for HIV-1 RNA dimerization [24, 32] and encapsidation [13, 23]. The 30-mer phosphorothioate antisense molecule SPac is complementary to a sequence localized between the major splice donor site and the first ATG *gag* initiation codon (+295 to +324 nt) and corresponds to the packaging signal *psi* ( $\psi$ ) [4, 17, 23].

### *Cells*

The human lymphoid cell line MOLT-3 was kindly provided by Dr. R.-P. Sekaly (Clinical Research Institute of Montreal, Québec, Canada). H9 cells chronically infected with HIV-1 (IIIB) (H9/HTLV-IIIB NIH 1983) [26, 27] were obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA. Uninfected and infected cells were cultivated in RPMI 1640 culture medium (Gibco BRL) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, L-glutamine (4 mM) and gentamycin (50 µg/mL) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Peripheral blood mononuclear cells from healthy HIV-1-seronegative donors were isolated by Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech) gradient centrifugation of heparinized venous blood. The cells were collected, washed and stimulated with phytohemagglutinin-P (PHA-P ; 5 µg/mL ; Pharmacia Biotech) for 48 hours. The cells were then washed and maintained in the same culture medium as above, supplemented with recombinant human interleukin-2 (20 U/mL ; Cellular Products Inc.).

### *Virus*

HIV-1 laboratory strain IIIB was obtained from Advanced BioScience Laboratories Inc., Kensington, MD, and used to infect MOLT-3 cells. The low passage HIV-1 clinical isolates used, VR2844A and VR2846A, were kindly donated by M. Fauvel

(Laboratoire de Santé Publique du Québec, Sainte-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada). VR2844A and VR2846A were derived from two HIV-1 seropositive individuals who had not been enrolled in zidovudine (AZT) or other therapy. Isolation of HIV-1 from patients was achieved by co-cultivating the patient's PBMCs with an equal number of PHA-stimulated PBMCs from HIV-1 seronegative donors. Approximately half of the coculture medium was replaced every 3 to 4 days with fresh medium. For HIV-1 isolate VR2844A, aliquots from co-culture supernatant were collected on day 6 and were used to infect PBMCs from HIV-1 seronegative donors. For HIV-1 isolate VR2846A, aliquots were collected on day 6 and propagated in PBMCs for up to 17 days, changing half the culture medium every 3 to 4 days. Aliquots from the PBMC culture supernatant were collected on day 11 and 14 and kept frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  for subsequent  $\text{TCID}_{50}$  determination and infection of PBMCs from HIV-1 seronegative donors. For virus titration, tenfold serial dilutions of virus ( $50\ \mu\text{L}$ ) were incubated with  $100\ \mu\text{L}$  of cells at  $2 \times 10^5$  cells/mL in microtiter plates at  $37^{\circ}\text{C}$  for 14 days. Every 3 to 4 days, fresh medium was added and the presence of virus in the culture supernatant was determined by the p24 antigen-capture assay described below.

#### *Antiviral assays*

To compare antiviral activity of the antisense PS-ODNs in a long-term model treatment in acutely infected cells, MOLT-3 cells were infected at a multiplicity of infection of 0.01 with HIV-1 laboratory strain IIIB. After 2 hours adsorption at  $37^{\circ}\text{C}$ ,

infected and control cells were washed twice with plain culture RPMI medium to remove unadsorbed virus. Fresh complete medium was added and the cells were plated into 96-well microtiter plates at a concentration of  $4 \times 10^5$  cells/mL. Cells were treated for up to 21 days with oligonucleotide phosphorothioates added free to the cultures at 0.1  $\mu$ M concentration. Every 3 or 4 days, cells were split to  $4 \times 10^5$  cells/mL and supernatants were collected to determine the HIV-1 titer. Except for the initial two hours period of virus adsorption, the oligonucleotides were always present in the culture medium during the course of the experiments. To study the inhibition of HIV-1 by the antisense PS-ODNs and their efficiency in chronically infected cells, we used the H9 cell line chronically infected with HIV-1 (IIIB). Cells were plated into 96-well microtiter plates at a concentration of  $4 \times 10^5$  cells/mL and antisense PS-ODNs were added at concentrations ranging from 0.1 to 7.5  $\mu$ M. The cells were kept in culture for 4 days and HIV-1 replication was determined by the p24 antigen assay. To test the inhibition by antisense PS-ODNs of HIV-1 isolates, PBMCs from HIV-1 seronegative donors were acutely infected with HIV-1 clinical isolate VR2846A at a viral titer of  $TCID_{50} = 1000$  (viral stock 800  $TCID_{50}/mL$ ). Infection was performed as described above and cells plated into 96-well microtiter plates at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL. Cells were treated up to 14 days with antisense PS-ODNs added to the cultures at 1  $\mu$ M concentration. Every 3 or 4 days, culture medium was replaced by fresh medium containing the drug at the original concentrations and supernatant was collected for determination of HIV-1 p24 antigen production. To evaluate the effectiveness of combination of our two novel sequences with *Srev* against HIV-1, we used acutely infected PBMCs with HIV-1 isolate VR2844A as a model. Cells were infected at a viral titer of  $TCID_{50} = 1000$  (viral stock 6324  $TCID_{50}$

/ mL), plated as described above and treated with either antisense drugs alone or in combination at final concentrations ranging from 0.1 to 3  $\mu$ M. Each drug was added to the combination at an equal molar ratio.

#### *Detection of HIV-1 replication*

Infected cells were monitored periodically for the presence of syncytia by microscopy under low power magnification. Virus replication was also determined by detection of p24 HIV-1 viral core antigen in cell-free supernatants by a p24 antigen-capture assay (Coulter Immunology or SAIC Frederick). The TCID<sub>50</sub> values were calculated by the method of Reed and Muench. Cell viability and cytotoxicity was monitored by the tetrazolium-based colorimetric cell proliferation assay (MTT) [25].

#### *Statistical analysis*

Experimental groups were expressed as mean  $\pm$  standard deviation, and compared to control groups or to different treatment groups using the single-factor analysis of variance. When statistical significance ( $p < 0.05$ ) was reached with the F test, comparisons of the means were performed using either the Tukey-HSD test or the Student t-test. A p value of 0.05 or less was considered significant.

## Results

### *The two novel antisense phosphorothioate oligonucleotides SDIS and SPac block syncytia formation as well as antisense oligonucleotide Srev in a long-term acute assay*

The ability of our two novel sequences to block syncytia formation in HIV-1-infected cells was compared to that of antisense ODN *Srev*, 14 and 21 days after infection. Results indicate that the two phosphorothioate oligonucleotides SDIS and SPac were as potent as the sequence *Srev* (Figure 1). After 14 days of infection, all three oligos completely blocked syncytia formation in acutely infected MOLT-3 cells at 0.1  $\mu$ M concentration (Fig. 1 B to D) compared to infected, untreated control cultures in which a large number of syncytia were present, along with dying cells (Fig. 1 A). In control uninfected cultures, no significant cell mortality was observed (Fig. 1 E). The cell counts for the infected cultures treated with the ODNs were very similar to those obtained with the uninfected, untreated control (Table 2).

At the low MOI used for these experiments (0.01), some cells survived the infection in the untreated control and probably entered a chronically infected state. These cells were clearly visible after 21 days (Fig. 1 F). At this time, syncytia formation was observed at a low level in cell cultures treated with each of the three phosphorothioate sequences (Fig. 1 G to I, pointed by the arrows). The cells in the uninfected, untreated controls remained viable for the 21 days of the experiment (Fig. 1 J). The number of viable cells after 21 days in the cultures treated with the ODNs were comparable to the

uninfected, untreated control while the count was significantly reduced in the infected, untreated control (Fig. 1 and Table 2).

*The two novel antisense sequences SDIS and SPac inhibit p24 production in acutely infected MOLT-3 cells as well as antisense sequences Srev and GEM 91*

We compared the antiviral effects of antisense oligonucleotides SDIS and SPac with antisense ODNs Srev and GEM 91 in a long-term assay using MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1 (IIIB). The amount of p24 antigen in culture supernatants was determined in cells treated with 0.1  $\mu$ M ODNs and compared to infected, untreated control cultures. This concentration was selected because it was found to be the lowest concentration at which high level of antisense activity was achieved with ODNs SDIS and SPac in preliminary tests (data not shown). SDIS and SPac were as potent as the two antisense ODNs Srev and GEM 91 in inhibiting p24 production during all the course of the experiment (Fig. 2). In cells treated with any of the four ODNs, viral production was inhibited almost completely for the 21 days of the experiment. In infected untreated cells, viral replication peaked 14 days after infection (8343 ng/million cells) and decreased thereafter.



*Comparison of the antiviral activity of SDIS and SPac with Srev in chronically infected cells*

To compare the ability of our two novel antisense sequences SDIS and SPac, and that of *Srev*, to block viral production in chronically infected cells, H9 cells chronically infected with HIV-1 (IIIB) were used as a model. Inhibition of p24 production was determined in cell culture supernatants 3 days after treatment with different concentrations of the oligos. In this model, SDIS and SPac showed activity similar to *Srev* (Figure 3). At 0.1  $\mu\text{M}$  concentration, all three oligomers showed limited effects on viral production (between 25 and 28 % inhibition). At 1.5  $\mu\text{M}$ , higher antiviral activity was achieved with all three oligos. At this concentration, SDIS (75 % inhibition) and SPac (76 %) were significantly less efficient in blocking viral replication than *Srev* (83 %) ( $p = 0.05$ ). At 7.5  $\mu\text{M}$ , no significant differences between *Srev*, SDIS and SPac could be noticed. Only SDIS showed an increase in its antiviral activity when used at 7.5  $\mu\text{M}$  compared to 1.5  $\mu\text{M}$ . In this model, a much higher concentration (1.5  $\mu\text{M}$ ) of the three antisense sequences was necessary to achieve a substantial inhibition of at least 75 % compared to the dose required for the same level of activity in acutely infected cells (0.1  $\mu\text{M}$  ; Fig. 2).

*The two novel sequences SDIS and SPac inhibit the replication of a HIV-1 clinical isolate with an efficiency similar to Srev*

Experiments on PBMCs acutely infected with the VR2846A clinical isolate were performed to determine if SDIS and SPac could inhibit the replication of a viral isolate other than a laboratory strain such as HIV-1 (IIIB) as efficiently as the sequence *Srev*. As shown in Fig. 4, SDIS and SPac were as potent as *Srev* against VR2846A clinical isolate all through the experiment ( $p = 0.05$ ). As soon as 4 days post-infection, SDIS and SPac inhibited more than 75% of p24 production of the clinical isolate at 1  $\mu\text{M}$  concentration compared to control infected, untreated cells. The antisense molecules could maintain the same high level of protection for at least 14 days, at which time the experiment was ended. More than 99% inhibition of p24 production was observed in infected SDIS-treated cells 14 days post-infection. The same level of inhibition was obtained in infected, *Srev*-treated cells, while inhibition was 88% in infected, SPac-treated cells.

*A combination of three antisense oligonucleotides inhibits the replication of a HIV-1 clinical isolate in acutely infected primary cells*

In order to evaluate the advantage of using a combination of three antisense sequences over treatment with drugs used individually, we compared the antiviral activity of a three-ODN combination with the individual drugs in PBMCs acutely infected with HIV-1 isolate VR2844A. Infected cells were treated with the three antisense drugs *Srev*, SDIS and SPac added in culture medium either individually or in combination, at concentrations ranging from 0.1 to 3  $\mu\text{M}$ . The p24 production was determined in supernatant after 7 days of treatment. Results are presented in Figure 5 as percent inhibition of p24 production compared to infected untreated controls. At 0.1 and 0.5  $\mu\text{M}$  final concentrations, the three-antisense combination showed higher inhibitory activity than antisense ODNs used individually ( $p = 0.05$ ); about 4 to 19-fold, depending on the ODN, at 0.1  $\mu\text{M}$ , and 2 to 27-fold at 0.5  $\mu\text{M}$ . At 1  $\mu\text{M}$  concentration, the three-drug combination showed similar activity to *Srev* and SPac used individually and higher antiviral activity (about 2-fold) than SDIS used alone, but the difference between the activity of SDIS and the cocktail was found not significant. At higher concentration, 3  $\mu\text{M}$ , no significant difference between the antiviral activity of the three-drug regimen and the single-drug regimens could be noticed.

*Cytotoxicity of phosphorothioate antisense oligonucleotides*

To determine the cytotoxicity of our phosphorothioate oligonucleotides free in solution, we compared their effects on cell viability in uninfected cells by the MTT assay at concentrations ranging from 0.1 to 18.5  $\mu\text{M}$  in MOLT-3 cells, and from 0.1 to 7.5  $\mu\text{M}$  in PBMCs (Table 3). During the 14 days of treatment with ODNs at 0.1 and 1.5  $\mu\text{M}$ , uninfected MOLT-3 cells showed no important loss of viability compared to uninfected, unexposed cells. At 1.5  $\mu\text{M}$ , cells treated with GEM 91 showed significant lower viability than cells treated with either SDIS or SPac. When higher doses of ODNs such as 7.5 and 18.5  $\mu\text{M}$  were used, some cytotoxic effects were observed 3 days post-treatment with *Srev* at 7.5  $\mu\text{M}$  (74 % viability) and SPac at 18.5  $\mu\text{M}$  (79 % viability), however these concentrations are largely above the concentrations that showed antiviral activity in previous assays (1  $\mu\text{M}$ ). In cultures treated with *Srev* at 7.5  $\mu\text{M}$ , significant less viability was observed compared to cultures treated with SDIS or SPac at this same concentration. In uninfected PBMCs, phosphorothioate oligonucleotides had little effect on cell viability at concentrations ranging from 0.1 to 2  $\mu\text{M}$  14 days post-treatment except for SPac and the three-drug combination which reduced cell viability to 74% at 2  $\mu\text{M}$  (Table 3). At 7.5  $\mu\text{M}$ , some cytotoxic effects were observed in cells treated with any of the treatment. No significant difference between the cell viability in PBMCs treated with antisense ODNs used alone and PBMCs treated with the cocktail was found at any concentration. In H9/HTLV-III, no cytotoxic effects were noted with all oligos at any concentration ranging from 1.5 to 18.5  $\mu\text{M}$  after 3-4 days post-treatment (results not shown).

## Discussion

We have compared the effect on HIV replication of two new antisense ODNs, SDIS and SPac which are complementary to two distinct sequences in the 5'-leader region of HIV-1 genome, with two well known antisense sequences : anti-*rev* and GEM 91. We restricted the scope of this study to the level of the antisense activity and not to the nature of the activity (specific vs non-specific effects) since the latter topic will be addressed in details in a further contribution (Lavigne et al. submitted). The two novel sequences targeted by SDIS and SPac, are highly conserved among different HIV-1 strains and have been shown to be essential for RNA encapsidation [4, 12, 13, 17]. Recently, a study [23] has showed that the HIV-1 encapsidation site is multipartite and composed of distinct functional encapsidation elements identified as hairpin structures. Two functional subregions, hairpins 1 and 3, which are in the 5'-leader region located between the primer binding site and the *gag* start codon, have been identified by these authors as essential for HIV-1 RNA encapsidation. The sequences targeted in our experiments span those two functional subregions and contain hairpin loop structure that has been shown to increase resistance to degradation and enhance activity [37, 39].

Other conserved sequences from the 5'-end of the HIV-1 genome have been the subject of investigation in previous studies for antisense targets. Sczakiel and Pawlita (1991) [30] showed that human T-cell line Jurkat constitutively expressing HIV-1 antisense RNA targeted against 407 bp of the 5' leader-*gag* region of HIV-1 (nucleotides +222 to +629) including the first splice donor site, inhibited virus release into the culture

medium at 88% on day 10 and 68% on day 14 post-infection. In another study [9], resistance to HIV-1 infection could be conferred to cells expressing the HIV-1  $\psi$  signal in an antisense orientation since no virus could be detected in the culture supernatants for up to 30 days post-infection. Also, three antisense oligonucleotides targeting the 5' LTR of HIV RNA were assayed to block reverse transcription in the presence of an 18-mer primer complementary to HIV PBS region [8]. The ODN targeting the transactivating response element TAR, did not affect reverse transcription while the ODN targeting a sequence in the U<sub>5</sub> region and the ODN targeting a sequence contiguous to the primer binding site (PrePBS) efficiently inhibited reverse transcription. Furthermore, antisense oligonucleotides directed against the dimerization site of HIV-1 Mal strain (nucleotides +260 to +294) were able to interfere with dimerization of a viral RNA fragment *in vitro* [33].

Recently a 20-mer phosphorotioate oligodeoxynucleotide (nt +262 to +281) covering a small portion (8 nucleotides) of the molecule SDIS reported here (nt +245 to +270), was tested in a HIV-1 (strain IIB)-acutely infected cord-blood mononuclear cells [5]. A reduction of approximately 50 % in RT activity was observed in the culture supernatant of antisense-treated HIV-1 infected cells 7 days post-infection at 0.1 and 1  $\mu$ M concentrations and around 73 % at 10  $\mu$ M concentration.

In this study, two novel sequences were targeting in the region located downstream the primer binding site and upstream the AUG initiation codon of *gag*. Assays in infected cell cultures showed that these two antisense ODNs can efficiently

inhibit viral replication with high level of activity. SDIS and SPac inhibited HIV-1 replication *in vitro* as efficiently as other sequences well-known for their anti-HIV activity such as anti-*rev* and GEM 91 in both acute and chronic infection models. GEM 91 is a 25-mer oligodeoxynucleotide phosphorothioate designed to bind to the translation initiation site of HIV-1 *gag* mRNA [2]. Anti-HIV activity of GEM 91 has been largely demonstrated in different cell culture models against various HIV-1 strains [2, 3, 20].  $IC_{50}$  (effective concentration inhibiting 50 % of viral replication) of GEM 91 in acute infection varied from 0.1 to 0.3  $\mu$ M. In comparison,  $IC_{50}$  of SDIS and SPac was below 0.1  $\mu$ M in our acute infection assays with laboratory strain IIIB.

For ODNs to be useful as therapeutic agents *in vivo*, they need to be effective in inhibiting HIV-1 clinical isolate replication. To address this issue, we studied the antiviral effects of our antisense molecules in human primary cells infected with a HIV-1 clinical isolate *in vitro* and compared their activity with *Srev*. We demonstrated that SDIS and SPac inhibited replication (80 % and more) of the clinical isolate VR2846A with non-syncytia-inducing phenotype at 1  $\mu$ M concentration. In this model,  $IC_{50}$  for SDIS was below 0.1  $\mu$ M, while  $IC_{50}$  for SPac was approximately 0.5  $\mu$ M (not shown). In addition, SDIS and SPac showed similar level of inhibition than *Srev* at 2  $\mu$ M against another clinical isolate (VR2844A) with non-syncytia phenotype for up to 14 days (not shown). Few investigations of ODN's antiviral activity against clinical isolates have been reported in the literature. GEM 91 has been tested on primary lymphocytes for its antiviral effect on clinical isolate HIV-1/571 [20]. GEM 91 almost completely blocked the replication of this isolate at 1  $\mu$ M for up to 14 days while treatment with 0.25  $\mu$ M was much less

effective (46% at day 7 ; 2% at day 11). Furthermore, SDIS and SPac showed similar or lower cytotoxic effects on MOLT-3 cell compared to *Srev* and GEM 91. In PBMCs, all three oligonucleotides showed similar effects on cell viability. In both cell assays, slight effects in cell viability were only noted at concentrations largely above the effective concentrations.

Our preliminary results on the use of antisense molecules in combination, obtained in PBMCs acutely infected with clinical isolate VR2844A, showed that antiviral effects of antisense drugs are improved at low concentrations (0.1 and 0.5  $\mu\text{M}$ ) when used in combination compared to drugs used individually. These observations suggest that a multitargeting approach using antisense drugs might be successful *in vivo* since micromolar concentrations are usually difficult to obtain in plasma and tissues after systemic administration. Complexation of ODN with lipid-based carrier system is one of the most promising approach to achieve higher cellular uptake and allow antiviral activity of antisense ODNs at low concentrations. In a previous study, we have demonstrated that cellular uptake and antiviral activity of antisense ODN *Srev* complexed to the new DLS lipid-based carrier system were strongly increased compared to its free form in different cell models [15]. Therefore, a multitargeting approach using antisense drugs complexed with DLS, might be a promising strategy since cellular uptake and intracytoplasmic as well as intranuclear localization would be enhanced. This issue will be addressed in a further contribution (Lavigne et al., submitted).



---

## Acknowledgements

This research was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (G.S. and J.Y.). C. Lavigne benefited from post-graduate scholarships from the *Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche* (FCAR).

The authors want to thank sincerely Mrs M. Fauvel for providing the VR2844A and VR2846A clinical isolates of HIV and for giving access to the Laboratoire de Santé Publique du Québec's P3 facilities used for virus manipulation.

---

**REFERENCES**

1. Agrawal, S., Ikeuchi, T., Sun, D., Sarin, P.S., Konopka, A., J. Maize, J., and Zamecnik, P.C. (1989) Inhibition of human immunodeficiency virus in early infected and chronically infected cells by antisense oligodeoxynucleotide and its phosphorothioate analogue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7790-7794.
2. Agrawal, S. and Tang, J.Y. (1992) GEM\*91-An antisense oligonucleotide phosphorothioate as a therapeutic agent for AIDS. *Antisense Res. Dev.* 2, 261-266.
3. Agrawal, S. (1995) GEM 91 : Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate inhibitor of HIV-1 replication, *Drugs of the Future* 20, 344-351.
4. Aldovini, A. and Young, R.A. (1990) Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* 64, 1920-1926.
5. Anazodo, M.I., Salomon, H., Friesen, A.D., Wainberg, M.A., and Wright, J.A. (1995) Antiviral activity and protection of cells against human immunodeficiency virus type-1 using an antisense oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate complementary to the 5'-LTR region of the viral genome. *Gene* 166, 227-232.

6. Askari, F. K. and McDonnell, W.M. (1996) Antisense-oligonucleotide therapy. *N. Engl. J. Med.* 334, 316-318.
7. Beltinger, C., Saragovi, H.U., Smith, R.M., LeSauter, L., Shah, N., DeDionisio, L., Christensen, L., Raible, A., Jarett, L., and Gewirtz, A.M. (1995) Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides. *J. Clin. Invest.* 95, 1814-1823.
8. Bordier, B., Hélène, C., Barr, P.J., Litvak, S., and Sarih-Cottin, L. (1992) *In vitro* effect of antisense oligonucleotides on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* 20, 5999-6006.
9. Cohli, H., Fan, B., Joshi, R.L., Ramezani, A., Li, X., and Joshi, S. (1994) Inhibition of HIV-1 multiplication in a human CD4<sup>+</sup> lymphocytic cell line expressing antisense and sense RNA molecules containing HIV-1 packaging signal and Rev Response Element(s). *Antisense Res. Dev.* 4, 19-26.
10. Crooke, S. (1997) Advances in understanding the pharmacological properties of antisense oligonucleotides. *Advances in Pharmacology* 40, 1-49.
11. De Mesmaeker, A., Altmann, K.-H., Waldner, A., and Wendeborn, S. (1995) Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 5, 343-355.

12. Hayashi, T., Shiao, T., Iwakura, Y., and Shibuta, H. (1992) RNA packaging signal of HIV-1. *Virology* 188, 590-599.
13. Kim, H.-J., Lee, K., and O'Rear, J.J. (1994) A short sequence upstream of the 5' Major splice site is important for encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *Virology*. 198, 336-340.
14. Kinchington, D., Galpin, S., Jaroszewski, J.W., Ghosh, K., Subasinghe, C., and Cohen, J.S. (1992) A comparison of gag, pol and rev antisense oligodeoxynucleotides as inhibitors of HIV-1. *Antivir. Res.* 17, 53-62.
15. Lavigne, C. and Thierry, A.R. Enhanced antisense inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in cell cultures by DLS delivery system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 566-571.
16. Lebedev, A.V. and Wickstrom, E. (1996) The chirality problem in P-substituted oligonucleotides. In : G. L. Trainor (Ed.), *Antisense Therapeutics : Progress and Prospects, (Perspectives in drug discovery and design vol. 4)* pp. 17-40, ESCOM Science Publishers B.V., Leiden.

17. Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1989) Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.* 63, 4085-4087.
18. Li, G., Lisziewicz, J., Sun, D., Zon, G., Daepler, S., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., and Klotman, M.E. (1993) Inhibition of Rev activity and human immunodeficiency virus type 1 replication by antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate analogs directed against the rev-responsive element. *J. Virol.* 67, 6882-6888.
19. Lisziewicz, J., Sun, D., Metelev, V., Zamecnik, P., Gallo, R.C., and Agrawal, S. (1993) Long-term treatment of human immunodeficiency virus-infected cells with antisense oligonucleotide phosphorothioates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3860-3864.
20. Lisziewicz, J., Sun, D., Weichold, F.F., Thierry, A.R., Lusso, P., Tang, J., Gallo, R.C., and Agrawal, S. (1994) Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate complementary to Gag mRNA blocks replication of human immunodeficiency virus type 1 in human peripheral blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7942-7946.
21. Matsukura, M., Shinozuka, K., Zon, G., Mitsuya, H., Reitz, M., Cohen, J.S., and Broder, S. (1987) Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides : inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7706-7710.

22. Matsukura, M., Zon, G., Shinozuka, K., Robert-Guroff, M., Shimada, T., Stein, C.A., Mitsuya, H., Wong-Staal, F., Cohen, J.S., and Broder, S. (1989) Regulation of viral expression of human immunodeficiency virus *in vitro* by an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide against *rev* (*art/trs*) in chronically infected cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4244-4248.
  
23. McBride, M. S. and Panganiban A.T. (1996) The human immunodeficiency virus type 1 encapsidation site is a multipartite RNA element composed of functional hairpin structures. J. Virol. 70, 2963-2973.
  
24. Muriaux, D., Girard, P.-M., Bonnet-Mathonière, B., and Paoletti, J. (1995) Dimerization of HIV-1<sub>Lai</sub> RNA at low ionic strength. J. Biol. Chem. 270, 8209-8216.
  
25. Pauwels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., Schols, D., Herdewijn, P., Desmyter, J., and De Clercq, E. (1988) Rapid and automated tetrazolium based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. J. Virol. Methods 20, 309-321.
  
26. Popovic, M., Read-Conole, E., and Gallo, R.C. (1984) T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III. Lancet II, 1472-1473.

27. Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., and Gallo, R.C. (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224, 497-500.
28. Putnam, D. A. (1996) Antisense strategies and therapeutic applications. *Am J Health-Syst Ph.* 53, 151-160.
29. Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starcich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway, S.R., Pearson, M.L., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Ghrayeb, J., Chang, N.T., Gallo, R.C., and Wong-Staal, F. (1985) Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 313, 277-284.
30. Sczakiel, G. and Pawlita, M. (1991) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells stably expressing antisense RNA. *J. Virol.* 65, 468-472.
31. Selvam, M.P., Buck, S.M., Blay, R.A., Mayner, R.E., Mied, P.A., Epstein, J.S. (1996) Inhibition of HIV replication by immunoliposomal antisense oligonucleotide. *Antivir. Res.* 33, 11-20.
32. Skripkin, E., Paillart, J.-C., Marquet, R., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1994) Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4945-4949.

33. Skripkin, E., Paillart, J.-C., Marquet, R., Blumenfeld, M., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1996) Mechanisms of inhibition of *in vitro* dimerization of HIV type 1 RNA by sense and antisense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* 271, 28812-28817.
34. Stein, C. A., Tonkinson, J., and Yakubov, L. (1991) Phosphorothioate oligodeoxynucleotides-antisense inhibitors of gene expression ? *Pharmacol. Ther.* 52, 365-384.
35. Stein, C. A. and Cheng, Y.-C. (1993) Antisense oligonucleotides as therapeutics agents : Is the bullet really magical ? *Science* 261, 1004-1012.
36. Stein, C. A. (1996) Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides : questions of specificity. *Trends Biotechnol.* 14, 147-149.
37. Tang, J. Y., Temsamani, J., and Agrawal, S. (1993) Self-stabilized antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioates : properties and anti-HIV activity. *Nucleic Acids Res.* 21, 2729-2735.
38. Thierry, A.R. and Dritschilo, A. (1992) Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity. *Nucleic Acids Res.* 20, 5691-5698.



39. Thierry, A. R., Rahman, A., and Dritschilo, A. (1993) Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 190, 952-960.
40. Vickers, T., Baker, B.F., Cook, P.D., Zounes, M., Buckheit Jr, R.W., Germany, J., and Ecker, D.J. (1991) Inhibition of HIV-LTR gene expression by oligonucleotides targeted to the TAR element. *Nucleic Acids Res.* 19, 3359-3368.
41. Zelphati, O., Imbach, J.-L., Signoret, N., Zon, G., Rayner, B., and Leserman, L. (1994) Antisense oligonucleotides in solution or encapsulated in immunoliposomes inhibit replication of HIV-1 by several different mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 22, 4307-4314.

---

## LEGENDS TO THE FIGURES

**Fig. 1.** Inhibition of syncytia formation in MOLT-3 cells acutely infected at a multiplicity of infection of 0.01 with HIV-1 (IIIB). Cells were infected as described in Materials and Methods and treated up to 21 days with phosphorothioate ODNs added free to the cultures. The photographs represent cell cultures 14 days (A-E) and 21 days (F-J) after treatment. (A and F) Control HIV-1-infected cells, untreated. (B and G) HIV-1-infected cells treated with 0.1  $\mu$ M *Srev*. (C and H) HIV-1-infected cells treated with 0.1  $\mu$ M SDIS. (D and I) HIV-1-infected cells treated with 0.1  $\mu$ M SPac. (E and J) Control uninfected, untreated cells. Arrows point to a few syncytia visible at day 21. Magnification =  $\times 100$

**Fig. 2.** Antiviral effects of phosphorothioate oligonucleotides in acutely infected cells in long-term cultures. MOLT-3 cells were infected with HIV-1 (IIIB) laboratory strain (MOI = 0.01) as described in Materials and Methods. The level of p24 antigen was determined in the culture supernatants every 3 to 4 days by HIV-1 antigen capture assay. Inhibition of p24 production by the oligomers at 0.1  $\mu$ M concentration is compared with infected, untreated control cells. The results represent the mean of triplicate determinations. SD < 15%

**Fig. 3.** Antiviral effects of phosphorothioate antisense ODNs in chronically infected cells. H9 cells chronically infected with HIV-1 (IIIB) were incubated with various concentrations of oligonucleotides. At day 4, the level of p24 antigen was determined in the supernatants. The data are given as percent inhibition of p24 production, compared with the infected, untreated controls. Values represent the mean of triplicate experiments. SD < 15%.

**Fig. 4.** Antiviral effects of phosphorothioate ODNs in HIV-1-infected PBMCs. Clinical isolate VR2846A was used to infect PBMC at a viral titer  $TCID_{50} = 1000$ . The cells were treated with the oligonucleotides at 1  $\mu$ M concentration for up to 14 days. The results represent the average ( $\pm$  SD) of two separate experiments carried out in duplicate.

**Fig. 5.** Short-term inhibition of the replication of a HIV-1 clinical isolate in acutely infected peripheral blood mononuclear cells by a combination of three antisense sequences. PBMCs were infected with HIV-1 isolate VR2844A at a viral titer of  $TCID_{50} = 1000$  and cultured for 7 days in the presence of antisense ODNs added either individually or in combination at various concentrations. Data are given in terms of percent inhibition of p24 antigen production compared to infected, untreated control cultures. Cocktail : a combination of *Srev*, SDIS and SPac at equal molar ratio. Values represent the mean ( $\pm$  SD) of at least two separate experiments.

**Table 1.** Sequence of the oligonucleotides used for the treatment of HIV-1 infection *in vitro*.

<i>ODNs and cocktails</i>	<i>Nucleotide sequence and cocktail composition</i>	<i>Targeted viral sequence</i>
GEM 91 (antisense)	5'-CTCTCGCACCCATCTCTCCTTCT-3'	<i>gag</i>
Srev (antisense)	5'-TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCCTGCCA-3'	<i>rev</i>
SDIS (antisense)	5'-CTCTTGCCGTGCGCGCTTCAGCAAGC-3'	dimerization site
SPac (antisense)	5'-TCTAGCCTCCGCTAGTCAAAATTTTGGCG-3'	packaging signal $\psi$
Cocktail	Srev-SDIS-SPac	<i>rev</i> -dimerization site- $\psi$

Oligonucleotides GEM 91, Srev, SDIS, and SPac were synthesized with a phosphorothioate backbone.

**Table 2.** Evaluation of cell survival in HIV-infected MOLT-3 cells treated with ODNs at 0.1  $\mu$ M

	Number of viable cells per mL ( $\times 10^6$ ) <sup>a</sup>	
	<i>14 days</i>	<i>21 days</i>
Uninfected, untreated cells	1.07 $\pm$ 0.04	1.18 $\pm$ 0.05
Infected, untreated cells	0.40 $\pm$ 0.30	0.92 $\pm$ 0.50
Infected, SDIS-treated cells	1.00 $\pm$ 0.03	1.09 $\pm$ 0.13
Infected, SPac-treated cells	0.94 $\pm$ 0.10	1.09 $\pm$ 0.11

<sup>a</sup> Cell counts were determined by the colorimetric (MTT) assay. The data represent the average of triplicate experiments.

**Table 3.** Cytotoxicity of phosphorothioate oligonucleotide in MOLT-3 cell line and PBMC cultures

CELL VIABILITY (%)					
Cells	Oligos	0.1 $\mu$ M	1.5 $\mu$ M	7.5 $\mu$ M <sup>a</sup>	18.5 $\mu$ M <sup>a</sup>
MOLT-3	<i>Srev</i>	ND	ND	73.6 $\pm$ 4.8	85.0 $\pm$ 6.4
	GEM 91	87.0 $\pm$ 7.8	83.6 $\pm$ 4.8	ND	ND
	SDIS	93.4 $\pm$ 4.9	99.5 $\pm$ 0.8	91.1 $\pm$ 8.5	99.9 $\pm$ 0.2
	SPac	99.6 $\pm$ 0.9	99.6 $\pm$ 0.2	99.8 $\pm$ 0.4	79.1 $\pm$ 13.8
		0.1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2 $\mu$ M	7.5 $\mu$ M
PBMC	<i>Srev</i>	97.1 $\pm$ 5.0	85.9 $\pm$ 7.6	84.2 $\pm$ 2.5	78.6 $\pm$ 7.6
	SDIS	100 $\pm$ 0	85.2 $\pm$ 4.5	85.2 $\pm$ 7.0	73.2 $\pm$ 3.4
	SPac	98.0 $\pm$ 3.4	83.9 $\pm$ 8.4	74.3 $\pm$ 8.6	79.2 $\pm$ 3.4
	Cocktail	100 $\pm$ 0	89.9 $\pm$ 7.3	74.1 $\pm$ 11.7	73.8 $\pm$ 0.8

ND : not determined ; Cocktail : a combination of equal amount of *Srev*, SDIS and SPac.

Values represent the number of viable cells calculated as a percentage of the uninfected, untreated control cultures after 3 days (<sup>a</sup>) or 14 days treatment with S-ODNs. Viability was determined by the colorimetric (MTT) assay. Experiments were carried out in triplicate in MOLT-3 and in duplicate in PBMCs.

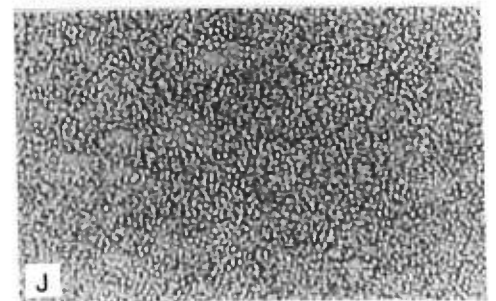
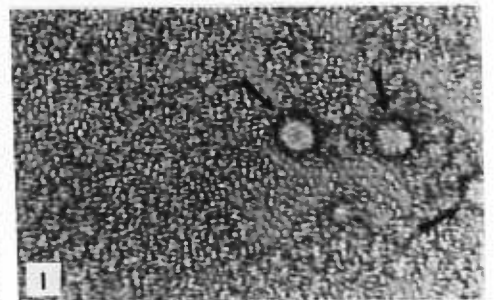
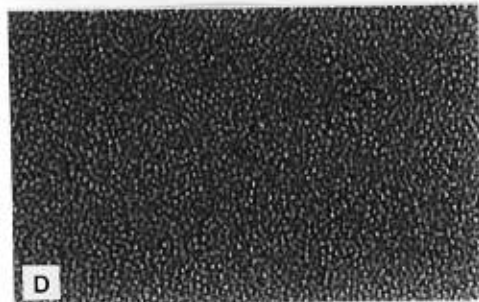
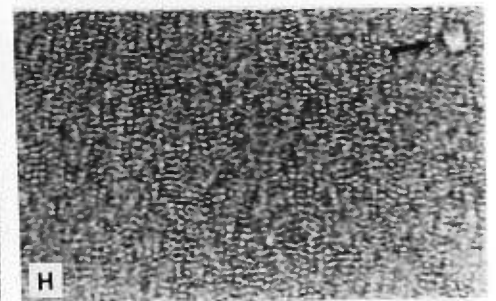
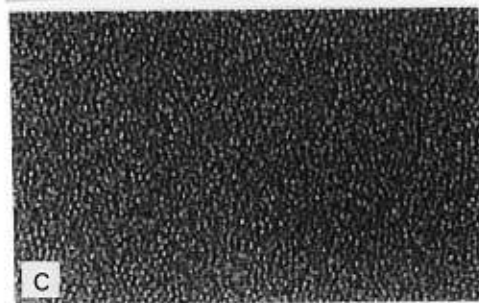
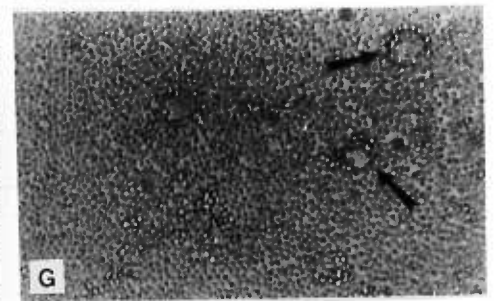
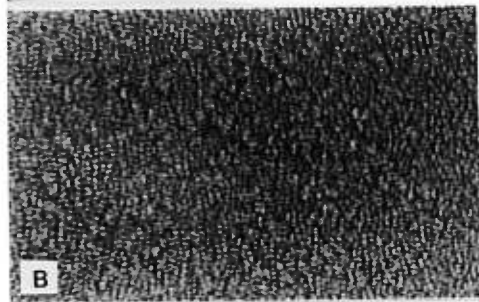
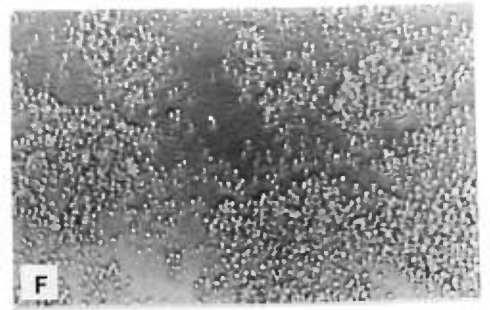
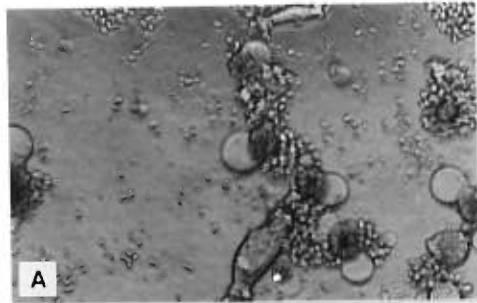


FIGURE 2

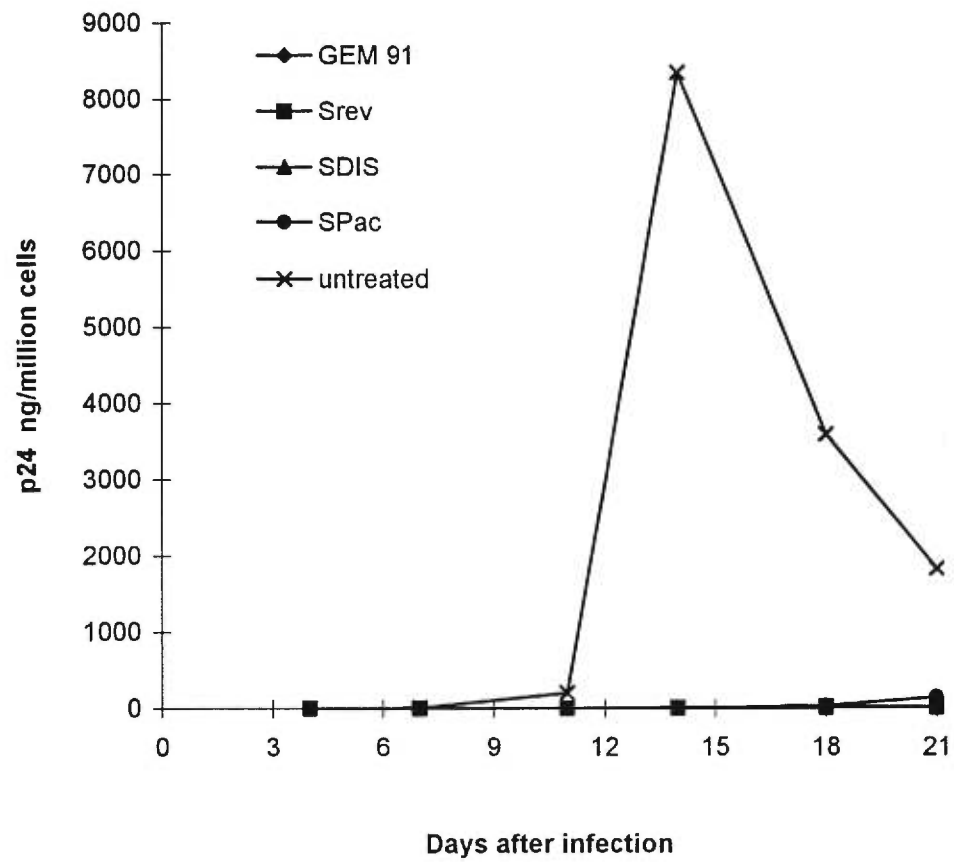




FIGURE 3

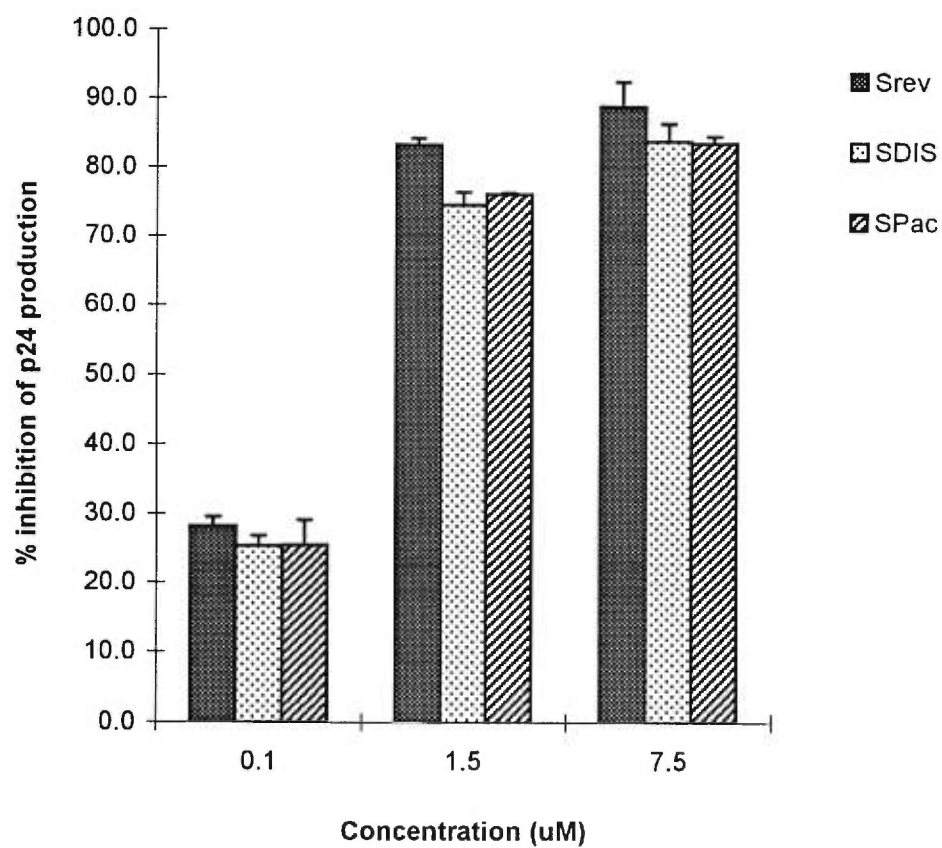


FIGURE 4

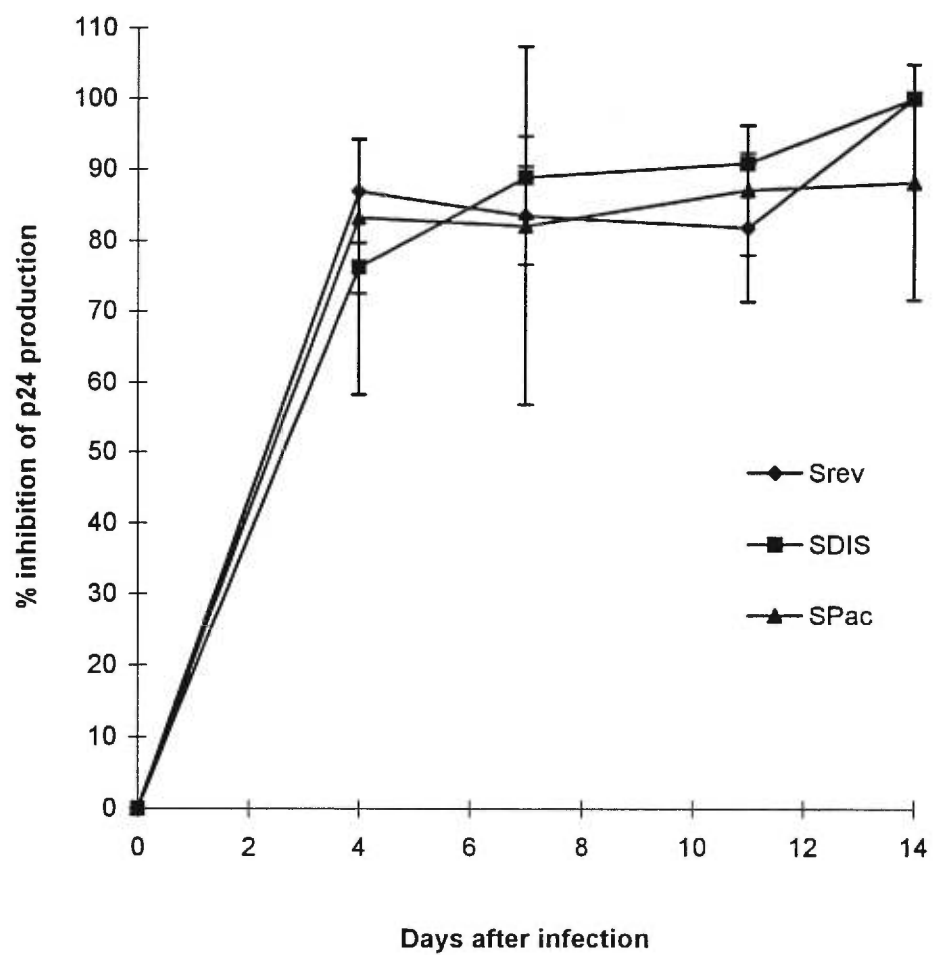
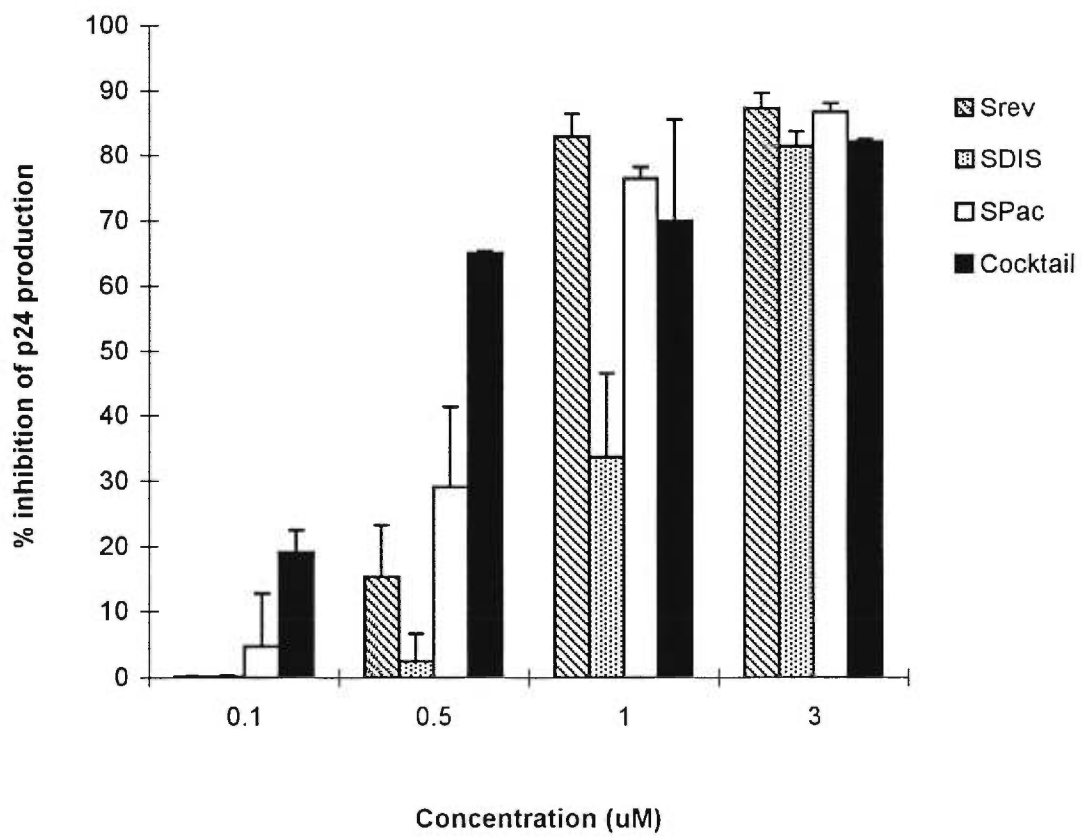


FIGURE 5



---

**CHAPITRE 3**

**ARTICLE 2**

---

## Enhanced Antisense Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Cell Cultures by DLS Delivery System

Carole Lavigne\*<sup>1</sup> and Alain R. Thierry†

\*Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7; and †Biovector Therapeutics, S.A., Chemin du Chêne Vert, BP 169, 31676 Labège Cedex, France

Received July 24, 1997

The relatively poor cell uptake of oligonucleotides and subsequent transport to the cytoplasm and nucleus is the main limitation in antisense therapeutics. The use of lipid-based carrier system is one of the most promising approaches to overcome these problems. In this study, we report the use of a new lipidic formulation to deliver a phosphorothioate oligonucleotide antisense directed against the regulatory gene *rev* of the HIV-1 genome and its application to the inhibition of HIV-1 in different cell culture models. Antiviral activity of either DLS-complexed or non-complexed oligonucleotides (ODNs) was compared in acutely and chronically infected cells. We have demonstrated that substantial antisense activity could be achieved at subnanomolar concentrations with DLS-complexed ODN in both acute and chronic infection systems. DLS-association highly improved inhibitory activity of the antisense ODN in acutely infected Molt-3 cells (100-fold) and primary cells (1000-fold) and in chronically infected H9 cells (1 500 000-fold). We have shown that anti-HIV activity of phosphorothioate ODNs can be strongly enhanced by using the DLS carrier system.

© 1997 Academic Press

Oligonucleotide-based therapy provides several potential advantages over traditional drugs, notably sequence specificity of recognition between the drug and the target, ease of design and limited cytotoxic effects (1). However, the efficacy of oligonucleotide (ODN) therapeutics appears to be limited in practice by several problems such as stability, cellular uptake, subcellular availability and non-specific effects (2-4). Significant progress has been made to resolve these problems,

particularly through the development of better systems for transport of antisense ODNs into cells using a variety of approaches (5). One of the most promising approach is the use of lipid-based carrier systems such as liposomes. Liposomes are microscopic closed vesicles composed of bilayered phospholipid membranes surrounding aqueous spaces in which drugs can be entrapped (6). Successful cellular delivery and enhancement of specific antisense activity have been demonstrated by some laboratories with different liposomal preparations such as conventional liposomes (7-9), cationic liposomes (10-14), pH-sensitive liposomes (15) and immunoliposomes (16-19).

Recently, a new lipidic formulation named DLS, has been developed and appeared efficient in delivering nucleic acids. This system results of complexe of DLS liposomes with nucleic acids which is of low particle size and of great homogeneous population (100-150 nm). The entrapment rate was found to be 88% of the initial ODN input dose (Lavigne et al., in preparation). High *in vitro* transfection efficiency of plasmid DNA, rapid cellular uptake and distribution in the cytoplasmic and nuclear compartments, stability at 4°C, low toxicity, relatively slow plasma clearance and wide-spread and long-lasting *in vivo* transgene expression in various mouse tissues make DLS formulation an attractive carrier system for systemic gene delivery (20, 21).

In this report, we have developed this system for the delivery of antisense ODNs in different cell culture models at low concentrations. We restricted the scope of this paper to the level of the antisense activity and not to the nature of the activity (sequence-specific vs non-sequence-specific activity) which will be addressed in a further contribution (Lavigne et al., in preparation). Cellular uptake and antisense activity of a phosphorothioate (PS) ODN directed against the regulatory *rev* gene of HIV-1 were strongly increased compared to its non-associated form. DLS-complexation appears to be a promising approach to bypass problems of extra-

<sup>1</sup> Corresponding author. Mailing address: Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Edifice 22, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7. Fax: (514) 686-5501. E-mail: carole.lavigne@sympatico.ca.

cellular nuclease degradation and poor cell penetration of oligonucleotides *in vitro*.

## MATERIALS AND METHODS

**Oligonucleotide synthesis.** The oligonucleotide 5'-TCG TCG CTG TCT CCG CTT CTT CCT GCC A-3' used in this study, a 28-mer complementary to the 5'-end sequence of HIV-1 *rev* mRNA was selected because of its known anti-HIV-1 activity in cell culture (22). Phosphorothioate synthesis was performed with an automated DNA synthesizer (BioServe Biotechnologies Laurel, MD, U.S.A.) with a sulfur atom introduced at each phosphodiester linkage. Synthesis was carried out on a 1  $\mu$ M scale. The oligonucleotides were deblocked, desalted and purified by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The oligonucleotides were quantitated by UV absorbance at 260 nm (1 OD  $\approx$  33  $\mu$ g of DNA).

**Preparation of ODN-liposome complexes.** DLS liposomes were formed by mixing 1 mg of dioctadecylamidoglycylspermidine (DOGS; Promega, Madison, WI) and 1 mg of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE; Sigma) as previously described as DLS-1 preparation (20, 21). Oligonucleotides were added to the liposome preparation at a final concentration of 0.26 mg/mL. The final aqueous phase contained 10  $\mu$ g of oligonucleotides for 38  $\mu$ L of rehydrated lipids. The preparation was incubated at room temperature for at least 30 minutes prior to addition to the cells. Dilution of the DLS-ODN preparation in sterile deionized water was made to obtain appropriate concentrations. DLS-ODN complexes were stored at 4°C up to the next treatment 3 or 4 days later. Fresh DLS-ODN complexes were prepared every week.

**Cells and virus.** The human lymphoid cell line Molt-3 was kindly provided by Dr. R.-P. Sekaly (Clinical Research Institute of Montreal, Québec, Canada). H9 cells chronically infected with HIV-1 (IIIB) (H9/HTLV-IIIB NIH 1983) (23, 24) were obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, (Rockville, MD, USA). Uninfected and infected cells were cultivated in RPMI 1640 culture medium (Gibco BRL) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, L-glutamine (4 mM) and gentamycin (50  $\mu$ g/mL) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy HIV-1-seronegative donors were isolated by Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech) gradient centrifugation of heparinized venous blood. The cells were collected, washed and stimulated with phytohemagglutinin-P (PHA-P) (1  $\mu$ g/mL; Pharmacia Biotech) for 24 hours. The cells were then washed and maintained in the same culture medium as above, supplemented with recombinant human interleukin-2 (10-20 U/mL; Cellular Products Inc.). HIV-1 laboratory strain IIIB was obtained from Advanced BioScience Laboratories Inc. (Kensington, MD), and used to infect Molt-3 cells and primary cells.

**Antiviral and cytotoxic assays.** To test the antiviral activity of the phosphorothioate antisense ODN *rev* (*Srev*) in a long-term model treatment in acutely infected cells, Molt-3 cells were infected with HIV-1 laboratory strain IIIB at a viral titer of TCID<sub>50</sub> = 1000 (viral stock 2000 TCID<sub>50</sub>/mL). After 2 hours of adsorption at 37°C, cells were washed twice in phosphate buffer saline to remove unadsorbed virus. Fresh complete culture medium was added and the cells were split into 96-well microtiter plates at a concentration of 4  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL. Cells were treated for up to 28 days with *Srev* added either free to the cultures at 10 or 100 nM concentrations or complexed with DLS formulation (DLS-*Srev*) at 0.01 to 1 nM concentrations. Every 3 or 4 days, cells were counted and split to 4  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL and supernatants were collected to determine the HIV-1 titer. For cytotoxic assays, uninfected Molt-3 cells were exposed to DLS-*Srev* or empty DLS at 0.1 nM for up to 28 days. Every 3 or 4 days, cells were harvested and cell counts determined.

Antiviral activity of *Srev* was also evaluated in a short-term acute infection model using primary cells. PBMCs were infected with HIV-1 (IIIB) as described above at a multiplicity of infection of 0.1. Cells

were plated in 96-well microtiter plates at a concentration of 4  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL and were cultured for 7 days with either 10 or 100 nM of *Srev* added free in culture medium or with 0.1 nM of DLS-*Srev*. The supernatants were then harvested and examined for virus production. Cell toxicity of DLS-ODN preparations were evaluated on uninfected cell cultures at concentrations ranging from 5 to 100 nM.

To study the inhibition of HIV-1 by the antisense ODN complexed with DLS formulation in chronically infected cells, we used the H9 cell line chronically infected with HIV-1 (IIIB) as a model. Cells were plated into 96-well microtiter plates at a concentration of 4  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL and antisense ODN was added either free at 0.1 and 1.5  $\mu$ M or complexed with DLS preparation at 1 and 10 pM concentrations. HIV-1 replication was determined by the p24 antigen assay in supernatants after 4 days. Cell toxicity of DLS-*Srev* was determined on infected cells after 7 days of exposure.

**Detection of HIV-1 p24 antigen.** Virus replication was determined by detection of p24 HIV-1 viral core antigen in cell-free supernatants by a p24 antigen-capture assay (Coulter Immunology or SAIC Frederick). Cell viability and cytotoxicity were monitored by the tetrazolium-based colorimetric cell proliferation assay (MTT) (25).

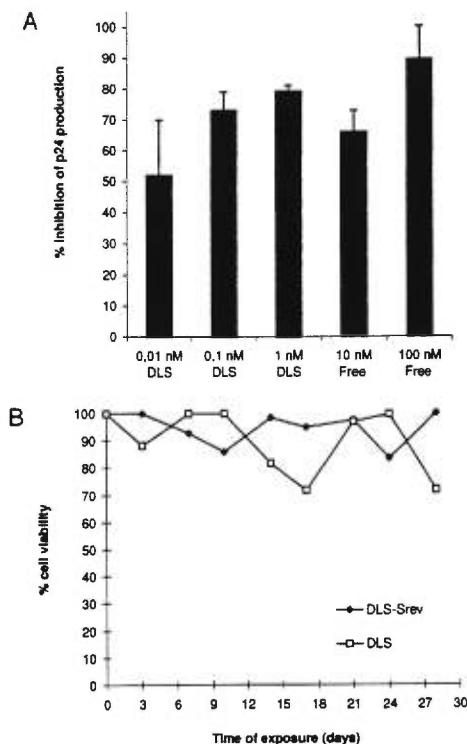
## RESULTS

### Long-Term Inhibition of HIV Replication in Acutely Infected Cell Lines

The effect of free and DLS-delivered phosphorothioate antisense *rev* was tested against HIV-1 (IIIB) in Molt-3 cell cultures. The inhibition of viral production was calculated at the peak of infection and was compared to infected, untreated cell cultures. Results of the dose response experiment in terms of percent inhibition of p24 production are shown in Figure 1 (A). When antisense *Srev* was complexed with DLS formulation, substantial antiviral activity was achieved at 0.1 and 1 nM (73% and 79%, respectively). The 50% inhibitory dose (IC<sub>50</sub>) was about 0.01 nM with DLS delivery. When *Srev* was added free in solution 66% inhibition was achieved at 10 nM and 90% at 100 nM. No significant ( $P < 0.05$ ) difference between the antiviral activity of 10 nM free *Srev* and 0.01 or 0.1 nM DLS-*Srev* were obtained. When the concentration of free *Srev* was increased to 100 nM, significantly higher antiviral activity (90%) was observed compared to DLS-*Srev* at 0.01 and 0.1 nM ( $P < 0.001$  and 0.005, respectively). In contrast, no significant difference was noted between the activity of 100 nM free *Srev* and 1 nM of DLS-*Srev*. Therefore, DLS delivery of ODN in acutely infected Molt-3 cells allowed a 100-fold reduction of the dose of antisense needed to provide high inhibitory effect. No important cytotoxic effects were noticed on uninfected cells exposed to 0.1 nM of either *Srev* complexed with DLS preparation or empty DLS for up to 28 days (Figure 1B).

### Inhibition of HIV Replication in Acutely Infected Primary Cells

In order to evaluate the efficacy of DLS formulation to deliver ODNs in primary cells we tested the antiviral activity of *Srev* either free in solution or complexed



**FIG. 1.** Long-term assay in Molt-3 cells acutely infected with HIV-1 (IIIB). (A) Dose-response effects of antisense ODN *Srev* added either free in solution or complexed to DLS formulation. Cells were infected with HIV-1 (IIIB) at a viral titer of 1000 TCID<sub>50</sub> and p24 production in cell culture supernatants was determined at the peak of infection for each assay. Values are expressed in terms of percent inhibition compared to infected untreated cell cultures. (B) Cell toxicity of DLS-*Srev* added to uninfected Molt-3 cell cultures at 0.1 nM concentration. Cell counts were determined by the MTT assay and reported as percent cell viability compared to uninfected, unexposed cell cultures. Values represent the mean of two separate experiments done in duplicate (SD  $\leq$  15%).

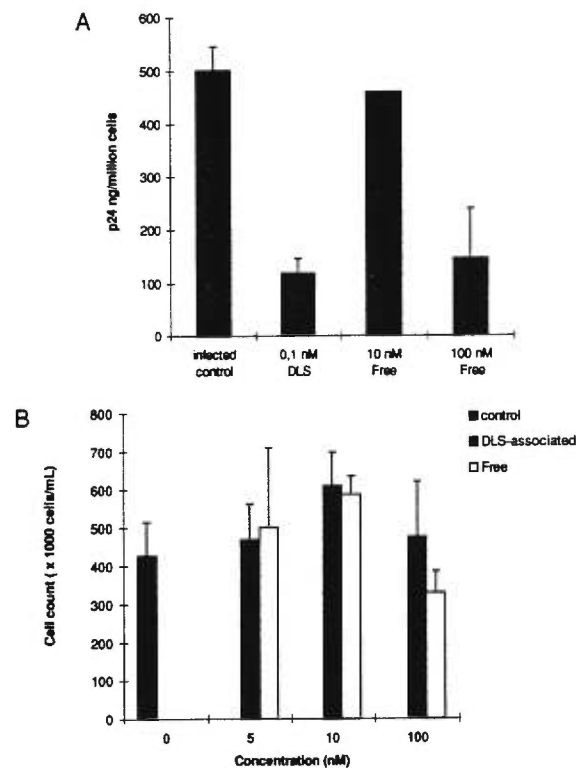
with DLS in PBMCs acutely infected with HIV-1 (IIIB). After 7 days of treatment, viral production in culture supernatants was determined in terms of p24 level. Data corrected for cell number are shown in Figure 2 (A). With 10 nM free *Srev*, very little reduction of p24 production (8%) was obtained compared to the infected, untreated control cultures. In contrast, with a higher concentration such as 100 nM, the p24 production was considerably reduced (71% reduction) with free *Srev*. Roughly the same level of p24 reduction (77% reduction) was obtained when cells were treated with *Srev* delivered by DLS at a concentration 1000-fold lower (0.1 nM). In this cell assay, therefore, an improvement factor of 1000 was provided by delivering the ODN with the DLS preparation.

Dose-response effect on cell viability after 7 days of exposure was evaluated with either free or DLS-*Srev*

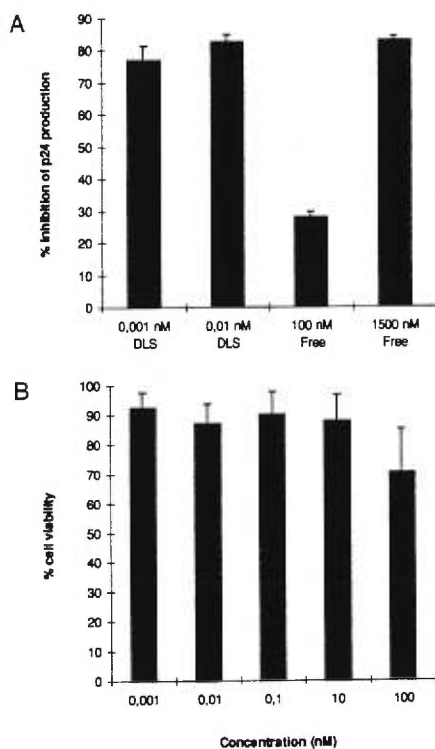
and was compared to untreated, unexposed cell cultures (Figure 2B). No cytotoxic effects were noted when cells were exposed to DLS-*Srev* at all the concentrations tested for up to 100 nM. Although no loss of cell viability was noted with free *Srev* at 5 and 10 nM, some cytotoxic effects were observed with 100 nM of free *Srev* (23% reduction of cell viability) compared to control cultures.

#### *Inhibition of HIV Replication in Chronically Infected Cell Lines*

The ability of DLS formulation to deliver ODN in chronically infected cells was investigated using the cell line H9/HTLV-IIIIB. As shown in Figure 3 (A), p24 production in supernatant of cultures treated with DLS-*Srev* was strongly reduced at very low DLS-ODN concentrations (77% reduction at 0.001 nM and 83% at 0.01 nM). Similar antiviral activity with free *Srev* was



**FIG. 2.** Short-term assay in acutely infected peripheral blood mononuclear cells with HIV-1 (IIIB). (A) Antiviral activity of antisense *Srev*. Cells were infected and treated for 7 days with *Srev* either in its free or DLS-complexed form. Cell culture supernatants were collected and the level of p24 determined. Values represent the mean of two separate experiments ( $\pm$ SD). (B) Cell toxicity of antisense *Srev*. Uninfected PBMCs were exposed to free *Srev* or DLS-*Srev* at various concentrations. After 7 days, cell numbers were compared to unexposed control cultures. Cell counts were determined by the MTT assay. Values represent the mean ( $\pm$ SD) of triplicate determinations.



**FIG. 3.** Short-term assay in chronically infected H9 cells with HTLV-IIIb. (A) Antiviral activity of phosphorothioate antisense *Srev*. Cells were treated with various concentrations of *Srev* added either free or DLS-complexed in culture medium. After 4 days, p24 production was determined in cell culture supernatants. Values represent the mean ( $\pm$ SD) of triplicate determinations. (B) Cell toxicity of phosphorothioate antisense *Srev* complexed with DLS formulation. Chronically infected cells were exposed to various concentrations of DLS-*Srev* and cell counts were determined by the MTT assay after 7 days. Data are reported in term of percent cell viability compared to infected, unexposed control cultures. Values represent the mean ( $\pm$ SD) of at least three separate experiments done in duplicate.

achieved only when cells were treated with 1.5  $\mu$ M (83% reduction of p24 production). With 100 nM of free *Srev*, little effect on viral production was seen (28% reduction). Therefore, DLS delivery improved the antisense activity of *Srev* by a factor of  $1.5 \times 10^6$  in this cell model compared to addition of the ODN directly in culture medium. Limited cytotoxic effects (30% reduction in cell viability) in infected cell cultures were observed only with DLS-*Srev* at the highest concentration tested (100 nM, Figure 3B).

About 90% of the antisense activity reported in all cell assays were due to non-sequence-specific activity (results not shown).

#### DISCUSSION

In this study, we have demonstrated that the replication of HIV-1 strain IIIb in different cell culture assays

can be efficiently inhibited by antisense oligonucleotides directed against the regulatory *rev* gene complexed to the new DLS lipidic formulation. Here, we looked only at the level of the antisense activity since the complexity of the antisense activity (sequence specificity) will be explored in a further contribution (Lavigne et al. in preparation). DLS formulation is a mixture of cationic (DOGS) and neutral (DOPE) lipids which appears as small unilamellar vesicles (SUV) of approximately 50 nm diameter. When DNA or ODN is added to the DLS preparation, a completely new structure with a different particle size (100-150 nm) is obtained. The cationic lipid-nucleic acid complex DLS-ODN, conventionally named lipoplex (26), is very stable and shows great homogeneity (21).

Here, we have shown that the DLS formulation enabled delivery of entrapped oligonucleotides to both acutely and chronically HIV-1-infected cells at subnanomolar concentrations. In all the cell assays, the amount of DLS-complexed phosphorothioate antisense ODN required for antiviral activity was at least 100 times lower than for the non-complexed oligomer. In acutely infected Molt-3 cell line, antiviral activity of antisense DLS-complexed *Srev* was improved by a factor of 100 compared to free *Srev*. In PBMCs, an improvement of antisense activity of 1000 was achieved when ODNs were complexed to DLS formulation. In our chronic infection system, we obtained the highest improvement of antisense activity of DLS-*Srev* since inhibition of viral production was observed at 0.001 nM compared to 1.5  $\mu$ M with free *Srev*, for an increase of 1,500,000 times. These results suggest that DLS lipidic formulation can be an efficient carrier for intracellular delivery of oligonucleotides in different cell types.

Compared to other previous studies on ODN delivered by liposomes in which improvement of antisense potency against HIV-1 was also reported in cell culture models after delivery with lipid-formulated ODN, our carrier system allowed a much higher improvement of antisense activity and significant inhibitory activity at much lower concentrations. In a COS-like monkey kidney cell line (CMT3) stably transfected with plasmids containing HIV-1 *gag* and *pol* or *rev* genes derived from cDNA clone BH10, the antisense activity of an ODN named GPI2A was markedly increased in the presence of lipofectin reagent (13). In this model, free GPI2A had limited inhibitory activity on viral protein synthesis (20%) at 5  $\mu$ M and was ineffective at 1  $\mu$ M. When GPI2A was delivered by lipofectin, significant inhibition of p24 viral core antigen synthesis was observed at 1  $\mu$ M and  $IC_{50}$  (50% inhibitory concentration) was estimated to be approximately 0.4  $\mu$ M. Thus, in this cell assay, the antisense effect of GPI2A was enhanced by  $\sim$ 10-fold through encapsulation in a cationic lipid formulation.

In two other recent studies, the use of immunoliposomes for delivering DNA oligonucleotides in HIV-1-



infected cell cultures was reported (18, 19). First, liposomes with cell-specific activity conferred by covalent coupling to Protein A in conjunction with monoclonal antibodies specific for the human major histocompatibility complex (MHC)-encoded HLA-B and C molecules were used as a transport system for delivering ODNs in cells acutely and chronically infected with HIV-1 (IIIB) (18). In acutely infected CEM cells, efficiency of antisense sequence *Srev* was improved by a factor of 5 when encapsulated in immunoliposomes.  $IC_{50}$  for free *Srev* was about  $0.5 \mu\text{M}$  while  $IC_{50}$  for liposome-encapsulated *Srev* was about  $0.1 \mu\text{M}$ . In chronically infected CEM cells, *Srev* encapsulated in HLA-targeted liposomes inhibited viral replication at concentrations 40-50 times lower ( $IC_{50} \leq 0.2 \mu\text{M}$ ) than that required for the free form ( $IC_{50} \sim 7.5 \mu\text{M}$ ).

Second, CD4 monoclonal antibody-targeted liposomes containing *rev* antisense PS-ODNs was evaluated in cells acutely infected with HIV-1 (IIIB) (19). In infected H9 cells, as well as peripheral blood T-lymphocytes (PBL), viral replication was reduced by 85% with  $4 \mu\text{g/mL}$  of *Srev*-immunoliposomes compared to 40-45% in H9 cells and 30% in PBL cells with  $4 \mu\text{g/mL}$  of free *Srev*. Thus, in these infection models, encapsulation into immunoliposomes enhanced antisense activity of *Srev* by a factor of 2. Therefore, DLS delivery system appears to be a powerful system for delivering ODNs in cell cultures and seems to be the most potent lipidic formulation presently reported in the literature.

We found different efficacy rates depending on the type of infection analyzed. Such differences between cell culture models evaluated simultaneously in the same study have also been reported with the antisense sequence *Srev* encapsulated in immunoliposomes (18). As mentioned above, the inhibition of HIV-1 replication by HLA-targeted liposome-encapsulated S-anti-*rev* was observed at concentrations 5 times lower in acute infection and 40-50 times lower in chronic infection compared to that observed with its free form. One possible explanation is that the association of ODNs with liposomes may protect DNA from degradative enzymes in endosomal vesicles leading eventually to higher intracytoplasmic and intranuclear accumulation. Increased intranuclear localization of ODNs encapsulated into liposomes compared to non-encapsulated ODNs has been already demonstrated in Molt-3 cell line using laser-assisted confocal microscopy (8). Higher intranuclear localization may favor antisense activity in chronic infection because the site of action in this model is expected to be predominantly in the nucleus since viral nucleic acid is already integrated into the cellular genome. In contrast, in acute infection system, phosphorothioate ODNs are known to act by different mechanisms such as non-specific effects by interference with virus binding to its membrane receptor, with virion internalization, or with viral reverse transcriptase in the cytoplasm, in addition to specific effects by hybridization to their viral mRNA target resulting in

inhibition of translation process into protein (27). Therefore, in acute infection, the site of action of PS-ODNs is mainly located in the cytoplasm, and a predominant intranuclear localization may disadvantage antisense activity in this model compared to chronic infection model. The higher activity of DLS-ODN on chronically infected cells compared to acutely infected cells supports this hypothesis. We can conclude that association of ODNs with the DLS carrier system allows increased intracellular availability of ODNs by bypassing vesicular trafficking resulting in a significant improvement of the efficacy of this class of compounds in both acute and chronic infection compared to non-complexed ODNs.

Unmodified antisense oligonucleotides have been reported to be unstable in serum and in cells (28) and to have low efficiency of cell penetration limiting their application (6). Consequently, the concentrations required to display activity *in vitro* with this class of compound are generally higher than  $10 \mu\text{M}$  (29). High antisense activity could also be achieved with phosphodiester antisense *rev* complexed with DLS formulation in acutely infected cell line and PBMCs at  $0.1 \text{ nM}$  (73% and 71%, respectively) and in chronically infected H9/HTLV-IIIB cell line at  $0.001 \text{ nM}$  (83%) (Lavigne et al. in preparation). This suggests that the DLS delivery system can efficiently protect unmodified oligonucleotides against nuclease degradation in different cell types allowing antisense activity at very low concentrations.

In conclusion, DLS-liposomes provided a very high level of improvement of antisense activity in HIV-1-infected cells and are certainly among the most efficient lipid-based carrier system presently reported in the literature. The most spectacular increase in efficiency was achieved in chronic infection in which ODNs delivered by DLS preparation showed over one million times more potency compared to free ODNs. The efficient intracellular delivery and inhibition activity of DLS-ODNs in peripheral blood mononuclear cells is very encouraging and promising for *in vivo* application of this new lipid formulation since studies in *in vitro* freshly prepared PBMC cultures are closely representative of the process of HIV-1 infection *in vivo*. The mechanism of action of DLS-associated oligonucleotides, their specific antisense activity and their extension to other target sequences are presently under investigation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by NIH grants. C. Lavigne benefited from post-graduate scholarships from the Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR) from the Province of Québec.

#### REFERENCES

1. Eckstein, F. (1996) *Science Spectra* 7, 56-61.
2. Agrawal, S., Sarin, P. S., Zamecnik, M., and Zamecnik, P. C. (1992) *in Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA*

- (Erickson, R. P., and Izant, J. G., Eds.), pp. 273-283. Raven Press, New York, NY.
3. Stein, C. A., and Cheng, Y.-C. (1993) *Science* **261**, 1004-1012.
  4. Thierry, A. R., and Takle, G. B. (1995) in *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics* (Akhtar, S., Ed.), pp. 199-221. CRC Press, Boca Raton, Florida.
  5. Rojanasakul, Y. (1996) *Advanced Drug Delivery Reviews* **18**, 115-131.
  6. Thierry, A. R., Rahman, A., and Dritschilo, A. (1992) in *Gene Regulation: Antisense RNA and DNA* (Erickson, R. P., and Izant, J. G., Eds.), pp. 147-161. Raven Press, New York, NY.
  7. Thierry, A. R., and Dritschilo, A. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **660**, 300-302.
  8. Thierry, A. R., and Dritschilo, A. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 5691-5698.
  9. Thierry, A. R., Rahman, A., and Dritschilo, A. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 952-960.
  10. Bennett, C. F., Chiang, M.-Y., Chan, H. C., Shoemaker, J. E. E., and Mirabelli, C. K. (1992) *Mol. Pharmacol.* **41**, 1023-1033.
  11. Bennett, C. F., Chiang, M.-Y., Chan, H., and Grimm, S. (1993) *J. Liposome Res.* **3**, 85-102.
  12. Wagner, R. W. (1994) *Nature* **372**, 333-335.
  13. Anazodo, M. I., Wainberg, M. A., Friesen, A. D., and Wright, J. A. (1995) *J. Virol.* **69**, 1794-1801.
  14. Hatta, T., Nakagawa, Y., Takai, K., Nakada, S., Yokota, T., and Takaku, H. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 341-346.
  15. Ropert, C., Lavignon, M., Dubernet, C., Couvreur, P., and Malvy, C. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 879-885.
  16. Leonetti, J.-P., Machy, P., Degols, G., Lebleu, B., and Leserman, L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2448-2451.
  17. Leserman, L., Machy, P., and Zelphati, O. (1994) *J. Liposome Res.* **4**, 107-119.
  18. Zelphati, O., Imbach, J.-L., Signoret, N., Zon, G., Rayner, B., and Leserman, L. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4307-4314.
  19. Selvam, M. P., Buck, S. M., Blay, R. A., Mayner, R. E., Mied, P. A., and Epstein, J. S. (1996) *Antivir. Res.* **33**, 11-20.
  20. Thierry, A. R., Lunardi-Iskandar, Y., Bryant, J. L., Rabinovich, P., Gallo, R. C., and Mahan, L. C. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9742-9746.
  21. Thierry, A. R., Rabinovich, P., Peng, B., Mahan, L. C., Bryant, J. L., and Gallo, R. C. (1997) *Gene Ther.* **4**, 226-237.
  22. Matsukura, M., Zon, G., Shinozuka, K., Robert-Guroff, M., Shimada, T., Stein, C. A., Mitsuya, H., Wong-Staal, F., Cohen, J. S., and Broder, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4244-4248.
  23. Popovic, M., Read-Conole, E., and Gallo, R. C. (1984) *Lancet* **II**, 1472-1473.
  24. Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C. (1984) *Science* **224**, 497-500.
  25. Pauwels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., Schols, D., Herdewijn, P., Desmyter, J., and De Clercq, E. (1988) *J. Virol. Methods* **20**, 309-321.
  26. Felgner, P. L., Barenholz, Y., Behr, J. P., Cheng, S. H., Cullis, P., Huang, L., Jessee, J. A., Seymour, L., Szoka, F., Thierry, A. R., Wagner, E., and Wu, G. (1997) *Hum. Gene Ther.* **8**, 511-512.
  27. Stein, C. A., Tonkinson, J. L., and Yakubov, L. (1991) *Pharmacol. Ther.* **52**, 365-384.
  28. Akhtar, S., Kole, R., and Juliano, R. L. (1991) *Life Sci.* **49**, 1793-1801.
  29. Crooke, S. T. (1992) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 329-376.

---

**CHAPITRE 4**

**ARTICLE 3**

**ON THE SPECIFICITY OF ANTISENSE ACTIVITY FOR THE INHIBITION  
OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 IN CELL CULTURE**

**Carole Lavigne<sup>1,2</sup>, Jocelyn Yelle<sup>2</sup>, Gilles Sauvé<sup>2</sup> and Alain R. Thierry<sup>3\*</sup>**

<sup>1</sup>Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

<sup>2</sup>Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3

<sup>3</sup>Biovector Therapeutics, S.A., Chemin du Ch  ne Vert, BP 169, 31676 Labège Cedex, France

\*Corresponding author. Mailing address : Biovector Therapeutics, S.A., Chemin du Ch  ne Vert, BP 169, 31676 Labège Cedex, France. Phone : 33 5 61 00 81 66. Fax : 33 5 61 00 45 85

---

**ABSTRACT**

We have evaluated the specificity and the variation in activity of antisense oligodeoxynucleotides against HIV infection in regard of a series of factors such as dose-response range, number and choice of experimental controls, backbone modifications of the oligos, type of cell infection, length of assays and delivery approach. The highest level of inhibition was achieved in our long-term assay using MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1 (IIIB) and treated with free phosphorothiate (PS) oligonucleotides (ODN). The highest level of specificity was observed in our short-term assay using MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1 (IIIB) and treated with free PS-ODNs. The highest potency ( $IC_{50}$  level) was observed in our short-term chronic infection model with DLS-delivered ODNs where the DLS delivery improved the ODN activity up to  $10^6$  times compared to free ODNs. The higher efficacy of PS-ODNs, when compared to unmodified ODNs, was solely demonstrated in our short-term assay with MOLT-3 cells. Important variation of the level of specificity was observed upon the type of control used and the type of cell assay employed. It seems that all three groups of control tested, random, sense sequence and non-antisense T30177 oligo, might have distinct activity and, consequently, different modes of action in inhibiting HIV replication. In conclusion, we suggest that efforts should be focused on developing new designs more adapted to the mode of action of synthetic oligonucleotides such as the structure/function rationale rather than the sequence/function rationale in order to improve their therapeutic efficacy.

## INTRODUCTION

Antisense oligodeoxynucleotides (ODNs) are a novel class of therapeutics agents which offer an attractive approach for the treatment of viral infections, cancer and genetic disorders by controlling cellular or viral gene expression at the mRNA and possibly gene levels. These molecules are designed to block the action of specific genes by binding to their RNA transcripts by a phenomenon called hybridization arrest through Watson-Crick base-pairing. Typically, antisense ODNs can selectively interfere with RNA splicing or processing, prevent initiation of translation, block progression of ribosomes along the mRNA and cause RNA cleavage through activation of RNase H (1). Paul Zamecnik's laboratory published the first report on application of antisense ODNs in 1978 (2) and against HIV replication (3). The authors showed that a 13-mer synthetic oligodeoxynucleotide complementary to the 3'-end of the Rous sarcoma virus genome inhibited the formation of new virus and prevented transformation of chick fibroblasts into sarcoma cells when added exogenously to the infected cell cultures. Since, many oligonucleotide analogs have been synthesized and studied as antisense agents, and antisense effects of ODNs in mammalian cells have been reported in numerous tissue culture experiments (4) and in several recent *in vivo* studies (5, 6).

The most widely used analogs of ODNs are phosphorothioate-modified ODNs (PS-ODN) which have a sulfur for oxygen substitution of one of the nonbridged oxygen atoms of internucleotide linkages. PS-ODNs have good biological activity,

pharmacology, pharmacokinetics and safety (7, 8). PS-antisense ODNs are now evaluated in clinical trials for their therapeutic potential against several human diseases including cancer, viral infections and connective tissue disorders, and first results are encouraging (9). Although results from recent clinical trials of first-generation PS-ODN drugs seem promising, the mechanism of action of these compounds remains somewhat speculative and may include antisense and non-antisense effects (10). PS-ODNs have been shown to inhibit the replication of HIV-1 *in vitro* by both sequence-specific and non-sequence-specific activity depending on the cell culture models used, the concentrations, and the assay's design (10, 11). Several studies have demonstrated that the potency and specificity of antisense ODNs can be greatly enhanced by the use of lipid-based carrier system to deliver the ODNs into cells (12, 13). Lipid carriers, such as the DLS system, increase cellular uptake and help antisense compounds to accumulate into nucleus, allowing activity at much lower concentrations (14, 15).

In the present study, we addressed the question of sequence-specificity and variation of antisense activity in HIV infection by comparing the inhibitory effect of various ODN sequences in different cell models. We compared the activity of free and DLS-associated PS-ODNs in one hand, and DLS-delivered unmodified or phosphorothioate-modified ODNs in the other hand, in both acute and chronic infection models. We looked at several factors that have been proposed to account for discrepancies in the literature on antisense technology such as dose-response range, number and choice of experimental controls, backbone-modifications of the ODNs, type

---

of cell infection (acute or chronic), along with length of assays and delivery approach, in order to improve further protocol design in this field area.



## EXPERIMENTAL SECTION

### Antisense and Control Oligos

Unmodified and phosphorothioate-modified oligonucleotides (PS-ODN, with a sulfur atom introduced at each phosphodiester linkage) were synthesized by using an automated DNA synthesizer (BioServe Biotechnologies Laurel, MD, U.S.A.) and purified by PAGE. In this study, we used four antisense sequences known to have anti-HIV-1 activity in either phosphorothioate (PS-ODN) or unmodified (PO-ODN) form : antisenses DIS and Pac which are complementary to a portion of the 5'-long terminal repeat of HIV-1 genome and are considered to be essential for HIV-1 RNA encapsidation (16, 17), antisense GEM 91 (gene expression modulator), a 25-mer complementary to the *gag* initiation site of HIV-1 (18) and antisense *rev*, a 28-mer complementary to the 5'-end sequence of HIV-1 *rev* mRNA (19). The oligonucleotide sequences are shown in Table 1. As controls, a 28-mer random phosphorothioate (RS) or phosphodiester (RD) sequence was made by coupling a mixture of all four nucleotides at each synthesis step in order to verify the sequence specificity of the antisense ODNs. We also used as controls for phosphorothioate ODNs two sense sequences named SSDIS and SSPac for sense SDIS and sense SPac, respectively (Table 1). Another ODN sequence named T30177 was also used for comparison. T30177 is a 17-mer ODN composed of only deoxyguanosine and thymidine residues stabilized by an intramolecular guanosine octet (20). T30177 contains single phosphorothioate internucleoside linkages at its 5' and 3' ends, and has shown strong anti-HIV activity in

infected cells based on its three dimensional structure. T30177 has been used here as a non-antisense control.

### **Cells and virus**

The human lymphoid cell line MOLT-3 was kindly provided by Dr. R.-P. Sekaly (Clinical Research Institute of Montreal, Québec, Canada). H9 cells chronically infected with HIV-1 (IIIB) (H9/HTLV-IIIB NIH 1983) (21, 22) were obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA. Uninfected and infected cells were cultivated in RPMI 1640 culture medium (Gibco BRL) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, L-glutamine (4 mM) and gentamycin (50 µg/mL) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy HIV-1-seronegative donors were isolated by Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech) gradient centrifugation of heparinized venous blood. The cells were collected, washed and stimulated with phytohemagglutinin-P (PHA-P) (1 µg/mL ; Pharmacia Biotech) for 24 hours. The cells were then washed and maintained in the same culture medium as above, supplemented with recombinant human interleukin-2 (10-20 U/mL ; Cellular Products Inc.). HIV-1 laboratory strain IIIB was obtained from Advanced BioScience Laboratories Inc., Kensington, MD, and was used to infect MOLT-3 cells and primary cells.

### **Preparation of ODN-liposome complexes**

DLS liposomes are a mixture of equal amounts of dioctadecylamidoglycylspermidine (Promega, Madison, WI) and dioleoyl phosphatidylethanolamine (Sigma) and consist of small unilamellar vesicles, which can complex with ODNs in an interactive molecular manner. Liposomes were prepared as previously described (23, 24). Oligonucleotides were first complexed to DLS preparation in sterile deionized water as described earlier (15) and the preparation was incubated at room temperature for at least 30 minutes just prior to addition to the cells. Dilution in deionized water was made to obtain appropriate concentrations. ODN-liposome complexes were stored at 4°C up to the next treatment 3 or 4 days later. Fresh ODN-liposome complexes were prepared every week (every 2 treatments).

### **Short-term evaluation of anti-HIV activity in acutely infected cells**

Antiviral activity of antisense ODNs was evaluated in two different cell systems. MOLT-3 cells or PBMCs were infected with HIV-1 (IIIB) as previously described (Lavigne et al. submitted) at a multiplicity of infection of 0.1. Cells were cultured with various concentrations of ODNs added either free in culture medium or complexed with DLS-liposomes for 7 days. The supernatants were then harvested and examined for virus production.

### **Long-term evaluation of anti-HIV activity in acutely infected cell lines**

To test the antiviral activity of the antisense ODNs in a long-term model treatment in acutely infected cells, MOLT-3 cells were infected at a multiplicity of infection of 0.01 with HIV-1 laboratory strain IIIB as previously described (Lavigne et al. submitted). Cells were treated for up to 21 days with oligonucleotide phosphorothioates added free to the cultures at 0.01, 0.1 or 1  $\mu\text{M}$  concentrations, or up to 28 days with either phosphorothioate-modified ODNs or unmodified ODNs complexed with DLS liposomes at 0.001, 0.01, 0.1, and 5 nM concentrations. Every 3 or 4 days, cells were split to  $4 \times 10^5$  cells/mL and supernatants were collected to determine the HIV-1 titer. Except for the initial two hours period of virus adsorption, the oligonucleotides were always present in the culture medium during the course of the experiments.

### **Antiviral assay in chronically infected cell lines**

To study the inhibition of HIV-1 by antisense ODNs and their efficiency in chronically infected cells, we used the H9 cell line chronically infected with HIV-1 (IIIB). Cells were plated into 96-well microtiter plates at a concentration of  $4 \times 10^5$  cells/mL and antisense ODNs were added either free or complexed with DLS-liposomes at 1.5 and 18.5  $\mu\text{M}$  concentrations or 0.001 and 0.01 nM concentrations, respectively. The cells were kept in culture for 3 to 4 days and HIV-1 replication was determined by the p24 antigen assay.

### **Detection of HIV-1 p24 antigen**

Virus replication was determined by detection of p24 HIV-1 viral core antigen in cell-free supernatants by a p24 antigen-capture assay (Coulter Immunology or SAIC Frederick). Cell viability and cytotoxicity were monitored by the tetrazolium-based colorimetric cell proliferation assay (MTT) (25).

### **Statistical analysis**

Experimental groups were expressed as mean  $\pm$  standard deviation, and compared to control groups or to different treatment groups using the single-factor analysis of variance. When statistical significance ( $p < 0.05$ ) was reached with the F test, comparisons of the means were then performed using either the Tukey-HSD test or the Student t-test. A p value of 0.05 or less was considered significant.

## RESULTS

### Short-term inhibition of HIV-1 replication in acutely infected MOLT-3 cells

We compared the antiviral effects of different ODN sequences added either free or associated with DLS, in a short-term assay using MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1 (IIIB). Free phosphorothioate antisenses GEM 91, *Srev*, SDIS and SPac were evaluated for their specific inhibition of viral replication compared to a random control at 0.01, 0.1 and 1  $\mu\text{M}$  after 7 days of treatment (Table 2). In this cell assay, specific inhibition was dose-dependent. At 0.01  $\mu\text{M}$  concentration, only SPac displayed antiviral activity (53 % inhibition of viral replication) while SDIS and random control completely failed to inhibit HIV-1 replication (0 % inhibition for each). At 0.1  $\mu\text{M}$ , all ODNs exhibited substantial antiviral activity varying from 76 to 92 % inhibition. In contrast, no inhibition could be achieved with the random control at this same concentration. Therefore, at 0.1  $\mu\text{M}$ , all the antiviral activity (100 % of the activity) observed with antisense sequences could be attributed to an antisense mechanism ( $p = 0.05$ ). When oligonucleotide doses were increased to 1  $\mu\text{M}$ , 81 to 98 % inhibition was obtained with ODN sequences compared to 96 % inhibition with the random control. Thus, at higher concentration, 100 % of the inhibitory activity was due to a non-antisense mechanism.

In addition, because we observed variations between the antiviral activity of the different antisense molecules at this concentration, (some antisense ODNs performed better than others) we could evaluate that an inhibition of about 11 to 17 % could be

due to a sequence-specific but an antisense-independent mechanism.  $IC_{50}$  of antisenses GEM 91, *Srev* and SDIS was between 0.01 and 0.1  $\mu$ M, while for SPac, it was about 0.01  $\mu$ M.  $IC_{50}$  of random control was between 0.1 and 1  $\mu$ M, so at least one log higher than for the antisense molecules.

When ODNs were complexed to DLS carrier system (Table 2), inhibitory activity could be achieved at lower concentrations but the level of inhibition per se was not improved by DLS delivery. In a first series of experiments we compared the antiviral activity of three phosphorothioate antisense ODNs (*Srev*, SDIS and SPac) with four control sequences (RS, SSDIS, SSPac and T30177). At 0.001 nM, antisense ODNs *Srev* and SDIS showed limited or no inhibitory activity (12 and 0 %, respectively), as achieved with T30177 control (12 %). SPac showed the highest antiviral activity with an average of 64 % inhibition followed by random and sense controls with an average of about 56 % inhibition. At this concentration, about 81 % (64% minus 12% = 52 %, therefore  $52/64 \times 100 = 81$  % of the activity) of the antiviral activity of antisense SPac could possibly be attributed to an antisense mechanism when compared to T30177 control but no such inhibition could be deduced when compared to RS and sense controls SSDIS and SSPac ( $p = 0.05$ ). The portion of the inhibition which could be attributed to a sequence-specific mechanism was about 52 to 64 % which represents the variability between the three different antisense molecules. When doses were increased to 0.01 nM, antisense ODNs and T30177 control showed similar antiviral activity in the range of 21 to 47 % inhibition, while random and sense (SSDIS) controls showed higher level of inhibition (74 and 72 % inhibition, respectively). Therefore, at this

concentration, no antisense-specific inhibition could be observed when compared to any of the four control sequences. Also, if we compared the level of inhibition of the antisense sequences together, no sequence-specific-dependent inhibition could be distinguished. At 0.1 nM, viral replication was inhibited at 57 to 69 % in cultures treated with antisense molecules, compared to 27, 41 and 52 % in cultures treated with T30177, SSDIS and SSPac controls, respectively. With the RS control sequence, 71 % inhibition was achieved but the difference between the antiviral activity of RS and that of the antisense molecules was not found significant. When compared to T30177 control, 73 % of the antiviral activity of the two antisense sequences SDIS and SPac could be attributed to an antisense mechanism ( $p = 0.05$ ). No significant difference between the antiviral activity of all three antisense molecules could be observed suggesting that, at this concentration, the activity of the antisense molecules was not sequence-specific. At 5 nM, the antiviral activity of the antisense sequences was not found significantly different than the antiviral activity of the RS control. At this concentration, about 30 % of the inhibition was due to a sequence-specific mechanism based on the comparison of the level of inhibition of the three antisense sequences.  $IC_{50}$  of ODNs varied from one sequence to another.  $IC_{50}$  of all three controls RS, SSDIS and SSPac was around 0.001 nM, while it was approximately 0.01 nM for antisense SPac and close to 0.1 nM for antisense *Srev*. For antisense SDIS,  $IC_{50}$  between 0.01 and 0.1 nM was obtained. In this experiment, the inhibition was found to be antisense-dependent depending on the type of control used and the dose tested.



In a second series of experiments, we compared the antiviral activity of DLS-associated PS-ODNs to DLS-associated unmodified ODNs (PO-ODN) (Table 2, bottom part). At a low concentration such as 0.01 nM, unmodified antisense ODNs *rev* (32 % inhibition) and DIS (29 %) showed very similar level of antiviral activity compared to PS-antisense ODNs *Srev* (31 %) and SDIS (21 %). In contrast, unmodified random control RD showed a much lower level of inhibition (2 %) compared to its phosphorothioate homolog RS (74 %). At this concentration, about 25 to 30 % of the activity of PO-antisenses could be attributed to antisense-dependent inhibition compared to RD control but this was not found significant. However, the antiviral activity of *rev* and DIS was found significantly different from the activity of the RS and SSDIS control sequences. No sequence-specific inhibition could be found when we compared the activity of DLS-*rev* and DLS-DIS. At higher concentration, 0.1 nM, *rev* and *Srev* had similar activity (54 and 57 % inhibition, respectively). At this same concentration, SDIS (69 %) and RS (71 %) showed higher inhibitory activity than DIS (53 %) and RD (60 %), respectively but this difference was not found significant. At this concentration, no antisense-dependent activity could be observed with PO-antisenses *rev* and DIS when compared to RD control. At 5 nM, the antiviral activity of DIS was found significantly lower than the antiviral activity of SDIS.  $IC_{50}$  of PO-ODNs was around 0.1 nM.

### Long-term inhibition of HIV-1 replication in acutely infected MOLT-3 cells

First, we compared the ability of four free PS-antisense sequences (GEM 91, *Srev*, SDIS and SPac) to inhibit viral replication in a long-term assay with a random control sequence, using MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1 (IIIB). Cells were treated for up to 21 days, and percent inhibition of p24 production was calculated at the peak of infection and compared to infected, untreated control cultures. Data are shown in Table 3. At 0.01  $\mu\text{M}$ , antisense SPac showed lower level of inhibition (33 %) than SDIS (73 %) and *Srev* (66 %). Therefore, about 33 to 40 % of the inhibition was due to a sequence-specific mechanism. At this concentration, no significant difference between the antiviral activity of the antisense molecules and the RS control sequence could be observed. At 0.1  $\mu\text{M}$ , all four antisense ODNs completely blocked viral replication (more than 99 %) and the activity of all four antisense ODNs was found significantly different from the activity of the RS control which also showed high antiviral activity (90 %). Thus, at this concentration, 10 % of the activity was due to an antisense-specific mechanism based on the comparison with the RS control. When doses were increased to 1  $\mu\text{M}$ , all PS-ODNs, including RS control, inhibited more than 99 % of p24 production. Therefore, at this concentration, the inhibition was not sequence- and antisense-dependent.  $\text{IC}_{50}$  of antisense ODNs *Srev* and SDIS was below 0.01  $\mu\text{M}$ , of RS at 0.01  $\mu\text{M}$ , of GEM 91 below 0.1  $\mu\text{M}$ , and of SPac between 0.01 and 0.1  $\mu\text{M}$ .

Second, we compared the antiviral activity of three PS-antisense molecules (*Srev*, SDIS and SPac) with four PS-control sequences (RS, T30177, and senses SSDIS and SSPac) using the DLS delivery system. Percent inhibition of p24 production was calculated at the peak of infection of each assay and compared to infected, untreated cultures (Table 3). At 0.001 nM, all three antisense ODNs showed similar antiviral activity (32 to 44 % inhibition). RS showed higher activity than *Srev* and SSPac ( $p = 0.05$ ). At 0.01 nM, no significant difference was found between all the oligonucleotides. Therefore, at 0.001 and 0.01 nM concentration, no sequence-specific and antisense-dependent activity was observed with antisense molecules. At 0.1 nM, antisense sequences showed higher level of inhibition (71 to 77 %) than RS, T30177 and SSDIS controls (55 to 68 %) but this difference was not found significant. At 5 nM, no significant difference between the antiviral activity of the three antisense molecules and the RS control sequence was observed. With the dosage used in these experiments, we obtained substantial antiviral activity with DLS-associated PS-ODNs, although we never observed the very high level of inhibition of viral replication seen when using relatively large amounts of free PS-ODNs. Nevertheless, improvement of inhibitory activity was achieved when PS-ODNs were complexed with DLS liposomes compared to free PS-ODNs since  $IC_{50}$  of DLS-antisense molecules was around 0.01 nM.

Third, we compared the efficiency of DLS-associated PS-ODNs with DLS-associated PO-ODNs at three concentrations (Table 3, bottom part). At 0.01 nM and 0.1 nM, the antiviral activity of DLS-associated PO-ODNs was not found significantly different from the antiviral activity of DLS-associated PS-ODNs. At 5 nM, significant

difference was found only between the antiviral activity of DLS-RS (50 % inhibition) and DLS-RD (92 % inhibition). At any concentration, no antisense-dependent inhibition was observed compared to RD control. The  $IC_{50}$  of DLS-*rev* was below 0.01 nM while  $IC_{50}$  of DLS-DIS and DLS-RD was somewhat higher, between 0.01 and 0.1 nM.

### **Short-term inhibition of HIV-1 replication in acutely infected peripheral blood mononuclear cells**

In this cell assay, we compared the antiviral activity of antisense sequence *rev* in its unmodified form with its phosphorothioate form using the DLS delivery system, and *Srev* free with DLS-*Srev* after 7 days of treatment. As shown in Table 4, with 0.05 nM DLS-*Srev* or DLS-RS, inhibitory activity similar to that achieved with 100 nM free *Srev* was observed. No significant difference between antiviral activity of DLS-PO-ODNs and DLS-PS-ODNs could be detected at any concentration. Antisense-dependent inhibition of DLS-*Srev* and DLS-*rev* was achieved only at 10 nM when compared to DLS-RS and DLS-RD, respectively and represented about 56 to 62 % of the activity. At 10 nM, inhibitory effects started to decrease with the random sequences RS and RD but not with the antisense sequences *Srev* and *rev*.  $IC_{50}$  of all ODNs was below 0.05 nM. In this model, we could not obtain more than 79 % inhibition of viral replication with DLS-associated ODNs (Table 4).

### Short-term inhibition of HIV-1 replication in chronically infected H9 cells

First, we compared the ability of different free phosphorothioate ODNs to inhibit viral production after 4 days of treatment, in H9 cells chronically infected with HIV-1 (IIIB). As shown in Table 5, at 0.1  $\mu\text{M}$ , limited antiviral activity was observed with PS-antisense ODNs *Srev*, SDIS and SPac and with SSPac sense control (about 26 % inhibition). At 1.5  $\mu\text{M}$ , high antiviral activity was obtained with all the ODNs tested. Antisense *Srev* and sense controls SSDIS and SSPac displayed similar activity. Also antisenses SDIS and SPac showed the same level of activity than the RS control, but a significant lower level of activity than oligos *Srev*, SSDIS and SSPac. At this concentration, only about 7 % of the activity of antisense *Srev* seems to be due to an antisense mechanism when compared to RS control. If we compared antisense ODNs' activity with the sense controls SSDIS and SSPac, no antisense-dependent inhibition could be observed. The portion of the inhibition that could be attributed to sequence-specific activity was only 8 %. At 18.5  $\mu\text{M}$ , a small increase in antiviral activity was observed with all three antisense sequences compared to 1.5  $\mu\text{M}$ , but we did not obtain very high level of inhibition of viral replication as was seen in the case of free PS-ODNs in acutely infected MOLT-3 cells (Table 3). The sense controls SSDIS and SSPac showed higher antiviral activity than the RS control but were as potent as the antisenses *Srev* and SPac. At this concentration, about 11 to 14 % of the inhibition of antisenses *Srev* and SPac could be attributed to an antisense-dependent mechanism when compared to RS control. If we compared with the two sense control sequences SSDIS and SSPac,

we could not see antisense-dependent inhibition. We could also observe different levels of inhibition depending on the antisense sequence used. *Srev* showed significant higher activity than SDIS and SPac at 1.5  $\mu\text{M}$  and SDIS at 18.5  $\mu\text{M}$ . However, the difference observed between the antisense sequence *Srev* and the antiviral activity of the antisense sequences SDIS and SPac was not higher than 8 %.  $\text{IC}_{50}$  of antisense molecules was between 0.1 and 1.5  $\mu\text{M}$ .

Second, we compared the antiviral activity of three different antisense sequences delivered by the DLS carrier system with four control sequences. Substantial antiviral activity could be achieved with all DLS-ODNs with a concentration as low as 0.001 nM, and the  $\text{IC}_{50}$  of all ODNs tested was below 0.001 nM. At 0.001 nM, even if we could observe some differences between the level of inhibition of the various oligonucleotides, these differences were not found significant. Therefore, at this concentration, no sequence-specific inhibition and no antisense-dependent inhibition could be attributed to the activity of the phosphorothioate antisense sequences. In contrast, at 0.01 nM, about 37 % of the activity of DLS-*Srev* could be attributed to an antisense-dependent mechanism when compared with DLS-T30177.

Third, we compared DLS-associated unmodified and phosphorothioate-modified ODNs at two different concentrations : 0.001 nM and 0.01 nM (Table 5). At these concentrations, similar antiviral effects were obtained with DLS-*rev* and DLS-*Srev* and with DLS-RD and DLS-RS. At 0.01 nM, about 38 % of the activity of DLS-*rev* was due to an antisense-dependent mechanism when compared to the DLS-T30177 control. DLS

liposomes alone, inhibited 19 % of viral production.  $IC_{50}$  of DLS-PO-ODNs was below 0.001 nM.

In this chronic infection model, DLS-complexation truly improved antiviral activity of ODNs compared to free ODNs.

### **Cytotoxicity of different ODN sequences**

First, we determined the cytotoxicity of free phosphorothioate ODNs in MOLT-3 cells and in chronically infected H9 cells. No cytotoxic effects on MOLT-3 cells were noticed with GEM 91, SDIS and SPac at 1  $\mu$ M after 21 days of exposure (Table 6). At this same concentration, the cell viability observed in cells treated with GEM 91 was found significantly lower than the cell viability observed in cells treated with any of the other oligonucleotides. When cell cultures were exposed for 3 days to 18.5  $\mu$ M of *Srev*, SDIS, SSDIS or SSPac, limited or no cytotoxic effects were observed (85 to 100 % viability). With 18.5  $\mu$ M of SPac or RS, more significant cytotoxicity was noticed (21 and 29 % reduction of viability, respectively). However, at this concentration, only the difference between the cell viability observed in cells treated with SDIS and RS was found significant. In chronically infected cells (results not shown), no cytotoxic effects were observed after 7 days of exposure of 0.1  $\mu$ M free *Srev* or RS (93 % cell viability) or of 18.5  $\mu$ M of free *Srev*, SDIS, SPac, RS, SSDIS, or SSPac (100 % cell viability).

Second, we evaluated the effects on cell viability of different DLS-ODN complexes in MOLT-3 cells and chronically infected H9 cells. After 21 days of exposure, little effects on MOLT-3 cell viability was observed with all the ODNs tested at 0.005  $\mu$ M (Table 6). At this concentration, only DLS-SPac showed some significant cytotoxic effects (77 % cell viability). Nevertheless, the cell viability observed in cells treated with DLS-SPac was not found significantly different from the cell viability observed in cells treated with the other oligonucleotides. After 7 days of exposure with 1  $\mu$ M of DLS-ODNs, cell viability was strongly affected (cell viability of 4 to 19 %). DLS-RD showed the highest loss of viability at this concentration. In chronically infected cells, no cytotoxic effects were observed with 0.1 nM DLS-ODNs after 7 days of exposure. At 0.1  $\mu$ M, limited effects on cell viability were noticed with DLS-SDIS, DLS-RS and DLS-SSDIS (84 to 89 % of viability), while some cytotoxicity was noticed with DLS-*Srev* (70 % of viability). Significant differences between *Srev* and the two PS-ODNs SDIS and SSDIS could be observed at this concentration, suggesting that, at higher doses, *Srev* might be more toxic than some other oligonucleotides such as SDIS.

Thus, in these two cell lines, no major cytotoxicity could be observed with either free or DLS-complexed ODNs at effective doses.



---

## DISCUSSION

The remarkable ability of oligodeoxynucleotides to inhibit genetic expression in a sequence-specific manner has become these recent years the subject of increased scrutiny in the field of antisense technology. This issue arises because the mechanism of action of these compounds remains unclear and can apparently include at the same time antisense and a variety of non-antisense mechanisms (11, 26, 27, 28). Here, we have investigated the influence of several factors on the specificity of activity of antisense ODNs against HIV-1 such as backbone modification, cell culture model, dose, sequence of the ODN, type of control used and delivery approach. In all cell models, we could distinguish between antisense, non-antisense sequence-specific and non-sequence specific activity. Antisense activity is dependent on the sequence and is presumed to occur by hybridization with the target. In our conditions part of the activity was also dependent of the sequence but was not due to an antisense activity and, finally, non-sequence-specific activity was observed with the control sequences which can be attributed to all the oligonucleotides. To study the effect of unmodified ODNs and to avoid extracellular biodegradation and cell surface non-specific interference of ODNs with virus entry, we used a carrier system. We have used the DLS delivery system which efficiently protected unmodified ODNs from nuclease degradation and increased intracellular availability allowing them to exert their activity against HIV-1 at low concentration (Lavigne *et al.* in preparation). In order to understand the mechanism of specificity of inhibition by antisense molecules, we compared the antiviral activity of either free or DLS-associated PS-modified or unmodified ODNs in four different cell

assays including three acute infection models (short-term and long-term assays with HIV-1 (IIIB)- infected MOLT-3 cells and a short-term assay with HIV-1 (IIIB)-infected PBMCs) and a chronic infection model (with H9/HTLV-III cell line).

In this study, the level of antiviral activity of ODNs varied upon the cell assay used and the level of the activity which was due to an antisense-dependent mechanism varied upon the type of control used to calculate the specificity of the inhibition. We found that the portion of the activity of the antisense molecules which can be attributed to an antisense-dependent mechanism was more considerable in our short-term assays using acutely infected cells than in our long-term assay with acutely infected MOLT-3 cells and our short-term assay using chronically infected cells (Table 7). In all the *in vitro* systems tested, DLS delivery did not improve the level of antiviral activity of phosphorothioate ODNs compared to free PS-ODNs, and DLS-unmodified ODNs were not more potent than free PS-ODNs when maximal inhibition is considered. Based on our results, the use of free phosphorothioate ODNs seems to be the best approach to block HIV replication *in vitro*. However, at  $IC_{50}$ , DLS delivery greatly improved cellular uptake since inhibition of viral replication with DLS-ODNs could be achieved at subnanomolar concentrations compared to micromolar concentrations with free ODNs (Table 7). This confirms that the DLS carrier system appears to be an efficient approach for ODN delivery. An  $IC_{50}$  in the nanomolar range is clearly of high pharmacological interest.  $IC_{50}$  around 0.001 nM was never observed for any *in vitro* experimental protocol using either free ODN, or ODN complexed with a carrier. The DLS formulation has also been tested for its *in vivo* efficiency for systemic gene delivery in mice. After a

single injection of DLS-complexed plasmid DNA, the transgene was detected in lung, liver, spleen, and heart and the transgene mRNA in lung and spleen for as long as 3 months (23). In addition, DLS -DNA showed a rapid cellular uptake and a high cytoplasmic and nuclear distribution of DNA in cell cultures, and a relatively low plasma clearance following intravenous administration in mice (24). Therefore, the DLS system may represent a powerful tool for *in vivo* application of gene therapeutics.

Non-specific effects of phosphorothioate oligonucleotides have been largely reported in many studies. PS-ODNs are polyanions and as a consequence they are able to bind to various cellular proteins based on charge interaction and base sequence (aptamer approach) (27, 29). The presence of a G-quartet, along with particular sequences flanking the G-quartet, may also enhance non-specific effects (28). Furthermore, CpG motifs have been found to be highly immunostimulatory in mice (30, 31). PS-oligos containing the dinucleotide motif CpG can increase immunoglobulin secretion and expression of B-cell activation markers such as MHC class II, induce interferons, augment natural killer (NK) cell activity and also stimulate the release of several interleukins from T cells. Phosphorothioate oligonucleotides (PS-ODNs) have been shown to inhibit the replication of HIV-1 *in vitro* by both sequence-specific (19, 32, 33, 34) and non-sequence-specific (33, 35, 36, 37) processes depending on the cell culture model employed. In acute infection models, non-antisense inhibition of PS-ODNs have been well documented (1) and might occur due to interference with virus adsorption, by binding to the CD4 receptor or the V3 loop of viral gp120 (38, 39, 40), or with reverse transcription (41). In chronic infection models, sequence-specific inhibition

of HIV production has been reported (19, 37) but the precise mechanism of action of PS-ODNs still remains to be elucidated.

In comparing the activity of free PS-ODNs with DLS-complexed PS-ODNs it is possible to evaluate the amount of activity which can be attributed to extracellular and/or membranar effects such as interaction with virus by binding to the gp120 viral protein and interaction with cell surface molecules. In fact, DLS complexation prevents ODN interaction with virus and/or cellular membrane and then bypasses the non-specific effects due to ODN binding to either the CD4 receptor or the gp120 viral protein. We found in our short-term acute infection model using MOLT-3 cell line, that approximately 25 % of the activity of PS-ODNs can be attributed to extracellular and/or membranar effects ( $p = 0.03$ ). Interestingly, in our PBMC assay and in our chronic infection model, no significant difference between the level of the inhibition of free PS-ODNs and DLS-PS-ODNs could be observed suggesting that the portion of the activity which can be attributed to non-specific extracellular and/or membranar effects may be less important in primary cells and chronically infected cells than in acutely infected established cell lines. In regard to this hypothesis, the higher level of inhibition observed in MOLT-3 cells treated with free PS-ODNs compared to that in primary cells (Table 7) might be explained in part by the addition of extracellular and/or membranar effects on overall antiviral activity in immortalized cell lines. In chronically infected cells, PS-ODNs cannot interact with virus entry nor reverse transcription steps which occur only in acute infections, and then can only interfere with post-integration steps. Then, free PS-ODNs and DLS-PS-ODNs might both exert their activity only in the cytoplasm

and/or the nucleus explaining in part why free PS-ODNs and DLS-PS-ODNs showed the same maximum level of activity in this model. Furthermore, difference in the level of the inhibition between DLS-PS-ODNs and DLS-PO-ODNs was more important in our assays using MOLT-3 cells than in our assays using either primary or chronically infected cells suggesting that non-specific intracellular effects due to backbone modification are more apparent in immortalized cell lines (Table 7).

In addition, intracellular uptake and bioavailability of ODNs may vary in one hand, between immortalized and primary cells (42) and in another hand, between acutely and chronically infected cells (15). The cellular uptake and the intracellular distribution of the free PS-ODN GEM91 was evaluated in MOLT-3 and PBMCs by flow cytometry and laser-assisted confocal microscopy for uptake and biodistribution, respectively (42). The cellular uptake was slow and similar in both MOLT-3 cells and PBMCs. However, in MOLT-3 cells, the intracellular distribution of GEM91 was mainly concentrated in cytoplasmic vesicles in contrast to PBMCs in which the intracellular distribution of GEM91 was more diffuse and then more available for cytoplasmic and nuclear activity. Complexation with DLS formulation may protect ODNs from degradative enzymes in endosomal vesicles and allow bypassing vesicular trafficking resulting in a higher intracellular and intranuclear localization compared to free ODNs (24). In this study, when PS-ODNs were delivered by DLS system, the level of activity achieved with the DLS-PS-ODNs was similar in both MOLT-3 cells and PBMCs in our short-term assays (Table 7) but in PBMCs, high antiviral activity was observed at lower concentrations compared to MOLT-3 cells (Table 2 and 4). This suggests that the

cellular uptake of DLS-PS-ODNs might be higher in PBMCs than in MOLT-3 cells or that intracellular distribution of DLS-PS-ODNs might be more diffuse in PBMCs than in MOLT-3 cells as previously observed (42). The highest  $IC_{50}$  of DLS-ODNs was observed in chronically infected cells in which high level of inhibition was observed at the very low concentration of 1 pM. This might be explained in part by a higher level of cellular uptake and/or a higher intranuclear localization compared to acutely infected cells. In this chronic model, an increased intranuclear localization may be advantageous among acute infection model and may result in an increased inhibitory activity since in chronically infected cells, the site of action of ODNs is expected to be predominantly in the nucleus where the viral acid nucleic is integrated into the cellular genome.

Taken together, our results suggest that non-specific effects of PS-ODNs on virus entry should be less important *in vivo* and that most of the activity should be due to intracellular activity. Assays on ODN's activity using primary cells should be promoted over assays using established cell lines since they are more representative of *in vivo* infections and since cellular uptake and intracellular distribution may vary among cell models employed.

In the literature, most of the studies which report antisense-dependent activity of antisense molecules have been done in short-term acute infection assays (32, 34, 36, 43). In the present study, the highest level of antisense-dependent activity of our PS and unmodified antisense ODNs either free or DLS-delivered was observed in our short-term assay using acutely infected MOLT-3 cells with HIV-1 (IIIB) (Table 7). In agreement

with our data, other investigators also observed in a long-term acute assay using MOLT-3 cell line, high level of antiviral activity in HIV-infected cell cultures treated with 28-mer random and mismatch sequences up to 21 days post-infection (33). However, in contrast to our results, antisense-dependent activity of GEM 91 was observed in another study (42) in which the activity of GEM 91 was compared to a random control in a long-term assay using acutely infected MOLT-3 cells with HIV-1 (IIIB).

In another experiment in which the efficacy of the three PS-antisense ODNs Srev, SDIS and SPac to block the replication of HIV-1 clinical isolate VR2846A was evaluated in infected PBMCs, SDIS and SPac showed antisense-dependent activity for up to 14 days when compared to their sense control but no antisense-dependent activity could be found when compared to the random control at 0.1  $\mu$ M concentration (unpublished observations). Non-antisense-dependent antiviral activity was also observed in PBMCs infected with the HIV-1 clinical isolate 571 with 1  $\mu$ M GEM91 compared to a random sequence 7 days after infection (42). However, after 11 days, the level of inhibition started to decrease in cells treated with the random control (74% inhibition at day 11 and 0% at day 14) compared to cells treated with GEM91 (>99% inhibition up to day 14).

In our chronic infection model we observed low antisense-dependent activity of our free PS-antisense ODNs (14 % and less). Non-antisense-dependent inhibition observed in our chronic infection system might be explained in part by direct interactions with proteins or by hybridization to other mRNA targets (4, 28). In a recent

study, inhibition of virus production in chronically infected H9 cells was evaluated at about 60%, (as measured by p24 determination) with either the antisense molecule GEM 91 or the mismatched oligo control at 1  $\mu$ M concentration, suggesting that inhibition of HIV-1 production in this chronic infection model was also a non-sequence-specific phenomenon (40). However, these authors found that treatment of the chronically infected H9 cells with GEM 91 caused a significant decrease in *gag* mRNA expression (60-70% inhibition) while mismatched oligo treatment resulted in a *gag* mRNA expression similar to the control, suggesting that GEM 91 had a sequence-specific effect at this stage of the viral replicative cycle. Nevertheless, a reduction in mRNA level does not necessarily result in a biological activity since a lower mRNA level might be sufficient for protein function. Taken together, the above considerations indicate that the nature of the activity of ODNs (antisense-dependent vs non-specific activity) may vary among type of infection and length of the assay and conclusions regarding their activity may differ depending on the stage of HIV replication investigated.

In conclusion, inhibition of HIV-1 replication by antisense oligodeoxynucleotides depends on various factors *in vitro* that should be taken into consideration for the design of any study on antisense oligos in order to demonstrate true antisense inhibition of genetic expression. For instance, the use of an efficient delivery system have made possible to point out extracellular and/or membranar activity of PS-modified ODNs which appears as the most effective presentation among those tested for the antisense ODN-mediated inhibition of HIV replication. As long as the inhibition of HIV replication is concerned, the term of *antisense* does not appear appropriate to



identify this class of compound. As the antisense sequences used in this study, and in others, were specifically designed for eliciting true antisense mechanism, it appears more promising to shift the ODN compound design for a design adapted for other modes of action such as the aptamer approach. This might result in better adjusting to the universal pharmacological paradigm of the structure/function rationale and consequently in developing more effective ODN therapeutics.

---

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada. C. Lavigne benefited from post-graduate scholarships from the *Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche* (FCAR). We thank Mrs M. Fauvel for giving access to the Laboratoire de Santé Publique du Québec's P3 facilities used for virus manipulation.

## REFERENCES

1. Stein, C.A. ; Tonkinson, J.L. ; and Yakubov, L. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides-antisense inhibitors of gene expression ? *Pharmacol. Ther.* **1991**, *52*, 365-384.
2. Zamecnik, P.C. and Stephenson, M. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1978**, *75*, 280-284.
3. Zamecnik, P.C. ; Goodchild, J. ; Taguchi, Y. ; and Sarin, P.S. Inhibition of replication and expression of human T-cell lymphotropic type III in cultured cells by exogenous synthetic oligonucleotides complementary to viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1986**, *83*, 4143-4146.
4. Stein, C.A. and Cheng, Y.-C. Antisense oligonucleotides as therapeutics agents : Is the bullet really magical ? *Science* **1993**, *261*, 1004-1012.
5. Agrawal, S. ; Temsamani, J. ; and Tang, J.-Y. Pharmacokinetics biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1991**, *88*, 7595-7599.
6. Bennett, C.F. ; Dean, N. ; Ecker, D.J. ; and Monia, B.P. Pharmacology of antisense therapeutic agents : cancer and inflammation. pp. 13-46 in *Antisense Therapeutics* (Agrawal, S. ed.) **1996**, Humana Press, New Jersey.

7. Iversen, P.L. ; Mata, J. ; Tracewell, W.G. ; and Zon, G. Pharmacokinetics of an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide against *rev* from human immunodeficiency virus type 1 in adult male rat following single injections and continuous infusion. *Antisense Res. Dev.* **1994**, *4*, 43-52.
8. Agrawal, S. ; Temsamani, J. ; Galbraith, W. ; and Tang, J.-Y. Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Clin. Pharmacokinet.* **1995**, *28*, 7-16.
9. Roush, W. Antisense aims for a renaissance. *Science.* **1997**, *276*, 1192-1193.
10. Wagner, R.W. The state of the art in antisense research. *Nature Medecine.* **1995**, *1*, 1116-1118.
11. Stein, C.A. and Kreig, A.M. Problems in interpretation of data derived from *in vitro* and *in vivo* use of antisense oligodeoxynucleotides. *Antisense Res. Dev.* **1994**, *4*, 67-69.
12. Wagner, R.W. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature.* **1994**, *372*, 333-335.
13. Thierry, A.R. and Tackle, G.B. Liposomes as a delivery system for antisense and ribozyme compounds. In : Akhtar S (ed). *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics.* **1995**, CRC Press : Boca Raton, pp.199-221.
14. Thierry, A.R. and Dritschilo, A. Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *21*, 5691-5698.

15. Lavigne, C. and Thierry, A.R. Enhanced antisense inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in cell cultures by DLS delivery system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *237*, 566-571.
16. Kim, H.-J. ; Lee, K. ; and O'Rear, J.J. A short sequence upstream of the 5' Major splice site is important for encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *Virology.* **1994**, *198*, 336-340.
17. Muriaux, D. ; Girard, P.-M. ; Bonnet-Mathonière, B. ; and Paoletti, J. Dimerization of HIV-1<sub>Lai</sub> RNA at low ionic strength. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 8209-8216.
18. Agrawal, S. and Tang, J.Y. GEM 91-an antisense oligonucleotide phosphorothioate as a therapeutic agent for AIDS. *Antisense Res. Dev.* **1992**, *2*, 261.
19. Matsukura, M. ; Zon, G. ; Shinozuka, K. ; Robert-Guroff, M. ; Shimada, T. ; Stein, C.A. ; Mitsuya, H. ; Wong-Staal, F. ; Cohen, J.S. ; and Broder, S. Regulation of viral expression of human immunodeficiency virus *in vitro* by an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide against *rev* (*art/trs*) in chronically infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1989**, *86*, 4244-4248.
20. Ojwang, J.O. ; Buckheit, R.W. ; Pommier, Y. ; Mazumder, A. ; De Vreese, K. ; Esté, J.A. ; Reymen, D. ; Pallansch, L.A. ; Lackman-Smith, C. ; Wallace, T.L. ; De Clercq, E. ; McGrath, M.S. ; and Rando, R.F. T30177, an oligonucleotide stabilized by an intramolecular guanosine octet, is a potent inhibitor of laboratory strains and clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2426-2435.
21. Popovic, M. ; Read-Conole, E. ; and Gallo, R.C. T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III. *Lancet* **1984**, *II*, 1472-1473.

22. Popovic, M. ; Sarngadharan, M.G. ; Read, E. ; and Gallo, R.C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. **1984**, 224, 497-500.
23. Thierry, A.R. ; Lunardi-Iskandar, Y. ; Bryant, J.L. ; Rabinovich, P. ; Gallo, R.C. ; and Mahan, L.C. Systemic gene therapy : Biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1995**, 92, 9742-9746.
24. Thierry, A.R. ; Rabinovich, P. ; Peng, B. ; Mahan, L.C. ; Bryant, J.L. ; and Gallo, R.C. Characterization of liposome-mediated gene delivery : expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA. *Gene Ther*. **1997**, 4, 226-237.
25. Pauwels, R. ; Balzarini, J. ; Baba, M. ; Snoeck, R. ; Schols, D. ; Herdewijn, P. ; Desmyter, J. ; and De Clercq, E. Rapid and automated tetrazolium based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J. Virol. Methods*. **1988**, 20, 309-321.
26. Gura, T. Antisense has growing pains. *Science*. **1995**, 270, 575-577.
27. Stein, C.A. Does antisense exist ? *Nature Medicine*. **1995**, 1, 1119-1121.
28. Stein, C.A. Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides : questions of specificity. *Trends Biotechnol*. **1996**, 14, 147-149.
29. Jendis, J. ; Strack, B. ; Volkmann, S. ; BÖNI, J. ; and MÖLLING, K. Inhibition of replication of fresh HIV type 1 patient isolates by a polypurine tract-specific self-complementary oligodeoxynucleotide. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. **1996**, 12, 1161-1168.

30. Tamamoto, T. ; Yamamoto, S. ; Kataoka, T. ; and Tokunaga, T. Ability of oligonucleotides with certain palindromes to induce interferon production and augment natural killer cell activity is associated with their base length. *Antisense Res. Dev.* **1994**, *4*, 119-122.
31. Krieg, A., *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* **1995**, *374*, 546-549.
32. Agrawal, S. ; Ikeuchi, T. ; Sun, D. ; Sarin, P.S. ; Konopka, A. ; Maize, J. ; and Zamecnik, P.C. Inhibition of human immunodeficiency virus in early infected and chronically infected cells by antisense oligodeoxynucleotide and its phosphorothioate analogue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1989**, *86*, 7790-7794.
33. Lisziewicz, J. ; Sun, D. ; Metelev, V. ; Zamecnik, P. ; Gallo, R.C. ; and Agrawal, S. Long-term treatment of human immunodeficiency virus-infected cells with antisense oligonucleotide phosphorothioates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 3860-3864.
34. Anazodo, M. I. ; Wainberg, M.A. ; Friesen, A.D. ; and Wright, J.A. Sequence-specific inhibition of gene expression by a novel antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate directed against a nonregulatory region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Virol.* **1995**, *69*, 1794-1801.
35. Agrawal, S. ; Goodchild, J. ; Civeira, M. ; Sarin, P.S. ; and Zamecnik, P.C. 1989. *Nucleosides Nucleotides.* **1989**, *8*, 819-823.
36. Kinchington, D. ; Galpin, S. ; Jaroszewski, J.W. ; Ghosh, K. ; Subasinghe, C. ; and Cohen, J.S. A comparison of gag, pol and rev antisense oligodeoxynucleotides as inhibitors of HIV-1. *Antivir. Res.* **1992**, *17*, 53-62.

37. Zelphati, O. ; Imbach, J.-L. ; Signoret, N. ; Zon, G. ; Rayner, B. ; and Leserman, L. Antisense oligonucleotides in solution or encapsulated in immunoliposomes inhibit replication of HIV-1 by several different mechanisms. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4307-4314.
38. Stein, C.A. ; Cleary, A.M. ; Yakubov, L. ; and Lederman, S. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to the third variable loop domain (v3) of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *Antisense Res. Dev.* **1993**, *3*, 9-31.
39. Yakubov, L. ; Khaled, Z. ; Zhang, L.-M. ; Truneh, A. ; Vlassov, V. ; and Stein, C.A. Mode of interaction of oligodeoxynucleotides with recombinant sCD4. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 18818-18823.
40. Yamaguchi, K. ; Papp, B. ; Zhang, D. ; Ali, A.N. ; Agrawal, S. ; and Byrn, R.A. The multiple inhibitory mechanisms of GEM 91, a gag antisense phosphorothioate oligonucleotide, for human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **1997**, *13*, 545-554.
41. Majumdar, C. ; Stein, C.A. ; Cohen, J.S. ; Broder, S. ; and Wilson, S.H. Stepwise mechanism of HIV reverse transcriptase: Primer function of phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *Biochemistry.* **1989**, *28*, 1340-1346.
42. Lisziewicz, J. ; Sun, D. ; Weichold, F.F. ; Thierry, A.R. ; Lusso, P. ; Tang, J. ; Gallo, R.C. ; and Agrawal, S. Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate complementary to Gag mRNA blocks replication of human immunodeficiency virus type 1 in human peripheral blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, *91*, 7942-7946.



43. Bordier, B. ; Peralá-Heale, M. ; Degols, G. ; Lebleu, B. ; Litvak, S. ; Sarih-Cottin, L. ;  
and Hélène, C. Sequence-specific inhibition of human immunodeficiency virus (HIV)  
reverse transcription by antisense oligonucleotides: Comparative study in cell-free  
assays and in HIV-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1995**, *92*, 9383-9387.

**TABLE 1**

Sequence of the oligonucleotides used for the treatment of HIV-1 infection *in vitro*.

<i>ODNs</i>	<i>Nucleotide sequence</i>	<i>Targeted Sequence</i>
GEM 91 (antisense)	5'-CTCTCGCACCCATCTCTCCTTCT-3'	<i>gag</i> gene
<i>Srev</i> or <i>rev</i> (antisense)	5'-TCGTCGGTGTCTCCGGTCTTCCTGCCA-3'	<i>rev</i> gene
SDIS (antisense)	5'-CTCTTGCCGTGCGGCTTCAGCAAGC-3'	dimerization site
DIS (antisense)	5'-CTCTTGCCGTGCGGCTTCAGCAAGCCG-3'	dimerization site
SPac (antisense)	5'-TCTAGCCTCCGCTAGTCAAATTTTGGCG-3'	packaging signal ( $\psi$ )
SSDIS (sense)	5'-CGGCTTGCTGAAGCGGCACGGCAAGAG-3'	dimerization site
SSPac (sense)	5'-CGCCAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGA-3'	packaging signal ( $\psi$ )
T30177	5'-GTGGTGGGTGGGT-3'	non-antisense control
RS (random)	28-mer made from a mixture of all four nucleotides	
RD (random)	28-mer made from a mixture of all four nucleotides	

Oligonucleotides GEM 91, *Srev*, SDIS, SPac, and RS (random) were synthesized with a phosphorothioate backbone.

Oligonucleotide T30177 was synthesized with a partial phosphorothioate backbone in which only the terminal 3' and 5' internucleoside linkages were phosphorothioate. Oligonucleotides *rev*, DIS, and RD (random) were synthesized with phosphodiester linkage.

TABLE 2

Antiviral activity of phosphorothioate-modified or unmodified ODNs added either free in solution or delivered by DLS-liposomes in a short-term assay using MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1 (IIIB)

Sequence	% inhibition of p24 production			
<i>Free</i>	<i>0.01 μM</i>	<i>0.1 μM</i>	<i>1 μM</i>	
GEM 91	ND	84 ± 13	98 ± 2	
<i>Srev</i>	ND	76 ± 11	81 ± 4	
SDIS	0 ± 0	91 ± 6	92 ± 1	
SPac	53 ± 2	92 ± 3	92 ± 2	
RS	0 ± 0	0 ± 0	96 ± 1	
<i>With DLS liposomes</i>	<i>0.001 nM</i>	<i>0.01 nM</i>	<i>0.1 nM</i>	<i>5 nM</i>
DLS- <i>Srev</i>	12 ± 2	31 ± 6	57 ± 6	48 ± 7
DLS-SDIS	0 ± 0	21 ± 13	69 ± 13	78 ± 11
DLS-SPac	64 ± 19	47 ± 10	64 ± 20	47 ± 6
DLS-RS	56 ± 19	74 ± 6	71 ± 5	52 ± 0
DLS-SSDIS	55 ± 3	72 ± 8	41 ± 7	ND
DLS-SSPac	57 ± 5	ND	52 ± 9	ND
DLS-T30177	12 ± 6	36 ± 17	27 ± 11	ND
DLS- <i>rev</i>	ND	32 ± 17	54 ± 05	24 ± 0
DLS-DIS	ND	29 ± 0.4	53 ± 18	26 ± 4
DLS-RD	ND	2 ± 2	60 ± 21	51 ± 5

ND : not determined

MOLT-3 cells were acutely infected with HIV-1 (IIIB) and incubated with various concentrations of free ODNs or DLS-ODN complexes during 7 days. Data are given as percent inhibition of p24 production in the supernatants compared to infected, untreated control cell cultures. The results represent the means of triplicate determinations for free ODNs experiments and of at least two assays for DLS delivery experiments.

TABLE 3

Comparison of antiviral activity of phosphorothioate ODNs added either free or complexed with DLS-liposomes on acutely infected MOLT-3 cells with HIV-1 (IIB) in a long-term assay

Sequence	% inhibition of p24 production									
	Free			With DLS						
	0.01 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0.001 nM	0.01 nM	0.1 nM	0.1 nM	0.1 nM	5 nM	5 nM
GEM 91	ND	> 99	> 99	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S <sub>rev</sub>	66 ± 7	99 ± 2	> 99	32 ± 17	52 ± 18	73 ± 6	68 ± 10	73 ± 6	68 ± 10	68 ± 10
SDIS	73 ± 18	> 99	> 99	44 ± 16	52 ± 17	77 ± 9	48 ± 8	77 ± 9	48 ± 8	48 ± 8
SPac	33 ± 18	> 99	> 99	36 ± 11	46 ± 6	71 ± 6	81 ± 23	71 ± 6	81 ± 23	81 ± 23
RS	54 ± 12	90 ± 0.1	> 99	77 ± 17	62 ± 12	68 ± 7	50 ± 15	68 ± 7	50 ± 15	50 ± 15
T30177	ND	ND	ND	73 ± 10	63 ± 22	55 ± 4	ND	55 ± 4	ND	ND
SSDIS	ND	ND	ND	44 ± 22	53 ± 10	61 ± 3	ND	61 ± 3	ND	ND
SSPac	ND	ND	ND	39 ± 4	82 ± 22	77 ± 15	ND	77 ± 15	ND	ND
rev	ND	ND	ND	ND	60 ± 13	73 ± 13	80 ± 0.4	73 ± 13	80 ± 0.4	80 ± 0.4
DIS	ND	ND	ND	ND	44 ± 49	60 ± 16	65 ± 9	60 ± 16	65 ± 9	65 ± 9
RD	ND	ND	ND	ND	48 ± 19	61 ± 5	92 ± 9	61 ± 5	92 ± 9	92 ± 9

ND : not determined

MOLT-3 cells were acutely infected with HIV-1 (IIB) and treated for up to 21 days with free phosphorothioate ODNs, or treated for up to 28 days with DLS-associated phosphorothioate ODNs. Percent inhibition of p24 production in the supernatants was calculated at the peak of the infection for each assay and compared to infected, untreated control cell cultures. Results represent the mean of at least three assays.

TABLE 4

Antiviral activity of phosphorothioate-modified or unmodified ODNs delivered by DLS-liposomes in a short-term assay on PBMCs acutely infected with HIV-1 (IIIB)

Sequence	% inhibition of p24 production			
	0.05 nM	0.1 nM	5 nM	10 nM
DLS-Srev	70 ± 7	74 ± 7	66 ± 9	52 ± 6
DLS-RS	74 ± 3	68 ± 1	76 ± 3	20 ± 8
DLS-rev	64 ± 8	71 ± 6	71 ± 2	66 ± 7
DLS-RD	57 ± 11	79 ± 3	72 ± 3	29 ± 7
Srev free (100 nM)	79 ± 19			

PBMCs were acutely infected with HIV-1 (IIIB) and incubated with various concentrations of liposome-encapsulated ODNs during 7 days. Data are given as percent inhibition of p24 production in the supernatants compared to infected, untreated control cell cultures. The results represent the means of triplicate determinations.

TABLE 5

Comparison of antiviral activity of phosphorothioate-modified or unmodified ODNs added either free in solution or complexed with DLS-liposomes on chronically infected H9/HTLV-IIIB cells

Sequence	% inhibition of p24 production			With 0.001 nM	DLS 0.01 nM
	Free 0.1 $\mu$ M	Free 1.5 $\mu$ M	Free 18.5 $\mu$ M		
<i>Srev</i>	28 $\pm$ 1	83 $\pm$ 1	87 $\pm$ 2	77 $\pm$ 4	83 $\pm$ 2
SDIS	25 $\pm$ 1	75 $\pm$ 2	79 $\pm$ 4	86 $\pm$ 13	ND
SPac	25 $\pm$ 4	76 $\pm$ 0.2	84 $\pm$ 1	79 $\pm$ 16	ND
RS	ND	77 $\pm$ 1	75 $\pm$ 1	74 $\pm$ 3	73 $\pm$ 3
SSDIS	ND	86 $\pm$ 3	85 $\pm$ 4	72 $\pm$ 4	ND
SSPac	26 $\pm$ 3	83 $\pm$ 4	87 $\pm$ 2	65 $\pm$ 13	ND
T30177	ND	ND	ND	86 $\pm$ 24	52 $\pm$ 22
<i>rev</i>	ND	ND	ND	83 $\pm$ 2	84 $\pm$ 4
RD	ND	ND	ND	68 $\pm$ 2	70 $\pm$ 4
DLS				19 $\pm$ 11	19 $\pm$ 8

ND : not determined

Chronically-infected H9/HTLV-IIIB cells were treated with free or DLS-complexed phosphorothioate ODNs during 4 days. Percent of inhibition of p24 production in the supernatants was calculated 4 days post-infection and compared to infected, untreated control cell cultures. The results represent averages of at least three experiments.

**TABLE 6**

Cytotoxicity of phosphorothioate-modified or unmodified ODNs added free in solution or delivered by DLS liposomes in MOLT-3 and H9/HTLV-IIIIB cell lines.

SEQUENCE	% CELL VIABILITY					
	MOLT-3 cell line			H9/HTLV-IIIIB cell line		
	<i>Free in solution</i>		<i>With DLS-liposomes</i>	<i>With DLS-liposomes</i>		<i>With DLS-liposomes</i>
1 $\mu$ M (21-day) <sup>b</sup>	18.5 $\mu$ M (3-day) <sup>a</sup>	0.005 $\mu$ M (21-day) <sup>b</sup>	1 $\mu$ M (7-day) <sup>a</sup>	0.1 nM (7-day)	0.1 $\mu$ M (7-day)	
GEM 91	96 $\pm$ 0.3	ND	ND	ND	ND	ND
Srev	100 $\pm$ 0	85 $\pm$ 6	94 $\pm$ 11	ND	90 $\pm$ 8	70 $\pm$ 15
SDIS	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0.2	96 $\pm$ 6	ND	89 $\pm$ 8	89 $\pm$ 11
SPac	100 $\pm$ 0	79 $\pm$ 14	77 $\pm$ 2	ND	91 $\pm$ 3	ND
RS	100 $\pm$ 0	71 $\pm$ 10	88 $\pm$ 20	9 $\pm$ 7	91 $\pm$ 9	84 $\pm$ 5
SSDIS	ND	91 $\pm$ 14	ND	ND	89 $\pm$ 9	89 $\pm$ 12
SSPac	ND	92 $\pm$ 6	ND	ND	91 $\pm$ 5	ND
rev	ND	ND	100 $\pm$ 0	11 $\pm$ 2	92 $\pm$ 9	ND
DIS	ND	ND	89 $\pm$ 19	19 $\pm$ 1	ND	ND
RD	ND	ND	93 $\pm$ 12	4 $\pm$ 2	97 $\pm$ 4	ND

ND : not determined

Values represent the number of cell viability calculated as a percentage of the a) uninfected or b) infected, unexposed control cultures in MOLT-3 cell cultures or as a percentage of the unexposed control cultures in chronically infected H9/HTLV-III cells. Cells were exposed to various concentrations of ODNs either added free or DLS-complexed during variable time of exposure. Viability was determined by the colorimetric (MTT) assay. The data represent averages of triplicate determinations (MOLT-3) or averages of three experiments done in duplicate (H9/HTLV-III).

**TABLE 7**

Summary of sequence-specificity and anti-HIV activity of oligonucleotides

<b>Cell culture model</b>	<b>Delivery</b>	<b>Specificity : dose / % of specificity of the activity</b>	<b>Maximum inhibition/ IC<sub>50</sub> range concentration</b>
	<i>Antisense-dependent mechanism</i>	<i>Sequence-specific inhibition</i>	
<i>Acute infection</i>			
MOLT-3 / HIV-1 (IIIB)			
Short-term assay	Free PS	up to 0.1 μM / 100 %	0.01 μM / 100 % 1 μM / 11-17 %
	DLS-PS	0.001 nM / 81 % 0.1 nM / 73 % all doses / 0 %	0.001 nM / 52-64 % 5 nM / 30 % all doses / 0 %
	DLS-PO		60% / 0.1 nM
	Free PS		98 % / 1 μM
	DLS-PS		74 % / 0.01 nM
	DLS-PO		0.001-0.1 nM
			0.1 nM
Long-term assay	Free PS	0.1 μM / 10 % all doses / 0 % all doses / 0 %	>99% / 0.1 μM 0.01 μM / 33 -40 % all doses / 0 % all doses / 0 %
	DLS-PS		≤ 0.01 μM
	DLS-PO		0.01 nM ≤ 0.01 nM
<i>PBMCs / HIV-1 (IIIB)</i>			
Short-term assay	Free PS	ND	< 0.1 μM
	DLS-PS	10 nM / 62 %	< 0.05 nM
	DLS-PO	10 nM / 56 %	< 0.05 nM
<i>Chronic infection</i>			
H9 / HIV-1 IIIB			
Short-term assay	Free PS	1.5 μM / 7 % 18.5 μM / 11-14 %	0.1-1.5 μM
	DLS-PS	0.01 nM / 37 %	< 0.001 nM
	DLS-PO	0.01 nM / 38 %	< 0.001 nM
		1.5 and 18.5 μM / 8 %	0.1-1.5 μM
		all doses / 0 % ND	< 0.001 nM < 0.001 nM

ND : not determined ; PS : phosphorothioate-modified ODN ; PO : unmodified ODN.



---

**CHAPITRE 5**

**ARTICLE 4**

**Combinations of Oligodeoxynucleotides Delivered by the DLS Carrier  
System : A New Approach for the Treatment of HIV-1 Infection**

Running title : Oligodeoxynucleotide combinations against HIV-1

CAROLE LAVIGNE<sup>1,2</sup>, JOCELYN YELLE<sup>2</sup>, GILLES SAUVÉ<sup>2</sup>, and ALAIN R.  
THIERRY<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de  
Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7 ;

<sup>2</sup>Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3

<sup>3</sup>Biovector Therapeutics, S.A., Chemin du Chêne Vert, BP 169, 31676 Labège Cedex,  
France ;

**Corresponding author ; Mailing address :**

Dr Alain R. Thierry  
Biovector Therapeutics, S.A.  
Chemin du Chêne Vert, BP 169  
31676 Labège Cedex  
France

## ABSTRACT

In this study, we evaluated a new approach to AIDS therapy with oligodeoxynucleotides by using combinations of different oligodeoxynucleotides (ODNs) complexed to a lipid-based carrier system. We have identified some of the factors that seem to influence the effectiveness of a combination strategy in cell cultures such as ODN concentrations, type of infection (acute vs chronic), backbone modification of the ODN, and the number of sequences. When delivered by the DLS carrier system, some advantages of using a combination of ODNs over treatment with only one ODN could be observed in our acute infection assays but not in our chronic infection model. These results suggest that in the acute infection model, the three different antisense ODNs in the cocktail might block an early step of the virus replication by combined inhibitory effects. Various combination of phosphorothioate-modified (PS) and unmodified oligonucleotides delivered by the DLS system, were compared for their antiviral activity in a long-term acute assay using HIV-1 (IIIB)-infected MOLT-3 cells. The most effective combination was the one with the three phosphorothioate antisense ODNs Srev, SDIS and SPac. In this study we have demonstrated that it is possible to achieve high anti-HIV activity by using in combination, low concentrations (0.1 pM) of antisense oligonucleotides complexed to a lipid-based carrier system such as the DLS system, without increasing cell toxicity. Nevertheless, more studies have to be done in order to determine the potential of this new approach for *in vivo* treatment of HIV infection.

## INTRODUCTION

Antisense oligonucleotides are new antiviral agents for HIV infection under development which have shown potential therapeutic application against HIV-1 (1-3). DNA oligonucleotides hybridize to target RNA by Watson-Crick base pairing to inhibit translation by simply blocking ribosomal reading or inducing degradation of the RNA part of duplexed DNA/RNAs by activation of RNase H (4). DNA with natural phosphodiester linkages has been found to be rapidly degraded by nucleases and to poorly cross cellular membranes. To overcome these problems, a first generation of chemically modified oligonucleotides has been developed based on backbone modifications. Phosphorothioate-modified oligonucleotides, in which an oxygen atom of the phosphodiester linkage has been replaced by a sulfur atom, are the most common oligonucleotide analogs to have been investigated. Several regions of the HIV genome have been targeted by phosphorothioate antisense oligonucleotides including *rev*, *tat*, *gag*, *pol*, *env*, and noncoding regions such as the 5'-LTR. Antisense oligonucleotides were effective in both acute and chronic infections (5-8).

Recently, two novel antisense sequences derived from the 5'-end of the HIV-1 genome named SDIS and SPac, have been developed in our laboratory and tested in acutely and chronically infected cells against laboratory and clinical HIV-1 isolates (Lavigne et al., submitted). The 26-mer phosphorothioate antisense molecule SDIS is complementary to a highly conserved sequence localized between the primer binding site and the major splice donor site spanning nucleotides +245 to +270 (9). This

sequence is considered to be essential for HIV-1 RNA dimerization (10, 11) and encapsidation (12, 13). The 30-mer phosphorothioate antisense molecule SPac is complementary to a sequence localized between the major splice donor site and the first ATG *gag* initiation codon (+295 to +324 nt) and corresponds to the packaging signal *psi* ( $\psi$ ) (13-15). Results of the anti-HIV assays done with SDIS and SPac were encouraging since the two sequences were found to be as potent as the well documented antisense oligonucleotides anti-*rev* (5) and GEM 91 (16) in inhibiting HIV-1 replication *in vitro*. GEM 91 is a 25-mer oligodeoxynucleotide directed against the translation initiation site of HIV-1 *gag* mRNA which has been extensively studied for its anti-HIV activity (3, 7, 17).

The goal of this study was to evaluate a new approach for the treatment of HIV infection by using a combination of different ODNs complexed to a lipid-based carrier system. Our intention by using such a combination strategy was to interfere, at the same time, at different levels in the replication of HIV-1 by using different ODNs which have distinct targets on the viral genome in order to improve the efficacy of oligonucleotide technology. The potential advantages of a combination approach using antisense technology are multiple and include a) the presence of additive inhibitory effects on HIV-1 replication by a combination of different mechanisms of action ; b) the possibility of targeting different viral genome's sites at the same time, therefore minimizing the emergence of escape mutants ; and c) the reduction of the individual oligonucleotides' concentration allowing clinical application more feasible.

Here we investigated the ability of a combination of ODNs used in HIV-infected cell cultures to provide the potential advantages expected from a multitargeting approach. We first compared the level of the antiviral activity, the viral breakthrough and the effects on cell survival of a three-ODN combination with single-ODN regimens in both acute and chronic infection models at low concentrations by using the DLS lipid-based delivery system. DLS liposomes consist of small unilamellar vesicles of approximately 50 nm diameter, which can complex with ODNs in an interactive molecular manner. After addition of DNA or ODN to DLS liposomes, a completely different structure is formed with particle size ranging from 100 to 150 nm which is very stable and shows great homogeneity. DLS formulation was recently evaluated in our laboratory for *in vitro* delivery of ODNs and was found to be a successful approach for enhancement of cellular uptake and antisense activity of this class of compounds (18). Second, in order to improve the potency of the combination approach with oligonucleotide analogs, we compared the anti-HIV activity of different combination of oligonucleotides delivered by the DLS carrier system in acutely infected MOLT-3 cells. Multiple steps in the HIV replicative cycle have been targeted by using phosphorothioate-modified and unmodified antisense molecules with different RNA targets (translation of the Rev protein, dimerization site, and packaging signal site) and scrambled sequences known to have non-specific effects on HIV replication. To our knowledge, the anti-HIV activity of a continuous multidrug regimen with unmodified and phosphorothioate-modified ODNs delivered by a lipid-based carrier system *in vitro* has never been investigated for the treatment of HIV infection.

## MATERIALS AND METHODS

**Oligodeoxynucleotide sequences.** Oligodeoxynucleotides were synthesized by an automated DNA synthesizer (BioServe Biotechnologies, Laurel, MD, USA) with a sulfur atom introduced at each phosphodiester linkage for phosphorothioate ODNs. Synthesis was carried out on a 1  $\mu$ M scale. The oligonucleotides were deblocked, desalted and purified by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The ODNs were quantitated by UV absorbance at 260 nm (1 OD  $\approx$  33  $\mu$ g of DNA). Sequences used in combination regimens are shown in Table 1. Three antisense sequences known to have anti-HIV activity were used : SDIS and SPac which are phosphorothioate-modified sequences complementary to a non-coding portion of the 5'-end of HIV-1 genome and the phosphodiester form DIS, and a 28-mer ODN complementary to the 5'-end sequence of HIV-1 *rev* mRNA in either a phosphorothioate (Srev) or phosphodiester (rev) form (5). SDIS is complementary to a highly conserved sequence which is considered to be essential for HIV-1 RNA dimerization and encapsidation. SPac is complementary to the RNA packaging signal *psi* ( $\psi$ ). Scrambled ODNs which are not complementary to any sequence motifs of the HIV-1 genome were also used in combination regimens : a 28-mer random sequence in a phosphorothioate (RS) or phosphodiester (RD) form. The composition of the five different combinations which were evaluated herein, is shown in Table 1.

**Cells and Virus.** The CD4<sup>+</sup> human lymphoid cell line MOLT-3 was kindly provided by Dr. R.-P. Sekaly (Clinical Research Institute of Montreal, Québec, Canada) and the CD4<sup>+</sup> human lymphoblastoid cells chronically infected with HIV-1 (IIIB) (H9/HTLV-IIIB NIH 1983) (19, 20) were obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA. Uninfected and infected cells were cultured in RPMI 1640 culture medium (Gibco BRL) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum, L-glutamine (4 mM) and gentamycin (50 µg/mL) at 37 °C in a 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere. HIV-1 laboratory strain IIIB was obtained from Advanced BioScience Laboratories Inc., Kensington, MD and used to infect MOLT-3 cells.

**Preparation of ODN-liposome complexes.** DLS liposomes were formed by mixing 1 mg of dioctadecylamidoglycylspermidine (DOGS ; Promega, Madison, WI) and 1 mg of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE ; Sigma) as previously described (21, 22). Oligonucleotides were first complexed to DLS liposomes separately in sterile deionized water at a final concentration of 0.26 mg/mL. The preparations contained 10 µg of ODNs for 38 µL of rehydrated lipids. The preparations were incubated at room temperature for at least 30 minutes prior to addition to the cells. Dilution of DLS-associated ODNs in sterile deionized water was made to obtain appropriate concentrations and combination of different ODNs were made at an equal molar ratio after complexation. DLS-ODN complexes were stored at 4 °C up to the next treatment 3 or 4 days later. Fresh DLS-ODN complexes were prepared every week (every two treatments).



**Antiviral assays.** To compare the antiviral activity of the three-ODN combination Srev-SDIS-SPac with that of single-ODN regimens at low concentrations, we used MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1 laboratory strain IIIB as a model. Cells were infected at a viral titer of  $TCID_{50} = 2000$  (viral stock 2000  $TCID_{50}/mL$ ). After 2 hours adsorption at 37°C, infected and control cells were washed twice with RPMI culture medium to remove unabsorbed virus and resuspended in fresh complete medium. Cells were plated into 96-well microtiter plates at a concentration of  $4 \times 10^5$  cells/mL and were treated up to 28 days with different DLS-associated ODNs added either alone or in combination. The ODN combinations were formed by adding equal amounts of each DLS-ODN preparation. For example, to obtain a final concentration of 100 pM with a combination of 3 ODNs, each ODN was added to the formulation at a concentration of 33 pM. Every 3 or 4 days, cells were split to  $4 \times 10^5$  cells/mL and supernatants were collected to determine the presence of HIV.

To test the efficiency of the three-ODN combination in chronic infection, we used H9 cells chronically infected with HIV-1 (IIIB) as a model. Cells were plated into 96-well microtiter plates at a concentration of  $4 \times 10^5$  cells/mL and ODN combinations were added as DLS-ODN preparations at 0.1 and 1 pM final concentrations. The cells were kept in culture for 4 days and HIV-1 replication was determined by the p24 antigen assay.

To compare the antiviral activity of different combinations of ODNs in a long-term assay, MOLT-3 cells were infected with HIV-1 laboratory strain IIIB at a viral titer of  $TCID_{50} = 1000$  as described above. Cells were plated into 96-well microtiter plates at a concentration of  $4 \times 10^5$  cells/mL and treated up to 21 days with different DLS-associated ODN combinations at 100 pM final concentrations. Every 3 or 4 days, cells were split to  $4 \times 10^5$  cells/mL and supernatants were collected to determine the HIV-1 activity.

**Determination of viral replication.** Virus replication was determined by detection of p24 HIV-1 viral core antigen in cell-free supernatants by a p24 antigen-capture assay (Coulter Immunology or SAIC Frederick). Cell viability was monitored by the tetrazolium-based colorimetric cell proliferation (MTT) assay (23).

**Statistical analysis.** Experimental groups were expressed as mean  $\pm$  standard deviation, and compared to control groups or to different treatment groups using the single-factor analysis of variance. When statistical significance ( $p < 0.05$ ) was reached with the F test, comparisons of the means were then performed using either the Tukey-HSD test or the Student t-test. A p value of 0.05 or less was considered significant.

## RESULTS

**Inhibition of viral production in acutely infected MOLT-3 cells by DLS-complexed ODNs used either alone or in combination.** To evaluate the beneficial effects of the three-ODN combination regimen on HIV-1 replication at low ODN concentrations, we used the DLS delivery system to achieve subnanomolar concentrations. We compared the antiviral activity of the three-ODN combination with each of the ODN used individually in MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1 (IIIB) in a long-term assay. The ODN cocktail as well as each individual ODN were complexed to DLS formulations prior to the addition to the culture medium and viral production in cell culture supernatants was determined every 3 to 4 days after infection. The level of p24 antigen in each well was monitored for 28 days and the highest values obtained in each sample were compared together. Results are presented in Figure 1 as percent inhibition of p24 production compared to infected, untreated cell culture controls. Antisense ODNs Srev and SPac showed limited activity at 10 pM concentration when used individually (28 % inhibition and 11 %, respectively) while SDIS showed a level of inhibition of 39 %. At the same concentration, a higher level of inhibition was achieved when the same antisense ODNs at 10 pM final concentration were used in combination (60 % inhibition) if we compared with Srev and SPac alone ( $p = 0.05$ ). When the dose of ODNs was increased to 100 pM, antiviral activity was improved in cell cultures treated with antisenses used alone : 41 % for Srev, 53 % for SDIS, and 37 % for SPac. However, no significant difference between the inhibitory

effects of the combination regimen Srev-SDIS-SPac and the single-regimens could be detected at 100 pM.

**Suppression of viral breakthrough by DLS-complexed ODNs used individually or in combination in acutely infected MOLT-3 cells.** To determine if our three-ODN combination was able to delay viral emergence for a longer period of time than ODN alone when used at subnanomolar concentrations, we used MOLT-3 cells infected with HIV-1 (IIIB) in a long-term assay. Cells were treated with the individual ODNs or with the three-ODN combination delivered by the DLS carrier system at 100 pM for 28 days. Results are shown in Figure 2. In infected, untreated cell cultures, HIV-1 was detected 14 days after infection. Neither SPac nor SDIS used individually at 100 pM were able to delay viral breakthrough over 14 days. In contrast, Srev at 100 pM used alone delayed the emergence of virus up to 21 days. The three-ODN regimen with 33 pM of each antisense ODNs showed the best activity, retarding the emergence of HIV-1 for at least 21 days, with decreased level of viral replication still evident at 28 days.

**Short-term antiviral activity of ODNs used alone or in a three-ODN combination in chronically infected cells.** We investigated the ability of the three-drug cocktail to inhibit viral production by chronically infected H9/HTLV-IIIIB cells and compared the antiviral activity with that of single-ODN regimens. Cells were treated for 4 days with ODNs complexed with the DLS formulation added either separately or simultaneously as a three-ODN combination, and viral replication was determined in cell culture supernatants. Results are shown in Figure 3. At 0.1 pM, a slightly lower antiviral effect was observed with the three-ODN combination (66 % inhibition) compared to SDIS (81 %) used individually ( $p = 0.05$ ). In contrast, no statistical difference between the cocktail (66 %) and Srev (73 %) or SPac (77 %) used alone was observed at this same concentration. When dose was increased to 1 pM, no statistically significant differences between antiviral activity of single-ODN and three-ODN regimens were obtained since all the regimens were equally efficient in inhibiting viral production (76 to 83 % for single-ODN regimens and 80 % for three-ODN cocktail).

**Comparison of the anti-HIV activity of different combination of oligonucleotides delivered by the DLS system.** In order to compare the effectiveness of different ODN cocktails we evaluated their ability to inhibit viral replication in acutely infected MOLT-3 cells in a long-term model treatment. Drugs were delivered by the DLS carrier system and antiviral activity at the peak of viral production was evaluated in cultures at a final concentration of 100 pM (Figure 4). Data were expressed

in terms of percent inhibition of p24 production compared to infected, untreated cell cultures. Results indicate that cocktails containing the random phosphodiester or phosphorothioate ODNs (cocktails 1, 2, 3, and 5) displayed lower activity than cocktail 4 devoid of random ODN. In this assay, the three-S-ODN cocktails 4 (Srev-SDIS-SPac) and 3 (Srev-SDIS-RS) were more effective than the four-S-ODN cocktail 5 (Srev-SDIS-SPac-RS) ( $p < 0.005$  and  $p < 0.01$ , respectively). Cocktail 4 was the most effective with 92 % inhibition of viral replication.

Difference between cocktail 4 and other cocktails was evident as soon as 3 days after the beginning of the treatment (Figure 5). In fact, cocktail 4 showed high antiviral activity after only 3 days of treatment (>99 %) and maintained a high level of inhibition during all the experiment (21 days). Cocktail 1 (rev-DIS-RD) showed maximum inhibitory effect at 7 days (74 %), a level of activity that decreased thereafter. Cocktail 2 (rev-DIS-RS) showed maximum activity at day 14 (88 %) after which the antiviral activity decreased steadily. Cocktail 3 (Srev-SDIS-RS) reached its peak of activity only after 17 days (86 %) while cocktail 5 (Srev-SDIS-SPac-RS) showed its maximum inhibitory effect 7 days after treatment (58 %). Therefore, cocktails 4 and 5 which contained the three antisense sequences reached their maximal antiviral activity very soon after infection and maintained their level throughout the experiment compared to the other cocktails where more variations in anti-HIV activity were observed or in which the maximum inhibitory activity was reached later after infection. Cocktail 5, however, showed lower activity than cocktail 4 throughout the experiment. At day 21, cocktails 3 and 4 were the two most potent combinations (72 % and 79 % inhibition, respectively)

while cocktail 2 was the least efficient combination (48 % inhibition). However, differences between the antiviral activity of cocktails 3, 4, and 5 were not statistically significant at this time.

#### **Cell survival of cultures acutely infected with HIV, treated with the cocktail.**

To determine the effects on cell survival of the three-ODN combination delivered by the DLS system, we compared the viability of infected MOLT-3 cells treated with each ODN used individually with that of infected cultures treated with the ODNs used in combination at 100 pM final concentration. After 28 days of treatment, cell counts were compared (Figure 6). The data are expressed in terms of percent cell viability compared to infected, untreated cell cultures. Overall, similar rates of cell survival were observed with the three-ODN combination and the single-ODN treatments. The three-ODN combination with 33 pM Srev, SDIS, and SPac caused less than 15 % cell mortality compared to control cultures all through the 28-day experiment.

Effects on cell survival of the three-ODN combination treatment with 33 pM each of Srev, SDIS and SPac delivered by the DLS carrier system, were also evaluated in chronically infected H9/HTLV-IIIB cells. After 7 days, infected cells treated with the antisense ODNs used either individually or in combination at 100 pM showed no significant loss of viability compared to untreated control cultures (Table 2). Taken together, our results show that when ODNs were used in combination at 33 pM for each antisense ODN, no synergistic toxicity was observed compared to ODNs used individually at 100 pM.

## DISCUSSION

In this report, the *in vitro* antiviral effects of a combination of three phosphorothioate antisense oligonucleotides directed against the HIV-1 genome was evaluated in cell lines at subnanomolar concentrations using the DLS delivery system which has been shown to be highly efficient to deliver DNA oligonucleotides *in vitro* (18). We restricted the scope of this study to the level of activity of the antisense oligonucleotides since the specificity of the activity has been addressed in another contribution (Lavigne *et al.*, submitted) in which the anti-HIV activity of the phosphorothioate antisense oligonucleotides Srev, SDIS and SPac was compared with the activity of three different control sequences: two sense sequences, a random sequence and a G-quartet control sequence. The specific activity of the antisense sequences varied upon the cell model, the type of control and the dose used.

Here, MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1 (IIIB) was used as an acute infection model and H9 cells chronically infected with HIV-1 (IIIB) as a chronic infection model. First, when antisense ODNs complexed with DLS-liposomes were tested in an acute infection model using MOLT-3 cells infected with HIV-1 (IIIB) in a long-term assay, higher inhibition of p24 production was achieved with multidrug regimen compared to some single-ODN regimens (1.5 to 5.4-fold at 10 pM, and up to 1.5-fold at 100 pM) (Fig. 1). Also, in this same model, emergence of virus could be delayed for 7 days in infected cells treated with the three-ODN combination compared to infected, untreated control cultures (Fig. 2). The cocktail prevented the emergence of



viral replication more effectively than SDIS and SPac used individually but was as effective as Srev used alone. However, all through the experiment, the viral production was lower in cells treated with the three-ODN combination than in cells treated with ODNs alone or untreated cells. These results indicate that there is effectively some advantages in using combinations of oligonucleotides at low concentrations among single-ODN treatment in acute infection. These advantages are not associated with an increase of cell toxicity since our assays on cell viability showed that antisense ODNs used in combination did not impair cell survival in this model (Figure 6).

In contrast to acute infections, no beneficial effects were obtained with the multidrug regimen compared to single-drug regimens in our chronic infection model. Nevertheless, in those cells, we were still able to inhibit viral production by more than 75 % by using very low concentrations of each ODN included in the combination such as 0.33 pM and around 66 % with 0.033 pM of each ODN. To our knowledge, anti-HIV activity of antisense oligonucleotides at such low concentrations have never been reported before for delivered ODNs, showing the high potency of the DLS delivery system. Antiviral activity at such low concentrations might eventually prove useful for *in vivo* application to avoid non-specific effects and toxicity. Furthermore, our results on cell viability showed that in combining antisense ODNs we did not increase cytotoxic effects compared to ODNs used individually (Table 2).

Taken together, these results suggest that a combination of ODNs might present some advantages in acute infection but not necessarily in chronic infection. In

chronically infected cells, the viral DNA is integrated to the cell genome and thus, the early steps of infection such as virus entry and reverse transcription are not available for ODN activity, and only the post-integration events can be targeted by the antisense molecules. Therefore, the advantages of a multitargeting approach seen in our acute infection model might be mainly due to non-antisense and/or antisense additive or synergistic effects displayed during early pre-integration steps such as reverse transcription. Antisense ODNs SDIS and SPac might block reverse transcription by an antisense mechanism if hybridization with viral RNA occurs or by non-antisense mechanisms such as binding to reverse transcriptase (24). Furthermore, since ODNs were complexed to DLS liposomes, they should not interact with events taking place at the cell membrane such as virus adsorption to the host cells and virus entry and/or fusion as reported in a recent study (25), thus eliminating potential non-antisense activity at these levels as an explanation for the higher level of antiviral activity of our cocktail seen in acute infection. In the previous study cited above, the ability of phosphorothioate oligonucleotides encapsulated in immunoliposomes to inhibit the cell-to-cell transmission of virus by HIV-induced syncytium formation was evaluated in comparison with oligonucleotides free in solution. When the phosphorothioate oligonucleotides were added free to uninfected CD4<sup>+</sup> C8166 cells co-cultured with chronically HIV-1 infected CEM cells expressing gp120 molecules, the formation of syncytia was completely blocked whereas liposome-encapsulated oligonucleotides failed to block syncytium formation. These results demonstrate that liposomal encapsulation can prevent oligonucleotides to bind to CD4 and to the V3 loop of viral gp120 and, therefore, to

exert extracellular inhibition of virus at the steps of viral entry and fusion with the cell membrane.

In order to improve our cocktail of oligonucleotides and to better elucidate the mechanisms of activity of the ODN combinations, we evaluated several different combinations of three or four oligonucleotide sequences, unmodified and phosphorothioate-modified (PS), in MOLT-3 cells acutely infected with HIV-1(IIIB). The combinations 2, 3, 4 which contain at least one PS-ODN were found to be more potent in inhibiting HIV-1 replication than cocktail 1 composed of three unmodified ODNs (Figures 4 and 5), indicating that non-specific inhibition due to backbone modification might be advantageous to enhance the antiviral activity of a combination of ODNs. In some cocktails, we included a random sequence either in an unmodified or PS-modified form in order to see if we could improve the efficacy of our cocktails by including a non-specifically-acting component. The three-antisense combination Srev-SDIS-SPac showed the highest antiviral activity (Figures 4 and 5) and was the only cocktail to show high level of inhibition as soon as 3 days after infection and to maintain its high level of activity throughout the experiment (Figure 5). Therefore, in our cell assay, we showed that it is more advantageous to use a combination of three antisense phosphorothioate sequences than a combination of two phosphorothioate or unmodified antisense sequences plus a random sequence. These results indicate that the choice of the sequence is important and might influence the antiviral activity of a given combination. By comparing the antiviral activity of the cocktail Srev-SDIS-SPac and the cocktail Srev-SDIS-SPac-RS, we also demonstrated that the number of sequences is an important

factor for the effectiveness of the combination. Indeed, in our assays, we could achieve higher antiviral activity with the three-ODN combination than with the four-ODN combination at 100 pM final concentration. This result cannot be explained only by a dilution factor since a high level of inhibition was obtained by using a combination of three ODNs at 10 pM final concentration (Figure 1), thus a combination made from 3.3 pM of each ODN, compared to 25 pM of each ODN for the four-ODN combination mentioned here. However, one should be cautious by comparing these two data since the two cell assays were not exactly identical. Furthermore, when we compared the antiviral activity of the four-ODN cocktail Srev-SDIS-SPac-RS with the three-ODN cocktail Srev-SDIS-RS, we found that a relatively smaller difference between their antiviral activity could be observed than between cocktails Srev-SDIS-SPac-RS and Srev-SDIS-SPac (Figure 4). This suggests that the presence of the random sequence could be in part responsible for the reduction in the efficacy of the four-ODN combination.

Studies on drug-combination strategy using antisense ODNs are extremely rare making comparisons very difficult. In another study (26) in which two 28-mer antisense ODNs, anti-*rev* and anti-*gag*, were tested in combination, the authors reported that the two-drug regimen treatment did not result after 4 weeks of treatment, in an increased inhibitory activity against HIV-1 (Ba-L) isolate in monocytes/macrophages cultures at concentrations ranging from 0.1 to 1.5  $\mu$ M, or HIV-1 (IIIB) isolate in PBMC cultures at concentrations ranging from 0.1 to 1  $\mu$ M, compared to the single-drug regimens. In contrast, in our previous study, the three-ODN cocktail (Srev-SDIS-SPac) added free to

the culture medium, inhibited the replication of an HIV-1 clinical isolate (VR2844A) in PBMCs more effectively than each ODN used alone at 0.1 and 0.5  $\mu\text{M}$  final concentrations, 7 days post-infection (Lavigne *et al.*, submitted). However, the apparent advantage of the combination strategy in our cell assay, was only observed under certain conditions (at low concentrations and for a certain period of time). It will be interesting to explore, in another study, if a combination of ODNs delivered by the DLS system will result in an increase in its antiviral effects in this cell assay as we observed in this study in our acute assays using cell lines. However, the difference between the previous reported results and our results with clinical isolates might be explained in part by unique properties of the isolates tested and the cell assay used (27). Also, as shown in this study, the choice and the number of sequences evaluated in combination may affect the efficiency of the combination treatment and therefore may explain, in part, the difference between these two studies with clinical isolates.

In conclusion, our observations provide new informations about the beneficial effects of a combination treatment with antisense oligonucleotides in cell cultures. Our results suggest that a combination of three oligonucleotides delivered by a lipidic formulation could be advantageous in certain conditions of acute infection *in vitro*, but the advantage was not very striking. In our chronic infection assay, no beneficial effects were obtained using oligonucleotides in combination, however we were able to inhibit viral production with a cocktail of three ODNs with the same efficiency than using each ODN individually at very low concentrations (0.1 and 1 pM) with the DLS delivery system. The combination approach might eventually prove useful for treating HIV

infection since no antagonistic interactions or increase in toxicity were observed *in vitro* with our three-ODN cocktail in all the cell assays employed. Based on our results and results from other studies, we can conclude that, in *in vitro* experiments, oligonucleotide combinations are at least as effective as ODNs used individually and might be under certain conditions more effective than some treatments with only one oligonucleotide. More studies need to be done to clearly demonstrate the advantages of using a combination of DNA oligonucleotides for the treatment of HIV infection and to evaluate the relevance of the *in vitro* advantages observed in this study for *in vivo* infection. Additive, non-antisense- and/or antisense-associated inhibitory effects acting at early steps of the viral replicative cycle (between the virus entry and the proviral integration) which may include sequence-dependent inhibition and non-specific effects might account for the higher antiviral activity displayed by our three-phosphorothioate antisense combination (Srev-SDIS-SPac) in the acute infection model. Combinations of DNA oligonucleotides with other drugs such as nucleoside and non-nucleoside analogs or protease inhibitors might be an attractive approach for the development of new strategies against HIV infection. Any system allowing better cell uptake and intracellular availability, like lipid-based carrier system, should enhance the antiviral effects of such a multidrug approach.

## AKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada. C. Lavigne benefited from post-graduate scholarships from the *Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche* (FCAR) from the Province of Québec.

The authors want to thank sincerely Mrs M. Fauvel for giving access to the Laboratoire de Santé Publique du Québec's P3 facilities used for virus manipulation.

## REFERENCES

1. Stein, C. A. and Cheng, Y-C. : Antisense oligonucleotides as therapeutics agents : Is the bullet really magical ? Science 1993;261:1004-1012.
2. Zhang, R., Yan, J., Shahinian, H., Amin, G., Lu, Z., Liu, T., Saag, MS., Jiang, Z., Temsamani, J., Martin, RR., Schechter, PJ., Agrawal, S., and Diasio, RB. : Pharmacokinetics of an anti-human immunodeficiency virus antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate (GEM 91) in HIV-infected subjects. Clin Pharmacol Ther 1995;58:44-53.
3. Yamaguchi, K., Papp, B., Zhang, D., Ali, AN., Agrawal, S., and Byrn, RA. : The multiple inhibitory mechanisms of GEM 91, a *gag* antisense phosphorothioate oligonucleotide, for human immunodeficiency virus type 1. AIDS Res Hum Retroviruses 1997;13:545-554.
4. Akhtar, S. and J. J. Rossi. : Anti-HIV therapy with antisense oligonucleotides and ribozymes : realistic approaches or expensive myths ? J. Antimicrob. Chemother. 1996 ;38:159-165.
5. Matsukura, M., Zon,G., Shinozuka, K., Robert-Guroff, M., Shimada, T., Stein, CA., Mitsuya, H., Wong-Staal, F., Cohen, JS., and Broder, S.: Regulation of viral expression of human immunodeficiency virus *in vitro* by an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide against *rev* (*art/trs*) in chronically infected cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:4244-4248.



6. Kinchington, D., Galpin, S., Jaroszewski, J.W., Ghosh, K., Subasinghe, C., and Cohen, J.S. : A comparison of gag, pol and rev antisense oligodeoxynucleotides as inhibitors of HIV-1. *Antivir. Res.* 1992;17: 53-62.
7. Lisziewicz, J., Sun, D., Weichold, F.F., Thierry, A.R., Lusso, P., Tang, J., Gallo, R.C., and Agrawal, S. : Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate complementary to Gag mRNA blocks replication of human immunodeficiency virus type 1 in human peripheral blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7942-7946.
8. Anazodo, M. I., Wainberg, M.A., Friesen, A.D., and Wright, J.A. : Sequence-specific inhibition of gene expression by a novel antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate directed against a nonregulatory region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Virol.* 1995; 69: 1794-1801.
9. Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starcich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway, S.R., Pearson, M.L., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Ghrayeb, J., Chang, N.T., Gallo, R.C., and Wong-Staal, F. : Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 1985; 313: 277-284.
10. Skripkin, E., Paillart, J.-C., Marquet, R., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. : Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 4945-4949.
11. Muriaux, D., Girard, P.-M., Bonnet-Mathonière, B., and Paoletti, J. : Dimerization of HIV-1<sub>Lai</sub> RNA at low ionic strength. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 8209-8216.

12. Kim, S.-G., Hatta, T., Tsukahara, S., Nakashima, H., Yamamoto, N., Shoji, Y., Takai, K., and Takaku, H. : Antiviral effect of phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides complementary to human immunodeficiency virus. *Bioorg. & Med Chem.* 1995; 3: 49-54.
13. McBride, M. S. and Panganiban A.T. : The human immunodeficiency virus type 1 encapsidation site is a multipartite RNA element composed of functional hairpin structures. *J. Virol.* 1996; 70: 2963-2973.
14. Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W., and Sodroski, J. : Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.* 1989; 63: 4085-4087.
15. Aldovini, A. and Young, R.A. : Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* 1990; 64: 1920-1926.
16. Agrawal, S. and Tang, J.Y. : GEM\*91-An antisense oligonucleotide phosphorothioate as a therapeutic agent for AIDS. *Antisense Res Dev* 1992; 2: 261-266.
17. Agrawal, S. : GEM 91 : Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate inhibitor of HIV-1 replication. *Drugs of the Future* 1995; 20: 344-351.
18. Lavigne, C. and Thierry, A.R : Enhanced antisense inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in cell cultures by DLS delivery system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 237: 566-571.
19. Popovic, M., Read-Conole, E., and Gallo, RC. : T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III. *Lancet* 1984; II: 1472-1473.

20. Popovic, M., Sarngadharan, MG., Read, E., and Gallo RC. : Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984; 224: 497-500.
21. Thierry, AR., Lunardi-Iskandar, Y., Bryant, JL., Rabinovich, P., Gallo, RC., and Mahan, LC. : Systemic gene therapy : Biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9742-9746.
22. Thierry, AR., Rabinovich, P., Peng, B., Bryant, JL., and Gallo, RC. : Characterization of liposome-mediated gene delivery : expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA. *Gene Ther* 1997; 4: 226-237.
23. Pauwels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., Schols, D., Herdewijn, P., Desmyter, J., and De Clercq, E. : Rapid and automated tetrazolium based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J Virol Methods* 1988; 20: 309-321.
24. Jendis, J., Strack, B., Volkmann, S., Böni, J., and Mölling, K. : Inhibition of replication of fresh HIV type 1 patient isolates by a polypurine tract-specific self-complementary oligodeoxynucleotide. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 1161-1168.
25. Zelphati, O., Imbach, JL., Signoret, N., Zon, G., Rayner, B., and Leserman, L. : Antisense oligonucleotides in solution or encapsulated in immunoliposomes inhibit replication of HIV-1 by several different mechanisms. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4307-4314.

- 
26. Weichold, FF., Lisiewicz, J., Zeman, RA., Nerukkar, LS., Agrawal, S., Reitz, MS., and Gallo, RC. : Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides alter HIV type 1 replication in cultures human macrophages and peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 863-867.
27. Crooke, MR :In vitro toxicology and pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Anticancer Drug Design* 1991; 6: 609-646.

## LEGENDS TO THE FIGURES

**FIGURE 1.** Long-term anti-HIV assay in acutely infected MOLT-3 cells. The cells were infected with HIV-1 (IIIB) and cultured in presence of antisense oligonucleotides added either individually or in combination for 28 days. Each ODN and the cocktail (Srev-SDIS-SPac) were delivered by the DLS carrier system at 10 and 100 pM final concentration. The highest level of p24 antigen in each assay was determined and the data are given in terms of percent inhibition of p24 production, compared to the highest level of p24 antigen found in infected, untreated cell cultures. Values represent the mean ( $\pm$  SD) of two separate experiments.

**FIGURE 2.** Long-term culture of HIV-1-infected MOLT-3 cells treated with antisense oligonucleotides added either individually or in combination delivered by the DLS carrier system. Cells were infected and treated with ODNs used individually or in combination at 100 pM final concentration. The cocktail was composed of Srev, SDIS and SPac antisense ODNs at a concentration of 33 pM each. The level of p24 production was determined in the culture supernatants every 3-4 days by HIV-1 antigen capture assay. Values represent the mean of duplicate determinations (SD < 15 %).

**FIGURE 3.** Short-term assay in H9 cells chronically infected with HIV-1 (IIIB). Cells were cultured in the presence of antisense ODNs delivered by the DLS carrier system, either individually or simultaneously in a three-drug combination. After 4 days, p24 antigen was determined in cell culture supernatants. Values represent the mean ( $\pm$  SD) of at least two separate experiments done in duplicate.

**FIGURE 4.** Comparison of the anti-HIV activity of various oligonucleotide combinations in acutely infected MOLT-3 cells. ODN combinations were delivered by the DLS carrier system at 100 pM final concentration. Data are given in terms of percent inhibition of p24 antigen production compared to infected, untreated control cultures at the peak of infection. 1) combination of unmodified antisense rev, DIS, and random sequence RD at 33 pM each, 2) combination of rev, DIS, and phosphorothioate random sequence RS at 33 pM each, 3) combination of phosphorothioate antisense Srev, SDIS, and RS at 33 pM each, 4) combination of Srev, SDIS, and SPac at 33 pM each, 5) combination of Srev, SDIS, SPac, and RS at 25 pM each, while « DLS » represents cells treated with DLS formulation only, at 100 pM. Values represent the mean ( $\pm$  SD) of triplicate experiments.

**FIGURE 5.** Long-term inhibition of HIV-1 strain IIB by different oligonucleotide combinations in acutely infected MOLT-3 cells. Cells were treated with various combinations of ODNs delivered by DLS formulation at 100 pM final concentration. ODNs were added in equal molar ratio to form the different combinations. Results are averages ( $\pm$  SD) of two separate experiments done in duplicate (SD < 20%).

**FIGURE 6.** Cell survival of MOLT-3 cell cultures treated with antisense drugs delivered by the DLS carrier system. Cells acutely infected with HIV-1 (IIB) were exposed to various antisense oligonucleotides added either individually or in a three-drug combination at 100 pM final concentration for 28 days and cell counts were determined by the MTT assay every 3 to 4 days. The data are reported in terms of percent of cell viability, compared to infected, untreated cell cultures. Values represent the mean of two separate experiments done in duplicate. (SD < 15%).

**Table 1.** Sequence of the oligonucleotides used in combination for the treatment of HIV-1 infection *in vitro*.

<i>ODNs and cocktails</i>	<i>Nucleotide sequence and cocktail composition</i>
<i>Srev</i> or <i>rev</i> (antisense)	5'-TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCCTGCCA-3'
SDIS (antisense)	5'-CTCTTGCCGTGCGCGCTTCAGCAAGC-3'
DIS (antisense)	5'-CTCTTGCCGTGCGCGCTTCAGCAAGCCG-3'
SPac (antisense)	5'-TCTAGCCTCCGCTAGTCAAAATTTTTGGCG-3'
RS (random)	mixture of all four nucleotides
RD (random)	mixture of all four nucleotides
Cocktail-1	<i>rev</i> -DIS-RD
Cocktail-2	<i>rev</i> -DIS-RS
Cocktail-3	<i>Srev</i> -SDIS-RS
Cocktail-4	<i>Srev</i> -SDIS-SPac
Cocktail-5	<i>Srev</i> -SDIS-SPac-RS

Oligonucleotides *Srev*, SDIS, SPac, and RS (random) were synthesized with a phosphorothioate backbone. Oligonucleotides *rev*, DIS, and RD (random) were synthesized with phosphodiester linkage.



**Table 2.** Viability of H9 cell cultures chronically infected with HIV-1<sub>MB</sub>, treated with DLS-associated antisense oligonucleotides used individually or in combination at 100 pM dose.

---

<i>Treatment</i>	<i>% cell viability</i>
DLS- <i>Srev</i>	90 ± 8
DLS-SDIS	89 ± 8
DLS-SPac	91 ± 3
DLS-Cocktail	95 ± 6

---

Cell counts were determined after 7 days of exposure by the MTT assay and percent of cell viability was calculated by comparison to chronically infected, untreated cell cultures. Cocktail : combination of 33 pM *Srev*, SDIS, and SPac.

FIGURE 1

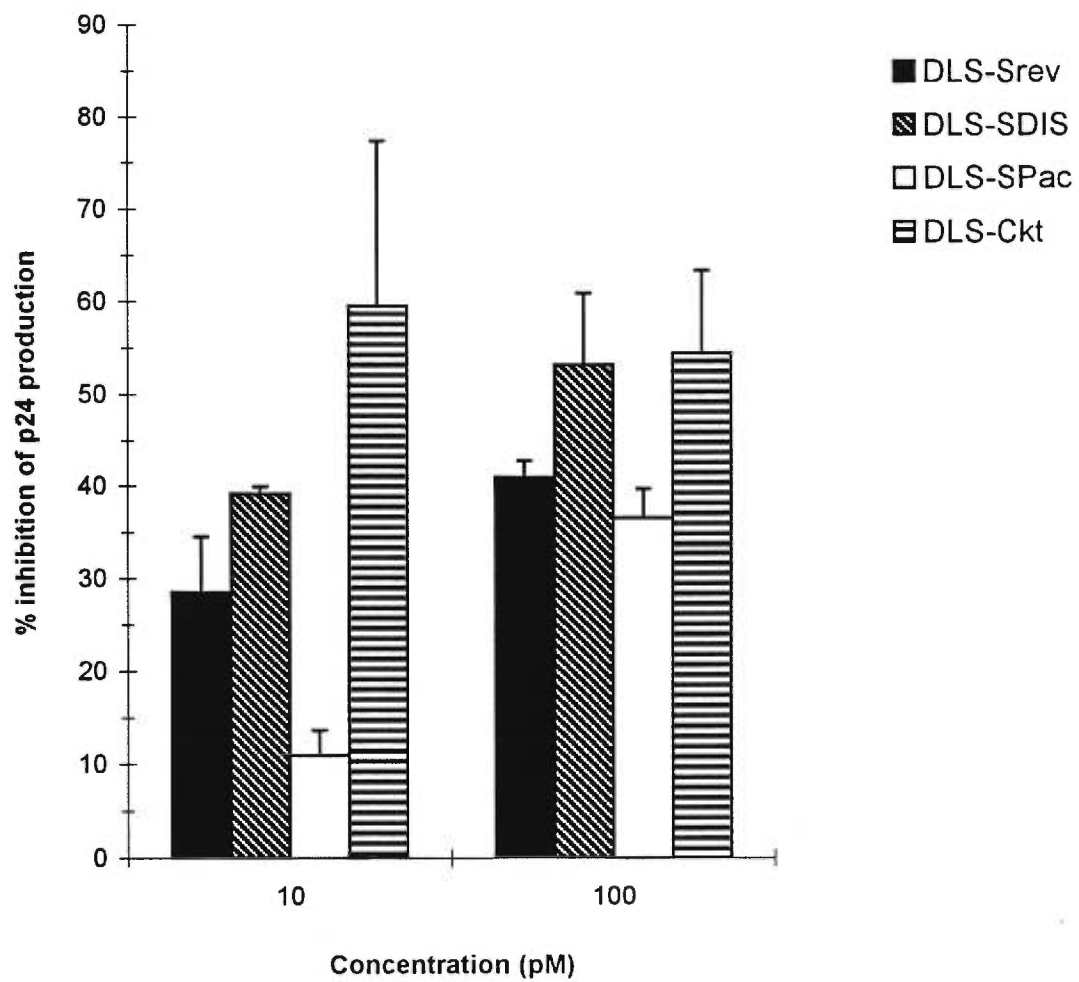




FIGURE 3

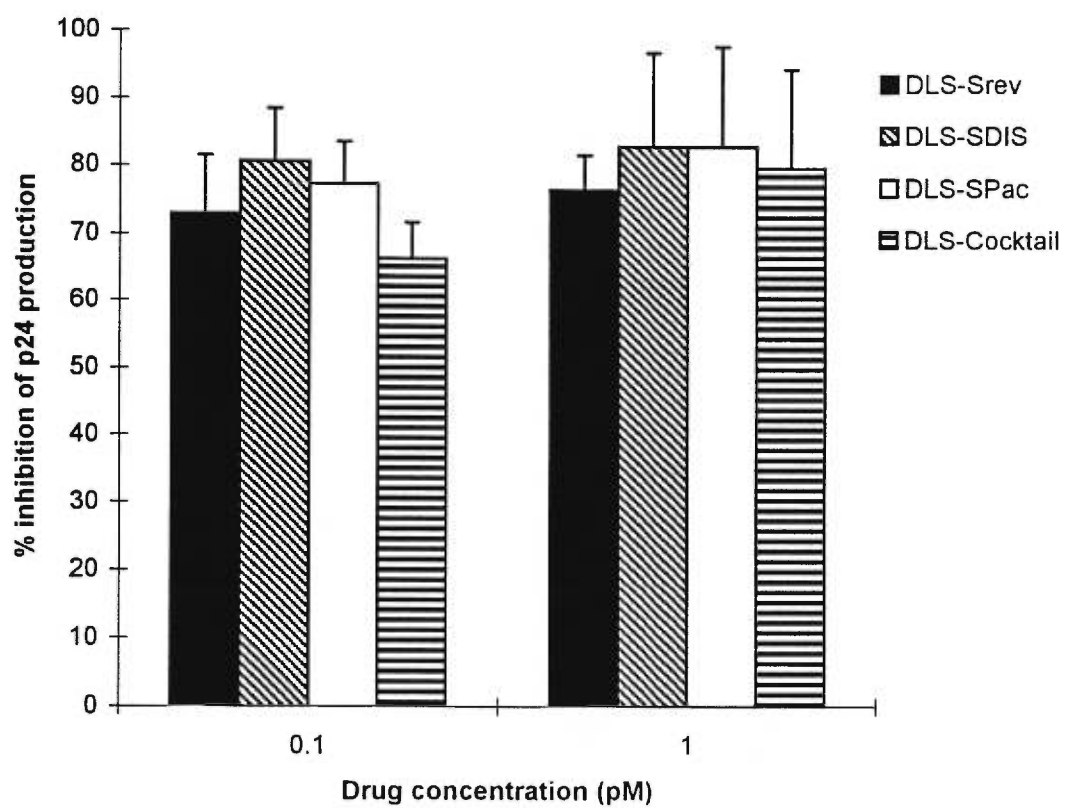


FIGURE 4

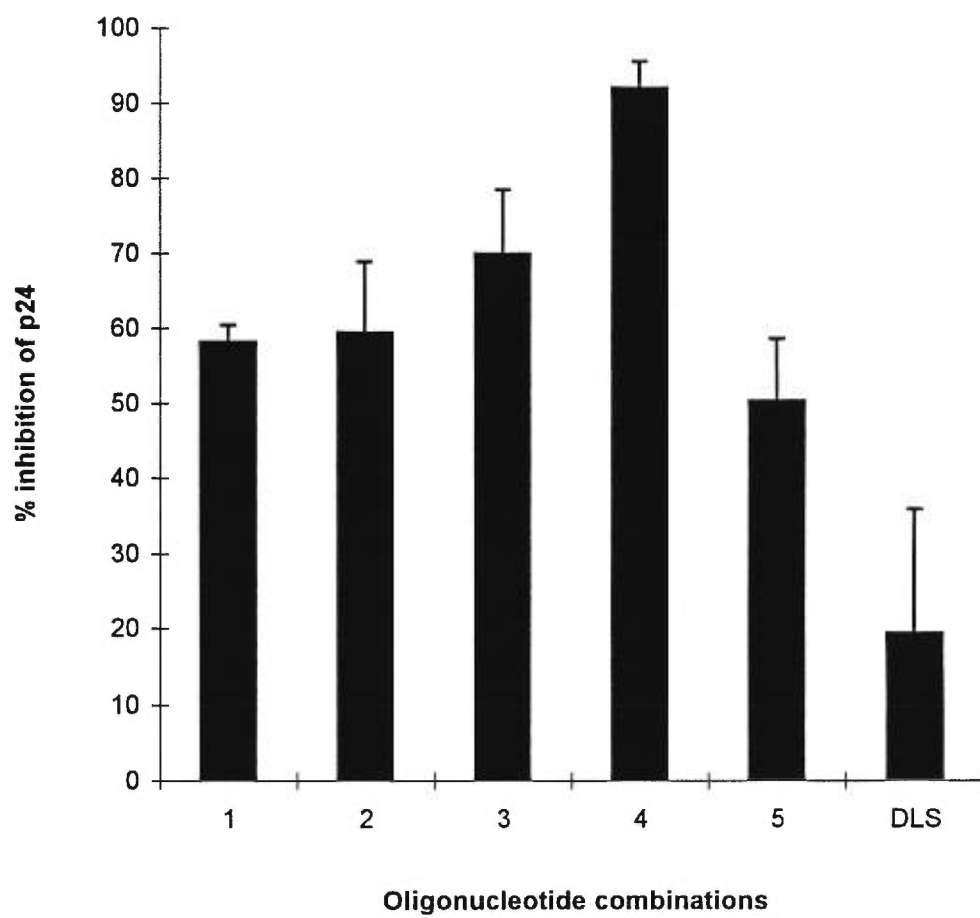


FIGURE 5

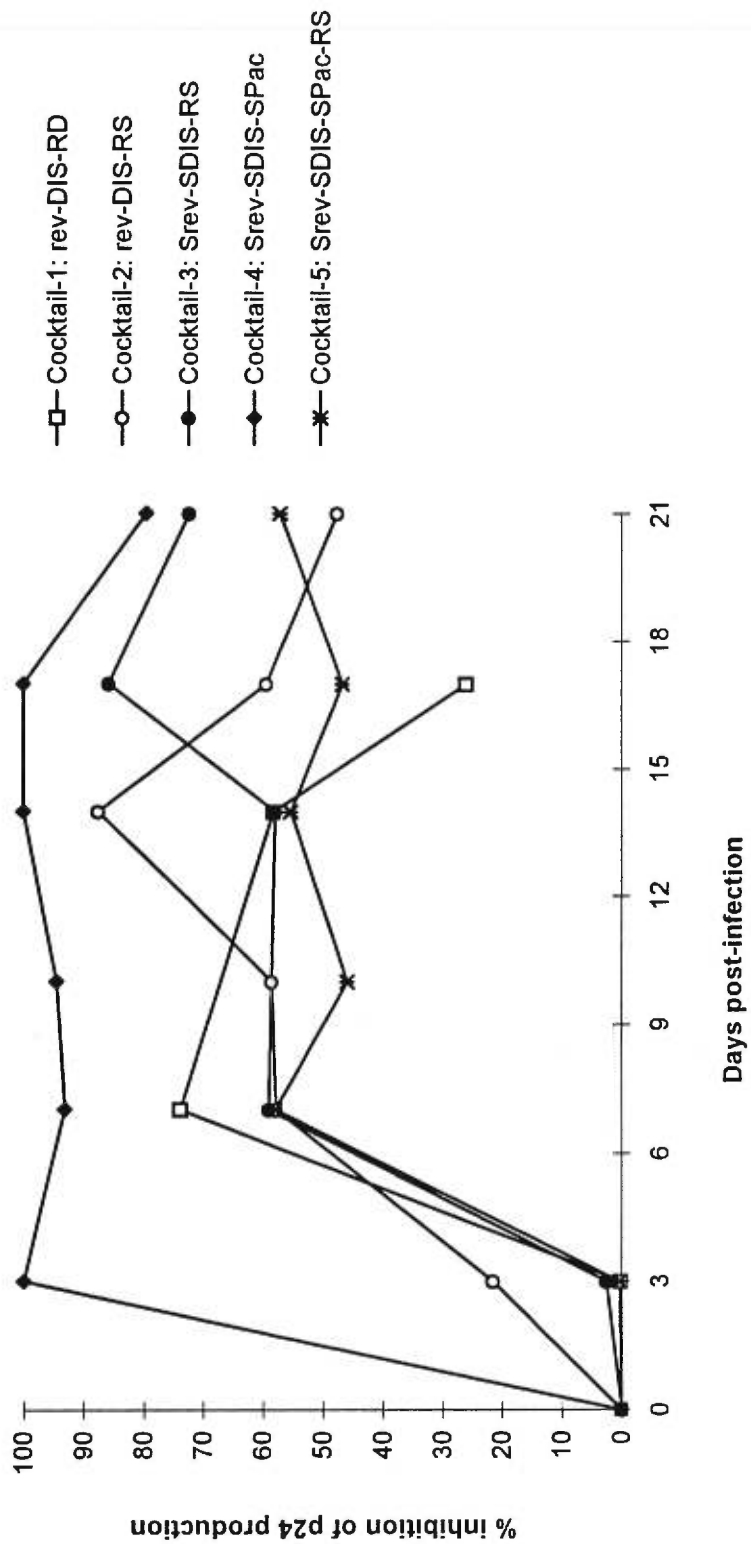
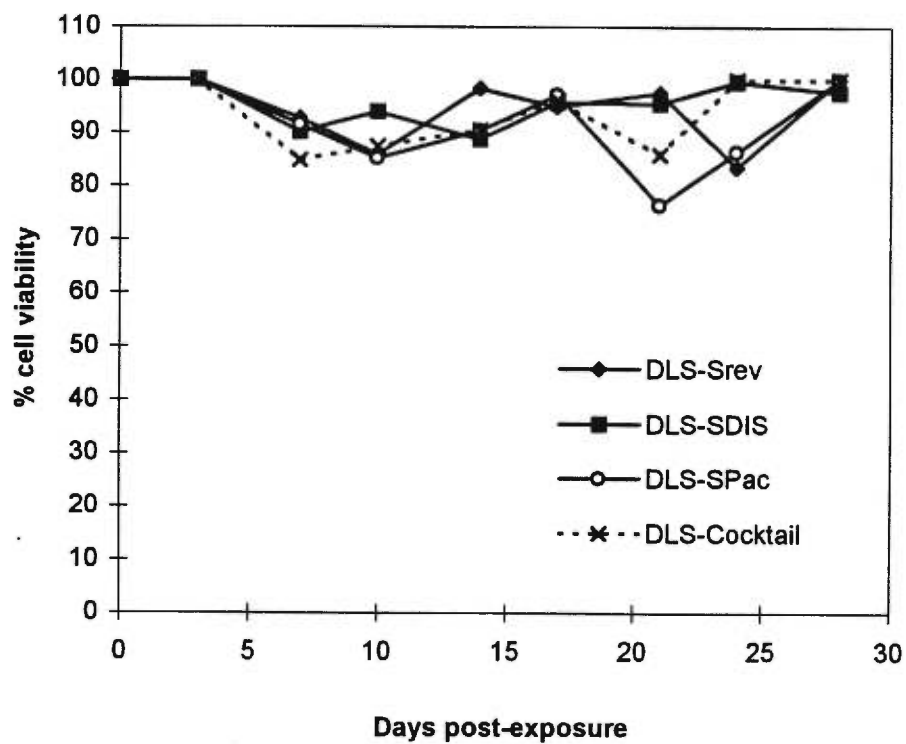


FIGURE 6



---

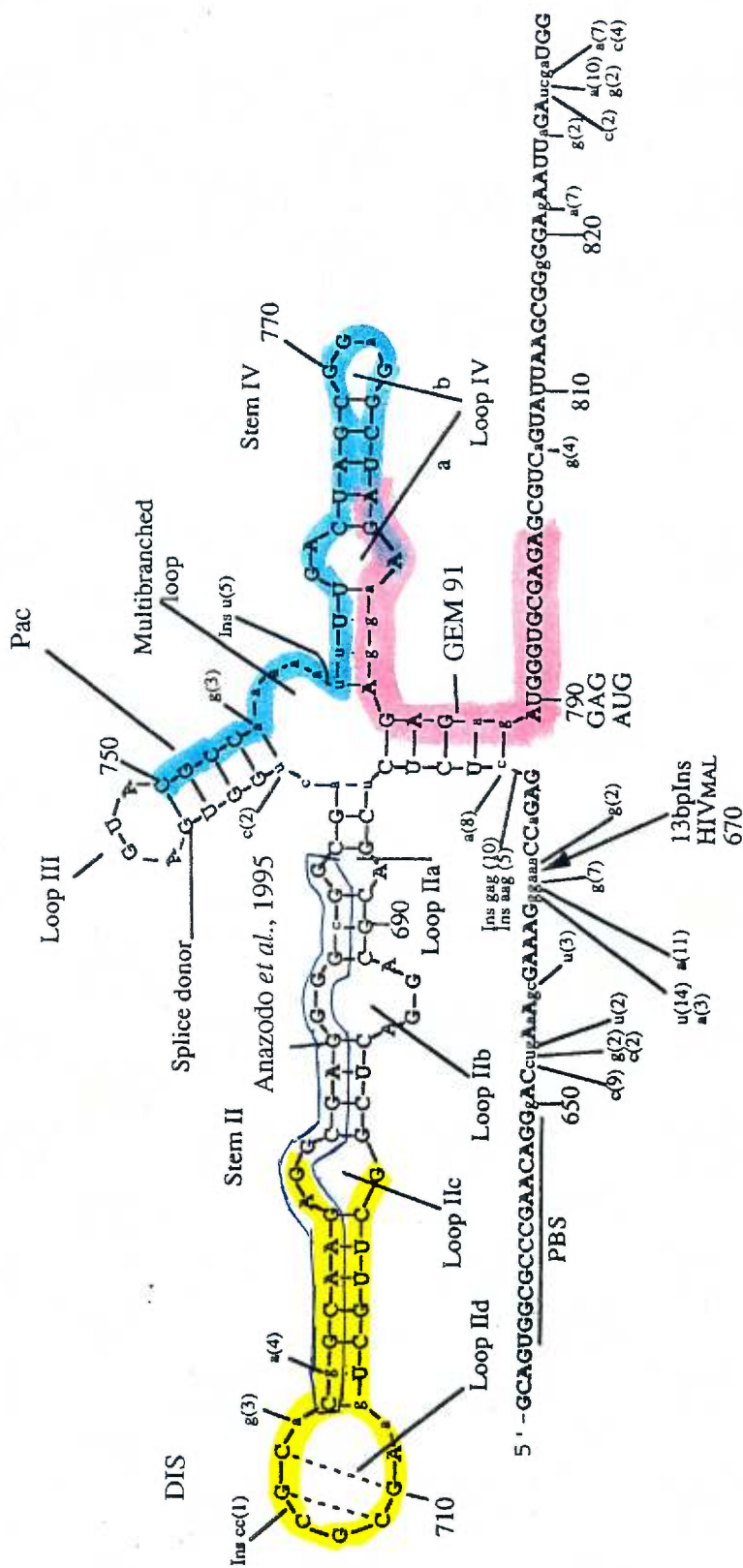
**CHAPITRE 6**  
**DISCUSSION GÉNÉRALE**



## Évaluation de l'activité anti-VIH de deux nouvelles séquences antisens dirigées contre la région du signal d'encapsidation du génome viral

Les oligonucléotides antisens ont été largement utilisés pour inhiber l'expression de gènes spécifiques viraux ou cellulaires. Théoriquement, ces molécules agiraient soit en empêchant l'attachement du ribosome à l'ARNm, soit en bloquant les processus d'épissage de l'ARNm ou soit en activant la ribonucléase H par la formation d'hétéroduplex ARN/ADN. Sur la base de ces mécanismes d'inhibition, la plupart des oligonucléotides antisens ont été sélectionnés pour être complémentaires à des séquences particulières de la coiffe, du codon d'initiation AUG, du site donneur (*splice donor*) ou du site accepteur (*splice acceptor*), de la jonction de l'épissage et de régions non-traduites de la partie 5' et 3' de l'ARNm.

La plupart des antisens oligonucléotides testés contre le VIH sont dirigés contre un ARNm codant pour une protéine de régulation comme les protéines Tat et Rev, ou pour une protéine de structure comme les protéines Gag ou Env. Dans le cadre de nos travaux, nous avons voulu explorer d'autres régions du génome viral et avons synthétisé deux nouvelles séquences oligonucléotidiques complémentaires à deux séquences hautement conservées dans la région 5' du LTR (Figure 1). La première séquence, que nous avons nommée DIS pour *dimerization site*, est un oligomère ADN de 26 nucléotides complémentaire à une séquence localisée entre le *primer binding site* et le site donneur (nucléotides +245 à +270) identifiée comme étant essentielle pour la dimérisation de l'ARN viral (Skripkin *et al.*, 1994) et son encapsidation (Kim *et al.*, 1994). Selon des études de modélisation moléculaire assistée par ordinateur, cette séquence est caractérisée par une structure secondaire en



**Figure 1. Modèle de prédiction de la structure secondaire de l'ARN du VIH-1 dans la région du signal d'encapsidation.**

Les lettres en majuscule sont les résidus conservés à travers 19 séquences homologues et les lettres en minuscule sont ceux substitués dans 1 des 19 séquences homologues. Les insertions de bases et les substitutions plus fréquentes sont également indiquées en minuscule avec la fréquence par rapport aux 19 isolats entre parenthèse. PBS : primer binding site ; Ins : insertion. Schéma tiré de Harrison and Lever, 1992.

forme de *stem-loop* contenant des séquences palindromiques (Harrison and Lever, 1992 ; McBride and Panganiban, 1996).

La deuxième séquence est un oligomère de 30 nucléotides complémentaire à une région située entre le site donneur et le codon d'initiation AUG du gène *gag* ( nucléotides +295 à +324) que nous avons nommée Pac pour *packaging*. Cette séquence comprend également une structure secondaire en forme de *stem-loop* reconnue comme étant essentielle pour l'encapsidation de l'ARN viral (Lever *et al.*, 1989 ; McBride and Panganiban, 1996). La séquence DIS étant située en amont du site donneur se retrouve sur tous les ARN génomiques ainsi que sur tous les ARN messagers sous-génomiques contrairement à la séquence Pac qui, étant située en aval du site donneur, ne devrait être présente que sur les ARN non-épissés.

Nous avons choisi ces séquences suite à l'étude de travaux antérieurs qui avaient démontré que cette région du site d'encapsidation pouvait constituer à notre point de vue une bonne cible pour la thérapie antisens. En effet, des études de mutagénèse dans cette région du génome ont démontré de façon évidente le rôle de certaines séquences entre l'extrémité 5' du LTR et le codon ATG du gène *gag* dans l'encapsidation de l'ARN viral. Des provirus mutants dans lesquels plusieurs bases avaient été retranchées dans la région située entre le site du *major splice donor* et le codon d'initiation du gène *gag* ont été transfectés dans des cellules en cultures. Les cellules transfectées par ces provirus mutants produisaient plus de virions avec des anomalies au niveau de la structure du nucléoïde comparativement aux cellules transfectées par le provirus sauvage. De plus, les particules virales mutantes produites étaient moins infectieuses et possédaient un plus faible contenu en ARN viral. Cependant, le patron de protéines virales n'était pas affecté (Lever *et al.*, 1989 ;

Aldovini and Young, 1990 ; Clavel and Orenstein, 1990). Dans une autre étude, des mutants de délétion dans lesquels une séquence de 13 bases située, cette fois-ci, en amont du site du *major splice donor*, présentaient eux aussi des contenus en ARN diminués (réduction de 6 fois) et se répliquaient moins efficacement que les virus sauvages (Kim *et al.*, 1994).

De plus, des cellules T humaines Jurkat exprimant de façon constitutive un ARN antisens complémentaire à une séquence de 407 nucléotides dans la région 5' du gène *gag* ont été établies à l'aide d'un vecteur non-rétroviral. Cette séquence ciblée inclut le site du *major splice donor*, nos deux séquences DIS et Pac et l'extrémité 5' du gène *gag* (nucléotides +222 à +629). Dans les cultures de cellules exprimant l'ARN antisens, la réplication du VIH-1 (IIIB) mesurée par la production de p24 dans le surnageant était inhibée à 88% 10 jours post-infection et 5 fois moins de cellules exprimaient les antigènes du VIH-1 à leur surface comparativement aux cultures contrôles (Sczakiel and Pawlita, 1991). De même, des cellules MT<sub>4</sub> transformées par un vecteur rétroviral dérivé du virus MoMuLV exprimant un ARN antisens de 1440 nucléotides complémentaire à une région située à l'extrémité 5' incluant le signal d'encapsidation de la souche HXB2 de HIV-1 étaient complètement protégées contre une infection par le VIH-1 et ce, jusqu'à 30 jours post-infection (Cohli *et al.*, 1994).

Afin d'évaluer l'efficacité de nos deux nouvelles séquences antisens à inhiber la réplication du VIH, nous avons comparé leur activité antivirale avec celle de deux molécules antisens bien reconnues pour leurs effets inhibiteurs sur le VIH (Chapitre 2). Il s'agit de l'oligonucléotide GEM 91, formé de 25 nucléotides, complémentaire à la région du codon d'initiation de la traduction du gène *gag* et d'une séquence de 28 nucléotides dirigée contre le site d'initiation de la traduction du gène *rev*. Tous les oligonucléotides utilisés dans cette étude

sont des oligonucléotides chimiquement modifiés (phosphorothioates) dans lesquels un atome d'oxygène dans la liaison phosphodiester a été remplacé par un atome de soufre. Nous avons choisi ce type de modification chimique (phosphorothioate) pour nos séquences afin de comparer nos résultats avec ceux de la littérature. La plupart des études sur les antisens ont été faites avec des analogues d'ODNs phosphorothioates à cause de leur résistance à la dégradation par les nucléases cellulaires et leur activation de la RNase H. Dans cet article nous démontrons que SDIS et SPac (S pour phosphorothioate) sont aussi efficaces que GEM 91 et Srev, à une concentration de 0.1  $\mu$ M, pour bloquer la formation de syncytia dans des cultures de cellules MOLT-3 infectées *de novo* par la souche de laboratoire IIB du VIH-1. Dans ce même modèle, SDIS and SPac bloquent presque entièrement (> 99% pour SDIS jusqu'au jour 21 ; 98.8% et plus pour SPac jusqu'au jour 18 et 92% au jour 21) la réplication virale et ce, aussi efficacement que GEM 91 et Srev pendant toute la durée de l'expérience (21 jours). Dans les cultures infectées non-traitées, la production virale atteint un maximum au jour 14 avec une estimation de p24 de 8343 ng/million de cellules.

Dans cet article nous avons également évalué l'efficacité de nos séquences dans des cellules H9 chroniquement infectées par le VIH-1 (IIB). Dans ce modèle, SDIS et SPac peuvent inhiber la production virale avec une activité semblable à celle de Srev. De même, nos essais sur des cultures de cellules mononucléaires provenant du sang périphérique (PBMCs) infectées *de novo* par un isolat clinique de VIH-1 (VR2846A) démontrent que SDIS et SPac sont également aussi actives que Srev pour inhiber la réplication d'une souche clinique.

Dans cette première partie de notre projet nous avons confirmé notre hypothèse que DIS et Pac pouvaient représenter des séquences intéressantes pour inhiber la réplication du VIH *in vitro* par l'approche antisens. Cette première série d'expériences nous a permis d'identifier deux nouvelles séquences antisens présentant une activité antivirale de même niveau que les séquences bien connues anti-*rev* et GEM 91. Nos séquences ont été testées contre deux souches de VIH différentes dont une souche de laboratoire (IIIB) et un isolat clinique dans des cellules infectées de façon aiguë et chronique en prenant soin d'utiliser des contrôles positifs et négatifs appropriés. Toutefois, dans le cadre de ce projet nous n'avons pas exploré à fond l'effet de nos oligonucléotides sur l'encapsidation des virions. Cependant nous avons quelques résultats nous permettant de croire que DIS et Pac bloquent les processus d'encapsidation. En effet, nous avons vérifié la capacité d'établir une infection *de novo* des virus produits par des cultures de cellules chroniquement infectées par VIH (IIIB) qui avaient été préalablement traitées avec nos oligonucléotides. Lorsque des cellules MOLT-3 étaient infectées avec le surnageant des cultures traitées avec SDIS et SPac à une concentration de 0.1  $\mu\text{M}$  moins de virus étaient produits comparativement aux cultures traitées avec la séquence contrôle sens (SSPac) pour une même quantité de virus au départ, nous indiquant que les cultures traitées avec les oligonucléotides antisens produisaient des virions moins infectieux. De plus, des observations de sections ultramincées de ces mêmes cultures de cellules chroniquement infectées par VIH (IIIB) et traitées avec nos oligonucléotides antisens ont révélé qu'il y avait plus de particules présentant des anomalies morphologiques dans ces cultures comparativement aux cultures contrôles.

Dernièrement, il a été démontré, par des études de compétition et des analyses de stabilité des hétérodimères, que des oligonucléotides antisens dirigés contre le site de dimérisation pouvaient inhiber *in vitro* la dimérisation de



l'ARN viral en formant un duplex extrêmement stable et presque irréversible (Skripkin *et al.*, 1996). De plus, dans cette étude, les oligonucléotides antisens étaient de meilleurs inhibiteurs que les oligonucléotides sens. De plus, un oligonucléotide phosphorothioate de 20-mère complémentaire à une séquence dans la région du signal d'encapsidation du génome du VIH (nucléotides +262 à +281) a été évalué pour son activité antivirale dans des cultures de cellules mononucléaires du sang de cordon ombilical infectées *de novo* (Anazodo *et al.*, 1995b). Après 7 jours de traitement, une réduction d'environ 50% de l'activité de la transcriptase inverse et du niveau de p24 dans le surnageant a été observée dans les cellules infectées traitées avec cet oligonucléotide à une concentration de 0.4  $\mu\text{M}$  et d'environ 80% à 1.6  $\mu\text{M}$ . Cet oligonucléotide antisens chevauche notre oligonucléotide DIS de 8 nucléotides à son extrémité 3'. Ces résultats sont donc très encourageants et indiquent que des oligonucléotides antisens dirigés contre la région du signal d'encapsidation représentent des outils potentiels pour inhiber la réplication du VIH *in vivo*.

### **Le système de transport liposomal DLS est un puissant outil pour transporter des oligonucléotides ADN**

L'utilisation des oligonucléotides ADN antisens présente certaines limitations dont le faible taux de pénétration cellulaire, leur sensibilité à la dégradation par les nucléases, leur faible disponibilité intracellulaire et leur action non-spécifique. Afin de pallier à ces problèmes, différentes stratégies ont été envisagées comme la modification chimique de l'enchaînement phosphodiester, dont la plus utilisée est la substitution d'un atome d'oxygène par un atome de soufre. Les phosphorothioates possèdent plusieurs avantages incluant leur stabilité face aux nucléases et leur reconnaissance par la ribonucléase H, une enzyme jouant un rôle-clé dans leur mécanisme d'action. Également, ils sont relativement faciles à obtenir à partir de dérivés

nucléotidiques disponibles commercialement et de synthétiseurs automatisés de plus en plus répandus. Cependant, leurs nombreux effets non-spécifiques représentent un obstacle majeur pour une application thérapeutique (Stein and Cheng, 1993).

Une alternative aux modifications chimiques est l'association des oligonucléotides avec des systèmes de transport afin de les protéger contre l'action des nucléases et d'augmenter leur taux de pénétration dans la cellule (Thierry and Tackle, 1995). Un nouveau système de transport liposomal (DLS) a été développé récemment dans le laboratoire du Dr Robert C. Gallo par le Dr Alain R. Thierry. Les liposomes DLS ont d'abord été testés avec succès pour le transport d'ADN plasmidique dans des études *in vitro* et *in vivo* (Thierry *et al.*, 1995 ; 1997). Nous avons voulu vérifier si les liposomes DLS pouvaient être un bon système pour pallier à certains problèmes rencontrés lors de l'utilisation des oligonucléotides ADN.

Afin d'évaluer l'efficacité du système DLS à transporter des oligonucléotides antisens, nous avons comparé le niveau d'activité antivirale de l'ODN antisens anti-*rev* libre (non-associé aux liposomes DLS) avec celui de l'ODN anti-*rev* associé aux liposomes DLS dans différents systèmes cellulaires. Les travaux de cette étude sont résumés dans le Chapitre 3. Le système DLS s'est avéré un puissant outil de transport pour ces composés. La complexation des ODNs avec les liposomes DLS a permis de diminuer de 100 fois la dose requise pour obtenir une activité antivirale de même niveau que celle obtenue avec les oligonucléotides libres dans les cellules MOLT-3 infectées *de novo*, de 1000 fois dans les cultures de PBMCs infectées *de novo* et de 1 500 000 fois dans les cellules H9 chroniquement infectées. Ces résultats nous apparaissent vraiment impressionnants et les niveaux d'activité observés sont supérieurs à



ceux des autres travaux publiés jusqu'à ce jour sur les systèmes liposomaux. Ainsi, une augmentation dans le niveau d'activité d'un oligonucléotide antisens de 10 fois seulement a été observée avec la formule commerciale lipofectine qui diffère dans sa composition des liposomes DLS (Anazodo *et al.*, 1995a). Dans une autre étude, l'encapsulation de l'ODN anti-*rev* dans des immunoliposomes a augmenté de 5 fois l'activité antivirale de cet oligo dans des cellules CEM infectées *de novo* et de 40 à 50 fois dans des cellules chroniquement infectées (Zelphati *et al.*, 1994).

Les oligonucléotides complexés aux liposomes DLS pénètrent dans la cellule par endocytose. Des ODNs complexés aux liposomes DLS et additionnés à des cultures de cellules HeLa à une concentration de 0.1  $\mu\text{M}$ , ont été retrouvés dans le cytoplasme en grande quantité sous forme d'aggrégats après seulement 4 heures d'incubation indiquant que les DLS-ODNs sont rapidement capturés par ces cellules. Après 24 heures d'incubation ils étaient retrouvés dans le noyau indiquant que les liposomes DLS permettent aux ODNs d'échapper aux enzymes lytiques des compartiments endosomes/lysosomes et ainsi favorisent leur distribution intracytoplasmique et intranucléaire (Lavigne *et al.*, en préparation). Les ODNs sont ainsi plus disponibles pour interagir avec leurs cibles augmentant alors leur activité.

De plus, les liposomes DLS protègent les oligonucléotides contre la dégradation par les nucléases extra- et intracellulaires. En effet, les oligonucléotides phosphodiester (donc non-modifiés) complexés avec les liposomes DLS peuvent inhiber la réplication virale à des concentrations très faibles : 0.1 nM dans des lignées cellulaires établies et des cultures de PBMCs infectées *de novo* par la souche IIIB du VIH-1 et 0.001 nM dans des cellules chroniquement infectées (Chapitre 4). Ces doses sont largement en-dessous

des doses normalement requises pour obtenir une activité avec des ODNs phosphodiesteres libres, lesquelles se situent généralement au-dessus de 10  $\mu$ M (Crooke, 1992). Alors, dans cette deuxième partie du projet, nous avons démontré que l'utilisation du système de transport DLS représente une solution prometteuse aux problèmes d'instabilité et de pénétration cellulaire des oligonucléotides.

### **Les mécanismes d'action des oligonucléotides antisens sont complexes et incluent des effets spécifiques et non-spécifiques**

Les travaux des dernières années ont démontré que les oligonucléotides antisens pouvaient être utilisés pour inhiber l'expression de nombreux gènes viraux et cellulaires dans plusieurs systèmes *in vitro* et modèles animaux. Des résultats encourageants démontrant l'efficacité des oligonucléotides à bloquer l'expression des gènes ont vite fait apparition dans les journaux scientifiques. A l'époque où nous avons initié ce projet, en 1994, on commençait à peine à parler des effets non-spécifiques des oligonucléotides. Quelques études, tout au plus, rapportaient avoir observé des effets biologiques avec des séquences contrôles mais ce phénomène n'était pas fréquent. Ce n'est que l'année suivante et surtout en 1996 que les chercheurs ont commencé à se questionner sur la spécificité de ces nouvelles molécules. Cependant, en 1994, nous étions déjà préoccupés par cette question et c'est pourquoi nous cherchions à synthétiser de nouveaux oligonucléotides antisens pour augmenter le degré de spécificité de l'activité de ces composés. Nous nous sommes vite rendu compte, par contre, que nos molécules antisens ne possédaient pas, de façon évidente, un avantage à ce niveau sur les oligonucléotides déjà existants. En même temps que nous réalisons que nos séquences contrôles pouvaient inhiber la réplication du VIH de façon aussi efficace que nos oligonucléotides antisens dans certaines conditions, d'autres équipes de chercheurs ont

commencé à être préoccupées par cette question et c'est alors qu'ils ont réorienté leurs travaux afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces composés oligonucléotidiques. De ces premières études, il est apparu que ces nouvelles drogues ne se comportaient pas tout à fait comme on l'avait prédit théoriquement (Stein, 1995 ; Gura, 1995). En effet, d'autres études mentionnaient aussi avoir observé des effets non-spécifiques de séquence en démontrant que leurs oligonucléotides contrôles présentaient parfois une activité aussi élevée que leurs séquences antisens comme dans notre cas (Kinchington *et al.*, 1992 ; Zelphati *et al.*, 1994).

Comme les études sur l'activité *in vitro* des oligonucléotides étaient souvent ponctuelles, il était donc difficile de comparer les études entre elles et de tenter de dresser des conclusions générales concernant l'activité de ces molécules. C'est dans ce contexte que nous avons voulu déterminer l'impact de certains facteurs et de certaines conditions sur l'activité *in vitro* des oligonucléotides afin de mieux contrôler les essais *in vitro* servant à déterminer la nature de l'activité de ces composés. Suite aux résultats très positifs que nous avons obtenu avec nos deux nouvelles séquences antisens, nous possédions ainsi plus d'une séquence qui était active contre le VIH. De plus, nous possédions un système de transport très efficace nous permettant de comparer l'activité antivirale des ODNs phosphodiesteres avec les ODNs phosphorothioates. Nous avons alors en main les éléments-clés pour entreprendre une étude comparative afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des ODNs antisens. Nous avons ainsi comparé l'activité de différents oligonucléotides tout en analysant différents facteurs pouvant influencer l'activité de ces molécules.

Dans ce volet de notre projet nous avons comparé l'activité antivirale de différentes séquences antisens avec des séquences contrôles dans des modèles cellulaires variés afin de déterminer le niveau de spécificité de l'activité anti-VIH. Nous avons également évalué l'influence du choix du modèle cellulaire employé en comparant l'activité des ODNs dans des modèles d'infection différents (infection *de novo* versus infection chronique) et dans des expériences de courte durée versus des expériences s'échelonnant sur une plus longue période de temps. Le type de contrôle choisi, la nature de l'ODN, la dose et la méthode utilisée pour délivrer les ODNs ont également été analysés. Les résultats de cette étude exhaustive sont détaillés dans le Chapitre 4.

Cette étude démontre que toutes les séquences utilisées, qu'elles soient antisens, sens ou aléatoires, peuvent, du moins dans nos conditions expérimentales, inhiber la réplication du VIH dans tous les systèmes cellulaires employés. Cependant on note des différences dans le niveau de l'activité antivirale selon la dose d'ODN employée et selon le modèle cellulaire utilisé. Les plus grandes variations dans le niveau de l'activité sont surtout observées dans notre expérience à court terme avec les cellules MOLT-3 infectées *de novo*. Les ODNs phosphorothioates et les ODNs phosphodiesteres présentent en général des niveaux comparables d'inhibition. De plus, le degré de spécificité varie en fonction de la séquence contrôle utilisée. Ce point est très important car souvent on attribue une activité spécifique de séquence à un ODN antisens en le comparant avec une autre séquence dite contrôle. Le choix de cette séquence contrôle devient alors déterminant pour déclarer la présence ou non d'une activité spécifique. En effet, dans certaines études précédentes, on déclarait observer une activité antisens suite à la comparaison avec un oligonucléotide contrôle à une concentration donnée et souvent dans des expériences à court terme. De plus, dans certaines études les contrôles étaient tout simplement absents. Il a même été suggéré dernièrement, qu'à l'avenir il

serait préférable d'utiliser au moins deux contrôles différents avant de mentionner l'effet antisens d'un oligonucléotide quelconque. Idéalement, une des deux séquences contrôles devrait être dirigée contre une cible différente comme, par exemple, contre un ARN messager d'une autre protéine ou d'une autre espèce.

Dans cette étude nous avons pu constater la complexité des mécanismes d'action des molécules antisens. En effet, nous avons pu faire une distinction entre l'activité antisens telle que décrite par l'hybridation de l'ODN avec sa cible et donc dépendante de la séquence oligonucléotidique, l'activité dépendante de la séquence de l'ODN mais ne relevant pas d'un mécanisme antisens et l'activité non-dépendante de la séquence, commune à tous les ODNs. Nous avons évalué la partie de l'activité pouvant être attribuée à une activité antisens spécifique en comparant l'activité antivirale des séquences antisens avec les séquences contrôles et nous avons trouvé qu'elle variait selon le modèle cellulaire utilisé, la dose et la séquence contrôle utilisé pour calculer le degré de spécificité. Dans notre expérience à court terme avec des cellules MOLT-3, 100 % de l'activité de nos molécules antisens pouvait être attribué à un effet antisens comparativement à environ 60 % dans notre expérience à court terme avec des cellules primaires. Dans notre expérience à long terme avec des cellules MOLT-3, la portion de l'activité pouvant être attribuée à un effet antisens ne dépassait pas 10 %. Finalement, dans notre expérience à court terme avec des cellules H9 chroniquement infectées, la portion de l'activité pouvant être attribuée à un effet antisens se situait autour de 37 %.

En comparant les différentes séquences antisens entre elles nous avons pu évaluer la portion de l'activité due à une activité spécifique de séquence mais ne dépendant pas d'un mécanisme antisens. Cette activité varie selon le

modèle cellulaire utilisé, étant en général plus importante dans les expériences avec les cellules MOLT-3 infectées *de novo* (jusqu'à 100% dans certains cas) que dans les cellules chroniquement infectées (8%). De plus, dans les cellules MOLT-3 infectées *de novo*, mais non dans les cellules chroniquement infectées, elle varie aussi selon l'approche utilisée pour véhiculer les ODNs. L'activité spécifique de séquence mais non-antisens est plus importante avec les ODNs libres qu'avec les ODNs complexés avec les liposomes DLS (jusqu'à 100 % comparativement à 64 % dans le cas de notre expérience à court terme et, jusqu'à 40 % comparativement à 0 % dans le cas de notre expérience à long terme). Cependant, elle ne semble pas être une composante importante de l'activité des ODNs phosphodiester.

De plus, en comparant l'activité antivirale des ODNs phosphorothioates libres avec celle des ODNs phosphorothioates complexés aux liposomes DLS dans notre modèle d'infection *de novo*, nous avons pu évaluer qu'environ 25% de l'activité des ODNs phosphorothioates pouvait être attribuée à des effets extracellulaires ou au niveau de la membrane cytoplasmique. Finalement, nous avons comparé l'activité antivirale des ODNs phosphorothioates et des ODNs phosphodiester associés aux liposomes DLS afin de déterminer l'influence de la modification chimique de l'enchaînement phosphodiester sur l'activité intracellulaire. Nous avons pu déterminer qu'environ 15% de l'activité intracellulaire des ODNs phosphorothioates était due à des effets non-spécifiques liés aux modifications chimiques dans les cellules MOLT-3 infectées *de novo*. La présence de modifications chimiques semble moins affecter l'activité des ODNs dans les cellules primaires infectées *de novo* et dans les cellules chroniquement infectées. Nous ne pouvons pas pour l'instant expliquer ces particularités. Ces derniers résultats démontrent que les effets non-spécifiques des ODNs phosphorothioates sont surtout observés au niveau extracellulaire/membranaire et au niveau de la transcription inverse dans la

cellule. Cependant nous n'avons pas évalué directement l'effet des ODNs sur l'étape de transcription inverse dans le cadre de ces expériences.

Zelphati *et al.*, (1994), ont également étudié le mécanisme d'action des ODNs antisens à l'aide de la séquence anti-*rev* utilisée dans notre étude et à l'aide d'immunoliposomes. Ils ont également démontré la complexité de l'activité de ces molécules en identifiant quatre mécanismes d'action différents. Le premier mécanisme est l'inhibition non-spécifique des processus d'adsorption, de fusion et d'entrée des virus par des ODNs phosphorothioates libres. Le deuxième mécanisme est l'interférence non-spécifique avec la transcription inverse par des ODNs phosphorothioates libres et encapsulés dans les immunoliposomes. Le troisième mécanisme est l'interférence avec la transcription inverse dépendante de la séquence mais indépendante de la ribonucléase H observé avec des ODNs phosphodiesteres encapsulés dans les immunoliposomes. Finalement, le quatrième mécanisme est l'interférence avec l'ARNm viral dépendante de la séquence et de la RNase H par les ODNs phosphorothioates libres ou encapsulés dans les immunoliposomes, c'est-à-dire le mécanisme antisens proprement dit. Dans une infection *de novo* les quatre mécanismes peuvent se produire alors que dans une infection chronique seul le quatrième mécanisme peut agir.

Récemment, l'étude des mécanismes d'action de GEM 91 a confirmé la complexité de l'activité des ODNs antisens (Yamaguchi *et al.*, 1997). Ces auteurs ont observé une inhibition non-spécifique de l'attachement des virus à la surface des cellules par les ODNs phosphorothioates et une inhibition des processus d'entrée et de la transcription inverse (formation de l'ADN viral dans la cellule) dépendante de la séquence des ODNs dans leur modèle d'infection *de novo*. Dans des cellules chroniquement infectées, les auteurs ont observé



une inhibition non-spécifique de la réplication virale par leur ODN phosphorothioate libre en comparant les niveaux de l'antigène p24 dans le surnageant des cultures traitées avec GEM 91 ou avec l'oligo contrôle *mismatched*. Dans ce même modèle d'infection chronique, une inhibition de la transcription de l'ARNm génomique dépendante de la séquence a été observée, cependant, le contenu en ARN viral des virions n'était pas affecté par GEM 91.

Ces deux dernières études semblent contradictoires sur certains points. Par contre il faut mentionner que les essais utilisés variaient beaucoup d'une étude à l'autre, que les séquences contrôles servant à déterminer la spécificité de séquence n'étaient pas les mêmes et que les séquences antisens étudiées différaient également d'où la difficulté de faire des comparaisons valables tel que nous l'avons souligné précédemment dans cette discussion. Dans notre étude nous avons en effet démontré que des variations dans la spécificité de l'activité peuvent dépendre du type de contrôle choisi, de l'essai cellulaire utilisé et de la séquence étudiée.

La complexité de l'activité des ODNs a également été observée avec d'autres séquences et dans des essais *in vitro* différents. Plusieurs séquences antisens dirigées contre une région non-codante présente dans la partie 5' du génome du virus de l'hépatite C (VHC) ont été testées dans deux systèmes d'extraits cellulaires utilisés pour des essais de traduction (lysate de réticulocyte de lapin et extrait de germe de blé) pour leur activité inhibitrice contre le VHC (Vidalin *et al.*, 1996). Il a été démontré que ces séquences antisens agissaient principalement par des effets non-spécifiques (jusqu'à 94% d'effets non-spécifiques). En comparant des  $\alpha$ -ODNs (dans lesquels la configuration



anomérique du sucre a été inversée) avec des  $\beta$ -ODNs, les auteurs ont pu identifier que les ODNs inhibaient la traduction du VHC autant par des mécanismes dépendants de la RNase H que par des mécanismes indépendants de la RNase H. De même, l'analyse de l'activité antivirale d'un oligonucléotide phosphorothioate complémentaire à une séquence du génome du cytomégalo virus humain (CMV) nommé ISIS 2922, a démontré la complexité de l'activité de ces composés (Anderson *et al.*, 1996). Trois mécanismes différents contribueraient à l'activité antivirale de ISIS 2922 : une inhibition antisens de l'expression du gène ciblé, une inhibition dépendante de la séquence mais ne relevant pas d'un mécanisme antisens et une inhibition non-spécifique de l'adsorption du virus sur la cellule-hôte. Beaucoup de travail reste encore à faire pour élucider les mécanismes par lesquels les oligonucléotides exercent leur activité. Un consensus apparaît maintenant dans le domaine de la technologie antisens concernant la complexité de l'activité de ces composés et nous savons maintenant que les effets biologiques des ODNs sont causés par un ensemble de mécanismes.

### **Inhibition de la réplication du VIH par des cocktails d'oligonucléotides**

Suite aux résultats extrêmement prometteurs présentés dans les chapitres précédents (Chapitres 2 et 3), nous avons évalué nos deux molécules DIS et Pac en combinaison avec l'ODN anti-*rev* contre l'isolat clinique VR2844A dans des cultures de PBMCs. Dans cet essai, lorsque les cellules infectées étaient traitées avec les trois ODNs phosphorothioates ajoutés simultanément dans le milieu de culture à une concentration finale de 0.1 et 0.5  $\mu$ M, la réplication virale était bloquée de façon plus efficace que lorsque les cellules étaient traitées avec un seul des trois ODNs à ces mêmes doses. À des

concentrations plus élevées, la différence entre l'activité de notre cocktail d'oligonucléotides (Srev-SDIS-SPac) et chaque ODN séparément est apparue moins évidente.

Puisque notre cocktail d'ODNs semblait apporter certains avantages lorsqu'ajouté à plus faible dose, nous avons utilisé les liposomes DLS pour diminuer les doses requises afin de pouvoir explorer l'hypothèse qu'à faibles doses, l'utilisation d'ODNs en combinaison serait plus avantageuse que l'utilisation d'un seul ODN pour inhiber la réplication virale. Dans les cellules MOLT-3 infectées *de novo* par le VIH, les ODNs antisens phosphorothioates associés aux liposomes DLS et ajoutés en combinaison à une concentration finale de 10 pM, ont inhibé la réplication virale plus efficacement que les ODNs Srev et SPac utilisés seuls (Chapitre 5). De plus, dans un essai de longue durée (28 jours), la réplication virale a été retardée de 7 jours dans les cellules traitées avec le cocktail comparativement aux cellules traitées avec seulement SDIS ou SPac et le niveau de production virale était plus bas avec le cocktail que les niveaux observés avec chaque ODN individuel. Il semblerait donc que dans ce système, l'addition simultanée de différentes séquences antisens empêche la réplication virale de manière plus efficace soit à cause d'un effet additif ou synergistique des mécanismes antisens ou des mécanismes non-spécifiques. Nous avons éliminé la possibilité que ce soit dû à un effet toxique sur les cellules puisque nous avons démontré clairement que le taux de survie des cellules traitées avec les ODNs ajoutés en combinaison était semblable à celui observé dans les cellules traitées avec seulement l'un ou l'autre des trois ODNs.

Afin de mieux comprendre pourquoi notre cocktail est plus efficace dans le système cellulaire mentionné ci-haut, nous avons vérifié l'efficacité de notre cocktail dans des cellules chroniquement infectées. Dans ce modèle d'infection chronique, le niveau d'inhibition de la production virale est le même pour les deux types de traitement (combinaison versus ODNs individuels). Ces résultats nous laissent croire qu'une partie importante de l'effet antiviral observé dans les cellules infectées *de novo* se situerait plutôt au niveau des mécanismes non-antisens i.e inhibition des processus post-entrée et/ou de la transcription inverse dans la cellule plutôt qu'au niveau des événements post-intégration.

En comparant différentes combinaisons d'oligonucléotides dans ce modèle de cellules infectées *de novo*, nous avons pu vérifier l'importance des modifications chimiques et du choix des séquences dans l'activité antivirale du cocktail d'ODNs. Dans cette étude, les cocktails avec au moins une séquence phosphorothioate sont plus efficaces que le cocktail avec trois séquences non-modifiées indiquant que la présence de séquences phosphorothioates dans la combinaison est avantageuse. Donc, une partie de l'activité du cocktail est probablement due aux effets non-spécifiques causés par la nature chimique des ODNs. De plus, en comparant les cocktails Srev-SDIS-SPac et Srev-SDIS-RS nous observons que le premier cocktail est plus efficace démontrant que dans notre système, il est plus avantageux d'utiliser trois séquences antisens plutôt qu'un mélange de séquences antisens et non-antisens. Ces résultats suggèrent que l'efficacité d'un cocktail peut être affectée de façon significative par le choix des séquences le composant. Finalement, dans notre étude, une combinaison de quatre ODNs phosphorothioates (Srev-SDIS-SPac-RS) s'est avérée moins efficace que deux combinaisons composées de trois ODNs phosphorothioates (Srev-SDIS-SPac et Srev-SDIS-RS). Par contre la différence entre les cocktails Srev-SDIS-RS et Srev-SDIS-SPac-RS est moins prononcée que la différence

entre les cocktails Srev-SDIS-SPac et Srev-SDIS-SPac-RS. Ces résultats nous amènent à deux conclusions: 1) une combinaison de trois ODNs semble être plus avantageuse qu'une combinaison de quatre ODNs et, 2) l'ajout de la séquence RS semble amener une réduction de l'efficacité du cocktail Srev-SDIS-SPac-RS. Ainsi, le nombre de séquences et la nature des séquences (nature chimique et séquence oligonucléotidique) sont des facteurs importants à considérer lors du choix d'une combinaison d'oligonucléotides. Les travaux sur les combinaisons d'oligonucléotides sont rares et notre étude aura contribué à améliorer nos connaissances sur la valeur d'une telle approche dans le domaine de la technologie antisens.

---

**CHAPITRE 7**  
**CONCLUSION**

L'attrait de la stratégie antisens tient non seulement à la sélectivité d'action des oligonucléotides mais également à la généralité de ses applications. Tout gène dont la séquence est connue peut être la cible d'un oligonucléotide antisens, si l'on envisage son implication dans un phénomène pathologique. Le développement des oligonucléotides synthétiques pour le contrôle sélectif de l'expression des gènes a ouvert de nouvelles possibilités pour les applications thérapeutiques, en particulier dans le domaine du cancer et du SIDA. Les premières études ont démontré les effets biologiques des ODNs antisens dans des domaines aussi divers que les oncogènes, les gènes viraux, ou les gènes codant pour des facteurs impliqués en immunologie ou en cardiologie. Certains oligonucléotides antisens synthétiques ont même atteint le stade d'essais cliniques dans le traitement de la leucémie et de certaines infections virales.

Cependant, il reste encore de nombreux problèmes à résoudre avant d'assister à une utilisation généralisée de cette approche thérapeutique. Les analogues d'oligonucléotides phosphorothioates, qui représentent la première génération de composés, ont fait l'objet de plusieurs études *in vitro* et *in vivo*. Il est apparu de ces études qu'en dépit de leur spécificité pour les séquences d'acide nucléique, les oligonucléotides phosphorothioates peuvent se fixer également sur d'autres cibles comme des protéines et induire ainsi une réponse biologique inattendue. Ainsi le mécanisme d'action des oligonucléotides antisens s'est avéré plus complexe que prévu et une meilleure compréhension de la nature de l'activité de ces molécules est présentement une priorité dans le domaine de la technologie antisens. Une meilleure distribution *in vivo* des oligonucléotides est un autre problème qui reste à surmonter et le développement de systèmes de transport et de ciblage des oligonucléotides est devenu une nécessité pour l'application thérapeutique de cette nouvelle stratégie. Un autre défi à relever dans le domaine de la technologie antisens est

le développement de nouveaux analogues antisens qui seront plus efficaces, moins toxiques, et stables en milieu physiologique et qui seront capables de traverser aisément les barrières biologiques.

Dans ce projet de recherche nous avons démontré qu'il est possible de surmonter certains de ces problèmes et d'augmenter l'efficacité de la stratégie antisens en utilisant de nouvelles approches. D'abord, nous avons développé deux nouvelles séquences antisens dirigées contre la région du signal d'encapsidation de l'ARN du VIH et étudié leur activité dans différents systèmes cellulaires. À l'aide de ces deux nouvelles séquences nous avons pu mettre en évidence la complexité de l'activité antivirale *in vitro* des oligonucléotides et identifier certains facteurs importants à considérer lors de l'élaboration de protocoles servant à l'étude *in vitro* de l'activité des molécules antisens. Les résultats de nos analyses très détaillées contribueront à une meilleure compréhension des mécanismes d'action des oligonucléotides phosphorothioates ce qui est essentiel et servira de base pour l'élaboration de la nouvelle génération d'analogues de nucléotides. Comme le Dr Agrawal le disait si bien lors d'une discussion sur l'impact thérapeutique de la première génération de drogues (les ODNs phosphorothioates) à la conférence « Antisense 97 » qui a eu lieu en mai à Cambridge dans le Massachussets (Nature Biotechnology, 15 : 519-524) : « *I think we are still learning about the first generation (compounds). We need to understand more about them.* »

De plus, nous avons évalué le potentiel d'un nouveau système de transport lipidique nommé DLS pour transporter *in vitro* des oligonucléotides dans des cellules infectées par le VIH. Le système DLS est un outil très puissant et est sûrement un des systèmes les plus efficaces déjà rapportés dans la littérature. L'association des oligonucléotides au système DLS a permis

de faire face à certains des problèmes rencontrés lors de l'utilisation des oligonucléotides tels que l'instabilité dans les milieux biologiques, le faible taux de pénétration cellulaire et la disponibilité intracellulaire. Nous avons pu réduire les doses requises pour une activité *in vitro* anti-VIH de 100 à 1,5 million de fois selon le modèle cellulaire utilisé. Nos résultats sont encourageants et nous indiquent que le système de transport lipidique DLS pourrait être une solution aux problèmes rencontrés *in vivo* lors de l'utilisation des oligonucléotides. Il pourrait également être très utile pour le transport de vecteurs plasmidiques exprimant un ARN antisens ou un ribozyme dirigé contre un ARN du VIH. Des études pharmacocinétiques ont démontré dernièrement le potentiel thérapeutique du système DLS et dans un avenir prochain, des études seront entreprises pour vérifier l'efficacité du système DLS à véhiculer *in vivo* des oligonucléotides vers leurs sites d'action à des doses thérapeutiques. Dans ces études il serait intéressant de vérifier si la complexation avec les liposomes DLS permet de réduire les effets secondaires associés à l'utilisation des oligonucléotides *in vivo* tout en permettant à la fois de réduire les doses et ainsi les coûts. Plusieurs protocoles appliquant la production *in situ* d'antisens et de ribozymes sont en cours d'essai dans des tentatives de thérapie cellulaire. Des cellules hématopoïétiques exprimant un antisens ou un ribozyme dirigé contre un ARN du VIH pourraient devenir résistantes à une infection par le VIH. Comme avec les oligonucléotides antisens synthétiques, les résultats des premières investigations utilisant des protocoles de thérapie cellulaire devraient donner des informations cruciales pour l'essor de ces nouvelles orientations. Ainsi le système DLS pourrait s'avérer très utile dans ce genre d'étude pour augmenter l'efficacité de la transfection des vecteurs plasmidiques exprimant un ARN antisens ou un ribozyme.



Nos travaux sur les combinaisons d'oligonucléotides nous ont permis de mieux évaluer les avantages d'une telle approche. Nous avons testé une combinaison de trois oligonucléotides phosphorothioates dans différents systèmes cellulaires ce qui nous a permis de déterminer qu'une telle stratégie pourrait présenter certains bénéfices pour le traitement des infections *de novo*. En comparant différentes combinaisons à l'aide du système DLS, nous avons pu analyser l'impact de certains facteurs sur l'activité d'un cocktail d'oligonucléotides. Notre approche est unique et nous croyons que nos résultats serviront de base pour de nouvelles études dans ce domaine. Les travaux sur l'utilisation des oligonucléotides en combinaison sont très peu nombreux et beaucoup reste à faire dans ce nouveau domaine de la thérapie antisens. Prochainement nous aimerions explorer plus à fond cette nouvelle avenue avec de nouvelles combinaisons incluant des oligonucléotides antisens et d'autres drogues comme l'AZT.

En terminant, nos travaux auront servi à faire avancer nos connaissances sur le potentiel thérapeutique des oligonucléotides antisens dans le traitement du SIDA. La technologie antisens est encore jeune et pourtant elle est déjà largement acceptée par la communauté scientifique comme étant une approche thérapeutique prometteuse. En ce qui concerne le SIDA, l'activité antivirale des oligonucléotides a démontré que cette approche offre beaucoup de possibilités contre le VIH et la deuxième génération de drogues devrait être plus efficace.

---

**CHAPITRE 8**  
**BIBLIOGRAPHIE**

Agrawal, S. Mixed-backbone oligonucleotide as second generation antisense agents. Second Annual Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore, MA, USA, abstract no. 174, 1997.

Agrawal, S. and Akhtar, S. Advances in antisense efficacy and delivery. TIBTECH. 13 : 197-199, 1995.

Agrawal, S., Jiang, Z., Zhao, Q., Shaw, D., Cai, Q., Roskey, A., Channavajjala, L., Saxinger, C., and Zhang, R. Mixed-backbone oligonucleotides as second generation antisense oligonucleotides : *In vitro* and *in vivo* studies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 : 2620-2625, 1997.

Agrawal, S. and Tang, J.Y. GEM 91-an antisense oligonucleotide phosphorothioate as a therapeutic agent for AIDS. Antisense Res. Dev. 2 : 261-266, 1992.

Agrawal, S., Tamsamani, J., Galbraith, W., and Tang, J. Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. Clin. Pharmacokinet. 28 : 7-16, 1995a.

Agrawal, S., Zhang, X., Zhao, H., Lu, Z., Yan, J., Cai, H., Diasio, R.B., Habus, I., Jiang, Z., Iyer, R.P., Yu, D., and Zhang, R. Absorption, tissue distribution and *in vivo* stability in rats of a hybrid antisense oligonucleotide following oral administration. Biochem. Pharmacol. 50 : 571-576, 1995b.

AIDS Clinical Trials Group. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. N. Engl. J. Med. 334 : 1011-1017, 1996.

AIDS Treatment Data Network . Treatment Review Double Issue #26 & #27. pp. 19, November 1997, [http ://www.aidsnvc.org/network](http://www.aidsnvc.org/network).

Akhtar, S. and Agrawal, S. *In vivo* studies with antisense oligonucleotides. TIPS 18 : 12-18, 1997.

Akhtar, S., Kole, R., and Juliano, R.L. Stability of antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera. Life Sci. 49 : 1793, 1991.

Akhtar, S. and Rossi, J.J. Anti-HIV therapy with antisense oligonucleotides and ribozymes : realistic approaches or expensive myths ? J. Antimicrob. Chemother. 38 : 159-165, 1996.

Aldovini, A. and Young, R.A. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. J. Virol. 64 : 1920-1926, 1990.

Allen, T.M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C., and Yau-Young, A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. Biochim. Biophys. Acta. 1066 : 29-36, 1991.

Anazodo, M. I., Wainberg, M.A., Friesen, A.D., and Wright, J.A. Sequence-specific inhibition of gene expression by a novel antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate directed against a nonregulatory region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. J. Virol. 69 :1794-1801, 1995a.

Anazodo, M.I., Salomon, H., Friesen, A.D., Wainberg, M.A., and Wright, J.A. Antiviral activity and protection of cells against human immunodeficiency virus type-1 using an antisense oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate complementary to the 5'-LTR region of the viral genome. *Gene* 166 : 227-232, 1995b.

Anderson, K.P., Fox, M.C., Brown-Driver, V., Martin, M.J., and Azad, R.F. Inhibition of human cytomegalovirus immediate-early gene expression by an antisense oligonucleotide complementary to immediate-early RNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 : 2004-2011, 1996.

Askari, F.K. and McDonnell, W.M. Antisense-oligonucleotide therapy. *The New England Journal of Medicine* 334 : 316-318, 1996.

Bachellerie, J.-P., Michot, B., Nicoloso, M., Balakin, A., Ni, J., and Fournier, M.J. Antisense snoRNAs : a family of nucleolar RNAs with long complementarities to rRNA. *TIBS* 20 : 261-264, 1995.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, T., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezin-Brun, F., Rouzioux, C., Rosenbaum, W., and Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 220 : 868-871, 1983.

Beltinger, C., Saragovi, H.U., Smith, R.M., LeSauter, L., Shah, N., DeDionisio, L., Christensen, L., Raible, A., Jarett, L., and Gewirtz, A.M. Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphoro-thioate-modified oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest.* 95 : 1814-1823, 1995.

Bennett, C.F., Chiang, M.-Y., Chan, H., and Grimm, S. Use of cationic lipids to enhance the biological activity of antisense oligonucleotides. *Journal of Liposome Research*. 3 : 85-102, 1993.

Bennett, C.F., Chiang, M.Y., Wilson-Lingardo, L., and Wyatt, J. Sequence specific inhibition of human type II phospholipase A2 enzyme activity by phosphorothioate oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 22 : 3202-3209, 1994.

Bennett, M.R. and Schwartz, S.M. Antisense therapy for angioplasty restenosis. *Circulation*. 92 : 1981-1993, 1995.

Bennett, R.M., Gabor, G.T., and Merritt, M.M. DNA binding to human leucocytes. *J. Clin. Invest.* 76 : 2182-2190, 1985.

Berger, E.A. Chemokine receptors and HIV : Doors for entry and windows on transmission and pathogenesis. Second Annual Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore, Maryland, USA, abstract 35, 1997.

BHIVA Guidelines Co-ordinating Committee. British HIV Association guidelines for antiretroviral treatment of HIV seropositive individuals. *The Lancet* 349 : 1086-1092, 1997.

Blumenfeld, M. and Vasseur, M. Oligonucléotides « sens » : ligands rationnels des facteurs de transcription. *médecine/sciences*. 10 : 274-281, 1994.

Bonn, D. Prospects for antisense therapy are looking brighter. *The Lancet*. 347 : 820, 1996.

Bordier, B., Hélène, C., Barr, P.J., Litvak, S., and Sarih-Cottin, L. *In vitro* effect of antisense oligonucleotides on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* 20 : 5999-6006, 1992.

Brady, G., Frey, J., Danbara, H., and Timmis, K.N. Replication control mutations of plasmid R6-5 and their effects on interactions of the RNA-I control element with its target. *J. Bacteriol.* 154 : 429-436, 1983.

Branda, R.F., Moore, A.L., Lafayette, A.R., Mathews, L., Hong, R., Zon, G., Brown, T., and McCormack, J.J. Amplification of antibody production by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J. Lab. Clin. Med.* 128 : 329-338, 1996.

Cann, A.J. *Principles of molecular virology.* Academic Press, London, 1993.

Caplen, N.J., Alton, E.F.W.W., Middleton, P.G., Dorin, I.R., Stevenson, B.J., Gao, X., Durham, S.R., Jeffery, P.K., Hodson, M.E., Coutelle, C., Huang, L., Porteous, D.J., Williamson, R., Geddes, D.M. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nature Medecine.* 1 : 39-46. 1995

Chatterjee, S., Johnson, P.R., and Wong, K.K. Jr. Dual-target inhibition of HIV-1 in vitro by means of an adeno-associated virus antisens vector. *Science.* 258 : 1485-1488, 1992.

Chiasson, B.J., Hong, M., Hooper, M.L., Armstrong, J.N., Murphy, P.R., and Robertson, H.A. Antisense therapeutics in the central nervous system : The induction of *c-fos*. p. 225-245 *In Antisense Therapeutics* (Agrawal, S., Ed), Humana Press, New Jersey, 1996.

Cirullo, R.E., Whitaker, K.B., and Holmes, E.W. Use of antisense RNA to study post-transcriptional regulatory processes. p. 175-182 *In Gene Regulation : Biology of Antisense RNA and DNA.* ( Erickson, R.P. and Izant, J.G., eds), Raven Press, Ltd., New York, 1992.

Clavel, F. and Orenstein, J.M. A mutant of human immunodeficiency virus with reduced RNA packaging and abnormal particle morphology. *J. Virol.* 64 : 5230-5234, 1990.

Clever, J., Sasseti, C., and Parslow, T. G. RNA secondary structure and binding sites for *gag* gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 69 : 2101-2109, 1995.

Coffin, J. Retroviridae and their replication *In : Fundamental Virology*, (Eds. : Fields, B.N., Knipe, D.M. et al.), Raven Press, Ltd., New York, pp. 645-708, 1991.

Cohen, E.A., Terwilliger, E.F., Jalinoos, Y., Prouix, J., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J. AIDS* 1 : 11-18, 1990.

Cohen, J.S. and Hogan, M.E. The new genetic medicines. *Scientific American.* December : 76-82, 1994.

Cohli, H., Fan, B., Joshi, R.L., Ramezani, A., Li, X., and Joshi, S. Inhibition of HIV-1 multiplication in a human CD4<sup>+</sup> lymphocytic cell line expressing antisense and sense RNA molecules containing HIV-1 packaging signal and Rev Response Element(s). *Antisense Res. Dev.* 4 : 19-26, 1994.



Cowsert, L.M., Fox, M.C. Zon, G., and Mirabelli, C.K. In vitro evaluation of phosphorothioate oligonucleotides targeted to the E2 mRNA of papillomavirus : potential treatment for genital warts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37 :171-177, 1993.

Crooke, S.T. Therapeutic applications of oligonucleotides. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 : 329-376, 1992.

Crooke, S. Advances in understanding the pharmacological properties of antisense oligonucleotides. *Advances in Pharmacology* 40 : 1-49, 1997.

Cullen, B.R. Regulation of HIV gene expression. *AIDS* 9 : S19-S32, 1995.

Daugherty, B.L., Hotta, K., Kumar, C., Ahn, Y.H., Zhu, J., and Pestka, S. Antisense RNA : effect of ribosome binding sites, target location, size, and concentration on the translation of specific mRNA molecules. *Gene Analysis Techniques* 6 : 1-16, 1989.

De Clercq, E. Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections. *Clinical Microbiology Reviews* 8 : 200-239, 1995.

De Maesmaker, A., Altmann, K.-H., Waldner, A., and Wendeborn, S. Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems. *Current Opinion in Structural Biology.* 5 : 343-355, 1995.

Deng, H, Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R., and Landau, N.R. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381 : 661-666, 1996.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.S., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, H. Lipofetion : a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84 : 7413-7417, 1987.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. HIV-1 entry cofactor : Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272 : 872-876, 1996.

Galbraith, W.M., Hobson, W.C., Giclas, P.C., Schechter, P.J., and Agrawal, S. Complement activation and hemodynamic changes following intravenous administration of phosphorothioate oligonucleotides in the monkey. *Antisense Res. Dev.* 4 : 201-206, 1994.

Gallo, R.C. and Montagnier, L. AIDS in 1988. *Scientific American*. 259: 41-48, 1988.

Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, R.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., and Markham, P.D. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 224 : 500-502, 1984.

Gewirtz, A.M. Treatment of chronic myelogenous leukemia (CML) with *c-myb* antisense oligodeoxynucleotides. *Bone Marrow Transplant*. 14 (suppl 3) : S57-61, 1994.

Glover, J.M., Leeds, J.M., Mant, T.G.K. Amin, D., Kisner, D.L., Zuckerman, J.E., Geary, R.S., Levin, A.A., and Shanahan, W.R.Jr. Phase I safety and pharmacokinetic profile of an ICAM-1 antisense oligonucleotide (ISIS 2302). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282 : 1173-1180, 1997.

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men : evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *New Engl. J. Med.* 305 : 1425-1431, 1981.

Gura, T. Antisense has growing pains. *Science.* 270 : 575-577, 1995.

Guvakova, M.A., Yakubov, L.A., Vlodavsky, I., Tonkinson, J.L., and Stein, C.A. *J. Biol. Chem.* 270 : 2670-2627, 1995.

Hahn, B.H. Viral genes and their products. p. 21-44, *In* : Textbook of AIDS medicine (Eds. : Broder, S., Merigan Jr., T.C., and Bolognesi, D.) Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1994.

Harrison, G. P. and Lever, A. M. L. The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J. Virol.* 66 : 4144-4153, 1992.

Hastie, N.D. and Held, W.A. Analysis of mRNA populations by cDNA.mRNA hybrid-mediated inhibition of cell-free protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 : 1217-1221, 1978.

He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D.O., and Landau, N.R. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G<sub>2</sub> phase of the cell cycle by inhibiting p34<sup>cdc2</sup> activity. *J. Virol.* 69 : 6705-6711, 1995.

Hélène, C. Rational design of sequence-specific oncogene inhibitors based on antisense and antigene oligonucleotides. *Eur. J. Cancer.* 27 : 1466-1471, 1991.

Hélène, C. Le contrôle spécifique de l'expression des gènes par les oligonucléotides : de la chimie à la clinique. *Ann. Pharmaceutiques françaises* 55 : 95-103, 1997.

Hélène, C. and Saison-Behmoaras, E. La stratégie antisens : nouvelles approches thérapeutiques. *Médecine/sciences* 10: 253-273, 1994.

Hélène, C. and Toulmé, J.-J. Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochem. Biophys. Acta* 1049 : 99-125, 1990.

Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitc, M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 373 : 123-126, 1995.

Jairath, S., Brown Vargas, P., Hamlin, H.A., Field, A.K., and Kilkuskie, R.E. Inhibition of respiratory syncytial virus replication by antisense oligodeoxyribonucleotides. *Antivir Res.* 33 : 201-213, 1997.

Johnson, V.A. Combination therapy for HIV-1 infection-overview : preclinical and clinical analysis of antiretroviral combinations. *Antivir. Res.* 29 : 35-39, 1996.

Kestler, H.W., Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, D., and Desrosiers, R.C. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65 : 651-662, 1991.

Kim, H.-J., Lee, K., and O'Rear, J.J. A short sequence upstream of the 5' Major splice site is important for encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *Virology*. 198 : 336-340, 1994.

Kinchington, D., Galpin, S., Jaroszewski, J.W., Ghosh, K., Subasinghe, C., and Cohen, J.S. A comparison of gag, pol and rev antisense oligodeoxynucleotides as inhibitors of HIV-1. *Antivir. Res.* 17 : 53-62, 1992.

Korba, B.E. and Gerin, J.L. Antisense oligonucleotides are effective inhibitors of hepatitis B virus replication *in vitro*. *Antivir. Res.* 28 : 225-242, 1995.

Kumar, C.C. and Novick, R.P. Plasmid pT181 replication is regulated by two countertranscripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 638-642, 1985.

Lacatena, R.M. and Cesareni, G. Base pairing of RNA I with its complementary sequence in the primer precursor inhibits ColE1 replication. *Nature* 294 : 623-626, 1981.

Lavigne, C., Rabinovitch, P., Mahan, L., Reitz, M., and Thierry, A.R. High efficiency lipid-based delivery of oligonucleotides : *in vitro* inhibition of HIV-1 (IIIB) replication at subnanomolar concentration. en préparation.

Le Doan, T., Étoré, F., Ma, D.D.F., et Tenu, J.-P. Perspectives d'une chimiothérapie plus sélective avec les oligonucléotides antisens. *Ann. Med. Interne.* 147 : 542-552, 1996.

Leiter, J.M.E., Agrawal, S., Palese, P., and Zamecnik, P.C. Inhibition of influenza virus replication by phosphorothioate oligodeoxy-nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87 : 3430-3434, 1990.

Lerner, M.R., Boyle, J.A., Mount, S.M., Wolin, S.L., and Steitz, J.A. Are snRNPs involved in splicing ? *Nature* 283 : 220-224, 1980.

Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W., and Sodroski, J. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.* 63 : 4085-4087, 1989.

Lewin, B. *Genes V*. Oxford University Press, Oxford, 1272 pp., 1994.

Li, Y., Hui, H., Burgess, C.J., Price, R.W., Sharp, P.M., Hahn, B.H., and Shaw, G.M. Complete nucleotide sequence, genome organization, and biological properties of human immunodeficiency virus type 1 in vivo : Evidence for limited defectiveness and complementation. *J. Virol.* 66 : 6587-6600, 1992.

Li, G., Lisziewicz, J., Sun, D., Zon, G., Daefler, S., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., and Klotman, M.E. Inhibition of Rev activity and human immunodeficiency virus type 1 replication by antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate analogs directed against the rev-responsive element. *J. Virol.* 67 : 6882-6888, 1993.

Lisziewicz, J., Sun, D., Klotman, M., Agrawal, S., Zamecnik, P., and Gallo, R.C. Specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by antisense oligonucleotides : An *in vitro* model for treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89 : 11209-11213, 1992.

Maher III, L.J., Wold, B., and Dervan, P.B. Inhibition of DNA binding proteins by oligonucleotide-directed triple helix formation. *Science* 245 : 725-730, 1989.

Majumdar, C., Stein, C.A., Cohen, J.S., Broder, S., and Wilson, S. HIV reverse transcriptase stepwise mechanism : Phosphorothioate oligodeoxynucleotide as primer. *Biochemistry*. 28 : 1340-1346, 1989.

Maltese, J., Sharma, H., Vassilev, L., and Narayanan, R. Sequence context of antisense RelA/NF- $\kappa$ B phosphorothioates determines specificity. *Nucleic Acids Res*. 23 : 1146-1151, 1995.

Matsukura, M., Zon, G., Shinozuka, K., Robert-Guroff, M., Shimada, T., Stein, C.A., Mitsuya, H., Wong-Staal, F., Cohen, J.S., and Broder, S. Regulation of viral expression of human immunodeficiency virus in vitro by an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide against rev (art/trs) in chronically infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86 : 4244-4248 , 1989.

McBride, M. S. and Panganiban A.T. The human immunodeficiency virus type 1 encapsidation site is a multipartite RNA element composed of functional hairpin structures. *J. Virol*. 70 : 2963-2973, 1996.

McLachlan, G., Davidson, D.J., Stevenson, B.J., Dickinson, P., Davidson-Smith, H., Dorin, J.R., and Porteous, D.J. Evaluation in vitro and in vivo of cationic liposome-expression construct complexes for cystic fibrosis gene therapy. *Gene Therapy*. 2 : 614-622, 1995.

McManaway, M.E., Neckers, L.M., Loke, S.L., al-Nasser, A.A., Redner, R.L., Shiramizu, B.T., Goldschmidts, W.L., Huber, B.E., Bhatia, K., and Magrath, I.T. Tumor-specific inhibition of lymphoma growth by an antisense oligodeoxynucleotide. *Lancet*. 335 : 808-811, 1990.

Milligan, J., Matteucci, M., and Martin, J. Current concepts in antisense drug design. *J. Med. Chem.* 36 : 1923-1937, 1993.

Nabel, G.L., Nabel, E.G., Yang, Z., Fox, B.A., Plautz, G.E., Gao, X., Huang, L., Shu, S., Gordon, D., and Chang, A.E. Direct gene transfer with DNA liposome complexes in melanoma : Expression, biological activity, lack of toxicity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 11307-11311, 1993.

Nakai, M. and Goto, T. Ultrastructure and morphogenesis of human immunodeficiency virus. *J. Electron. Microsc.* 45 : 247-257, 1996.

Nordstrom, K. Control of plasmid replication—how do DNA iterons set the replication frequency ? *Cell* 63 : 1121-1124, 1990.

Öhagen, A., Luftig, R.B., Reicin, A.S., Yin, L., Ikuta, K., Kimura, T., Goff, S.P., and Höglund, S. The morphology of the immature HIV-1 virion. *Virology.* 228 : 112-114, 1997.

Ojwang, J.O., Hampel, A., Looney, D.J., Wong-Staal, F. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 expression by a hairpin ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 10802-10806, 1992.

Pagano, J.S. Jimenez, G., Sung, N.S., Raab-Traub, N., and Lin, J.C. Epstein-Barr viral latency and cell immortalization as targets for antisense oligomers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660 : 107-116, 1992.

Pantaleo, G., Graziosi, C., and Fauci, A.S. The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection. *Semin. Immun.* 5 : 157-163, 1993.



Paterson, B.M., Roberts, B.E., and Kuff, E.L. Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 4370-4374, 1977.

Poddevin, B., Meguenni, S., Elias, I., Vasseur, M., and Blumenfeld, M. Improved anti-herpes simplex virus type 1 activity of a phosphodiester antisense oligonucleotide containing a 3'-terminal hairpin-like structure. *Antisense Res Dev.* 4 : 147-154, 1994.

Poulin, L., Fauchon, M., Darveau, A., and Levy, J.A. Inhibition of protein synthesis by the human immunodeficiency virus type 1 *nef* gene product. *J Gen Virol.* 75 : 2977-2984, 1994.

Putnam, D.A. Antisense strategies and therapeutic applications. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 53 : 151-160, 1996.

Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starcich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway, S.R., Pearson, M.L., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Ghayeb, J., Chang, N.T., Gallo, R.C., and Wong-Staal, F. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 313 : 277-284, 1985.

Rojanasakul, Y. Antisense oligonucleotide therapeutics : drug delivery and targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 18 : 115-131, 1996.

Rosen, C.A. and Pavlakis, G.N. Tat and Rev : positive regulators of HIV gene expression. *AIDS* 4 : 499-509, 1990.

Roush, W. Antisense aims for a renaissance. *Science.* 276 : 1192-1193, 1997.

Schooley, R.T., Ramirez-Ronda, C., Lange, J.M.A., Cooper, D.A., Lavelle, J., Lefkowitz, L., Moore, M., Larder, B.A., St. Clair, M., Mulder, J.W., McKinnis, R., Pennington, K.N., Harrigan, P.R., Kinghorn, I., Steel, H., Rooney, J.F., and the Wellcome Resistance Study Collaborative Group. Virologic and immunologic benefits of initial combination therapy with zidovudine and zalcitabine or didanosine compared with zidovudine monotherapy. *J. Inf. Dis.* 173 : 1354-1366, 1996.

Sczakiel, G. and Pawlita, M. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells stably expressing antisense RNA. *J. Virol.* 65 : 468-472, 1991.

Sczakiel, G., Oppenlander, M., Rittner, K., and Pawlita, M. Tat- and rev-directed antisense RNA expression inhibits and abolishes replication of human immunodeficiency virus type 1 : A temporal analysis. *J. Virol.* 66 : 5576-5581, 1992.

Shine, J. and Delgarno, V. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA : complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 : 1342-1346, 1974.

Simons, R.W., Hoopes, B.C., McClure, W.R., and Kleckner, N. Three promoters near the termini of IS10 : pIN, pOUT, and pIII. *Cell* 34 : 673-682, 1983.

Singer, M.F., Jones, O.W., and Nirenberg, M.W. The effect of secondary structure on the template activity of polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49 : 392-399, 1963.

Skripkin, E., Paillart, J.-C., Marquet, R., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 4945-4949, 1994.

Skripkin, E., Paillart, J.-C., Marquet, R., Blumenfeld, M., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. Mechanisms of inhibition of *in vitro* dimerization of HIV type 1 RNA by sense and antisense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* 271 : 28812-28817, 1996.

Srinivasan, S.K. and Iversen, P. Review of *in vivo* pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate oligonucleotides. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 9 : 129-137, 1995.

Staszewski, S., Hill, A.M., Bartlett, J., Eron, J.J., Katlama, C., Johnson, J., Sawyer, W., and McDade, H. Reductions in HIV-1 disease progression for zidovudine/lamivudine relative to control treatments : a meta-analysis of controlled trials. *AIDS* 11 : 477-483, 1997.

Stein, C.A. Does antisense exist ? *Nature Medecine.* 1 : 1119-1121, 1995.

Stein, C.A. Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides : question of specificity. *Trends Biotechnol.* 14 : 147-149, 1996.

Stein, C.A. and Cheng, Y.-C. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents - Is the bullet really magical ? *Science* 261 : 1004-1012, 1993.

Stein, C.A. and Krieg, A.M. Problems in interpretation of data derived from *in vitro* and *in vivo* use of antisense oligodeoxynucleotides. *Antisense Res. Dev.* 4 : 67-69, 1994.

Strebel, K., Daugherty, D., Clouse, K., Cohen, D., Folks, T., and Martin, M.A. The HIV 'A' (*sor*) gene product is essential for virus infectivity. *Science* 328 : 728-730, 1987.

Subbramanian, R.A. and Cohen, E.A. Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J.Virol.* 68 : 6831-6835, 1994.

Sun, L.Q., Wang, L., Gerlach, W.L., and Symonds, G. Target sequence-specific inhibition of HIV-1 replication by ribozymes directed to *tat* RNA. *Nucleic Acids Res.* 23 : 2909-2913, 1995a.

Sun, L.Q., Pyati, J., Smythe, J., Wang, L., Macpherson, J., Gerlach, W., and Symonds, G. Resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection conferred by transduction of human peripheral blood lymphocytes with ribozyme, antisense, or polymeric trans-activation response element constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 7272-7276, 1995b.

Taira, K. and Nishikawa, S. Construction of several kinds of ribozymes. p. 35-54 *In Gene Regulation : Biology of Antisense RNA and DNA.* ( Erickson, R.P. and Izant, J.G., eds), Raven Press, Ltd., New York, 1992.

Thierry, A.R. and Dritschilo, A. Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity. *Nucleic Acids Res.* 20 : 5691-5698, 1992.

Thierry, A.R., Lunardi-Iskandar, Y., Bryant, J.L., Rabinovich, P., Gallo, R.C., and Mahan, L.C. Systemic gene therapy: Biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 9742-9746, 1995.

Thierry, A.R., Rabinovich, P., Peng, B., Mahan, L.C., Bryant, J.L., and Gallo, R.C. Characterization of liposome-mediated gene delivery : expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA. *Gene Ther.* 4 : 226-237, 1997.

Thierry, A. R., and Takle, G.B. Liposomes as a delivery system for antisense and ribozyme compounds *in* *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics* (Akhtar, S., Ed.), pp. 199-221, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1995.

Toulmé, J.-J. Les antisens : science et patience. *Médecine/sciences* 10: 250-252, 1994.

Uhlmann, E. and Peyman, A. Antisense oligonucleotides : A new therapeutic principle. *Chemical Reviews.* 90 : 543-584, 1990.

Vickers, T., Baker, B.F., Cook, P.D., Zounes, M., Buckheit Jr, R.W., Germany, J., and Ecker, D.J. Inhibition of HIV-LTR gene expression by oligonucleotides targeted to the TAR element. *Nucleic Acids Res.* 19 : 3359-3368, 1991.

Vidalin, O., Major, M.E., Rayner, B., Imbach, J.-L., Trépo, C., and Inchauspé, G. In vitro inhibition of Hepatitis C Virus gene expression by chemically modified antisense oligodeoxynucleotides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 : 2337-2344, 1996.

Wagner, R.W. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature.* 372 : 333-335, 1994.

Watson, J.D. and Crick, F.H.C. Molecular structure of nucleic acids : a structure for deoxyribonucleic acids. *Nature (London).* 171 : 737-738, 1953.

Weintraub, H. Les ADN et les ARN antisens. *Pour la Science*. 149 : 54-61, 1991.

Wrobel, I. and Collins, D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytose. *Biochem. Biophys. Acta*. 1235 : 296-304, 1995.

Yakubov, L.A., Deeva, E.A., Zarytova, C.F., Ivanova, E., Ryte, M., Yurchenko, L.V., and Vlassov, V.V. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells : involvement of specific receptors ? *Proc Natl Acad Sci USA*. 86 : 6454-6458, 1989.

Yakubov, L.A., Khaled, Z., Zhang, L.-M., Truneh, A., Vlassov, V., and Stein, C.A. Mode of interaction of oligodeoxynucleotides with recombinant sCD4. *J. Biol. Chem*. 268 : 18818-18823, 1993.

Yamada, O., Yu, M., Yee, J.-K., Kraus, G., Looney, D., Wong-Staal, F. Intracellular immunization of human T cells with a hairpin ribozyme against human immunodeficiency virus type 1. *Gene Ther*. 1 : 38-45, 1994.

Yamaguchi, K., Papp, B., Zhang, D., Ali, A.N., Agrawal, S., and Byrn, R.A. The multiple inhibitory mechanisms of GEM 91<sup>®</sup>, a *gag* antisense phosphorothioate oligonucleotide, for human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 13 : 545-554, 1997.

Yao, X.-J., Subbramanian, R.A., Rougeau, N., Boisvert, F., Bergeron, D., and Cohen, E.A. : Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr : Role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J. Virol*. 69 : 7032-7044, 1995.

Yu, M., Poeschla, E., Yamada, O., Degrandis, P., Leavitt, M.C., Heusch, M., Yees, J.-K., Wong-Staal, F., and Hampel, A. *In vitro* and *in vivo* characterization of a second functional hairpin ribozyme against HIV-1. *Virology* 206 : 381-386, 1995.

Zamecnik, P.C., Goodchild, Y., Taguchi, Y., and Sarin, P.S. Inhibition of replication and expression of human T-cell lymphotropic virus type III in cultured cells by exogenous synthetic oligonucleotides complementary to viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83 : 4143-4146, 1986.

Zamecnik, P.C. and Stephenson, M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxy-nucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75 : 280-284, 1978.

Zelphati, O., Imbach, J.-L., Signoret, N., Zon, G., Rayner, B., and Leserman, L. Antisense oligonucleotides in solution or encapsulated in immunoliposomes inhibit replication of HIV-1 by several different mechanisms. *Nucleic Acids Res*. 22 : 4307-4314, 1994.

Zelphati, O. and Szoka, Jr., F.C. Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharmaceutical Research*. 13 : 1367-1372, 1996.

Zerial, A., Thuong, N.T., Hélène, C. Selective inhibition of the cytopathic effect of type A influenza viruses by oligodeoxynucleotides covalently linked to an intercalated agent. *Nucleic Acids Res*. 15 : 9909-9919, 1987.

Zhang, R., Yan, J., Shahinian, H., Amin, G., Lu, Z., Liu, T., Saag, M.S., Jiang, Z., Temsamani, J., Martin, R.R., Schechter, P.J., Agrawal, S., and Dasiao, R.B. Pharmacokinetics of an anti-human immunodeficiency virus antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate (GEM 91) in HIV-infected subjects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 58 : 44-53, 1995.