

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

Faculté de pharmacie
Université de Montréal
Grade octroyé le:

7-08-2008

**Mise au point de micelles polyioniques pour
l'administration de biomacromolécules thérapeutiques :
synthèse de polymères et études physicochimiques**

par

Marie-Hélène Dufresne

Faculté de Pharmacie

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

Juin, 2008

© Marie-Hélène Dufresne, 2008

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Cette thèse intitulée :

**Mise au point de micelles polyioniques pour l'administration de biomacromolécules
thérapeutiques : synthèse de polymères et études physicochimiques**

présentée par :

Marie-Hélène Dufresne

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Robert E. Prud'homme, président-rapporteur

Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche

Audrey H. Moores, membre du jury

Gerrit Borchard, examinateur externe

À déterminer, représentant du doyen de la FES

Résumé

À ce jour, plusieurs biomacromolécules d'intérêt thérapeutique, dont certains acides désoxyribonucléiques, acides ribonucléiques, peptides et glycopolymères, ont été identifiées. Malheureusement, en raison de leur haute masse molaire et de leur nature polyionique, ces molécules traversent difficilement les membranes cellulaires et leur internalisation dans le tissu cible est faible. Il est possible de contrer ces difficultés en incorporant ces biomacromolécules dans un vecteur. Les micelles polyioniques sont des systèmes auto-assemblés particulièrement adaptés à la vectorisation de polyions. Ces structures résultent d'interactions électrostatiques entre un polyion (le principe actif) et un copolymère de charge opposée possédant un segment hydrophile nonionique. Le polyion se retrouve séquestré et protégé dans le cœur du vecteur alors que les segments hydrophiles forment une couronne assurant la solubilité du système. Le couplage de molécules de reconnaissance à la surface des micelles permet finalement d'accroître leur accumulation et leur internalisation au site d'action. L'objectif de cette recherche était de mettre au point des telles micelles polyioniques pour l'administration de biomacromolécules polyioniques thérapeutiques, notamment l'héparine et un oligodésoxyribonucléotide antisens (ODN).

Dans un premier temps, des copolymères de type poly(éthylène glycol) (PEG)-*bloc*-poly(méthacrylate d'(alkylamino)éthyle) ont été synthétisés par polymérisation radicalaire par transfert d'atomes à partir d'un macroamorceur de PEG. Une banque de polymères variant quant à la nature des groupements cationiques (amines primaires, tertiaires, quaternaires et leur mélange), à la longueur de la chaîne de PEG (2000, 3000 ou 5000 g/mol) et au nombre d'unités cationiques (10 à 40 unités monomères) a ainsi été préparée. Ces polymères ont servi, dans un deuxième temps, à établir des relations structure-activité entre la composition du polymère et les propriétés de leurs micelles. Les travaux réalisés dans cette thèse montrent que la nature du groupement amine, l'hydrophobie des composantes cationiques et anioniques, et la longueur de la chaîne de PEG ou du segment cationique sont autant de facteurs qui affectent l'interaction entre le polymère cationique et le polyion et dictent les caractéristiques des micelles. Finalement, une méthode de synthèse

permettant d'obtenir des polymères modifiés par une molécule de reconnaissance en bout de chaîne a été proposée. Cette méthode a permis d'attacher de petites (biotine) comme de grosses (transferrine) molécules de reconnaissance aux polymères. Des micelles capables de reconnaissance moléculaire ont été obtenues en incluant tout simplement le conjugué polymère-ligand lors de la formation des micelles.

Dans l'ensemble, les travaux présentés dans cette thèse nous rapprochent de notre objectif général en permettant, d'une part, l'identification des polymères qui forment les micelles aux propriétés les plus intéressantes et en procurant, d'autre part, une approche efficace pour préparer des micelles ciblées.

Mots-clés : Vectorisation, ciblage, micelles polyioniques, biomacromolécules, héparine, oligonucléotide antisens, polymères cationiques, polymérisation radicalaire par transfert d'atomes.

Abstract

To date, a plethora of biomacromolecules with therapeutic activity, including deoxyribonucleic acids, ribonucleic acids, peptides and glycopolymers, has been identified. The widespread clinical use of those molecules, however, has been limited by their high molecular weight and polyionic nature, which restrict their entry into cells. Polyion complex micelles (PICMs) have been proposed as a delivery vector to alleviate these issues. PICMs result from cooperative electrostatic interactions between a polyion (the therapeutic biomacromolecule) and a cationic copolymer possessing a water-soluble nonionic segment. Upon complexation, the polyion is sequestered and protected in the core of the vector while the hydrophilic segments form a hydrophilic corona conferring solubility and colloidal stability to the system. A ligand can be further attached at the surface of the micelles to promote their accumulation and internalization at the target site. In view of such attractive properties, the present work was aimed at optimizing PICMs for the delivery of two therapeutic biomacromolecules, namely heparin and an antisense oligodeoxyribonucleotide (ODN).

Atom transfer radical polymerization was used to synthesize copolymers of the type poly(ethylene glycol) (PEG)-*block*-poly((alkylamino)ethyl methacrylate) from a PEG macroinitiator. A library of copolymers varying in the order of the amino group (primary, tertiary, quaternary and mixtures thereof), in the PEG chain length (2000, 3000 or 5000 g/mol) and in the cationic block length (10-40 monomeric units) was thereby prepared. The polymers were used to establish structure-activity relationships between polymer composition and properties of the resulting micelles. Our results show that the order of the amino group, the hydrophobicity of the cationic and ionic components, and the PEG and cationic chain lengths all contribute to determining the properties of the micelles. A synthetic route was also proposed to prepare polymers presenting a targeting molecule at the distal end of the PEG chain. The strategy revealed to be efficient for conjugating small (biotin) as well as large (transferrin) targeting moieties. Micelles capable of molecular

recognition were directly obtained by incorporating the polymer-ligand conjugate into the micellar composition.

Taken as a whole, the results presented here take us a few steps closer to the general objective by identifying, on the one hand, the polymers that lead to micelles with interesting properties and by providing, on the other hand, a versatile synthetic route to the preparation of targeted micelles.

Keywords: Drug delivery, targeting, polyion complex micelles, biomacromolecules, heparin, antisense oligonucleotide, cationic copolymers, atom transfer radical polymerization.

Table des matières

CHAPITRE 1 - Avant-propos.....	1
CHAPITRE 2 - Introduction.....	4
1 La thérapie génique.....	4
1.1 Barrières à la thérapie génique.....	7
1.2 Surmonter les barrières à la thérapie génique.....	10
1.2.1 Optimisation de la séquence du matériel génétique.....	10
1.2.2 Modifications chimiques du matériel génétique.....	12
1.2.2.1 Modifications des acides nucléiques.....	12
1.2.2.2 Conjugués d'acides nucléiques.....	16
1.2.3 Approches mécaniques et électriques.....	21
1.2.4 Vectorisation.....	23
1.2.4.1 Vecteurs viraux.....	24
1.2.4.2 Vecteurs non viraux.....	27
2 Complexes polyioniques.....	29
2.1 Complexation - Forces impliquées.....	29
2.2 Polyions utilisés pour la thérapie génique.....	35
2.3 Synthèse des polymères cationiques utilisés pour la thérapie génique.....	40
2.4 Préparation des complexes polyioniques.....	42
2.5 Stabilité des complexes polyioniques.....	46
2.5.1 Stabilité colloïdale.....	46
2.5.2 Stabilité face à la dissociation.....	47
2.6 Influence des propriétés physicochimiques des complexes polyioniques sur leur efficacité de transfection.....	50
2.6.1 Essais d'efficacité <i>in vitro</i>	50
2.6.1.1 Voies d'internalisation.....	50
2.6.1.2 Libération du matériel génétique dans la cellule.....	53

		vi
	2.6.1.3 Balance efficacité et toxicité	57
	2.6.2 Essais d'efficacité <i>in vivo</i>	58
3	Micelles polymères	59
	3.1 Abstract	60
	3.2 Introduction	61
	3.3 Dynamics of micellization	63
	3.3.1 Micelle stability	65
	3.3.2 Towards increased micelle stability	68
	3.4 Polymers in Drug Delivery	71
	3.5 Drug Incorporation	74
	3.5.1 Drug loading procedures	74
	3.5.2 Achieving high drug loading	76
	3.6 Drug Release	78
	3.7 Pharmaceutical Applications	80
	3.7.1 Non-targeted micelles	80
	3.7.2 Targeted micelles	81
	3.8 Conclusion	85
	3.9 Acknowledgements	86
4	Bibliographie	86

CHAPITRE 3 - Study of the Micellization Behavior of Different Order Amino Block Copolymers with Heparin		
	1 Abstract	111
	2 Introduction	112
	3 Materials and Methods	115
	3.1 Materials	115
	3.2 Instrumentation	116
	3.2.1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Analyses	116
	3.2.2 Molecular Weight Determination	116

3.2.3	Dynamic Light Scattering (DLS) and Multi-Angle Static Light Scattering (MASLS) Measurements	116
3.2.4	Atomic Force Microscopy (AFM) Imaging.....	117
3.3	Synthesis of poly(ethylene glycol) ATRP macroinitiator (α -(2-bromoisobutyrylate)- ω -methylPEG).....	118
3.4	Synthesis of 2-(<i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino)ethyl methacrylate (AEMABoc)	118
3.5	ATRP polymerization	119
3.5.1	PEG- <i>b</i> -P(AEMABoc)	119
3.5.2	PEG- <i>b</i> -P(DMAEMA)	120
3.5.3	PEG- <i>b</i> -P(DEAEMA)	120
3.6	Deprotection of PEG- <i>b</i> -P(AEMABoc) to its hydrochloride salt derivative PEG- <i>b</i> -P(AEMA).....	120
3.7	Transformation of PEG- <i>b</i> -P(DMAEMA) and PEG- <i>b</i> -P(DEAEMA) into PEG- <i>b</i> -poly[2-(<i>N,N,N</i> -trimethylamino)ethyl methacrylate] (PEG- <i>b</i> -P(TMAEMA)) and PEG- <i>b</i> -poly[2-(<i>N,N,N</i> -diethylmethylamino)ethyl methacrylate] (PEG- <i>b</i> -P(DEMAEMA)), respectively.	120
3.7.1	PEG- <i>b</i> -P(TMAEMA).....	121
3.7.2	PEG- <i>b</i> -P(DEMAEMA).....	121
3.8	Potentiometric titrations	121
3.9	Effect of heparin/polymer molar charge ratio on micelle formation	122
3.10	Effect of pH on micelle formation	122
3.11	Effect of salt concentration on micelle stability.....	123
3.12	Effect of freeze-drying on PICM integrity.....	123
4	Results and Discussion.....	123
4.1	Polymer synthesis	123
4.2	Characterization of diblock copolymers	125
4.2.1	Potentiometric titrations	127
4.3	Characterization of PICM	129
4.3.1	Effect of heparin/polymer molar charge ratio on micelle formation	129

	viii
4.3.2	Effect of pH on micelle formation 132
4.3.3	Effect of ionic strength on micelle stability 134
4.3.4	Effect of freeze-drying on PICM integrity..... 136
5	Conclusion 137
6	Acknowledgements 137
7	References 138

CHAPITRE 4 - Characterization of polyion complex micelles designed to address the challenges of oligonucleotide delivery..... 142

1	Abstract 143
2	Introduction 144
3	Materials and Methods 146
3.1	Materials..... 146
3.2	Techniques 147
3.3	Synthesis of atom transfer radical polymerization (ATRP) macroinitiators.. 148
3.4	Synthesis of cationic block copolymers..... 148
3.5	Potentiometric titrations 149
3.6	Incorporation of ODN (gel electrophoresis) 149
3.7	Micelle formation as ascertained by dynamic light scattering (DLS)..... 150
3.7.1	Effect of N/P ratio 150
3.7.2	Effect of ionization degree 150
3.8	Stability of micelles by a displacement assay 150
3.9	Protection against DNase I degradation..... 151
4	Results and Discussion..... 151
4.1	Polymer synthesis 151
4.2	Effect of N/P ratio on micelle formation..... 156
4.2.1	Incorporation of ODN 156
4.2.2	Colloidal Properties..... 158
4.3	Effect of polymer composition and length on micelle formation 160

4.4	Effect of polymer composition and length on the stability of micelles towards dissociation.....	163
4.5	Effect of polymer composition and length on protection of the ODN against DNase I degradation.....	166
5	Conclusion	168
6	Acknowledgments.....	169
7	References.....	169

CHAPITRE 5 - Thiol-Functionalized Polymeric Micelles : From Molecular Recognition to Improved Mucoadhesion.....			175
1	Abstract		176
2	Introduction.....		177
3	Experimental Procedures		179
3.1	Materials.....		179
3.2	Techniques		180
3.3	Synthesis of asymmetric <i>t</i> Bu-S-PEG-OH.....		181
3.4	Synthesis of block ionomers		181
3.5	Synthesis of thiol-terminated block ionomer		182
3.6	Synthesis of biotin-terminated block ionomers.....		183
3.7	Preparation of PICM		183
3.8	Molecular recognition experiments.....		184
3.9	Mucoadhesion experiments.....		184
3.10	Aggregation of thiolated micelles		185
4	Results and Discussion.....		185
4.1	Polymer synthesis		185
4.2	Molecular recognition		188
4.3	Mucoadhesion		190
4.4	Aggregation of thiolated micelles		191
5	Conclusion		194
6	Acknowledgment		194

7	References	x 194
CHAPITRE 6 - Discussion		198
1	Synthèse des copolymères blocs	198
2	Propriétés tampon	201
3	Effet du ratio de charges sur les propriétés colloïdales des micelles	202
4	Effet de la composition des polyions sur les propriétés colloïdales des micelles..	204
5	Effet de la composition du polymère sur la stabilité des micelles face à la dissociation.....	205
6	Transferrine en tant que ligand	207
7	Préparation de micelles ciblées et essais de liaison cellulaire.....	208
8	Conclusions et perspectives	213
9	Bibliographie.....	216
ANNEXE 1 - Ciblage des micelles à la transferrine.....		I
1	Procédure Expérimentale	I
1.1	Produits	I
1.2	Caractérisation des polymères	II
1.3	Synthèse de α - <i>tert</i> -butanethio- ω -hydroxyl poly(éthylène glycol) (<i>t</i> Bu-S-PEG-OH)	II
1.4	Synthèse du macroinitiateur pour la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (PRTA).....	III
1.5	Synthèse du copolymère thiolé	III
1.6	Synthèse de transferrine-maléimide	IV
1.7	Synthèse du conjugué Tf-PEG- <i>b</i> -PAEMA	IV
1.8	Préparation des micelles (ciblées ou non).....	V
1.9	Capture cellulaire des micelles.....	V

Liste des tableaux

Tableau 2-I. Principales caractéristiques des vecteurs viraux communément utilisés en thérapie génique.	26
Table 2-II: Selection of polymers most often used for the preparation of micelles in drug delivery.....	73
Table 3-I: Characteristics of the diblock copolymers and their heparin-based PICM.....	125
Table 4-I. Characteristics of the copolymers of the AEMA series.	153
Table 4-II. Characteristics of the copolymers of the DMAEMA series.	154
Table 4-III. Characteristics of the AEMA/DMAEMA copolymers.....	155
Tableau 6-I. Tableau récapitulatif de la composition des polymères préparés aux chapitres 3 et 4. Les nombres représentent le degré de polymérisation.	199

Liste des figures

Figure 2-1. Représentation schématique des mécanismes d'action de différents agents de la thérapie génique.	6
Figure 2-2. Représentation schématique des obstacles rencontrés par du matériel génétique administré par la voie <i>i.v.</i> lors de son parcours vers une cible nucléaire.	8
Figure 2-3. Dérivés d'acides nucléiques.	14
Figure 2-4. Représentation schématique de la formation de liaisons électrostatiques entre un brin d'ADN et un polymère cationique par coopérativité.	30
Figure 2-5. Effet du ratio de charges sur diverses propriétés des polyplexes.	32
Figure 2-6. Structure de polymères cationiques communément utilisés en thérapie génique.	36
Figure 2-7. Structure de lipides cationiques communément utilisés en thérapie génique. ...	39
Figure 2-8. Self-assembly of polymeric micelles and polyion complex micelles in an aqueous milieu.	62
Figure 2-9. Titration of a solution of poly((2-acrylamido)-2-methylpropanesulfonic acid)(AMPS)- <i>graft</i> -dodecyl ₂₀	66
Figure 2-10. Stability of micelles against sodium dodecyl sulfate.	69
Figure 2-11. Sketch of dendrimer and star-shaped copolymer-based UPM.	71
Figure 2-12. Most often used drug-loading procedures.	75
Figure 2-13. Swelling of pre-micelles with increases in the TBA fraction.	76
Figure 2-14. Proposed release mechanisms of hydrophobic drugs following ionization of pH-sensitive UPM and PM.	83
Figure 3-1. Structure of the amino diblock copolymers studied.	114
Figure 3-2. ¹ H NMR spectra of diblock copolymer PEG- <i>b</i> -P(AEMABoc) in CDCl ₃ and of its deprotected equivalent PEG- <i>b</i> -P(AEMA) in D ₂ O.	126
Figure 3-3. pH and apparent pK _a of PEG- <i>b</i> -P(AEMA), PEG- <i>b</i> -P(DMAEMA) and PEG- <i>b</i> -P(DEAEMA) copolymers as a function of α	128

Figure 3-4. Effect of heparin/polymer molar charge ratio on the scattering intensity and polydispersity index of micelles prepared in an acetate buffer pH 4.	130
Figure 3-5. AFM image of PEG- <i>b</i> -P(AEMA)/heparin PICM.	131
Figure 3-6. Effect of pH on scattering intensity and particle diameter of PEG- <i>b</i> -P(AEMA), PEG- <i>b</i> -P(DMAEMA), and PEG- <i>b</i> -P(DEAEMA) based PICM.	133
Figure 3-7. Effect of ionic strength on scattering intensity and particle diameter of PEG- <i>b</i> -P(AEMA), PEG- <i>b</i> -P(DMAEMA), PEG- <i>b</i> -P(TMAEMA), PEG- <i>b</i> -P(DEAEMA) and PEG- <i>b</i> -P(DEMAEMA) based PICM.	135
Figure 4-1. Structure of the copolymers studied.	152
Figure 4-2. Gel electrophoresis of PICMs prepared at N/P ratios varying from 0.5 to 3 using PEG ₄₅ - <i>b</i> -PAEMA ₂₃ , PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₀ , PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -PAEMA ₂₁ and PEG ₆₈ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₀	157
Figure 4-3. Colloidal properties of PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₆ micelles prepared at N/P ratios varying from 0.5 to 3.	159
Figure 4-4. Average diameter (z-average) of PICMs prepared at the N/P ratio of 1.5 and typical size distributions of micelles of PEG ₆₈ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₅ and PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₆	161
Figure 4-5. Destabilization of micelles in presence of the competitive polyanion heparin.	165
Figure 4-6. The ability of the PICMs to protect the ODN against DNase I degradation.	167
Figure 5-1. Preparation and uses of thiolated PICM.	179
Figure 5-2. Effect of the potassium naphthalene/ <i>tert</i> -butyl mercaptan molar ratio on the chain end functionalization and monomer conversion.	187
Figure 5-3. ¹ H NMR spectra of <i>t</i> Bu-S-PEG-OH in CDCl ₃ and <i>t</i> Bu-S-PEG- <i>b</i> -PDMAEMA in D ₂ O.	187
Figure 5-4. Affinity experiment showing the ability of biotinylated PICM to molecularly recognize streptavidin.	189

Figure 5-5. Retention of non-thiolated PICM and thiolated PICM on an immobilized mucin matrix as a function of the number of washings..	191
Figure 5-6. (A) Representation of the size distribution of thiolated micelles prior to oxidation and variations in the hydrodynamic diameters of non-thiolated PICM and thiolated PICM as a function of time as determined by DLS..	193
Figure 6-1. Effet du ratio de charges molaire sur les propriétés des micelles de PEG ₄₅ - <i>b</i> -PAEMA ₁₆ et d'héparine et de PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₆ et d'ODN.	203
Figure 6-2. Capture des micelles (ciblées ou non) par les cellules A549.	212

Liste des schémas

Schéma 2-1. Mécanisme de la PRTA catalysée par un complexe de cuivre.	41
Scheme 5-1. Synthetic route to the preparation of thiol-terminated and biotin-terminated block ionomers.....	186
Schéma 6-1. Voie de synthèse utilisée pour la préparation de polymères conjugués à la transferrine.	209

Abbreviations

$^1\text{H NMR}$	proton nuclear magnetic resonance
$^1\text{H RMN}$	resonance magnétique nucléaire du proton
α	ionization degree
β	buffering capacity
ADN	acide désoxyribonucléique
AEMA	méthacrylate d'aminoéthyle ; « <i>aminoethyl methacrylate</i> »
AEMABoc	méthacrylate de 2-(<i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino)éthyle ; « 2-(<i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino)ethyl methacrylate »
AFM	atomic force microscopy
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATRP	atom transfer radical polymerization
BCA	acide bicinchonique
CAC	critical association concentration
CES	chromatographie d'exclusion stérique
CMC	critical micelle concentration
DCM	dichloromethane
DEAE	diéthyleaminoéthyle
DEAEMA	méthacrylate de 2-(diéthylamino)éthyle ; « 2-(<i>N,N</i> -diethylamino)ethyl methacrylate »
DEMAEMA	méthacrylate de 2-(diéthylmethylamino)éthyle ; « 2-(<i>N,N,N</i> -diethylmethylamino)ethyl methacrylate »
DLS	dynamic light scattering
DMAEMA	méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle ; « 2-(<i>N,N</i> -dimethylamino)ethyl methacrylate »
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMRIE	bromure de 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyéthylammonium
DODAB	bromure de dioctadécyl-diméthylammonium

DOTAP	1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium propane
DOGS	dioctadécylamidoglycylspermine
DOPE	dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOSPA	dioléoyl-oxypropyldiméthylammonium amidospermine
DOTMA	<i>N</i> -[1-(2, 3-dioléyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -triméthylammonium
DTT	dithio-1,4-thréitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EO	ethylene oxide
EtBr	ethidium bromide
GPC	gel permeation chromatography
HABA	4-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid
HPMA	méthacrylamide d'hydroxypropyle
ITC	isotherm titration calorimetry
i.v.	intraveineuse
LD ₅₀	lethal dose
LDL	lipoprotéines de faible densité
MASLS	multi-angle static light scattering
MES	acide 4-morpholine-éthanesulfonique
M _n	masse molaire moyenne en nombre ; « <i>number-average molecular weight</i> »
M _m	masse molaire moyenne en masse
M _w	weight-average molecular weight
MW	molecular weight
ODN	oligodésoxyribonucléotide, « <i>oligodeoxyribonucleotide</i> »
PAMA	poly(acide méthacrylique)
PAMAM	polyamidoamide
pARNis	petits ARN interférants
PAsp	poly(acide aspartique)
pb	paires de bases
PEG	poly(éthylène glycol) ; « <i>poly(ethylene glycol)</i> »
PEGMA	poly(ethylene glycol)methyl ester methacrylate

PEI	poly(éthylèneimine) ; « <i>polyethylenimine</i> »
PI	polydispersity index
PICM	polyion complex micelles
PLys	poly(lysine)
PM	polymeric micelle
PMDETA	<i>N,N,N',N',N''</i> -pentamethyldiethylenetriamine
PRTA	polymérisation radicalaire par transfert d'atome
PS	phosphorothioate
PVPE	poly(bromure de <i>N</i> -éthyl-4-vinylpyridinium)
RISC	complexe ribonucléoprotéique (« <i>RNA-induced silencing complex</i> »)
RNaseH	ribonucléase H
RSS	recombinases spécifiques de site
siRNA	small interfering RNA
SD	standard deviation
Sulfo-SMCC	sulfosuccinimidyl-4(<i>N</i> -maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate
TBA	<i>tert</i> -butanol
Tf	transferrine
TFA	acide trifluoroacétique ; « <i>trifluoroacetic acid</i> »
THF	tétrahydrofuranne ; « <i>tetrahydrofuran</i> »
TMAEMA	méthacrylate de 2-(triéthylamino)éthyle ; « <i>2-(N,N,N-trimethylamino)ethyl methacrylate</i> »
TPS	tampon phosphate salin
UPM	unimolecular polymeric micelle

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier Jean-Christophe, sans qui cette aventure n'aurait pu être possible. Merci d'avoir donné une chance à la jeune fille anxieuse et timide qui s'est présentée à ton bureau il y a maintenant 7 ans de cela; j'ai choisi ton labo, je dois l'avouer, par hasard et je salue encore ma bonne étoile. Tout au long de ses années, je me suis nourrie de ta curiosité, de ton dynamisme, de ta rigueur et de ton savoir. Sache que tu es un scientifique d'exception et que ce fut pour moi un honneur de travailler sous ta supervision. Au-delà de tes qualités de scientifique, j'ai aussi beaucoup apprécié tes qualités humaines et ta perspicacité; tu as su t'imposer comme figure d'autorité pour me pousser dans mes travaux tout en te montrant compréhensif et en me supportant dans les moments où j'étais sur le point de craquer. Pour tout ça et plus encore, Ô « *Respected JC* », merci.

Je tiens aussi à remercier les membres du jury pour avoir évalué cette thèse de manière aussi consciencieuse et apporté des commentaires des plus constructifs. Ma thèse est très certainement de meilleure qualité grâce à vous. De même, merci à MC, Peter, Gen, maman et Marc d'avoir si aimablement mis la main à la pâte, que ce soit au niveau du contenu que du contenant; vos efforts sont appréciés. Finalement, je ne peux passer sous silence la contribution des co-auteurs de mes articles qui ont participé, par leur apport intellectuel ou manuel, au mérite des publications. À vous aussi, merci.

Le Ph.D. fut non seulement pour moi l'occasion de poursuivre une formation académique afin de me réaliser en tant que scientifique mais aussi l'occasion de faire des rencontres marquantes, inestimables. Je pense d'abord à Marc, mon mari maintenant, que j'ai rencontré dans un cours de caractérisation des polymères durant ma première année... Je n'aurais pu rêver d'un partenaire qui comprenne mieux les stress du pré-doc, des séminaires, de la rédaction (articles, thèse); personne d'autre, dans ces moments, n'aurait aussi bien toléré une loque qui ne participe à aucune tâche ménagère! Aussi, je n'aurais pu rêver d'un partenaire que me stimule autant – à qui le premier article? à qui la bourse de doctorat? qui finira le premier? J'apprécie notre complicité professionnelle comme notre complicité personnelle. Mais, par-dessus tout, je chéris la confiance que tu as en moi; par

ton regard, j'en viens à croire que je suis bonne et intelligente. Merci de faire de moi une personne meilleure.

Je pense aussi à MC, mon mentor à mes débuts, avec qui j'ai tout de suite développé une amitié et une complicité profondes. Sais-tu que tu es une des rares personnes avec qui je peux passer des moments de silence ou, au contraire, déblatérer des stupidités sans mourir d'angoisse? Sais-tu aussi combien ta capacité d'intégrer des connaissances m'impressionne? Tu demeures à mes yeux une source inépuisable de réponses et j'adhère à l'expression « Pourquoi chercher dans un livre quand on peut demander à MC?!? ». Merci pour tout.

Je pense finalement à mes très chers collègues de bureau, MC (encore!), MA (qui complète le trio des « Marie »), Peter et Gen. J'ai passé des moments privilégiés avec vous, que ce soit à travailler, discuter science, se plaindre, potiner ou tout simplement partager un même espace. Vous avez tous été pour moi tellement disponibles (autant pour des questions scientifiques que personnelles), chaleureux, attentionnés et discrets quand il le fallait... des collègues de rêve quoi. Vous me manquez.

Le Ph.D. est une période exigeante et le fait de partager des moments agréables avec les amis et collègues de labo, que l'on côtoie au quotidien, est un atout précieux. Ainsi, à certains moments, les 5@7 du vendredi deviennent un motivateur pour se donner à fond durant la semaine, la partie de « 8 extrême » du midi une échappatoire pour oublier les échecs de la matinée et les amitiés une raison de se rendre au labo de bon cœur le matin. À vous tous de la faculté de pharmacie et de la « secte Leroux » (passée et présente) qui auront rempli mes journées de petits bonheurs, merci.

Finalement, j'aimerais transmettre toute ma gratitude à mes parents et beaux-pères qui m'ont inculqué le désir d'aller toujours plus loin, au bout de mes capacités. Merci aussi d'avoir été, tout au long de ces années, un compas qui m'a permis de remettre à jour mon sens des valeurs dans mes moments de stress ou de découragement démesurés. Et, bien au-delà de tout ça, merci d'être fiers; c'est la plus grande satisfaction qui soit.

En espérant oublier personne... Merci!

CHAPITRE 1 - Avant-propos

À ce jour de nombreuses études ont mis en évidence le potentiel de biomacromolécules telles les acides désoxyribonucléiques, les acides ribonucléiques, les peptides ou les glycopolymères comme agents thérapeutiques. Malheureusement, l'administration de telles molécules par les voies orale ou intraveineuse demeure difficile en raison des propriétés physicochimiques de ces agents (masse molaire élevée, haute densité de charges, etc.). Il est en théorie possible de pallier ces difficultés en ayant recours à la vectorisation. La vectorisation consiste à associer un principe actif à un système de transport (dit vecteur) de manière à soumettre sa biodistribution aux propriétés physicochimiques du vecteur. Dans le cas des polyions, la vectorisation permet, entre autres, de masquer les charges afin de promouvoir l'internalisation cellulaire ou l'absorption du principe actif ou, encore, de protéger un principe actif labile contre une dégradation prématurée.

Les micelles polyioniques sont des vecteurs particulièrement adaptés à la vectorisation de molécules polyioniques. Ces systèmes résultent d'interactions électrostatiques entre un polyion (le principe actif) et un copolymère polyionique de charge opposée possédant un segment hydrophile nonionique. Les structures formées présentent une architecture cœur-couronne où le polymère hydrophile nonionique assure la solubilisation et la protection du cœur qui, lui, se compose des chaînes ioniques neutralisées. De par leur neutralité, robustesse, solubilité et stabilité colloïdale en solution, les micelles polyioniques sont particulièrement adaptées à l'administration de biomacromolécules polyioniques *in vivo*. De plus, il est possible d'en adapter les propriétés afin de répondre à des besoins particuliers de la voie d'administration choisie. Par exemple, il est possible de greffer une molécule de reconnaissance à la surface des micelles afin d'accroître leur présence au site d'action.

Dans cette optique, l'objectif principal de cette thèse était de mettre au point des micelles polyioniques pour l'administration de biomacromolécules thérapeutiques. Plus particulièrement, nous nous sommes penchés sur la formulation de l'héparine, un glycosaminoglycane aux propriétés anticoagulantes, et d'un oligodésoxyribonucléotide

antisens (ODN), un agent de thérapie génique. Pour ce faire, nous avons établi les objectifs spécifiques suivants :

1. Synthétiser et caractériser une banque de copolymères cationiques afin d'établir des relations structure-activité entre la composition des polymères et les propriétés physicochimiques des micelles polyioniques ;
2. Étudier les propriétés physicochimiques des micelles polyioniques obtenues avec l'héparine. Ces résultats sont non seulement intéressants dans l'optique de formuler l'héparine mais servent aussi de tremplin à la mise au point de micelles polyioniques à base d'ODN ;
3. Étudier les propriétés physicochimiques des micelles polyioniques obtenues avec l'ODN ;
4. Établir un protocole et synthétiser des micelles polyioniques ciblées ;
5. Évaluer l'efficacité de ces micelles à cibler une population cellulaire *in vitro*.

Les travaux réalisés dans cette thèse ont fait l'objet de trois publications, toutes publiées. Afin de bien situer ces contributions, un chapitre d'introduction sera d'abord présenté. Dans un premier temps, nous déterminerons les enjeux de la thérapie génique et évaluerons les principaux vecteurs étudiés à ce jour pour l'administration de matériel génétique. Cette section établit aussi les bases de la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes, une méthode de polymérisation utilisée dans la préparation des polymères de cette thèse. Dans un deuxième temps, nous étudierons la grande famille des micelles polymères et leur utilisation dans la formulation de biomacromolécules polyioniques, comme de principes actifs hydrophobes de faible masse molaire. Cette section décrit, de plus, le concept du ciblage (actif et passif).

Les manuscrits issus des travaux de cette thèse seront ensuite présentés. Le premier manuscrit (chapitre 3) consiste en une analyse des propriétés physicochimiques de micelles obtenues à partir de copolymères diblocs de type poly(éthylène glycol)-*bloc-*

poly(méthacrylate d'(alkylamino)éthyle) dont la nature du groupement amine (primaire, tertiaire et quaternaire) variait. Les micelles décrites dans ce manuscrit ont été obtenues en utilisant l'héparine comme biomacromolécule anionique. Le deuxième manuscrit (chapitre 4) est complémentaire au premier et décrit les effets de la longueur du segment de poly(éthylène glycol) ou du segment cationique sur les propriétés physicochimiques des micelles. Pour cette étude plus systématique, une banque de 33 copolymères a été préparée et les micelles ont été obtenues avec un ODN de type phosphorothioate (PS). Dans le troisième manuscrit (chapitre 5), une voie de synthèse a été élaborée afin de préparer des polymères modifiés en bout de chaîne par une molécule de reconnaissance modèle (*i.e.* la biotine). Ces polymères, lorsqu'incorporés dans la composition de micelles d'ODN PS, génèrent des vecteurs capables de reconnaissance moléculaire. Finalement, la voie de synthèse décrite dans le troisième manuscrit a été adaptée afin de coupler aux polymères une molécule de reconnaissance d'intérêt clinique, la transferrine. Les micelles obtenues à partir de ce polymère ont été testées *in vitro* pour leur capacité à cibler une population cellulaire d'intérêt. Le détail expérimental de ces travaux sera présenté à l'annexe 1 alors que les résultats seront discutés au chapitre 6. Le chapitre 6 comprend aussi une discussion de l'ensemble des résultats et se clôt par des conclusions générales.

CHAPITRE 2 - Introduction

1 La thérapie génique

La thérapie génique est une stratégie thérapeutique consistant à introduire de l'information génétique exogène à l'intérieur de cellules afin de traiter une maladie. Elle vise, par exemple, à remplacer ou suppléer un allèle mutant défectif par un allèle fonctionnel ou encore à moduler (promouvoir ou inhiber) l'expression d'une protéine dont l'activité aurait un impact thérapeutique. Si, à l'origine, la thérapie génique a été développée dans le but de traiter des anomalies génétiques héréditaires, il est maintenant clair qu'elle peut être appliquée au traitement de nombreux désordres physiologiques dont certains cancers, les infections virales, la douleur, les maladies cardiovasculaires et les atteintes traumatiques du système nerveux.

Les agents étudiés en thérapie génique peuvent être divisés en deux catégories selon qu'ils agissent directement sur le gène ou qu'ils ciblent plutôt l'acide ribonucléique messager (ARNm), inhibant alors la synthèse des protéines. Les acides désoxyribonucléiques (ADN) plasmidiques assurant la suppléance d'un gène déficient (récessif) font partie de la première catégorie puisqu'ils peuvent être intégrés au sein du génome par recombinaison homologue. Ce mécanisme moléculaire permet l'échange d'information entre une séquence chromosomique endogène, soit la cible à modifier, et une séquence exogène portant une région homologue (Figure 2-1) (Biet 2003). Bien que l'intégration au chromosome ne soit pas nécessaire à l'expression transitoire d'un gène, elle est désirable car elle assurerait une efficacité thérapeutique permanente puisque le bagage génétique acquis serait automatiquement transmis aux cellules filles lors de la division. De même, certains oligodésoxyribonucléotides (ODNs) peuvent se complexer à l'ADN au niveau de séquences particulières du génome (caractérisées par la présence de bases purines sur un brin et de bases pyrimidines sur l'autre) pour former des hélices triples. Ces ODNs, lorsque couplés par une chaîne flexible à un court fragment d'ADN capable d'introduire des mutations délétères ou de réparer des mutations existantes, servent à diriger l'ADN thérapeutique près de sa cible sur le génome (Figure 2-1) (Biet 2003; Kren 2002). La formation de l'hélice triple permet non seulement de limiter l'interaction à des sites

spécifiques du génome, mais aussi de stimuler localement la réaction de recombinaison (Biet 2003; Kren 2002).

D'autre part, l'expression d'une protéine peut être atténuée à l'aide d'ODNs antisens agissant sur l'ARNm. Ces derniers se lient par appariement de bases complémentaires et peuvent inhiber la synthèse de la protéine cible en recrutant la ribonucléase H (RNaseH), une enzyme qui hydrolyse le segment d'ARN de l'hétéroduplexe ODN/ARN (Figure 2-1) (Hughes 2001; Kurreck 2003). En contrepartie, les ODNs antisens peuvent inhiber l'action du ribosome, et ainsi la traduction d'une protéine, directement par encombrement stérique (Hughes 2001; Kurreck 2003). La séquence des ODNs est alors choisie de façon à ce qu'ils se lient à l'ARNm en position 5' (Kurreck 2003). Un résultat similaire peut être obtenu à l'aide de petits ARN interférants (« *small interfering RNAs* » pARNis) qui agissent, eux aussi, sur l'ARNm. Non sans rappeler les mécanismes d'action des ODNs antisens, les pARNis peuvent induire un blocage de l'élongation de la protéine durant la traduction ou encore promouvoir une activité de nucléase (Figure 2-1) (Dautry 2004). Dans le cytosol, les petits pARNis sont incorporés sous forme de simple brin dans un complexe ribonucléoprotéique dénommé RISC (« *RNA-induced silencing complex* »), où ils servent de guide à l'activité enzymatique du complexe par appariement des bases complémentaires (Akhtar 2007; Zamore 2001). Récemment de nouveaux agents interférents endogènes, les microARNs, ont été identifiés (Cowland 2007). Ces courtes molécules (~22 nucléotides) se lient à l'ARNm en position 3' et inhibent la synthèse de protéines principalement par encombrement ou en activant la dégradation partielle de l'ARNm (Cowland 2007). Plusieurs mécanismes cellulaires dont la prolifération, la différenciation ou l'apoptose sont régulés par les microARNs, indiquant leur potentiel comme agents thérapeutiques contre le cancer (Cowland 2007). Finalement, les ribozymes agissent eux aussi sur l'ARNm. Ces molécules d'ARN ont une activité enzymatique intrinsèque et inhibent la traduction de protéines en catalysant l'hydrolyse de l'ARNm préférentiellement aux séquences AUC et GUC. La structure tridimensionnelle des ribozymes est cruciale à leur activité enzymatique (Scott 1996).

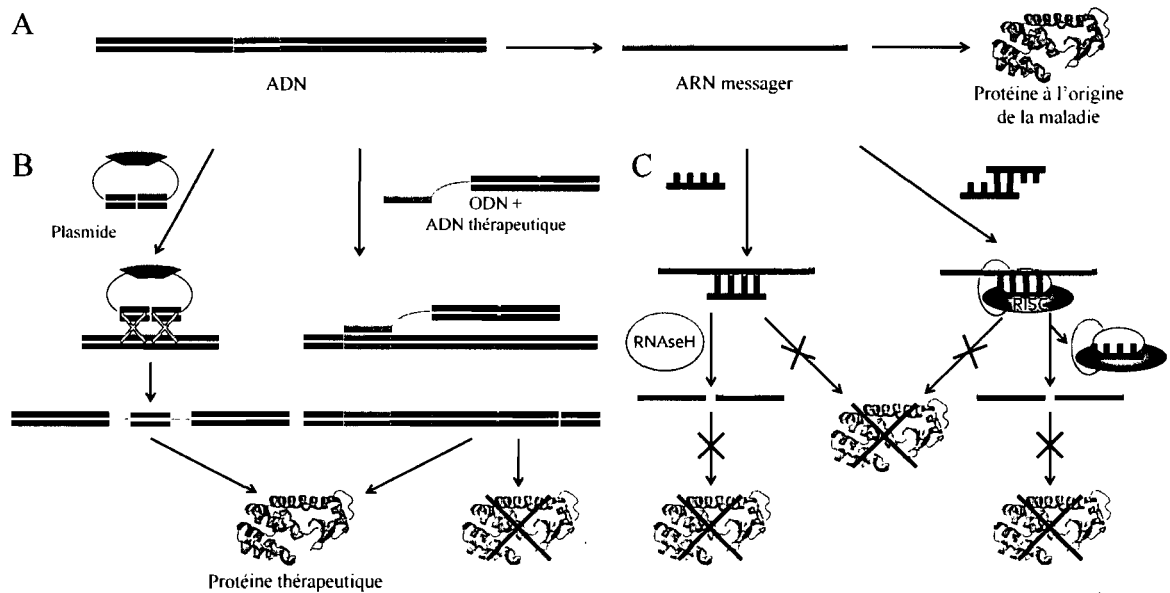


Figure 2-1. Représentation schématique des mécanismes d'action de différents agents de la thérapie génique. La synthèse des protéines (A) se déroule normalement en deux étapes. En premier lieu, l'ADN est copié par l'ARN polymérase sous forme d'ARNm (transcription). Cet ARNm est ensuite traduit en protéine par le ribosome (traduction). La thérapie génique peut altérer ce processus au niveau de l'ADN (B) ou de l'ARNm (C). Par exemple, un plasmide assurant la suppléance d'un gène déficient peut être inséré au sein du génome par recombinaison homologue (B - gauche). Le segment vert représente le gène de remplacement alors que les sections en **bleu foncé** représentent les zones d'homologie responsables de l'insertion du gène à un endroit ciblé. Alternativement, un ADN thérapeutique (**bleu clair**) portant une mutation à introduire (vert) peut être lié par une chaîne flexible à un ODN (**orange**) capable de former une hélice triple avec l'ADN (B - droite). La séquence d'ODN permet non seulement de cibler l'action du conjugué mais active les mécanismes responsables de la réparation de l'ADN. Les séquences introduites peuvent restaurer la synthèse d'une protéine thérapeutique ou compromettre la synthèse d'une protéine indésirable. Les ODNs et les pARNis, quant à eux, se lient à l'ARNm par appariement Watson-Crick (C). Les ODNs peuvent inhiber la synthèse de protéines en formant un hétéroduplexe avec l'ARNm qui est reconnu et clivé par la RNaseH (C - gauche). D'autre part, les ODNs peuvent inhiber la traduction de l'ARNm par le ribosome par encombrement stérique (C - centre). Les pARNis, quant à eux, sont incorporés sous forme de simple brin dans le complexe RISC ayant une activité de nucléase (C - droite). Après avoir clivé l'ARNm, le complexe RISC est recyclé. À l'instar des ODNs, les pARNis peuvent de plus inhiber la synthèse d'une protéine par encombrement stérique (C - centre).

1.1 Barrières à la thérapie génique

Bien qu'à ce jour plusieurs gènes ou protéines aient été identifiés comme cibles thérapeutiques potentielles, l'administration efficace de matériel génétique demeure un enjeu important de la thérapie génique. En prenant comme exemple l'administration intraveineuse (*i.v.*), il est incontestable que plusieurs barrières physiologiques devront être surmontées pour assurer la faisabilité de la thérapie génique Figure 2-2.

Dans un premier temps, le matériel génétique injecté par la voie *i.v.* se voit exposé aux diverses composantes du système sanguin incluant les nucléases, des enzymes qui, en rompant les liaisons chimiques le long de la chaîne principale, décomposent les acides nucléiques en leurs nucléotides constituants. Les acides nucléiques typiquement utilisés en thérapie génique sont instables dans de telles conditions et présentent donc des temps de demi-vie courts, de l'ordre de quelques minutes seulement (Wickstrom 1986; Kawabata 1995). Dans un deuxième temps, pour être efficace, le matériel génétique doit atteindre son site d'action. Cependant, lorsqu'administré par la voie *i.v.*, le matériel génétique est rapidement éliminé de la circulation et s'accumule préférentiellement dans le foie et les reins (Kawabata 1995; Rifai 1996). Les chaînes de haute masse molaire seraient majoritairement captées et éliminées par le système des phagocytes mononucléés, plus précisément par les cellules de Kupffer, alors que les chaînes de faible masse molaire (ODNs, produits de dégradation d'ADN plasmidique, etc.) transiteraient par les reins (Kawabata 1995; Zauner 1998). Cette distribution dans le foie et les reins peut poser problème lorsque ces tissus ne constituent pas la cible du traitement.

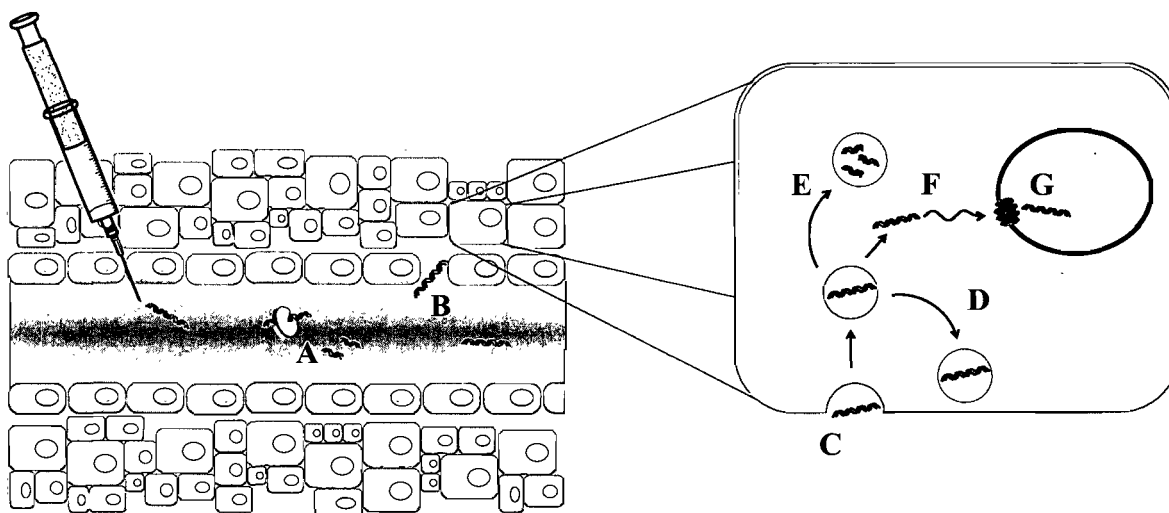


Figure 2-2. Représentation schématique des obstacles rencontrés par du matériel génétique administré par la voie *i.v.* lors de son parcours vers une cible nucléaire. Dans la circulation, le matériel génétique (**bleu foncé** – ici un segment d'ADN double brin) est exposé aux nucléases, des enzymes qui dégradent les acides nucléiques en leurs nucléotides constitutants (A). Le matériel génétique qui échappe aux enzymes et aux principaux organes d'élimination (foie et rein) doit alors passer la barrière endothéliale et traverser le milieu interstitiel pour rejoindre les cellules cibles (B). À cet effet, certains tissus tumoraux présentent des vaisseaux dont la barrière endothéliale est discontinue, favorisant ainsi le passage et l'accumulation de matériel génétique localement. En raison de leur charge et de leur masse molaire élevée, les acides nucléiques traversent difficilement la membrane cellulaire et sont plutôt internalisés par endocytose (C). Le matériel génétique se retrouve alors piégé dans une vésicule d'endocytose qui peut être recyclée vers la membrane plasmique (D) ou dirigée vers les lysosomes, des organelles riches en nucléases (E). Le peu de matériel qui réussit à s'échapper devra ensuite se rendre au noyau par diffusion (si sa taille le permet) (F). À ce stade, les courtes chaînes de matériel génétique peuvent diffuser au travers des pores nucléaires (**rouge**) et atteindre leur cible (G). Les chaînes plus grosses, quant à elles, sont contraintes d'attendre la déstabilisation de l'enveloppe nucléaire se produisant lors de la mitose afin de pénétrer dans le noyau.

En supposant que le matériel génétique administré échappe à l'élimination, il doit alors traverser le milieu interstitiel par diffusion ou convection pour rejoindre les cellules cibles puis y être internalisé en quantité suffisante afin d'exercer son action. Cependant, en raison de leur haute masse molaire (typiquement supérieure à 6000 g/mol) et de leur nature

polyanionique, les acides nucléiques nus traversent difficilement la membrane cellulaire; leur internalisation se fait plutôt par endocytose (Stein 1993; Hughes 2001). Toutefois, ce processus demeure inefficace puisque seules quelques chaînes parviennent à pénétrer dans la cellule (Hughes 2001). Ces dernières se retrouvent alors piégées à l'intérieur de vésicules d'endocytose (loin de leur site d'action). Rapidement, le contenu de ces endosomes primaires sera soit recyclé vers la membrane plasmique, soit dirigé vers les compartiments tardifs de l'endocytose puis vers les lysosomes, des organelles au contenu riche en enzymes digestives telles les nucléases. Par conséquent, l'internalisation par endocytose représente souvent une impasse pour les acides nucléiques thérapeutiques.

Par ailleurs, le peu de matériel génétique qui réussit à s'échapper des endosomes/lysosomes n'atteint pas nécessairement sa cible intracellulaire qui, selon le mécanisme d'action, peut se situer dans le cytoplasme (ARNm) ou le noyau (pré-ARNm, ADN). En effet, Capecchi (1980) a montré qu'un plasmide codant pour la thymidine kinase (~4,5 kpb) micro-injecté dans le cytoplasme de fibroblastes murins n'exprimant pas la thymidine kinase (cellules LMTK⁻) n'induisait aucune activité enzymatique alors qu'une micro-injection du même gène directement dans le noyau permettait son expression dans 50 à 100 % des cellules. Ces résultats suggèrent que l'ADN localisé dans le cytoplasme ne peut aisément atteindre le noyau. Bien qu'à l'époque les raisons de cette observation étaient obscures, il est depuis reconnu que plusieurs facteurs entrent en jeu. D'une part, le temps de demi-vie des acides nucléiques dans le cytoplasme est court, de l'ordre de 50 à 90 min pour de l'ADN plasmidique (à la fois simple ou double brin), dû à la présence de nucléases cytoplasmiques (Lechardeur 1999). D'autre part, bien que les petites molécules hydrosolubles diffusent librement du cytosol au noyau, la diffusion de larges chaînes d'ADN se voit ralentie par la structure squelettique filamenteuse du cytoplasme. Ceci a été confirmé notamment par Lukacs *et al.* (2000) qui ont évalué l'effet de la longueur de chaînes d'ADN sur leur mobilité dans le cytoplasme de cellules HeLa. Leurs résultats suggèrent que les chaînes d'ADN de moins de 100 paires de bases (pb) demeurent relativement mobiles dans le cytoplasme. En effet, les coefficients de diffusion mesurés

pour ces chaînes sont seulement 5 fois inférieurs à ceux calculés dans l'eau (soit $\sim 4,6 \times 10^{-8}$ cm²/s), leur permettant d'atteindre rapidement le noyau (quelques min). Par contre, la vitesse de diffusion des chaînes d'ADN diminue de façon importante avec un accroissement de leur taille et les brins de plus de 2000 pb sont pratiquement immobiles (coefficient de diffusion d'environ $2,5 \times 10^{-10}$ cm²/s). Par ailleurs, la membrane nucléaire peut agir comme une barrière additionnelle au passage de l'ADN du cytoplasme au noyau. L'enveloppe nucléaire est formée de 2 membranes concentriques et est ponctuée de 3000 à 4000 pores nucléaires dont le diamètre, lorsque clos, est d'environ 9-10 nm (Wiethoff 2003). Les petits acides nucléiques composés de moins de 200 à 300 pb, notamment les ODNs antisens, peuvent diffuser à travers ces pores (Leonetti 1991; Ludtke 1999). Par contre, sans aide additionnelle, les molécules plus grosses sont contraintes d'attendre la déstabilisation de l'enveloppe nucléaire lors de la mitose afin de pénétrer dans le noyau, limitant leur activité aux cellules en division. De plus, cette attente prolonge le temps de résidence des acides nucléiques dans le cytoplasme où ils courent un risque accru de dégradation.

En résumé, les barrières physiologiques à la thérapie génique sont nombreuses et diverses stratégies ont été développées afin de surmonter ces obstacles et d'améliorer l'efficacité thérapeutique des acides nucléiques *in vitro* et *in vivo*. Les différentes approches proposées reposent sur l'optimisation des propriétés du matériel génétique lui-même, ou sur la mise au point de vecteurs capables de transporter efficacement les acides nucléiques à leur cible. Ces stratégies sont présentées ci-dessous.

1.2 Surmonter les barrières à la thérapie génique

1.2.1 Optimisation de la séquence du matériel génétique

La séquence du matériel génétique doit être sélectionnée avec soin puisqu'il semblerait que certains motifs de répétition ou séquences diminueraient l'efficacité de

transfection du matériel génétique alors que d'autres seraient bénéfiques. Par exemple, les acides nucléiques simple brin riches en résidus guanosine sont à éviter dans le cadre d'une thérapie antisens. Ces séquences peuvent interagir avec des régions spécifiques de l'ADN pour former des hélices triples *via* l'établissement de ponts hydrogène de type Hoogsteen, réduisant la quantité d'ODN disponible pour inhiber l'ARNm ciblé (Kurreck 2003). Un second exemple de séquence à éviter dans la mise au point d'ODNs antisens est le motif CpG. Cet enchaînement de résidus a la propriété de stimuler le système immunitaire et d'induire une activité cytotoxique indépendante du mécanisme antisens. Une telle séquence peut cependant devenir intéressante dans le cadre de l'immunothérapie du cancer et la vaccination (où les ODNs servent d'adjuvants) (Wilson 2006).

L'optimisation de la séquence peut également faciliter l'internalisation du matériel génétique dans le noyau. Dans la plupart des cellules, les molécules nécessaires au fonctionnement du noyau (protéines, ribosomes, etc.) y sont acheminées par transport actif. Ces molécules peuvent être directement reconnues par un récepteur de translocation nucléaire ou faire appel à des protéines cytosoliques, les importines, afin de les guider au travers des pores nucléaires (Görlich 1999). Il a été démontré que, lorsqu'ils présentaient des suites particulières de nucléotides (dites séquences de ciblage nucléaire), des plasmides pouvaient exploiter ces mécanismes d'internalisation dans le but de promouvoir leur passage du cytoplasme au noyau et d'augmenter leur efficacité de transfection (Dean 1997). En fait, ces séquences seraient reconnues par des facteurs cytoplasmiques de transcription qui seraient, à leur tour, reconnus par les importines (Dean 1997). Vacik *et al.* (1999) ont de plus montré qu'il était possible de mettre au point des plasmides portant des séquences reconnues par des facteurs de transcription exprimés uniquement par certaines cellules afin de réaliser un ciblage tissulaire. Ainsi, de trois lignées cellulaires (cellules musculaires lisses, fibroblastes et cellules épithéliales de singe) traitées avec un plasmide portant comme séquence de reconnaissance le promoteur du gène de la protéine musculaire actine- γ , seules les cellules musculaires lisses ont exprimé le gène thérapeutique administré.

Une fois dans le noyau, il est possible de promouvoir l'insertion d'un transgène dans le génome en optimisant l'information génétique contenue dans un plasmide. Typiquement, les événements de recombinaison homologue sont peu fréquents chez les cellules des mammifères (Biet 2003). À l'inverse, les virus et les bactériophages sont capables d'intégrer leur bagage génétique de manière efficace et spécifique en ayant recours à des recombinases spécifiques de site (RSS), des enzymes qui reconnaissent et appariant certaines séquences d'acides nucléiques présentes à la fois sur le pathogène et sur le génome hôte (Glover 2005). Olivares *et al.* (2002) ont profité de cette propriété afin d'intégrer le gène du facteur de coagulation IX humain chez des souris. Plus précisément, ils ont co-administré un plasmide codant pour une RSS avec un plasmide codant pour ledit gène et contenant un site de reconnaissance *attB* (qui est homologue au site pseudo-*attP* présent sur le génome murin). Tel que révélé par les titres sériques soutenus et persistants (au-delà de 250 jours) du facteur de coagulation IX humain dosés chez les animaux traités, la RSS a bel et bien permis d'intégrer le gène thérapeutique dans le génome des souris. Il serait en théorie possible de combiner ces trois éléments dans un seul et même plasmide (Glover 2005).

1.2.2 Modifications chimiques du matériel génétique

1.2.2.1 Modifications des acides nucléiques

La modification des acides nucléiques vise principalement à prévenir la dégradation prématurée du matériel génétique dans les milieux physiologiques. Idéalement, les modifications apportées ne devraient pas affecter l'activité des analogues générés (*e.g.* affinité et spécificité d'hybridation avec l'ARNm dans le cas des ODNs antisens, activité enzymatique dans le cas des ribozymes, etc.). Pour des raisons pratiques, les modifications chimiques sont surtout apportées aux acides nucléiques courts et l'emphase de cette section sera donc mise sur les dérivés d'ODNs antisens.

Généralement, les modifications sont effectuées soit sur la base, le sucre ou la chaîne principale des acides nucléiques. Des exemples de modifications de même que certaines caractéristiques des dérivés obtenus sont présentés à la Figure 2-3. Les dérivés phosphorothioate (PS) ont été parmi les premiers à être introduits. Chez ces derniers, un atome de soufre remplace l'oxygène non-liant du groupement phosphate, ce qui permet d'augmenter le temps de demi-vie d'environ 7 fois dans le sérum humain comparativement à l'analogue naturel phosphodiester (Kurreck 2002). En contrepartie, une telle modification introduit des centres chiraux sur les groupements phosphate (diastéréoisomère Rp ou Sp) qui réduisent l'affinité des ODNs envers leur ARNm cible (Stein 1993). Ainsi, le point de fusion des duplexes ODN PS/ARN diminue de 0.5-1 °C par nucléotide comparativement aux duplexes obtenus avec le dérivé phosphodiester (Wilds 2000). La diminution du point de fusion indique une diminution de l'affinité (stabilité) du duplexe formé. De plus, les dérivés PS ont tendance à interagir de manière non spécifique avec diverses protéines et ce, indépendamment de leur séquence (Brown 1994). Les conséquences de ces interactions sont multiples. Par exemple, une amélioration de l'internalisation cellulaire des ODNs PS peut résulter de leur liaison aux protéines membranaires (Brown 1994). Par contre, puisque la liaison aux protéines n'est pas spécifique, les ODNs PS peuvent induire une toxicité cellulaire lorsque les protéines touchées sont nécessaires à l'activité métabolique de la cellule. Ces effets peuvent d'ailleurs être facilement confondus avec l'activité antisens et de bons contrôles doivent être utilisés lors des expériences d'efficacité. Néanmoins, les dérivés PS demeurent les plus étudiés et les plus utilisés des analogues d'ADN.

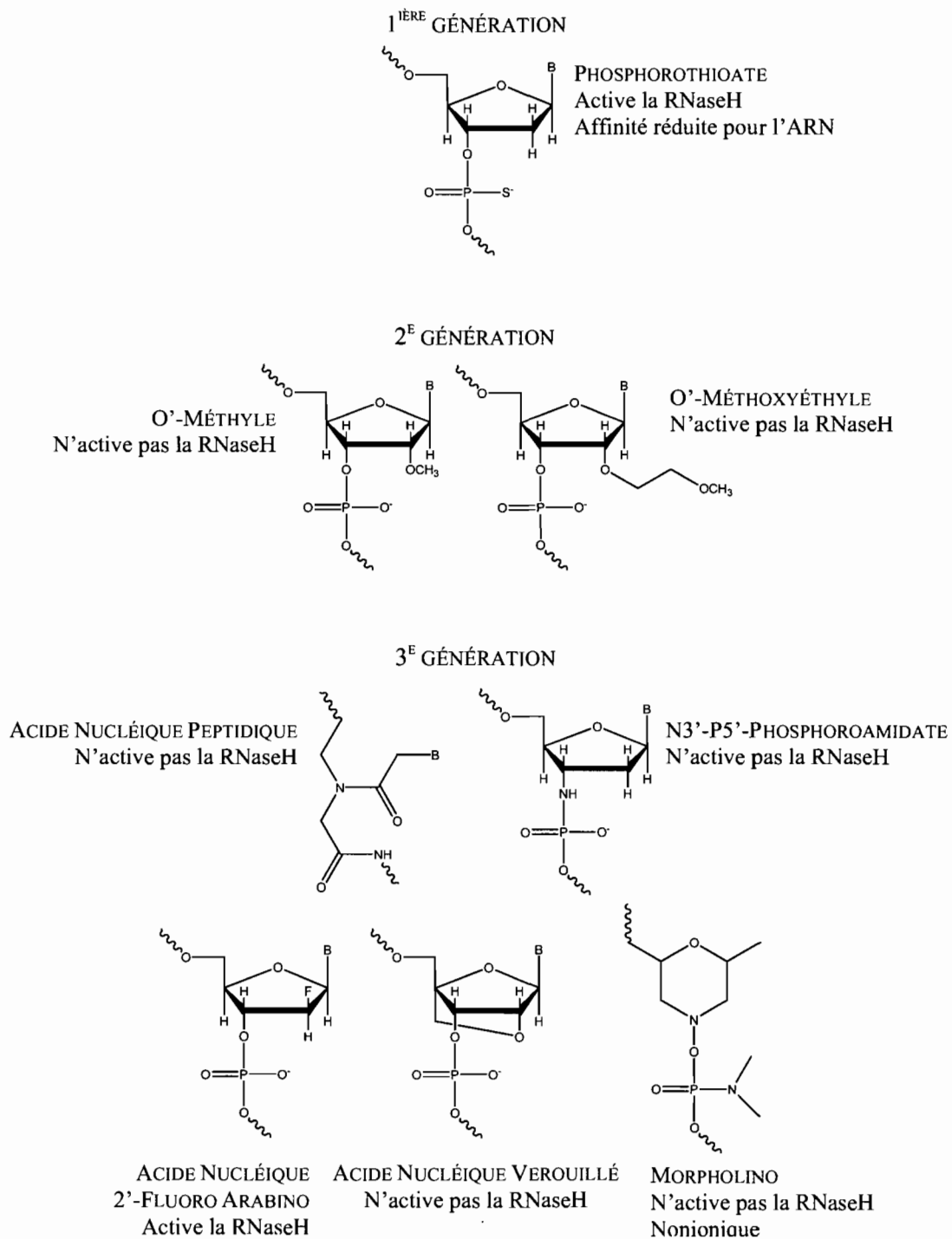


Figure 2-3. Dérivés d'acides nucléiques.

Afin d'améliorer davantage la résistance aux nucléases, d'accroître l'affinité d'hybridation avec l'ARN et de diminuer la toxicité non spécifique des ODNs PS, des dérivés de seconde (modifications alkyles en position 2' du ribose) et troisième générations (batterie de substitutions et modifications sur le sucre et la chaîne principale) ont été préparés. Si la plupart des ces dérivés surpassent les PS à plusieurs égards, ceci se fait au dépend de leur capacité à activer la RNaseH (Figure 2-3) (Kurreck 2003). Ainsi, à l'exception du dérivé acide nucléique 2'-fluoro arabino, ces analogues inhiberaient exclusivement la synthèse de protéines par encombrement stérique, en bloquant la traduction de l'ARNm. Cette perte d'activité s'explique aisément du fait que le groupement hydroxyle en position 2' du brin d'ARN est primordial à l'hydrolyse de l'ARN par la RNaseH. Cette fonction se situe normalement dans le sillon mineur du duplexe ODN/ARN, de sorte que toute modification affectant la structure tridimensionnelle et l'accessibilité de ce groupement compromet l'activité de la RNaseH, ce qui est généralement le cas pour les modifications de 2^e ou 3^e génération (Zamaratski 2001). Puisque l'activité des ODNs de dernière génération se fait par encombrement stérique, certains chercheurs ont émis l'hypothèse qu'une augmentation de la stabilité de l'hétéroduplexe ODN/ARNm pourrait améliorer l'efficacité de transfection. Ainsi, Michel *et al.* (2003) ont proposé d'introduire un groupement cationique le long de la chaîne principale d'un ODN afin de promouvoir, en plus des interactions Watson-Crick, la formation de liaisons électrostatiques entre l'ODN et sa cible. Cette modification a permis d'augmenter significativement la stabilité du duplexe ODN/ARN tout en maintenant la spécificité d'interaction, tel que démontré par une diminution marquée du point de fusion lors de l'introduction d'un mésappariement. Tel qu'anticipé, la plus grande stabilité du duplexe a entraîné une diminution d'environ 3 fois de la concentration d'ODN nécessaire pour obtenir 50 % d'inhibition (IC₅₀) de l'expression de luciférase de luciole, un gène rapporteur, dans des cellules HepG2. De plus, cette approche permet, si ce n'est que

modestement, d'augmenter l'internalisation cellulaire en favorisant les interactions avec la membrane cellulaire anionique.

Finalement, une stratégie reposant sur l'utilisation d'analogues mixtes dits « gapmères » permet d'intégrer avantageusement les propriétés des diverses modifications chimiques énoncées jusqu'à présent dans la conception de dérivés capables d'activer la RNaseH. Plus précisément, les gapmères sont composés d'une séquence centrale à base de nucléotides phosphodiester ou PS flanquée à chaque extrémité de nucléotides de 2^e ou 3^e génération. Les modifications en bout de chaîne garantissent la stabilité (face à la dégradation enzymatique), la spécificité et l'affinité pour la cible d'ARNm alors que la chaîne centrale assure l'affinité pour la RNaseH. Il est à noter que 4 à 5 nucléotides sont généralement suffisants pour activer la RNaseH (Kurreck 2003).

En dépit des améliorations apportées, il est des barrières à la thérapie génique que les modifications chimiques des acides nucléiques ne peuvent surmonter. Ainsi, les ODNs modifiés sont souvent utilisés en combinaison avec d'autres stratégies, telles la conjugaison ou la vectorisation, pour un effet additif.

1.2.2.2 Conjugués d'acides nucléiques

L'utilisation de conjugués d'acides nucléiques vise à modifier le profil pharmacocinétique et la biodistribution du matériel génétique, à augmenter son internalisation cellulaire ou à favoriser sa localisation nucléaire. Par exemple, le couplage de cholestérol permet de modifier la biodistribution de matériel génétique administré par la voie *i.v.* et de cibler certains tissus. Dans ce cas, le couplage au cholestérol engendre une redistribution du conjugué d'acide nucléique dans le foie, tout en réduisant sa clairance glomérulaire (Bijsterbosch 2000). L'accumulation préférentielle des conjugués de cholestérol dans les cellules endothéliales, de Kupffer et parenchymales du foie peut s'expliquer par leur liaison à diverses protéines plasmatiques, dont l'albumine et d'autres protéines de haut poids moléculaire, qui sont ensuite internalisées par le biais de récepteurs

spécifiques (Bijsterbosch 2000; Soutschek 2004). Une autre étude, *in vitro* cette fois, semble indiquer que lipoprotéines de faible densité (LDL) seraient impliquées dans la liaison et l'internalisation des conjugués de cholestérol par endocytose *via* les récepteurs à la LDL (Krieg 1993). D'autre part, la capture cellulaire des conjugués de cholestérol peut résulter directement du partage du cholestérol lipophile dans la membrane cellulaire suivi de son internalisation par endocytose d'adsorption (Krieg 1993). Conjointement, ces propriétés ont permis à un conjugué pARNi-cholestérol de diminuer les concentrations de l'ARNm responsable de la synthèse de l'apolipoprotéine B de 60 % dans le foie de souris, ce qui a entraîné une réduction des niveaux de cholestérol plasmatique de 37 % (Soutschek 2004). Cette approche semble prometteuse particulièrement pour le traitement de l'hypercholestérolémie.

D'autre part, la conjugaison de matériel génétique à une molécule de reconnaissance, ou ligand, a été proposée afin de favoriser leur internalisation par endocytose récepteur-dépendante. En plus d'augmenter l'internalisation cellulaire, cette approche offre la possibilité de cibler spécifiquement un tissu surexprimant un récepteur donné. Ceci devient particulièrement intéressant dans le cas des cellules cancéreuses dont la surexpression de certains récepteurs ou antigènes de surface peut être ciblée au moyen de résidus orienteurs tels que des anticorps, des peptides, des aptamères, des sucres ou des vitamines (Hudson 1999; Li 1998; Chu 2006; Shi 2000). Par exemple, sachant que les cellules de cancer ovarien humain 2008 surexpriment un récepteur à l'acide folique, Li *et al.* (1998) ont pu augmenter l'internalisation d'un ODN inhibant la synthèse de la protéine *c-fos* en le couplant à l'acide folique, inhibant ainsi la croissance cellulaire de 60% comparativement à moins de 20% pour l'ODN libre. De plus, des essais effectués en présence d'acide folique libre ou sur des cellules n'exprimant pas le récepteur confirment la spécificité de l'interaction du dérivé folate avec sa cible. D'autre part, certaines molécules de reconnaissance permettent d'atteindre des tissus reclus et autrement inaccessibles. Ceci est le cas des anticorps monoclonaux anti-récepteur à la transferrine qui facilitent le passage au travers de la barrière hémato-encéphalique, tel que mis en évidence par Shi *et*

al. (2000). De fait, le couplage de l'anticorps à un dérivé d'acide nucléique peptidique radioactif leur a permis d'imager la production d'ARNm dans des cellules cancéreuses inoculées dans le cerveau de rats (Shi 2000).

Une autre approche visant à augmenter l'internalisation cellulaire consiste à coupler le matériel génétique à un peptide de translocation. Les peptides de translocation comprennent typiquement de 7 à 30 acides aminés et portent généralement une charge nette positive (Järver 2004). L'intérêt suscité par ces peptides vient du fait qu'ils diffuseraient librement au travers de la membrane cytoplasmique, entraînant les molécules qui leur sont couplées (Järver 2004). Le mécanisme exact de cette translocation demeure obscur mais certaines études semblent indiquer que les charges positives distribuées le long de la chaîne peptidique recruteraient et interagiraient avec les phospholipides anioniques de la membrane, induisant une déstabilisation de sa structure moléculaire par la formation de micelles inverses (Derossi 1996). Ces peptides de translocation ont, entre autres, été utilisés pour augmenter l'internalisation cellulaire d'ODNs (Astriab-Fisher 2000; Juliano 2006) et d'acides nucléiques peptidiques (Simmons 1997; Pooga 1998), tel que révélé par cytométrie en flux et microscopie confocale à balayage laser. Par contre, des études plus récentes remettent en question ce mécanisme de translocation et suggèrent que l'efficacité observée serait en fait un artéfact découlant du design expérimental et suggèrent que l'internalisation des peptides de translocation se ferait plutôt par endocytose (Järver 2004; Richard 2003). Bien qu'une controverse persiste quant à la voie d'internalisation, il n'en demeure pas moins que la conjugaison de tels peptides a permis d'augmenter l'activité thérapeutique de matériel génétique *in vitro* (Juliano 2006; Astriab-Fisher 2000) comme *in vivo* (Pooga 1998) et qu'ils présentent un intérêt indéniable. Compte tenu de la non-spécificité de l'internalisation de ces conjugués, il est néanmoins à noter que les applications *in vivo* sont restreintes à une administration locale, à moins que le peptide soit initialement caché et qu'il ne devienne accessible qu'après avoir rejoint sa cible.

Une inspection plus détaillée de la composition des peptides de translocation révèle que l'arginine serait impliquée dans le processus d'internalisation. En effet, il a été montré

que des poly(arginine)s de plus de 8 unités se distribuaient rapidement dans le cytoplasme et le noyau cellulaire. Malheureusement, la haute densité de charges de ces peptides favorise leur interaction avec le matériel génétique *via* des liaisons électrostatiques et empêche leur conjugaison directe au matériel génétique puisque les conjugués produits sont instables et ont tendance à s'agréger. Afin de pallier ce problème tout tirant profit des poly(arginines), Ohmichi *et al.* (2005) ont préparé un pARNi modifié en position 3' par quatre unités d'un acide nucléique portant un groupement guanidinium, le groupement actif de la poly(arginine), sur leur base. En limitant le nombre d'unités cationiques à quatre, les auteurs ont pu préparer des conjugués solubles. De plus, leurs données indiquent que la séquence cationique en bout de chaîne n'interfère pas avec l'hybridation (le point de fusion mesuré pour le dérivé cationique et sa cible est identique à celui du pARNi d'origine) et augmente l'internalisation cellulaire, mettant en évidence le potentiel et l'applicabilité de cette modification pour augmenter l'activité antisens des pARNis.

Finalement, certains chercheurs ont émis l'hypothèse qu'il serait possible de profiter des composantes cellulaires responsables du transport actif de protéines au travers des pores nucléaires dans le but de promouvoir l'entrée de matériel génétique conjugué à des peptides de localisation nucléaire. Ces peptides sont reconnus par les importines qui les ancrent aux pores nucléaires pour ensuite induire leur passage vers le noyau (Görlich 1999; Wagstaff 2007). La séquence ProLysLysLysArgLysVal, retrouvée sur l'antigène grand T du virus simien 40, est la plus utilisée à cette fin. Les premiers essais avec de l'ADN plasmidique indiquent que, bien que les conjugués soient reconnus par les importines, **ils demeurent localisés dans le cytoplasme**, tel que révélé par microscopie confocale à balayage laser (Sebestyén 1998; Ciolina 1999). Dans les deux études citées, les conjugués utilisés possédaient plusieurs peptides de localisation nucléaire par plasmide (de l'ordre de 14 à 85 peptides par 1 kpb). Singulièrement, l'une de ces études a révélé qu'il était néanmoins possible pour des conjugués dont le nombre de peptides de localisation nucléaire était inférieur à 1 peptide par 900 pb d'augmenter l'expression du transgène (Ciolina 1999). Si les auteurs de cet article n'ont pas cherché à interpréter ce résultat, une

hypothèse est venue du groupe de Behr qui a montré qu'un seul peptide de translocation nucléaire était suffisant pour augmenter l'activité de transfection d'un ADN de 3,3 kpb et ce, dans plusieurs lignées cellulaires (Zanta 1999). Ce dernier propose que, lorsque la densité de peptides attachés au plasmide augmente, la distance entre chaque peptide diminue et ce, jusqu'à être inférieure à la distance séparant deux pores nucléaires adjacents. Ainsi, un même plasmide interagirait simultanément avec plusieurs pores et cette interaction multiple résulterait en une internalisation nucléaire nette nulle. En tenant compte du nombre de pores par noyau et de la taille du noyau des cellules employées dans cette étude, les auteurs ont établi que le nombre de peptides ne devrait pas dépasser un par 1 kpb pour un transport efficace. Bien que le groupe de Behr ait démontré que la conjugaison d'un peptide de localisation nucléaire puisse augmenter l'efficacité de transfection (Zanta 1999), leur étude n'a pas directement montré la distribution intracellulaire (nucléaire) de leur conjugué d'ADN. Dans une étude indépendante parue subséquemment, Ludtke *et al.* (1999) ont, pour leur part, mis en évidence une accumulation accrue d'un ADN de 900 pb modifié à l'aide d'un seul peptide dans le noyau de cellules HeLa. L'efficacité de transfection s'est aussi vue augmentée, confirmant le bien-fondé de cette approche.

Bien que la conjugaison des acides nucléiques se soit à plusieurs reprises révélée profitable, une discussion de cette stratégie ne serait complète sans mentionner les quelques limitations qui lui sont inhérentes. D'une part, dans le contexte de la thérapie antisens, c'est-à-dire lorsque le matériel génétique inhibe la synthèse d'une protéine en se liant à l'ARNm, le couplage d'une molécule de reconnaissance ou d'un peptide peut réduire l'affinité et la spécificité entre le matériel génétique et sa cible par encombrement ou par interactions non spécifiques. D'autre part, principalement dans le cas d'ADN plasmidique, le manque de contrôle et de sélectivité de la plupart des réactions de couplage peut résulter en une modification de la séquence responsable de l'activité thérapeutique, inhibant ainsi l'expression du transgène. Un tel phénomène a été rapporté par Leahy *et al.* (1996) qui ont observé une diminution de 60 % de l'activité biologique d'un plasmide exprimant la

chloramphénicol acétyltransférase suite au greffage de biotine à raison de 100 molécules par 100 pb. Pour contrevenir à cet effet, il est possible de coupler les ligands à un court brin d'ADN pouvant former une hélice triple avec le plasmide (Neves 1999; Brandén 1999). Ainsi, le greffage se fait donc de manière spécifique et contrôlée à un endroit choisi. Finalement, les réactions de couplage impliquent souvent plusieurs étapes et requièrent une purification exhaustive de sorte qu'il peut être difficile et coûteux de préparer les conjugués de matériel génétique en grande quantité.

1.2.3 Approches mécaniques et électriques

Les approches mécaniques et électriques permettent d'administrer du matériel génétique nu sans avoir recours à la conjugaison ni à des vecteurs viraux ou synthétiques, qui peuvent parfois s'avérer toxiques (voir sections 1.2.4.1, 2.6.1.3 et 2.6.2). De toutes les approches mécaniques, la micro-injection demeure la plus directe, bien qu'extrêmement laborieuse. Durant la micro-injection une aiguille est insérée à travers de la membrane cellulaire et le contenu de la seringue déversé à l'endroit désiré, permettant par exemple l'administration de matériel génétique intact dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule. Malheureusement, cette technique requiert l'utilisation d'un microscope spécialisé et doit être pratiquée sur chaque cellule individuellement, limitant son application à la thérapie génique *in vitro* ou *ex vivo* (Luo 2000).

D'autres approches mécaniques visant à augmenter la pression du liquide interstitiel dans le tissu cible ont été élaborées afin de déstabiliser la structure de la membrane cellulaire et de provoquer l'internalisation du matériel génétique par diffusion. Ainsi, Mann *et al.* (1999) ont développé une méthode *in vitro* permettant de perfuser des tissus cardiovasculaires humains à haut débit (haute pression) sans les déformer. Ce faisant, les auteurs ont réussi à introduire un ODN marqué à la fluorescéine dans le noyau de plus de 90 % des cellules de ces tissus (Mann 1999). Une seconde approche mécanique reposant sur une augmentation de pression dans les cellules hépatiques murines *in vivo* a été décrite

séparément par les groupes de Liu et Wolff (Liu 1999; Zhang 1999). Dans cette approche, l'augmentation de pression résulte de l'injection rapide d'un large volume de matériel génétique par la veine de la queue des souris. Physiologiquement, l'injection d'un large volume dans la queue induit une insuffisance cardiaque transitoire qui se solde en une accumulation du liquide injecté dans la veine cave inférieure et en un mouvement rétrograde de l'excès de solution vers le foie. L'augmentation de la pression hydrodynamique dans le foie entraîne à son tour un élargissement des fenestrations de la paroi sinusoïdale, rendant les membranes des cellules hépatocytes plus perméables et facilitant l'accumulation de matériel génétique dans ces cellules (Zhang 2004; Herweijer 2007). Bien qu'efficace chez les petits animaux, cette méthode est difficilement transposable chez l'homme en raison du large volume d'injection qui serait requis et de désordres physiologiques (dont la pression artérielle élevée) potentiellement engendrés. En revanche, une variante méthodologique où une sangle est utilisée afin d'augmenter localement la pression dans un membre (*e.g.* mollet), permet l'administration efficace de matériel génétique dans le muscle de grands mammifères (Herweijer 2007).

Une dernière approche mécanique visant à augmenter l'internalisation cellulaire du matériel génétique, la biolistique, peut finalement être décrite. Cette méthode consiste à bombarder les cellules cibles avec des microparticules d'or ou de tungstène recouvertes d'acide nucléique (Wells 2004). Les particules atteignent les cellules avec une énergie cinétique telle qu'elles réussissent à pénétrer efficacement la membrane cellulaire. Toutefois, les applications *in vivo* de la biolistique sont limitées à des cibles topiques (Wells 2004).

Finalement, il est possible d'accroître de façon importante la pénétration de matériel génétique à l'intérieur d'un tissu en lui appliquant un courant électrique. Par exemple, l'administration répétée d'un ODN antisens par iontophorèse a permis la guérison de souris NC/Nga qui, lorsqu'élevées dans un environnement normal (non contrôlé), développent des dermatites atopiques (Sakamoto 2004). Plus spécifiquement, le matériel génétique, portant une charge anionique, est soumis à un courant électrique de charge identique le forçant à

pénétrer à travers la peau (force électromotrice répulsive). Si l'iontophorèse agit sur le principe actif, l'électroporation, quant à elle, augmente directement la perméabilité d'un tissu (Banga 1999). Cette technique repose sur l'utilisation d'impulsions électriques de haut voltage afin de générer un champ électrique qui entraîne un réarrangement transitoire de la structure moléculaire de la membrane cellulaire, la rendant plus perméable aux brins d'ADN (Chen 2006; Dujardin 2001). L'iontophorèse et l'électroporation induiraient toutes deux très peu de dommages permanents de la peau (Dujardin 2002; Banga 1999). Cependant, ces méthodes sont typiquement restreintes à des applications locales (topique, oculaire, musculaire).

1.2.4 Vectorisation

La vectorisation peut être définie comme une opération visant à moduler et contrôler la biodistribution d'un principe actif en l'associant à un système de transport approprié appelé vecteur. Le principe de base de la vectorisation repose sur l'hypothèse voulant qu'il soit possible de rendre la distribution d'un principe actif indépendante de ses propriétés physico-chimiques intrinsèques et de la soumettre aux propriétés du vecteur. Dans le cadre de la thérapie génique, un vecteur se doit d'être stable dans le compartiment sanguin et inerte face aux défenses immunitaires, ceci afin de circuler de manière prolongée et d'accéder aux tissus cibles avec son contenu toujours intact. Une fois à proximité du tissu, le vecteur doit reconnaître les cellules d'intérêt de façon spécifique, s'y lier et ainsi induire son internalisation par endocytose. À ce stade, le vecteur doit posséder un mécanisme lui permettant d'échapper à l'endosome ou au lysosome où le matériel internalisé sera dégradé. Une fois dans le cytosol (et ce, dépendamment du matériel génétique) le vecteur peut soit directement libérer sa cargaison ou acheminer son contenu jusqu'à la membrane nucléaire. Outre ces exigences, le vecteur devra de plus être biocompatible et biodégradable, faute de quoi ses composantes doivent pouvoir être éliminées par filtration glomérulaire.

Les vecteurs utilisés en thérapie génique sont communément classés en deux catégories. Les premiers, dits « viraux », consistent en des virus dont le bagage génétique a été modifié pour porter le transgène thérapeutique; ces vecteurs sont efficaces mais potentiellement toxiques et immunogènes. Les vecteurs de la deuxième catégorie, dits « non viraux », reposent sur l'utilisation de matériaux synthétiques (liposomes, polymères) pour transporter le matériel génétique; ces vecteurs sont relativement faciles à préparer, généralement plus sécuritaires que les vecteurs viraux mais peu efficaces.

1.2.4.1 Vecteurs viraux

Une particule virale est composée d'une enveloppe ou capsid (lipidique dans le cas des rétrovirus, protéique dans le cas de l'adénovirus) qui renferme du matériel génétique (ADN ou ARN) sous forme compacte. Les virus possèdent une petite taille, généralement de l'ordre de la centaine de nm et le plus souvent de moins de 250 nm. Le cycle viral se résume à deux phases, soit l'infection et la réplication. Ainsi, le matériel génétique du virus contient l'information nécessaire à la libération du matériel génétique dans la cellule hôte, des éléments régulant la réplication ou l'expression des gènes, de même que des séquences codant pour des protéines d'emballage (Ameziane 2005). L'internalisation cellulaire d'un virus peut se faire par endocytose récepteur-dépendante par l'intermédiaire de protéines présentes à la surface de la capsid et reconnues par les cellules hôtes (Roth 2004). D'autre part, une fusion de la capsid avec la membrane cellulaire, facilitée par la présence de peptides amphipathes, peut également se produire (Roth 2004).

Les virus ont développé au fil de leur évolution la capacité de pénétrer efficacement dans les cellules eucaryotes et de s'y reproduire. Ils sont pour ainsi dire des agents de transfection accomplis et il a donc été tout naturel de tenter de les modifier de façon à les rendre adéquats pour le transport de matériel génétique thérapeutique. Dans le cadre d'une thérapie génique, le bagage génétique du virus est modifié afin d'intégrer les séquences d'intérêt. De plus, à l'exception de certaines applications pour le traitement du cancer, les

gènes codant pour les protéines de réplication et d'empaquetage sont éliminés, de sorte que le vecteur viral ne peut se reproduire (Ameziane 2005). Ces mêmes gènes sont en revanche utilisés *in vitro* dans le but de produire des capsides vides qui seront utilisées pour contenir le matériel génétique thérapeutique. Plusieurs virus ont ainsi été transformés en vecteurs pour la thérapie génique; les plus utilisés sont présentés dans le Tableau 2-I. Ce tableau rapporte aussi les caractéristiques principales de chacun de ces vecteurs, illustrant les différences de leur mécanisme d'action et, ultimement, de leur efficacité de transfection.

Tableau 2-I. Principales caractéristiques des vecteurs viraux communément utilisés en thérapie génique. Adapté de Waehler (2007) et Ameziane (2005).

PROPRIÉTÉ DES VECTEURS	ADÉNOVIRUS	VIRUS ADÉNO-ASSOCIÉ	RÉTROVIRUS	LENTIVIRUS
Taille (nm)	70-100	20-25	100	100
Taille du matériel génétique encapsulé (kpb)	8-10	4,9	8	9
Nature du matériel génétique encapsulé	ADN	ADN	ARN	ARN
Intégration chromosomique	Non	Non	Oui	Oui
Mécanisme d'internalisation	Endocytose par récepteur, libération de l'endosome, transport au noyau <i>via</i> microtubules	Endocytose par récepteur, libération de l'endosome, transport au noyau	Liaison au récepteur, changement de conformation, fusion à la membrane, internalisation, épluchage, entrée de l'ADN rétro- transcrite dans le noyau	
Durée de l'expression du transgène	Semaines à mois	> 1 an	Long terme	
Réplication du vecteur <i>in vivo</i>	Possible mais pas une préoccupation majeure	Possible mais pas une préoccupation majeure	Risque	Risque
Transfection des cellules quiescentes	Oui	Oui	Non	Oui
Mutagenèse insertionnelle?	Non	Non	Oui	Oui

La première expérience chez l'humain a été effectuée en 1989 par le Dr. Rosenberg. Ce dernier a réalisé la transfection, *ex vivo*, de lymphocytes T à l'aide d'un rétrovirus. Les cellules transfectées ont ensuite été réintroduites chez des patients atteints de mélanomes avancés (Rosenberg 1990). Depuis, plusieurs autres études ont été amorcées et, à ce jour,

près de 70 % des essais cliniques en cours impliquent des vecteurs viraux (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>, une publication de « *The Journal of Gene Medicine* » 2008). Bien qu'une discussion détaillée des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* avec les différents vecteurs viraux dépasse le cadre de cette introduction, une courte énumération de leurs désavantages semble nécessaire pour mieux comprendre les motivations qui ont mené au développement des vecteurs synthétiques non viraux. Ainsi, bien que le taux de transfection obtenu avec les vecteurs viraux soit important, les restrictions imposées quant à la taille de l'ADN ou le type de matériel génétique pouvant être encapsulé (ADN plasmidique, ARN) limitent leur applicabilité. Plus important encore, lorsqu'injectés *in vivo*, les vecteurs viraux sont généralement peu spécifiques, peuvent entraîner une réponse immunitaire ou générer une toxicité importante suite, par exemple, à l'intégration aléatoire du matériel génétique transporté (provoquant des mutations pouvant mener à des cancers) (Young 2006). Tous ces facteurs mettent en doute l'innocuité des vecteurs viraux et peuvent compromettre leur utilisation chez l'humain.

1.2.4.2 Vecteurs non viraux

Dans cette section, nous ne traiterons que des vecteurs synthétiques développés pour l'administration *i.v.*, bien que plusieurs autres systèmes, incluant des formes dépôt à libération prolongée, existent. En plus de devoir être sécuritaires, ciblés et relativement faciles à préparer, les vecteurs synthétiques ont la lourde tâche d'égaliser, voire excéder, les efficacités de transfection obtenues avec les vecteurs viraux. Il n'est donc pas surprenant que les propriétés des vecteurs synthétiques les plus performants ressemblent étrangement à celles des vecteurs viraux.

Une classification sommaire des vecteurs synthétiques permet d'en différencier deux types. La première catégorie comprend les systèmes dont les composantes sont neutres ou anioniques et pour lesquels l'incorporation du matériel génétique se fait de manière physique. La seconde catégorie comprend les systèmes chargés positivement qui

interagissent de façon électrostatique avec le matériel génétique. Les vecteurs de la première catégorie incluent les liposomes (sensibles ou non au pH) et les nanoparticules (à base, entre autres, de poly(D,L-acide lactique) ou de poly(cyanoacrylate d'alkyle)) (Mundargi 2008; Toub 2006; Fattal 2001). Ces systèmes présentent plusieurs désavantages dont un très faible taux d'encapsulation. Dans le cas des liposomes, le matériel génétique hydrosoluble est incorporé dans la cavité aqueuse centrale de la vésicule. Malheureusement, lorsque que le diamètre des liposomes est ajusté de manière à assurer leur circulation prolongée dans le sang (~100 nm), le volume de cette cavité devient rapidement trop étroit pour accommoder de larges chaînes d'acide nucléique. Un deuxième désavantage de cette classe de vecteurs est qu'ils sont souvent préparés dans des conditions incompatibles avec le matériel génétique (*e.g.* contraintes de cisaillement élevées, solvants organiques, sonication, etc.).

La deuxième catégorie de vecteurs inclut les complexes polyioniques (à base de liposomes cationiques ou de polymères cationiques) et les micelles polyioniques. Ces systèmes résultent d'interactions électrostatiques spontanées entre le matériel génétique et les composantes cationiques de sorte que les taux d'incorporation obtenus sont élevés. Les interactions électrostatiques permettent de plus de condenser le matériel génétique en une structure compacte de petite taille, le protégeant ainsi contre l'action des nucléases. Finalement, ces systèmes étant auto-assemblés, leur préparation et leur utilisation s'en trouvent grandement facilitées. Ainsi, les prochaines sections porteront sur l'étude détaillée des propriétés physicochimiques des vecteurs cationiques utilisés à ce jour, en ayant pour objectif d'intégrer ces connaissances à l'élaboration d'un système de transfection performant.

2 Complexes polyioniques

2.1 Complexation - Forces impliquées

Le mécanisme de formation des complexes polyioniques à base de polymères cationiques et de matériel génétique (polyplexes) correspond à celui décrit depuis des décennies pour les polymères ioniques synthétiques, bien que la structure du matériel génétique puisse varier (Kabanov 1995). En solution, le polymère cationique et le matériel génétique sont associés à des contre-ions qui viennent partiellement neutraliser les charges distribuées le long de leur chaîne principale. La proximité du polymère cationique et du matériel génétique génère une force d'attraction entre les composantes de charges opposées, favorisant leur rapprochement et leur interaction (Fuoss 1949). La libération des contre-ions survenant suite à la complexation s'accompagne d'un gain d'entropie qui rend le processus énergétiquement favorable (Kakizawa 2002). La constante d'affinité entre les polyions dépend donc largement de la force ionique du milieu et est maximale à de faibles concentrations de sels (Mascotti 1990). Dans ces conditions, le gain apparent en entropie est significatif.

La formation de polyplexes est de plus favorisée par un effet de coopérativité. Sachant que la constante d'équilibre pour la formation d'une liaison électrostatique dépend de l'énergie d'interaction et de la probabilité de rencontre entre l'acide nucléique et le polymère (concentration), il est facile de voir que, si la formation du premier lien électrostatique constitue l'étape limitative, les liaisons subséquentes seront de plus en plus aisées à former (Figure 2-4). En fait, la constante d'équilibre pour la formation de la $n^{\text{ième}}$ liaison augmente de manière exponentielle et la formation des complexes polyioniques est d'autant plus favorable que la longueur de la chaîne des polyions augmente (Papisov 1989). À toutes fins pratiques, les chaînes polyioniques de plus de dix unités ioniques peuvent être considérées comme occupant deux états à l'équilibre, soit libre ou complètement complexé (bien que des défauts d'auto-assemblage puissent survenir) (Papisov 1989; Kabanov 1995).

Néanmoins, il est important de réaliser que, même si la coopérativité favorise considérablement la formation de complexes, ceux-ci ne sont pas statiques et des échanges entre les chaînes peuvent éventuellement se produire.

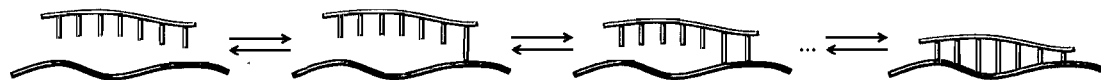


Figure 2-4. Représentation schématique de la formation de liaisons électrostatiques entre un brin d'ADN (**mauve**) et un polymère cationique (**vert**) par coopérativité. La formation de la $n^{\text{ième}}$ liaison est facilitée par l'interaction entre les groupements adjacents.

La neutralisation des charges lors de la complexation du matériel génétique avec le polymère cationique donne naissance à des domaines hydrophobes dont la taille et le nombre dépendent de la longueur des chaînes polyioniques et du ratio (ϕ) entre le nombre d'unités cationiques et anioniques (Kabanov 1995). À de faibles valeurs de ϕ (< 1), des complexes solubles présentant un excès de charges négatives sont obtenus. Dans ces conditions, et en supposant que la masse molaire du matériel génétique dépasse largement celle du polymère (*e.g.* dans le cas d'un plasmide), les chaînes cationiques se distribuent de façon uniforme entre les molécules d'ADN. Plus le nombre de chaînes cationiques augmente, plus la charge du complexe approche de la neutralité et plus le nombre de domaines hydrophobes augmente, jusqu'à l'atteinte d'un ratio critique ϕ_c ($\phi_c < 1$). Ce ratio correspond au moment où la création de domaines hydrophobes additionnels suivant l'ajout de polymère provoquerait la précipitation du complexe. Dès lors, une distribution asymétrique des chaînes cationiques devient thermodynamiquement favorable; l'addition de polymère mène à la formation simultanée de deux populations de complexes (stœchiométriques ou non) qui diffèrent en composition et solubilité (Kabanov 1995). Les complexes non stœchiométriques ($\phi = \phi_c$) demeurent en solution alors que les complexes stœchiométriques ($\phi = 1$) sont insolubles. Quand le nombre d'unités cationiques

contrebalance enfin le nombre d'unités anioniques ($\varphi = 1$), toutes les chaînes d'ADN et de polymère sont intégrées au sein de complexes stœchiométriques insolubles. Grâce à un effet de coopérativité, les chaînes polymères cationiques ajoutées en excès ($\varphi > 1$) peuvent continuer à interagir avec l'ADN pour finalement produire des particules solubles avec une charge nette positive (De Smedt 2000). Cette séquence d'événements se traduit par la formation de complexes solubles et ionisés à hauts et faibles ratios φ alors que des complexes neutres ayant tendance à s'agréger sont obtenus près du ratio φ_c (Figure 2-5).

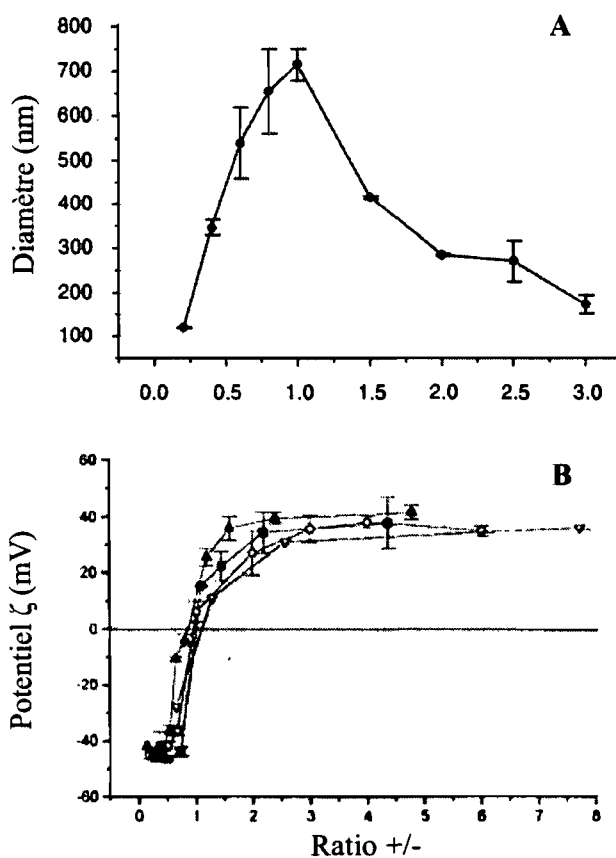


Figure 2-5. Effet du ratio de charges sur diverses propriétés des polyplexes. Le diamètre des polyplexes (A) est minimal en présence d'un excès d'ADN ou de polymère cationique. La solubilité des complexes est alors assurée par une charge de surface (B). Les complexes préparés à des ratios stœchiométriques sont neutres, provoquant la formation d'agrégats insolubles. (A) Polyplexes d'ADN et de poly(lysine). Adapté de Pouton (1998). (B) Polyplexes d'ADN et de poly(lysine) (■), d'un dendrimère de polyamidoamine intact (○) ou hydrolysé (▲) et de poly(éthylèneimine) (▽). Adapté de Tang (1997).

La nature des complexes formés varie selon le type de matériel génétique employé : ADN plasmidique, ODN simple brin ou ARN. En effet, la masse molaire des ADNs plasmidiques utilisés pour le transfert de gène peut facilement atteindre quelques millions de grammes par mole. En comparaison, celle des chaînes polymères cationiques dépasse rarement les centaines de mille de sorte que la longueur de l'ADN dépasse largement la

longueur de la chaîne polymère; la molécule d'ADN agit alors comme une molécule hôte. À l'inverse, les oligonucléotides utilisés pour la thérapie antisens présentent typiquement entre 15-22 pb (4500-6600 g/mol) de sorte que le polymère devient la molécule hôte. On peut s'attendre à ce que, pour un même ratio de charges, les caractéristiques des complexes formés diffèrent. De plus, la densité de charges des acides nucléiques à simple brin est inférieure à celle des acides nucléiques à double brin et la fraction de contre-ions en équilibre avec le groupement phosphate passe de 0,68 à 0,78, respectivement (Record 1976). Ainsi, il est à prévoir que l'affinité d'un ADN simple brin pour un polymère cationique sera réduite comparativement à un ADN double brin. Un tel phénomène a été observé pour un ODN simple brin linéaire comparé à un ODN de même longueur présentant une structure en épingle à cheveux (Sundaram 2005), illustrant l'effet de différences à prime abord inconséquentes sur les forces contrôlant la formation des complexes polyioniques.

Les lipoplexes (complexes résultant de l'interaction entre des liposomes cationiques et le matériel génétique) sont aussi des systèmes auto-assemblés et leur formation peut être décrite en deux temps (Elouahabi 2005). D'abord, les liposomes et le matériel génétique interagissent de manière électrostatique, avec plusieurs liposomes distribués le long d'une chaîne d'ADN. Ce processus est exothermique (tel que mis en évidence par calorimétrie isotherme à titrage), rapide, réversible (Pector 2000) et associé à un gain d'entropie, principalement suite à la libération de contre-ions (Pozharski 2003). Dans un deuxième temps, la neutralisation des charges élimine les répulsions entre les lipides cationiques, déstabilisant l'organisation de la bicouche lipidique et provoquant une fusion et un réarrangement des lipides (Pector 2000). Ce processus est coopératif, lent et endothermique.

À l'instar des polyplexes, les propriétés des lipoplexes sont affectées par le ratio φ . À faibles valeurs de φ , des complexes solubles présentant un excès de charges négatives sont générés. Dans ces conditions, et en supposant encore une fois que la masse molaire du matériel génétique dépasse largement celle du liposome, les structures observées par

microscopie à balayage électronique révèlent généralement la présence simultanée de complexes ADN/lipide et de segments d'ADN libres (Gershon 1993). L'ajout de plus de lipides augmente graduellement la proportion de complexes. Fait intéressant, la composition de ces complexes lipidiques (*i.e.* φ) demeure constante, suggérant que l'interaction des liposomes avec l'ADN n'est pas uniforme. Cette tendance a été mise en évidence par Xu *et al.* (1999) qui ont étudié le type d'agrégats obtenus en mélangeant des liposomes et de l'ADN plasmidique à différents ratios φ (0,125, 0,2 et 0,5). Pour ce faire, les auteurs ont séparé sur gradient de sucrose les complexes formés des chaînes d'ADN libres. Leurs données révèlent que les complexes isolés présentent tous la même composition (soit une charge positive pour 2,2 groupements phosphate) et ce, indépendamment du ratio de charges initial. Cette composition donne lieu à des structures stratifiées dans lesquelles les chaînes d'ADN sont séparées par des bicouches lipidiques. L'ajout de lipides supplémentaires permet de neutraliser suffisamment de charges pour induire la fusion des lipides et provoquer leur réorganisation. Les complexes obtenus près de ce ratio (*i.e.* $\varphi \sim 1$) sont fortement agrégés voire insolubles. L'ajout d'un large excès de liposomes donne lieu à des structures hétérogènes incluant des liposomes, des structures ADN/liposome fusionnées et des filaments d'ADN recouverts d'une bicouche lipidique (à l'image de spaghettis et boulettes de viande, tel que proposé par Sternberg (1994)). Le nombre et la longueur de ces filaments dépendent de la nature des lipides utilisés et de leur facilité à produire une bicouche avec un rayon de courbure très large (la chaîne d'ADN ayant un diamètre d'environ 2.5 nm) (Xu 1999). Xu *et al.* (1999) ont aussi étudié les agrégats obtenus après avoir préparé des lipoplexes à des ratios φ de 16, 8, 5 et 2. Cette fois, les liposomes excédentaires ont été éliminés sur gradient de sucrose. Leurs données semblent indiquer que les lipoplexes isolés sont aussi de composition définie, avec trois charges positives pour chaque groupement phosphate.

Il est à prévoir que l'incorporation du matériel génétique dans les polyplexes ou lipoplexes provoquera des changements significatifs de ses propriétés. Notamment, les chaînes d'ADN plasmidique, qui présentent typiquement des rayons hydrodynamiques de

l'ordre de quelques centaines de nanomètres en solution, sont condensées en structures compactes de quelques dizaines de nanomètres. Il est donc important de vérifier l'activité du matériel génétique libéré du complexe. Ceci est particulièrement critique pour les acides nucléiques dont la structure tridimensionnelle affecte l'activité thérapeutique (e.g. ribozymes (Scott 1996)).

2.2 Polyions utilisés pour la thérapie génique

Les premiers polymères à avoir été utilisés pour des applications en thérapie génétique ont été choisis parmi une sélection de produits « prêts à utiliser » synthétisés pour d'autres applications. Ainsi, le dextran-diéthyleaminoéthyle (dextran-DEAE), la poly(lysine) (PLys), le poly(éthylèneimine) (PEI) et les dendrimères de polyamidoamine (PAMAM) ont été utilisés avec des succès mitigés (Figure 2-6). Depuis, avec un bagage de connaissances croissant sur les facteurs qui affectent l'efficacité de transfection des polyplexes, plusieurs polymères cationiques ont été synthétisés et d'autres, naturels, sélectionnés de manière plus réfléchie. La structure de ces polymères peut varier de linéaire à branchée à dendritique. Quelques exemples de tels polymères (que nous qualifierons de « 2^e génération ») sont représentés à la Figure 2-6.

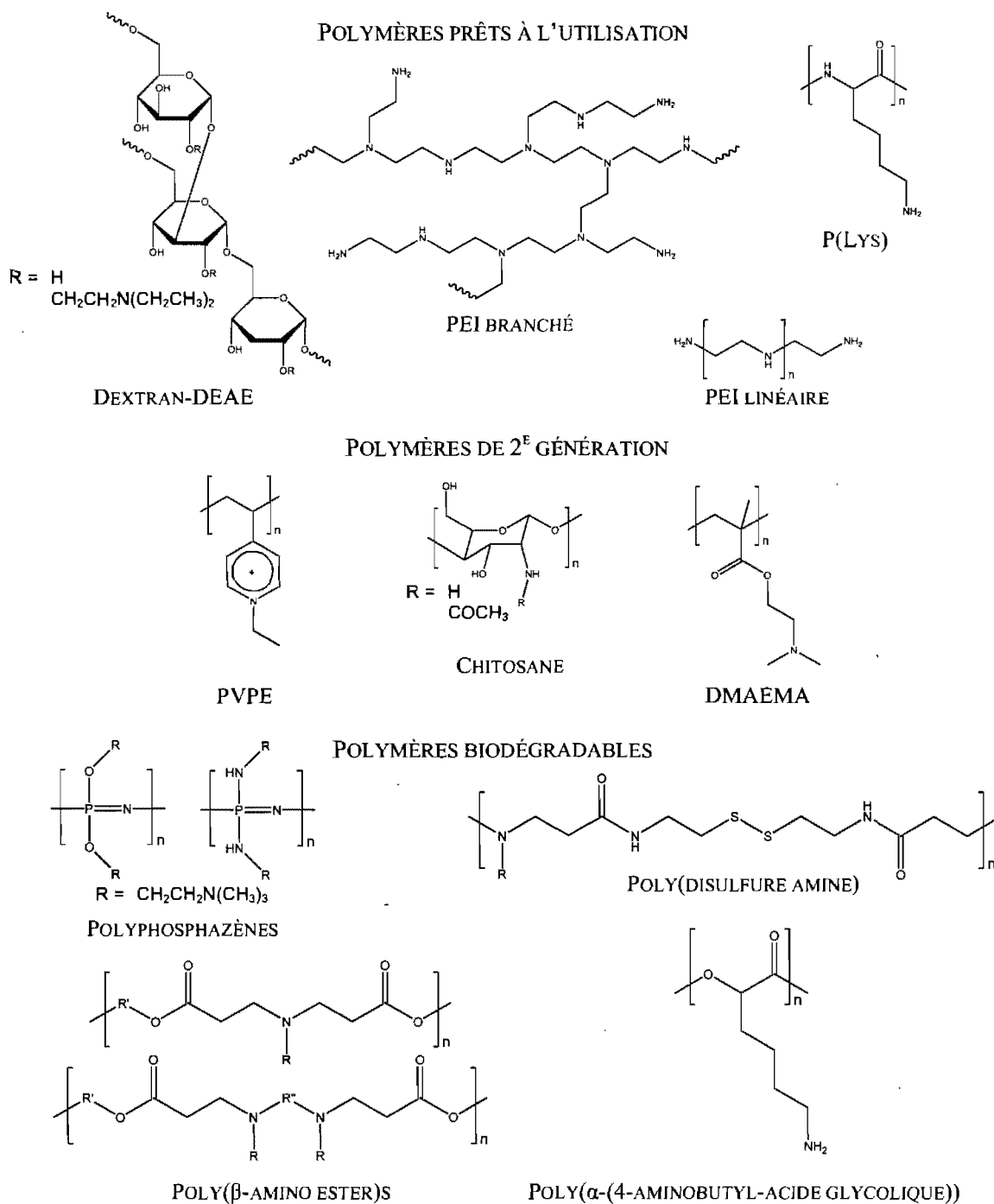


Figure 2-6. Structure de polymères cationiques communément utilisés en thérapie génique. Abréviations manquantes : poly(bromure de *N*-éthyl-4-vinylpyridinium) (PVPE) et poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle) (PDMAEMA).

Malheureusement, plusieurs de ces matériaux synthétiques ne sont pas biodégradables et leur masse molaire doit être limitée en-deçà de 40 000 g/mol pour permettre leur filtration glomérulaire et, ainsi, éviter leur accumulation *in vivo* (Seymour 1987). Afin de pallier ce problème, des efforts ont récemment été réalisés vers l'élaboration de polymères biodégradables. Une première approche consiste à préparer des polymères *de novo*, en incluant des unités hydrolysables ou sensibles à la réduction (*e.g.* ponts disulfures) le long de la chaîne principale du polymère. C'est le cas par exemple des polymères basés sur la structure des polyphosphazènes (Luten 2003), des poly(β -amino ester)s (Lynn 2000; Anderson 2003), des polyesters (Lim 2000b) ou des poly(disulfure amine)s (Ou 2008). Des exemples de tels polymères sont représentés à la Figure 2-6. Une deuxième approche vise à réticuler ou joindre bout-à-bout de courtes chaînes polymères non-biodégradables par des groupements qui seront clivés dans la cellule (Gosselin 2001; Kloeckner 2006; You 2007; Neu 2006). Notons ici que le choix de groupements hydrolysables en milieu acide est à éviter lorsqu'un polymère avec une forte capacité tampon (*e.g.* PEI) est utilisé. En effet, de tels polymères agissent comme des éponges à protons et empêchent l'acidification du milieu. Tel que nous le verrons plus loin, les polymères biodégradables peuvent induire la libération du matériel génétique dans la cellule et contrevenir aux problèmes de toxicité rencontrés pour la plupart des polymères cationiques.

Les lipides cationiques, quant à eux, sont caractérisés par un segment hydrophobe, une tête cationique et un groupement servant à joindre les deux fonctionnalités (ester, amide, carbamate, etc.). Le premier lipide utilisé avec succès pour des fins de transfection a été le *N*-[1-(2, 3-dioléyloxy)propyl]-*N,N,N*-triméthylammonium (DOTMA) (Felgner 1987). Depuis, des variations de la chaîne lipidique et de la tête cationique ont donné lieu à une vaste sélection de lipides cationiques. Par exemple, certains lipides ne possèdent qu'un seul groupement cationique comparativement à d'autres qui ont une tête polycationique (dioléoyl-oxypropyldiméthylammonium amidospermine (DOSPA), dioctadécylamidoglycylspermine (DOGS)), renforçant en théorie l'affinité pour le matériel

génétique (Figure 2-7). Les lipides cationiques sont rarement utilisés seuls mais plutôt en combinaison avec des lipides neutres tels le cholestérol ou avec des lipides fusogènes tels le dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE).

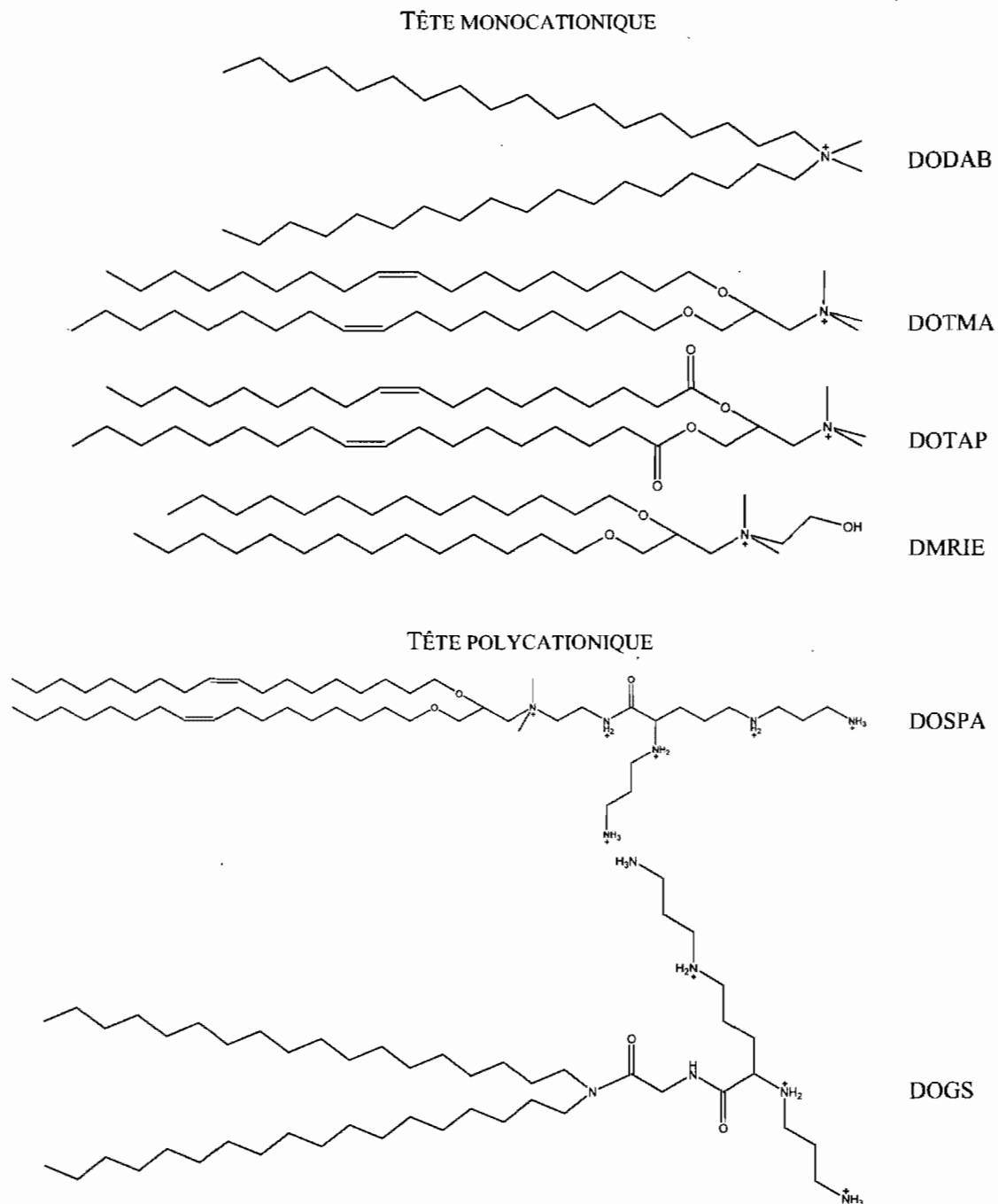


Figure 2-7. Structure de lipides cationiques communément utilisés en thérapie génique. Abréviations manquantes : bromure de dioctadécyltriméthylammonium (DODAB) et bromure de 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyéthylammonium (DMRIE).

2.3 Synthèse des polymères cationiques utilisés pour la thérapie génique

À l'exception de polymères tels le dextran ou le chitosane, qui sont des polymères naturels, la plupart des polymères utilisés pour la formation des polyplexes sont synthétisés en laboratoire. Idéalement, des méthodes de polymérisation contrôlées et vivantes, *i.e.* qui procèdent en l'absence de transferts de chaîne irréversibles ou de réactions de terminaison, sont préférables afin de bien contrôler la longueur et l'architecture des polymères obtenus. Ainsi, les polymères dérivés d'acides aminés (tels la PLys) sont préparés *via* la polymérisation de dérivés α -acide aminé-*N*-carboxyanhydrides par ouverture de cycle. Le PEI linéaire et les polyphosphazènes sont obtenus par polymérisation cationique alors que les poly(vinyle)s, quant à eux, sont synthétisés par des méthodes radicalaires contrôlées et vivantes. La polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (PRTA) et la polymérisation radicalaire par addition-fragmentation et transfert de chaîne réversible sont deux méthodes particulièrement adaptées à la préparation de polymères vinyliques ionisables (Heath 2007). La PRTA ayant été utilisée pour préparer les polymères utilisés dans cette thèse, une attention particulière sera portée à cette voie de polymérisation.

Typiquement, les polymérisations radicalaires contrôlées vivantes reposent sur l'instauration d'un équilibre rapide et dynamique entre de faibles quantités d'espèces radicalaires croissantes et une large majorité d'espèces dormantes de manière à limiter les réactions de terminaison. Dans le cadre de la PRTA, les espèces dormantes sont des dérivés halogénures alors que les espèces radicalaires sont générées en présence d'un catalyseur métallique (Coessens 2001; Matyjaszewski 2001). Le mécanisme de la PRTA est illustré au Schéma 2-1. En l'absence de réactions secondaires autres que les réactions de terminaison, la vitesse de polymérisation par PRTA est dictée par la constante d'équilibre, $K_{\text{éq}}$ ($K_{\text{éq}} = k_{\text{act}}/k_{\text{désact}}$). Si $K_{\text{éq}}$ est trop faible, la PRTA est lente voire irréalisable. En contrepartie, une $K_{\text{éq}}$ trop importante se traduira par une concentration élevée de radicaux et une augmentation des réactions de terminaison (Matyjaszewski 2001). Lorsque la réaction est

contrôlée, moins de 5% des chaînes en croissance subissent une réaction de terminaison. De plus, une croissance uniforme à partir de chaque amorceur est typiquement observée, permettant la polymérisation de polymères (hyper)branchés et de copolymères blocs.

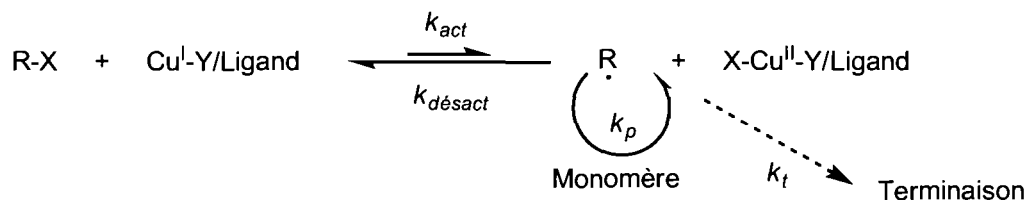


Schéma 2-1. Mécanisme de la PRTA catalysée par un complexe de cuivre. Les espèces radicalaires (actives) sont générées par l'entremise d'un processus d'oxydoréduction du complexe métal/ligand ($\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Y/Ligand}$, où Y représente un contre-ion, le plus souvent un halogène); le complexe métallique s'oxyde après abstraction de l'halogène (X) présent sur l'espèce dormante (R-X). Ce processus se produit avec une constante d'activation k_{act} et une constante de désactivation $k_{désact}$. Les chaînes de polymère croissent suite à l'addition des espèces radicalaires ($\text{R}\cdot$) aux monomères avec une constante de propagation k_p . Des réactions de terminaison (k_t) peuvent se produire.

Tel que suggéré au Schéma 2-1, la PRTA est une réaction impliquant plusieurs composantes (monomère, amorceur halogéné, complexe métallique (lui-même composé d'un métal et d'un ligand), additifs, etc.) et son succès résulte de l'optimisation de l'ensemble de ces composantes. Par exemple, chaque monomère possède un équilibre de transfert d'atome qui lui est propre et qui affectera la PRTA. Ainsi, les acrylates sont typiquement plus réactifs que les méthacrylates (k_p plus élevé) et produisent des polymères aux indices de polymolécularité plus élevés (Matyjaszewski 2001). D'autre part, la stabilité du radical formé par l'amorceur influence la constante d'amorçage de la réaction; idéalement, la vitesse d'amorçage devrait être supérieure à la vitesse de propagation de manière à favoriser une polymérisation uniforme à partir de toutes les chaînes d'amorceur. Certains groupements fonctionnels sont connus pour stabiliser les espèces radicalaires et augmenter l'activité de l'amorceur. Par exemple, les dérivés halogène de chaînes alkyles

tertiaires sont plus actifs que leurs analogues secondaires ou primaires. De plus, la nature de l'halogène affecte la force de la liaison R-X dans l'ordre R-Cl > R-Br > R-I (Braunecker 2007; Matyjaszewski 2001). Ainsi, les chlorures d'alkyles sont en théorie de moins bons amorceurs que les iodures d'alkyles. Le choix du ligand affecte aussi grandement l'équilibre de la PRTA. Les ligands à base groupements azote sont particulièrement efficaces lors de polymérisations catalysées par le cuivre. De façon générale, l'activité des ligands aminés diminue en fonction du nombre de sites de coordination ($N_4 > N_3 > N_2 \gg N_1$) et en fonction du nombre de carbones séparant les groupements amine ($C_2 > C_3 \gg C_4$) (Braunecker 2007; Matyjaszewski 2001). Finalement, d'autres facteurs externes dont la température et le solvant influencent l'équilibre de la PRTA en affectant, par exemple, la solubilité du complexe métallique ou la constante d'équilibre de la réaction.

Certaines inquiétudes ont été manifestées dans la communauté scientifique quant à la présence de cuivre résiduel et à l'innocuité des polymères préparés par PRTA pour des applications pharmaceutiques. L'implication réelle de la présence de cuivre résiduel semble, par contre, négligeable pour autant que des conditions de purification adéquates sont appliquées (passage des polymères sur silice, dialyse, etc.). Par exemple, Sant *et al.* (2004) ont mesuré un taux de cuivre résiduel inférieur à 0.09 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de polymère. Néanmoins, des efforts plus récents ont permis de réduire la quantité de cuivre nécessaire à la PRTA à des concentrations de l'ordre de 1-100 ppm (Pintauer 2008).

2.4 Préparation des complexes polyioniques

Les complexes polyioniques sont obtenus spontanément par simple mélange de leurs composantes (*i.e.* le matériel génétique + polymère cationique ou liposomes cationiques) et les conditions de préparation affectent grandement leurs propriétés. Ainsi, l'ordre d'addition des composantes, la concentration du milieu en matériel génétique, la

concentration du milieu en sels et la dilution post-complexation sont tous des facteurs qui peuvent influencer les propriétés des complexes et leur efficacité de transfection. Par exemple, Zelphati *et al.* (1998a) ont systématiquement étudié l'effet des conditions de préparation sur les propriétés finales de lipoplexes préparés à partir de liposomes de DMRIE/DOPE et d'un ADN plasmidique codant pour la β -galactosidase. Leurs résultats montrent qu'à de faibles ratios ϕ (*i.e.* < 1), l'ajout des liposomes à l'ADN a permis d'obtenir des polyplexes de l'ordre de 250-300 nm alors que de larges agrégats ($> 1,5 \mu\text{m}$) ont été produits lorsque l'ADN a été ajouté aux liposomes (présents en quantité minoritaire). De même, pour les complexes avec un excès de charges positives ($\phi > 1$), de meilleurs résultats ont été obtenus en ajoutant l'ADN à une grande quantité de lipides. La vitesse de mélange s'est avérée être un autre paramètre critique lors de la production de lipoplexes. Ainsi, les complexes produits à haute vitesse étaient généralement moins bien définis (populations multimodales) et plus volumineux que ceux obtenus à une plus faible vitesse de mélange. De plus, les auteurs ont pu mettre en évidence une relation entre la taille initiale des liposomes cationiques et la taille de leurs polyplexes. La distribution de taille des lipoplexes préparés à partir de vésicules multilamellaires était large, avec une population de particules agrégées de plus de $1 \mu\text{m}$, alors que celle obtenue pour les lipoplexes préparés à partir de liposomes extrudés (sur membrane de 100 nm) était plus étroite, avec des particules dont le diamètre moyen était inférieur à 200 nm. Pour les polyplexes, un comportement similaire est observé lorsque des polymères de grande masse molaire sont utilisés, produisant des complexes volumineux et de distribution hétérogène (Wolfert 1999). Finalement, l'étude de Zelphati (1998a) montre que la concentration en matériel génétique affecte aussi la taille des lipoplexes produits à un même ratio de charges. En réduisant la concentration d'ADN de 1 à 0.1 mM, ils ont pu réduire la taille et augmenter l'uniformité des complexes générés (Zelphati 1998a). Cette tendance a été corroborée par Dubuig *et al.* (1998) pour des polyplexes à base du même plasmide et d'un peptide cationique amphiphile. Cette fois, des polyplexes d'environ 40 nm de diamètre ont été obtenus à une concentration d'ADN de 20 $\mu\text{g/mL}$ comparativement à 130 nm à une

concentration de 400 µg/mL. Ces résultats ont des répercussions significatives dans le cadre d'études *in vivo* au cours desquelles des quantités importantes de matériel génétique sont injectées. Une attention particulière doit alors être portée à optimiser les propriétés de complexes préparés à haute concentration.

De tous les paramètres de préparation affectant les propriétés des complexes polyioniques, le ratio de charges demeure le plus critique puisqu'il est garant du taux d'incorporation du matériel génétique dans les complexes, de la stabilité colloïdale de la formulation (*cf.* Figure 2-5 et section 2.5.1) de même que de la toxicité du mélange final. L'électrophorèse sur gel est la méthode la plus souvent utilisée pour déterminer le taux d'incorporation du matériel génétique puisqu'elle permet de discriminer le matériel génétique complexé du matériel génétique libre en fonction de la taille (et de la charge). Cette technique peut de plus révéler la présence de chaînes polymères cationiques libres à des ratios azote/phosphate (N/P)¹ élevés (Lam 2004). D'autre part, l'incorporation du matériel génétique peut être mise en évidence par fluorescence en présence, par exemple, de bromure d'éthidium. Ce fluorophore est connu pour s'intercaler entre les bases de l'ADN double brin, générant une fluorescence de l'ordre de 20 fois supérieure à sa fluorescence intrinsèque. Le bromure d'éthidium peut aussi être utilisé pour marquer l'ARN et l'ADN simple brin même si, à masse égale, la fluorescence est beaucoup moins intense. En présence de polymère ou de liposomes cationiques, le matériel génétique se condense en une structure compacte au sein des complexes, empêchant l'intercalation du bromure d'éthidium. Ainsi, une absence de fluorescence est indicatrice de l'incorporation efficace du matériel génétique.

Typiquement, un excès de matériel cationique (N/P > 1,5) est nécessaire pour assurer le compactage et l'incorporation intégrale du matériel génétique dans les complexes

¹ Lors du calcul du ratio N/P, seuls les atomes d'azote provenant des groupements amine du polymère sont considérés. Les groupements phosphate, quant à eux, proviennent des acides nucléiques. Les ratios N/P sont souvent utilisés dans la littérature lorsque le polycation est une base faible et que son degré d'ionisation dans les complexes n'est pas connu.

polyioniques. En contrepartie, la valeur exacte du ratio N/P dépend de plusieurs facteurs dont la densité de charges du matériel cationique et, dans le cas des polymères, la longueur de la chaîne cationique. Par exemple, d'après une étude systématique de Wolfert *et al.* (1999) montrant l'effet de plusieurs paramètres sur les propriétés des polyplexes, il apparaît que la densité de charges joue un rôle crucial dans la capacité des polymères à condenser l'ADN. Ainsi, bien que tous les polymères d'une série de copolymères de méthacrylate de 2-(triéthylamino)éthyle (TMAEMA) et de méthacrylamide d'hydroxypropyle (HPMA) aient pu retarder la migration de l'ADN par électrophorèse sur gel au ratio N/P de 2, la présence du monomère neutre HPMA a perturbé le compactage de l'ADN, tel que suggéré par l'incapacité des polymères à forts ratios de HPMA d'exclure le bromure d'éthidium. Dans un même ordre d'idée, ces résultats indiquent que la nature de l'amine et, par extension, son degré d'ionisation affectent aussi la capacité des polymères à compacter l'ADN. De fait, pour une même masse molaire, un homopolymère comportant des amines primaires a permis de diminuer la fluorescence du bromure d'éthidium par 93% alors que son analogue présentant des amines tertiaires n'a pu induire que 15% d'extinction de fluorescence et ce, à un ratio N/P beaucoup plus élevé. Finalement, les données de cette étude montrent qu'une augmentation de la masse molaire facilite l'interaction entre les polymères et le matériel génétique, permettant une meilleure condensation de l'ADN à de plus faibles ratios N/P. L'effet de la masse molaire sur l'incorporation du matériel génétique a été corroboré par d'autres groupes (Dubruel 2002; Jin 2005).

Il ressort de cette discussion qu'un grand nombre de paramètres de préparation peut affecter les propriétés des complexes polyioniques. Ces variations rendent les comparaisons entre les diverses études difficiles et renforcent l'intérêt d'études systématiques ou d'études incluant des formulations de référence (contrôles).

2.5 Stabilité des complexes polyioniques

2.5.1 Stabilité colloïdale

La stabilité colloïdale des complexes polyioniques est cruciale *in vivo* dans la mesure où les vecteurs doivent maintenir une taille qui leur permette de circuler de manière prolongée dans le sang afin d'atteindre leur tissu cible. De même, *in vitro*, des complexes stables en solution sont désirables, si ce n'est que pour assurer la reproductibilité des essais de transfection. Tel que vu à la section 2.1, le ratio ϕ permet d'ajuster les propriétés (taille, charge de surface) et, par extension, la solubilité et la stabilité colloïdale des complexes. Ainsi, en maintenant un excès de charges positives ($\phi > 1$) ou négatives ($\phi < 1$), la répulsion stérique entre les charges présentes à la surface des particules assure leur dispersion. Les complexes sont typiquement préparés avec un excès de charges positives (plutôt que négatives) afin de maximiser l'incorporation du matériel génétique, de favoriser leur interaction avec les cellules, de promouvoir leur internalisation et d'augmenter leur efficacité de transfection.

Malheureusement, même lorsqu'ils présentent une charge de surface, les complexes polyioniques sont souvent sujets à l'agrégation au fil du temps. À cet effet, la nature du polymère cationique jouerait un rôle important dans les propriétés des complexes formés et, par conséquent, leur stabilité en solution. Par exemple, alors que le PEI et des dendrimères de PAMAM hydrolysés produisent des polyplexes de moins de 100 nm de diamètre qui demeurent stables en solution au fil des jours, la PLys et les dendrimères de PAMAM intacts génèrent des polyplexes de l'ordre du micromètre qui s'agrègent macroscopiquement en quelques heures et ce, même à des ratios N/P élevés (>6) (Tang 1997). De plus, l'augmentation de la force ionique lors de l'exposition des complexes au milieu physiologique (*in vitro* ou *in vivo*) peut avoir des effets significatifs sur leur stabilité en solution. En effet, l'écrantage des charges de surface par les sels réduit les forces de répulsion entre les particules de manière à entraîner l'agrégation des complexes (Wiethoff 2003). À l'instar des sels, diverses protéines sériques chargées négativement (*e.g.*

albumine) peuvent interagir de manière électrostatique avec les complexes cationiques, provoquant leur agrégation et compromettant leur stabilité colloïdale (Zelphati 1998b; Wiethoff 2003).

Il est possible de prévenir l'agrégation des complexes polyioniques en modifiant leur surface avec des chaînes polymères hydrophiles, flexibles et inertes. Le polymère le plus souvent utilisé à cette fin est le poly(éthylène glycol) (PEG). Sa présence à la surface des particules génère une couronne, ou barrière stérique, qui camoufle les charges des complexes tout en assurant leur solubilité et en augmentant leur stabilité en solution. Cette stratégie a permis d'augmenter à la fois la stabilité colloïdale de polyplexes et de lipoplexes (Choi 2001; Kursa 2003; Bally 1999). Dans le cas des polyplexes, les particules obtenues ressemblent à plusieurs égards aux micelles polyioniques. Ces dernières seront discutées en détail à la section 3.

2.5.2 Stabilité face à la dissociation

La stabilité des complexes face à la dissociation est critique autant *in vitro* qu'*in vivo*. En fait, si l'affinité entre le matériel génétique et le polymère cationique est trop faible, les complexes risquent de se dissocier prématurément dans le sang, compromettant à la fois leur temps de circulation, leur accumulation dans les cellules ciblées et leur capacité à protéger leur cargaison contre la dégradation enzymatique. Une fois dans la cellule, par contre, une affinité trop forte entre le vecteur et le matériel génétique pourrait empêcher la libération de ce dernier, compromettant ainsi l'activité thérapeutique (Gabrielson 2006). Il semble donc primordial de comprendre les facteurs qui affectent la stabilité des complexes afin de mieux en adapter les propriétés en vue d'une efficacité optimale.

Puisqu'ils résultent d'interactions électrostatiques, les complexes polyioniques sont sensibles aux ions de faibles masses molaires, aux polyions, de même qu'à tout facteur affectant leur degré d'ionisation. Par exemple, les complexes se dissocient lorsque la

concentration du milieu en sels de faibles masses molaires augmente significativement. Le plus souvent, les concentrations provoquant la dissociation des complexes dépassent 0,3 à 0,5 M (Kabanov 1998) de telle sorte que l'intégrité des vecteurs n'est généralement pas compromise aux conditions physiologiques. Par contre, des réactions d'échange avec des protéines sériques et les membranes cellulaires sont susceptibles de se produire (Zelphati 1996; De Smedt 2000). Ces réactions d'échange peuvent être reproduites *in vitro* en incubant les complexes avec des polymères anioniques, puis en mesurant la libération de matériel génétique par fluorescence ou gel d'électrophorèse. L'héparine, le dextran sulfaté, le poly(acide aspartique) (PAsp) ou le poly(acide méthacrylique) (PAMA) sont les polymères anioniques les plus utilisés à cette fin. Ce type d'étude a permis d'identifier les relations structure-activité clé affectant la stabilité des polyplexes face à la dissociation.

D'une part, il est possible de stabiliser les complexes face à dissociation en augmentant la masse molaire du matériel génétique ou du polymère cationique (Fischer 2004). En effet, nous avons vu à la section 2.1 que la formation des complexes polyioniques est d'autant plus favorable que le nombre d'interactions électrostatiques entre le matériel génétique et le polycation augmente (effet de coopérativité). De même, la densité de charges des acides nucléiques (Sundaram 2005), de la chaîne polymère (Arigita 1999; Rungsardthong 2003) et des liposomes cationiques affecte la force des interactions électrostatiques, les complexes les plus stables étant obtenus à haute densité de charges, alors que l'effet de coopérativité est maximal. En pratique, la densité de charges du matériel génétique diffère selon qu'un ADN simple ou double brin est utilisé. D'autre part, le degré d'ionisation et la présence de co-monomères neutres ou anioniques affectent le nombre de charges disponibles le long des chaînes polymères. Dans le cas des lipoplexes, la nature de la tête cationique et la proportion de lipides cationiques entrant dans la composition de la bicouche déterminent la densité de charges des liposomes. Finalement, il est possible d'augmenter la stabilité des complexes polyioniques en introduisant des composantes lipophiles afin de favoriser, en plus des interactions électrostatiques, la formation des domaines hydrophobes. Ainsi, les polyplexes préparés à partir d'ODNs PS

sont relativement plus stables que ceux de leurs analogues phosphodiester (Sundaram 2007).

À l'inverse, il est envisageable de provoquer la dissociation des complexes et la libération du matériel génétique dans la cellule en réponse à divers stimuli physiologiques incluant l'acidification rencontrée lors du passage des endosomes vers les lysosomes et la différence du potentiel réducteur entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme ou le noyau (Manickam 2006). Ou *et al.* (2008) ont pu, par exemple, provoquer la libération d'ADN plasmidique intact en traitant des polyplexes sensibles à la réduction avec du dithio-1,4-thréitol (un agent réducteur modèle). Ainsi, il est possible de profiter des avantages qu'offre, entre autres, une haute masse molaire sur la stabilité des complexes face à la dissociation dans le sang, tout en assurant une libération efficace dans la cellule.

Les relations structure-stabilité décrites ci-dessus résultent d'interactions faibles entre les composantes du vecteur et le matériel génétique. Il est d'autre part possible d'augmenter la stabilité des complexes en introduisant des liaisons covalentes. Par exemple, Oupicky *et al.* (2001) ont préparé des polyplexes de PLys et d'ADN réticulés par un agent de couplage bi-fonctionnel réagissant avec les groupements amine en excès présents à la surface des particules. Tel qu'anticipé, leurs données démontrent une stabilité accrue de ces polyplexes et confirment l'applicabilité de la réticulation. Néanmoins, une attention particulière doit être portée à la compatibilité des conditions de couplage avec les acides nucléiques. De plus, les conditions doivent être sélectionnées afin de favoriser les réactions intra- vs. inter-particulaires. L'utilisation de matériaux sensibles au pH ou aux conditions réductrices assure ensuite la libération du matériel génétique une fois dans la cellule (Neu 2006; Neu 2007).

2.6 Influence des propriétés physicochimiques des complexes polyioniques sur leur efficacité de transfection

2.6.1 Essais d'efficacité *in vitro*

Malgré une faible corrélation entre les données *in vitro* et *in vivo*, les essais de transfection *in vitro* demeurent une méthode de choix pour mettre au point et évaluer l'efficacité des complexes polyioniques. Tenter de comparer tous les essais *in vitro* réalisés à ce jour avec les différents polymères et lipides cationiques serait un tour de force compte tenu que d'infimes changements dans la préparation des complexes de même que dans les conditions de transfection (temps d'incubation, présence ou absence de sérum, concentration en ADN, etc.) peuvent se traduire par des changements d'efficacité dramatiques. De plus, la diversité du matériel génétique testé et les comportements variés des multiples lignées cellulaires ajoutent à la difficulté d'établir des relations entre les résultats obtenus dans la littérature. Néanmoins, certaines tendances générales se dégagent et seront décrites ci-dessous.

2.6.1.1 Voies d'internalisation

Considérant que, lors de la formation des lipoplexes, l'interaction entre le matériel génétique et les liposomes cationiques induit la fusion des lipides, il a initialement été supposé que les lipoplexes acheminaient le matériel génétique aux cellules suite à la fusion des lipoplexes à la membrane cellulaire. Depuis, il a été établi que l'endocytose était la voie principale d'internalisation des lipoplexes, tel que révélé, entre autres, par des expériences de co-localisation des lipoplexes et des vésicules d'endocytose (Zuhorn 2007). De même, les polyplexes sont internalisés par endocytose. De manière générale, l'utilisation de lipoplexes ou polyplexes présentant une charge résiduelle cationique améliore l'efficacité de transfection *in vitro* en favorisant l'interaction de ces derniers avec les composantes

anioniques de la cellule (De Smedt 2000). Par exemple, des études indiquent que les complexes cationiques interagissent de manière électrostatique avec les protéoglycanes sulfatés présents à la surface des cellules. En effet, Mislick *et al.* (1996) ont mis en évidence une réduction importante (53 fois) de l'efficacité de transfection de polyplexes de PLys et d'ADN plasmidique dans des cellules ovariennes mutantes de hamster chinois (*i.e.* déficientes en xylosyltransférase, un enzyme essentiel à la synthèse des protéoglycanes) comparativement aux mêmes cellules endogènes.

Plusieurs voies d'endocytose seraient impliquées dans l'internalisation des lipoplexes et des polyplexes et peuvent être divisées en deux grandes classes, celles dépendantes de la clathrine et celles indépendantes de la clathrine. L'endocytose dépendante de la clathrine est initiée par la formation, à la surface de la cellule, de puits recouverts de clathrine qui s'invaginent jusqu'à l'obtention d'une vésicule (étape qui correspond à l'internalisation proprement dite). Cette dernière se débarrasse alors de son manteau protéique avant de fusionner avec les endosomes précoces, dont le contenu transitera jusqu'aux lysosomes. L'endocytose indépendante de la clathrine, quant à elle, comprend les voies d'endocytose dépendante ou non de la cavéoline, la macropinocytose ou encore la phagocytose (bien que cette voie soit plutôt réservée aux cellules phagocytaires telles les macrophages). Compte tenu des différents rôles que tiennent ces voies d'internalisation dans la cellule, il est concevable que le mode d'internalisation des complexes affecte leur transformation intracellulaire et leur activité thérapeutique. En effet, de plus en plus d'études indiquent que toutes les voies d'internalisation ne sont pas gage d'efficacité de transfection. Par exemple, Rejman *et al.* (2005) ont montré que des polyplexes à base de PEI branché et d'ADN plasmidique étaient internalisés à la fois par endocytose dépendante de la clathrine et par endocytose dépendante de la cavéoline dans les cellules A549 et HeLa. Alors que l'inhibition de la voie dépendante de la clathrine par la chlorpromazine ou une diminution des concentrations de potassium n'a pas affecté l'efficacité de transfection des complexes, l'inhibition de la voie dépendante de la cavéoline par la filipine ou génistéine a complètement bloqué l'activité de transfection des

polyplexes, indiquant que cette voie est cruciale pour leur activité de transfection. Les auteurs expliquent ce résultat du fait que les complexes localisés dans les cavéoles ne rejoignent jamais les lysosomes alors que les complexes internalisés *via* les puits recouverts de clathrine seraient dégradés dans les lysosomes. Ces résultats ont été corroborés par von Gersdorff *et al.* (2006) qui ont, de plus, montré que les voies d'internalisation garantissant l'activité de transfection pouvaient varier d'une lignée cellulaire à l'autre. Ainsi, dans les cellules HUH-7 et COS-7, l'activité de transfection s'est vue compromise en présence d'inhibiteurs de la voie clathrine dépendante alors que l'inhibition de la voie dépendante de la cavéoline n'a pas affecté l'efficacité de transfection des complexes. Bien que ces données soient contradictoires, elles permettent tout de même de conclure que le niveau global d'internalisation ne reflète pas nécessairement l'efficacité de transfection d'une formulation.

Certaines études ont de plus tenté d'établir une relation entre la taille des particules et leur voie d'internalisation. Ainsi, Rejman *et al.* (2004) ont déterminé que les particules de moins de 200 nm étaient principalement internalisées par endocytose dépendante de la clathrine (et étaient acheminées vers les lysosomes) alors que les particules de l'ordre de 200-500 nm étaient internalisées par endocytose dépendante de la cavéoline. Grosse *et al.* (2005) ont obtenu des résultats considérablement différents et ont plutôt suggéré que les complexes de plus de 200 nm étaient internalisés par macropinocytose, les particules de taille moyenne par endocytose dépendante de la clathrine et les petits complexes (inférieurs à 100 nm), par endocytose dépendante de la cavéoline. Encore une fois, les résultats recensés dans la littérature sont contradictoires mais semblent néanmoins indiquer qu'une petite taille facilite l'internalisation par endocytose (Roth 2004). D'autre part, Ogris *et al.* (1998) ont montré que, bien que leur endocytose soit difficile, les grosses particules sont pourtant efficaces *in vitro*. Ces derniers ont préparé des polyplexes de petite (30-60 nm) et de grande taille (jusqu'à 1 μm) à un ratio N/P constant en ajustant la force ionique du milieu. Leurs résultats suggèrent que, selon la lignée cellulaire, les grosses particules formées en présence de sel induisent une activité de transfection de 10 à 500 fois

supérieure aux petites particules. De par leur taille, les particules plus grosses échappent aux mouvements browniens et sédimentent sur les cellules, augmentant ainsi leur concentration à la surface des cellules et leurs contacts avec ces dernières.

2.6.1.2 Libération du matériel génétique dans la cellule

Suivant l'internalisation des complexes dans les endosomes ou cavéoles, deux processus essentiels à l'activité de transfection doivent se produire. Premièrement, le matériel génétique (sous forme libre ou complexé) doit s'échapper des vésicules d'endocytose afin d'atteindre sa cible thérapeutique. Deuxièmement, le matériel génétique qui est toujours complexé doit se détacher du vecteur afin d'exercer son action. Le passage du matériel génétique des endosomes ou cavéoles au cytoplasme demeure l'une des étapes les plus critiques de la transfection avec les polyplexes (De Smedt 2000). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer et optimiser la distribution des polyplexes dans le cytoplasme. Une première hypothèse veut que les polyplexes portant un excès de charges positives interagissent directement avec la membrane pour provoquer des défauts dans la bicouche (Wiethoff 2003; Zuhorn 2007). Par exemple, les données de Zhang *et al.* (2000) suggèrent qu'en interagissant avec les lipides anioniques de la membrane cellulaire, les dendrimères de PAMAM (générations 4 à 7) induisent une déformation de la bicouche lipidique, un changement de l'organisation des lipides vers la phase hexagonale inverse, suivi par une déstabilisation de la bicouche lipidique qui permettrait la fuite du matériel génétique. D'autre part, il est envisageable qu'un contact intime entre le polymère cationique et les composantes de la membrane (*e.g.* les glycosaminoglycanes) déplace suffisamment de molécules d'eau pour causer une déshydratation locale de la membrane, déstabilisant ainsi la structure moléculaire de la bicouche et permettant le passage des complexes par diffusion (Zuhorn 2007).

Des mécanismes reposant sur l'acidification des endosomes ont aussi été proposés et servent à expliquer l'activité observée dans les cas où la voie d'internalisation par

endocytose dépendante de la clathrine est responsable de l'activité de transfection. En effet, les endosomes possèdent des pompes (ATPases) qui transportent des protons de manière active contre un gradient de concentration du cytoplasme vers l'intérieur, provoquant l'acidification de la vésicule. L'hypothèse la plus répandue veut que les polymères cationiques présents dans les endosomes bouleversent le cours normal de l'acidification en tamponnant l'organelle et en forçant l'ATPase à pomper plus de protons afin d'atteindre le pH désiré (Pack 2005; Wiethoff 2003). Un influx de contre-ions se produit parallèlement à l'entrée de protons et entraîne une augmentation de la pression osmotique de l'endosome, la lyse de la membrane et l'expulsion des complexes vers le cytoplasme. Ce mécanisme, connu sous le nom d'« éponge à protons » a été décrit pour la première fois par Boussif *et al.* (1995) et expliquerait la grande efficacité de transfection des polyplexes de PEI et de dendrimère de PAMAM, deux polymères à forte capacité tampon qui sont faiblement ionisés à pH physiologique (le pK_a de l'amine primaire du PEI est 5,5 alors que les pK_a s des amines primaires et tertiaires des dendrimères de PAMAM sont 6,9 et 3,9, respectivement) (Roth 2004; De Smedt 2000). L'effet éponge à protons a été confirmé par plusieurs données expérimentales. Par exemple, des études de transfection en présence de bafilomycine A1, un inhibiteur des pompes à protons, révèlent que l'acidification est cruciale à la fuite de l'ADN des endosomes/lysosomes et à l'activité de transfection du PEI (Kichler 2001; Merdan 2002). De plus, lors d'une étude très convaincante où ils ont eu recours à des chromophores sensibles au pH ou à la concentration en ion chlorures, Sonawane *et al.* (2003) ont pu directement observer que le PEI et les dendrimères de PAMAM internalisés dans des vésicules de macropinocytose (visibles au microscope) tamponnaient le pH de ces organelles tout en provoquant une accumulation d'ions chlorure. Parallèlement à ces effets, les auteurs ont observé un gonflement et une fragilisation des vésicules, en conformité avec l'effet éponge à protons.

Depuis, un nombre grandissant d'études visant à synthétiser et tester des polymères à forte capacité tampon a vu le jour (Funhoff 2004; Dubruel 2004). Les résultats de ces études sont rarement à la hauteur des attentes et une controverse s'est installée quand à la

validité et à l'importance réelle de l'effet éponge à protons dans l'activité de transfection. Par ailleurs, une analyse plus profonde des résultats obtenus à ce jour indique que d'autres facteurs entreraient en jeu. Par exemple, il a été proposé que la flexibilité de la chaîne polymère, plus que sa capacité tampon, affecte l'efficacité de transfection. Le gonflement et la déstabilisation des endosomes résulteraient ainsi d'une extension des chaînes polymères internalisées suite à l'ionisation de leurs groupements cationiques. Cette hypothèse permet d'expliquer que, bien qu'ils aient une bonne capacité tampon, les dendrimères de PAMAM « rigides » sont de mauvais agents de transfection comparativement à leurs analogues hydrolysés flexibles (Tang 1997).

Dans le cas des lipoplexes, la déstabilisation de l'endosome est aussi synonyme de dissociation des complexes et de libération du matériel génétique. Les travaux du groupe de Szoka avec des lipoplexes d'ADN plasmidique et d'ODN (Xu 1996; Zelphati 1996) ont permis de proposer un mécanisme pour la libération du matériel génétique à partir de complexes lipidiques. Ainsi, les lipoplexes confinés dans les endosomes induiraient un « flip-flop » des lipides anioniques préférentiellement retrouvés sur la face cytoplasmique de la membrane endosomale, provoquant ainsi une déstabilisation de la bicouche. Les lipides membranaires diffuseraient, de plus, de façon latérale afin d'interagir avec les lipides cationiques des polyplexes, de générer des paires ioniques neutres et de provoquer la fusion des lipides. Une fois initié, le processus de déstabilisation et de fusion serait autocatalytique dans la mesure où il faciliterait le « flip-flop » d'autres lipides anioniques et augmenterait l'affinité entre les composantes cationiques et anioniques par un effet combiné de coopérativité et d'interactions hydrophobes. Ce mécanisme se solderait par la dissociation du matériel génétique et sa fuite dans le cytoplasme. Plus tard, Hafez *et al.* (2001) ont suggéré que la formation de paires ioniques neutres entre les lipides cationiques et anioniques produit des chaînes dont la tête occupe un volume nettement inférieur à celui calculé à partir de leur contribution volumique individuelle. Ainsi, les paires lipidiques présentent une forme conique et adoptent une structure en phase hexagonale inverse responsable de la déstabilisation des endosomes. De même, l'utilisation

de lipides s'organisant en phase lamellaire inverse comme le DOPE et le cholestérol facilite la déstabilisation des endosomes et la libération des acides nucléiques (Hafez 2001; Wiethoff 2003).

Plusieurs observations indirectes corroborent le mécanisme proposé par Szoka. Notamment, Marcusson *et al.* (1998) ont montré que, suite à la capture cellulaire de polyplexes de DOTAP et d'un ODN inhibant la PKC- α , les lipides cationiques demeurent localisés dans les endosomes et lysosomes alors que l'ODN est rapidement détecté dans le noyau des cellules.

Si les polyplexes et les lipoplexes présentent tous deux la capacité de déstabiliser les endosomes, les mécanismes par lesquels ils agissent demeurent relativement inefficaces et différentes stratégies visant à augmenter la disponibilité cytoplasmique du matériel génétique ont été développées. Ces dernières incluent l'addition d'agents lysosomotropiques dans le milieu de transfection (*e.g.* chloroquine) et l'incorporation de peptides ou polymères membrano-lytiques dans les complexes afin de favoriser le passage de l'endosome au cytoplasme (De Smedt 2000; Pack 2005). Les peptides et polymères membrano-lytiques sont particulièrement prometteurs considérant que leur utilisation est compatible avec des applications *in vivo*. L'activité des peptides membrano-lytiques résulte d'un changement de leur conformation de pelote statistique à hélice α suivant l'acidification rencontrée lors du transit des endosomes précoces aux lysosomes (Wong 2007). La conformation en hélice α favorise l'interaction de ces peptides avec la membrane endosomale/lysosomale, provoquant une déstabilisation de l'organelle cellulaire et la fuite de son contenu. De même, les polymères membrano-lytiques changent de conformation en réponse au pH du milieu. Ces polymères possèdent à la fois des groupements acide carboxylique et des groupements hydrophobes et évoluent de pelotes statistiques en globules suite à une baisse du pH. En milieu acide, les globules hydrophobes se partagent dans la membrane endosomale et la déstabilisent. Ainsi, après avoir incorporé un copolymère d'AMA membrano-lytique dans des lipoplexes de DOTAP et d'un ODN,

Yessine *et al.* (2006) ont observé une forte accumulation de l'ODN dans le noyau de cellules A549 et ont mesuré une activité antisens accrue.

2.6.1.3 Balance efficacité et toxicité

Les caractéristiques des complexes polyioniques qui augmentent l'efficacité de transfection *in vitro* ont souvent un effet néfaste sur la cytotoxicité des formulations. Ainsi, l'optimisation de l'activité de transfection vise à trouver le meilleur compromis entre efficacité et innocuité. Par exemple, il est possible d'augmenter l'efficacité de transfection des polyplexes et des lipoplexes en augmentant leur charge de surface. Par contre, ce gain d'activité se fait au détriment de la viabilité des cellules. Cette dualité se traduit par une courbe dose-réponse entre le ratio N/P et l'efficacité de transfection en forme de cloche (van de Wetering 1997). Plus particulièrement, van de Wetering *et al.* (1997) ont établi que le nombre de cellules transfectées était maximal pour des viabilités cellulaires variant de 40-70% et ce, indépendamment du polymère utilisé (dextran-DEAE, PLys, PDMAEMA) ou de sa masse molaire (PDMAEMA de 4000 à 817 000 g/mol). La cytotoxicité des polyplexes préparés à des ratios N/P élevés serait due à la présence de chaînes polymères ou de liposomes cationiques non complexés.

D'autre part, plusieurs études montrent qu'une augmentation de la masse molaire des polymères cationiques permet d'augmenter l'activité de transfection des polyplexes (van de Wetering 1997; van de Wetering 1998; Wolfert 1999). Encore une fois, cette activité accrue se fait au dépend de l'innocuité, imposant une limite quant à la masse molaire qui puisse concrètement être utilisée. Le recours à des polymères biodégradables permet de diminuer la cytotoxicité des complexes et ainsi d'utiliser des polymères de haute masse molaire afin de maximiser l'efficacité de transfection (You 2007).

2.6.2 Essais d'efficacité *in vivo*

Plusieurs facteurs affectent l'efficacité de transfection des complexes polyioniques *in vivo* et découlent de l'excès de charges cationiques présent à la surface des vecteurs. Ainsi, une fois dans le sang, les complexes cationiques interagissent avec une panoplie de composantes sériques, déclenchant des événements aboutissant à leur inactivation. D'une part, les complexes polyioniques peuvent interagir avec les protéines du système du complément, protéines qui sont responsables de l'élimination des pathogènes *in vivo*. La nature du polymère ainsi que celle des lipides et du matériel génétique sont autant de facteurs qui affectent le potentiel des complexes polyioniques à activer le système du complément. À cet effet, Planck *et al.* (1996) ont montré que les lipoplexes d'ADN et de DOTAP déjouaient plus facilement le système du complément que les polyplexes à base de PLys, PAMAM et PEI ou que les lipoplexes comprenant le lipide à tête polycationique DOGS. Malgré ces différences (mesurées *in vitro*), il reste qu'en pratique les complexes polyioniques sont rapidement reconnus et éliminés de la circulation, avec ~5% de la dose injectée circulant après 30 min (Ogris 1999; Verbaan 2004; Litzinger 1996). D'autre part, l'interaction des complexes avec les composantes plasmatiques peut entraîner la neutralisation et l'agrégation des particules, affectant ainsi leur biodistribution. En effet, les complexes agrégés s'accumulent rapidement dans les poumons où ils oblitèrent les capillaires sanguins et peuvent entraîner une toxicité aiguë (Litzinger 1996; Ogris 1999). Ainsi, Ogris *et al.* (1999) ont rapporté la mort de 50% des souris traitées par la voie *i.v.* avec 50 µg de complexes de transferrine-PEI et d'ADN plasmidique. De plus, certaines composantes sériques peuvent entraîner la dissociation des complexes polyioniques, particulièrement des polyplexes (Roth 2004). Zelpathi *et al.* (1998b) ont par exemple montré que l'acide oléique et l'héparine pouvaient déloger le matériel génétique aux concentrations retrouvées dans le sérum. La stabilisation des complexes par des liaisons covalentes (réticulation) permet de contrecarrer cet effet et d'augmenter les temps de circulation du vecteur (Lechardeur 1999; Neu 2007). Finalement, une fois dans la cellule, d'autres facteurs diminuent l'efficacité de transfection. Par exemple, la neutralisation des

complexes diminue leur association avec la membrane alors que leur agrégation les rend difficiles à internaliser (De Smedt 2000; Roth 2004). De plus, dans le cas des lipoplexes, la présence de protéines à la surface des complexes interfère avec le mécanisme permettant la déstabilisation des endosomes et la libération du matériel génétique (Zelphati 1998b).

En définitive, les résultats obtenus *in vivo* pour les complexes polyioniques sont habituellement décevants et ont suscité le développement de vecteurs plus performants. Particulièrement, il est possible de remédier à plusieurs des problèmes rencontrés *in vivo* avec les complexes polyioniques en utilisant des systèmes dont la surface est recouverte d'une couronne de polymère inerte et pour lesquels les charges cationiques sont masquées. Par exemple, des polyplexes recouverts de chaînes de PEG (polyplexes PEGylés) ont été préparés et ont permis d'augmenter significativement le temps de circulation des particules (Ogris 1999; Verbaan 2004). Akinc *et al.* (2008) ont, pour leur part, préparé une banque d'environ 700 analogues de lipides cationiques (dits « lipidoïdes ») qu'ils ont formulés en lipoplexes PEGylés. Leurs résultats montrent que, selon la composition de l'agent cationique, les lipoplexes PEGylés peuvent présenter une activité thérapeutique spécifique dans le foie, les poumons et les macrophages péritonéaux lorsqu'administrés par la voie *i.v.*

3 Micelles polymères

Les micelles polymères sont des systèmes auto-assemblés présentant une structure cœur-couronne. La couronne est habituellement composée d'un polymère hydrophile nonionique et assure la solubilisation du cœur qui, lui, résulte soit de la ségrégation de chaînes polymères hydrophobes ou de l'interaction entre des chaînes polymères de charges opposées. Alors que le cœur hydrophobe des micelles polymères amphiphiles sert de réservoir pour la solubilisation d'un principe actif lipophile, les micelles polyioniques permettent de complexer de manière efficace un principe actif polyionique tel l'ADN. De par leur neutralité, solubilité et stabilité colloïdale en solution, les micelles polyioniques

sont particulièrement attrayantes pour l'administration de matériel génétique *in vivo*. Les micelles polyioniques, de même que les micelles polymère amphiphiles, sont discutées plus en détail dans les prochaines sections d'après un texte publié dans *Challenge in drug delivery for the new millenium* (Dufresne 2003). Cet article de revue, intitulé « Block Copolymer Micelles – Engineering Versatile Carriers for Drugs and Biomacromolecules » est reproduit ici avec la permission de Gattefossé.

3.1 Abstract

Amphiphilic block polymer chains are known to self-assemble in aqueous milieu to yield polymeric micelles. Water-soluble polymeric micelles present an architecture in which the hydrophobic blocks associate to form an inner core protected by a palisade of hydrophilic segments. Hydrophobic interactions generally are the driving force behind the micellization processes. However, the self-association of polymeric chains can involve additional forces. For example, electrostatic forces were shown to induce the complexation and neutralization of oppositely-charged polymers, thereby allowing the formation of polyion complex micelles. Both polymeric micelles and polyion complex micelles have fairly narrow size distributions with diameters ranging from 10 to 100 nm. Interest has recently been raised in exploiting these micelles as nanocarriers for either hydrophobic or electrostatically-charged drugs. Although both formulations are very promising for various applications in drug delivery, they suffer from their instability in infinitely dilute solutions (such as conditions encountered following their administration). The micelles can be stabilized by physically or chemically cross-linking the core. An alternative strategy to circumvent micellar instability consists in synthesizing unimolecular polymeric micelles. Unimolecular polymeric micelles are amphiphilic star-block copolymers or dendrimers that are intrinsically stable since they consist of a single macromolecule. This paper highlights recent advances by our laboratory as well as other research groups in the preparation,

characterization and pharmaceutical evaluation of polymeric micelles, polyion complex micelles and unimolecular polymeric micelles.

Keywords: Polymeric micelles, polyion complex micelles, block copolymers, star-shaped polymers, drug targeting, stimuli-responsive polymers.

3.2 Introduction

Amphiphilic block polymer chains are known to self-assemble in aqueous milieu to yield polymeric micelles (PM). Water-soluble PM present an architecture in which the hydrophobic blocks associate to form an inner core protected by a palisade of hydrophilic segments. Hydrophobic interactions generally are the driving force behind the micellization processes (Figure 2-8A). However, the self-association of polymeric chains can involve additional forces. For example, electrostatic forces were shown to induce the complexation and neutralization of oppositely-charged polymers, thereby allowing the formation of polyion complex micelles (PICM) (Figure 2-8B). Both PM and PICM have fairly narrow size distributions with diameters ranging from 10 to 100 nm.

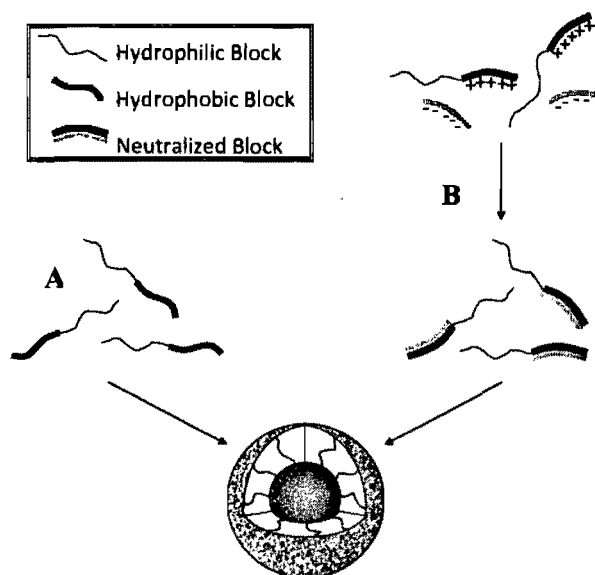


Figure 2-8. Self-assembly of polymeric micelles (A) and polyion complex micelles (B) in an aqueous milieu.

Interest has recently been raised in exploiting these micelles as nanocarriers for either hydrophobic or charged biomacromolecules. The core/shell structure accounts for their qualities as efficient drug delivery systems. Firstly, the core of PM provides a reservoir, or cargo space, where hydrophobic drugs can be solubilized whilst the corona confers hydrophilicity to the overall system. Sequestration of a labile drug inside the micellar core further protects it from premature degradation, either chemical or enzymatic. Secondly, amphiphilic block copolymers can be designed to exhibit very low toxicity and immunogenicity. PM then come as an attractive alternative to low molecular weight surfactants such as Cremophor[®] EL, which is associated to marked side-effects (van Zuylen 2001). Thirdly, a highly-hydrated shell composed of flexible, non-ionic polymer chains can prevent the adsorption of opsonins on the carrier, thereby reducing its capture by the mononuclear phagocyte system, prolonging its circulation time and modifying its biodistribution (Jones 1999). Lastly, PM can be used to target a drug, either passively or actively. On one hand, passive targeting takes advantage of the fact that tumors

present leaky vasculatures (where small micelles can spontaneously penetrate) and impaired lymphatic drainage; long circulation times allow for the selective accumulation of micelles in these areas. On the other hand, active targeting is achieved by modifying the micelle so as to favor its chemical recognition by a specific cell receptor or to induce a response to external stimuli such as pH or temperature variations.

Despite being conceptually attractive, PM suffer from instability towards infinite dilution (condition arising from their administration). It is crucial that the PM retain their integrity *in vivo* in order to meet qualities such as long circulation time, passive accumulation or controlled drug release. This review addresses efforts made by our laboratory as well as other research groups to rationalize the dynamics of micellization for the advised preparation of nanocarriers with tailored pharmaceutical activity.

3.3 Dynamics of micellization

A simplistic appraisal of micelle formation is to state the micellization process as a fine tuned equilibrium between attractive and repulsive forces above a critical concentration. The attractive forces are associated to the core-forming block of the copolymers and can be either purely hydrophobic or involve other forces such as electrostatic interactions. Regardless of the nature of the attraction, the segregation or coalescence of polymeric chains is entropically driven. This somewhat unexpected net gain in entropy originating from an ordering process can be rationalized when considering the solvent contribution. In the case of PM, it is argued that solvent molecules organize themselves to form a clathrate cage around the hydrophobic segment of the copolymer chains and that this acquisition of structure decreases the entropy of water (Atkins 1997). To offset this general increase in free energy, the hydrophobic segments tend to withdraw from the aqueous phase and herd into small clusters or micelles. Segregation of the non-polar moieties decreases their contacts with water molecules, thereby increasing the

entropy of the solvent. The formation of PICM, on the other hand, can be best described as the sequential complexation of the polyions followed by the self-association of the neutralized condensates into micelles. The driving force for the cooperative electrostatic interactions between polyions in aqueous solution comes from the entropic gain associated with the release of low molecular weight counter ions (Kakizawa 2002). Condensation of the polyions yields neutral and water-insoluble moieties that self-assemble in the same fashion as copolymers featuring a hydrophobic block.

PM are generally known to be small colloids with narrow size distributions such that there must be forces that counteract the attraction of the polymeric chains and prevent their coalescence. These repulsive forces are mostly brought about by the presence of the shell-forming blocks of the copolymers. The hydrophilic segments of the block copolymers generally present large degrees of hydration and large excluded volumes. They contribute to favor micelle formation by minimizing the interactions between the core and external medium and stabilizing the hydrophobic/hydrophilic interface (Allen 1999). Hydrophilic segments are also known to limit or hinder micelle growth by providing steric repulsions between the hydrated chains. These repulsive forces further hamper secondary aggregation and coagulation by overwhelming the attractive forces operating between micelles. The stabilizing role of the hydrophilic moieties can alternatively be understood in terms of entropy. An increase in the association number will lead to an increased density of the corona and cause the shell-forming segments to assume a more stretched conformation. Elongation of the hydrophilic segments reduces their mobility and accounts for adverse decreases in conformational entropy (Kataoka 2001).

It can now be seen how factors such as the nature of the hydrophobic block (being more or less hydrophobic) or hydrophilic segment (neutral vs. charged) and their respective length may alter the attraction/repulsion balance and dictate the stability of the resulting micelles. For instance, copolymers displaying high hydrophilic block surface densities will produce small particles (Dunn 1994). Similarly, copolymers bearing either more hydrophobic segments (Ranger 2001) or a larger hydrophobic/hydrophilic ratio

(Jeong 1998) will associate more readily as PM in water. Understanding the underlying dynamics of micellization clearly provides insight for the design of micelles with tailored properties. In this light, efforts have been dedicated to the preparation of micelles with increased micellar stability.

3.3.1 Micelle stability

Micelle stability was shown to have a great impact on circulation times and eventually on the release characteristics of a system. Early dissociation of the micellar structure following *in vivo* dilution would certainly impair delivery of a drug to its target site and potentially cause toxicity problems associated with a burst in drug release. Micelle stability can be assessed with respect to two different aspects, namely thermodynamic stability and kinetic stability. A micelle is thermodynamically stable with respect to its micelle/unimer equilibrium above a critical association concentration (CAC); dilution of a polymer solution below the CAC destabilizes micelles and favors the unimer formation. Generally speaking, the more hydrophobic or the longer the water-insoluble block, the greater the entropy gain ensuing from micellization and the lower the CAC. In principle, several approaches can be used to evaluate the CAC. These rely on the detection of discontinuities in the physical properties of a solution (such as molar conductivity, surface tension or osmotic pressure) (Atkins 1997). If this holds true for low molecular weight surfactants (which usually exhibit critical micelle concentrations (CMCs) in the mM range), it can rarely apply to copolymer solutions as they present CACs at concentrations generally too low for any of these changes to be detected experimentally. A favored method involves the use of fluorescent probes such as pyrene, for which increases in fluorescence intensity and changes in the fine structure of the emission spectra can be associated to the partitioning of the probe into the non-polar core of micelles (Jones 1999). Lately, Raju *et al.* (2001) have evaluated the application of isotherm titration calorimetry (ITC) for the determination of the CAC. The CAC is readily extracted from enthalpograms,

which are generated by plotting the heat evolved against polymer concentration (Figure 2-9). ITC is an attractive technique in that a single measurement not only yields the CAC but also the enthalpy, entropy and heat capacity of micellization. As the titration proceeds through the dilution of a concentrated polymer solution, the instance of micelle dissociation can only be evaluated for systems that are in equilibrium (or kinetically unstable).

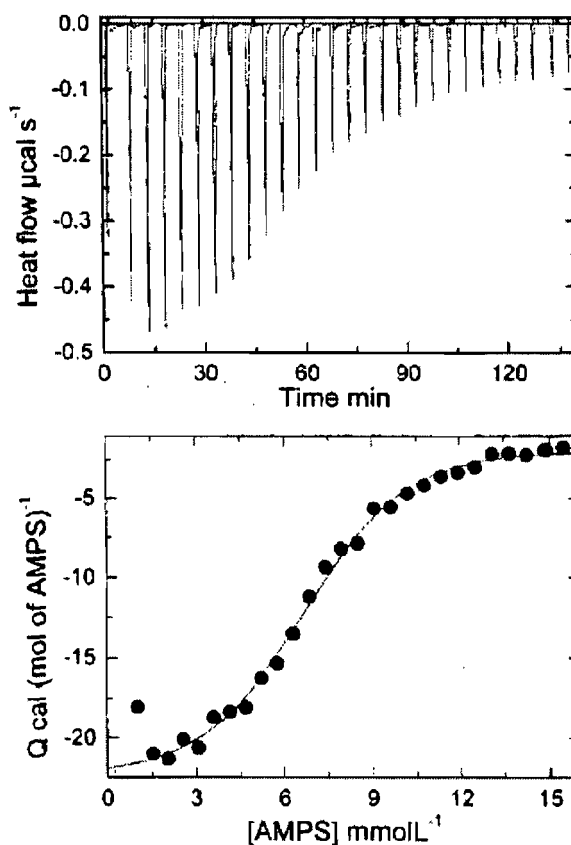


Figure 2-9. Titration of a solution of poly((2-acrylamido)-2-methylpropanesulfonic acid)(AMPS)-*graft*-dodecyl₂₀ (20 gL^{-1} , $25 \text{ }^\circ\text{C}$, in 0.2 M NaCl). The top portion represents the calorimetric trace (heat flow vs. time). The bottom part depicts the corresponding enthalpogram [reaction enthalpy vs. concentration of polymer (AMPS units) in the sample]. The enthalpy of demicellization can be directly extracted from the enthalpogram. Adapted from Raju (2001) with permission.

The kinetic stability of micelles refers to the actual rate of micelle dissociation below the CAC. Systems for which dissociation takes place over hours or even days have been reported, as opposed to low molecular weight surfactants that dissociate within milliseconds below their CMC (Kwon 1995). Several properties of the copolymer can be modified to improve the kinetic stability. These include the physical state of the micelle core, the content of solvent inside the core, the size of the hydrophobic block, the hydrophobic/hydrophilic balance, and the incorporation of hydrophobic compounds. Increased kinetic stability can, for instance, be met by using hydrophobic segments that will yield micelles with crystalline or highly viscous cores. The gain in stability ensues from limited and hindered mobility of the hydrophobic segments (Lavasanifar 2002). The viscosity of the micellar core is most often evaluated using fluorescent probes (for which the intensity ratio of excimer to monomer can be related to the fluidity of the environment) and by ^1H nuclear magnetic resonance. On the other hand, Creutz *et al.* (1998) showed that the rate of disassembly could be slowed down by increasing the hydrophobic/hydrophilic balance of the core-forming block. Increases in the hydrophobicity of the copolymers led to reduced rates of unimer exchanges, which is indicative of increased stability. It is argued that unimer exchanges and micelle disassembly were limited due to highly unfavorable interactions between the hydrophobic block and aqueous bulk. Alternatively, Kataoka and colleagues reported instances where micellar stability increased following incorporation of a hydrophobic drug (namely adriamycin) in the core of PM (Yokoyama 1998; Kataoka 2000). It is proposed that the occurrence of π - π stacking between the hydrophobic drug and the side groups of the core-forming segments and increased hydrophobic interactions both contributed to this gain in kinetic stability.

3.3.2 Towards increased micelle stability

Despite these efforts in modifying the properties of the block copolymers to yield carriers presenting increased thermodynamic and kinetic stabilities, PM remain equilibrium systems that are intrinsically susceptible to dilution. Other strategies which mostly rely on the chemical bonding or cross-linking of the different micelle components, have thus been explored to proscribe dissociation. There generally are 3 approaches to the preparation of core cross-linked micelles: polymerization or cross-linking of reactive groups introduced on the side chain, reactive groups present at the core chain end, or entrapped low molecular weight monomers. Iijima *et al.* (1999) have prepared copolymers of poly(ethylene glycol)-*block*-poly(D,L-lactide) (PEG-*b*-P(DLLA)) presenting a methacryloyl polymerizable group at the lactide chain end. They showed that the polymerization of the methacryloyl groups in the core of pre-formed micelles conferred increased stability to the system towards the presence of sodium dodecyl sulfate or following dissolution in organic solvents. Kim *et al.* (1999) revealed that the stability of a similar system could further be improved by incorporating and polymerizing low molecular weight monomers (namely ethylene glycol dimethacrylate) in the core (Figure 2-10). In another study conducted by Kakizawa *et al.* (2001), PEG-*block*-poly(L-lysine) copolymers presenting side-chain thiol groups were used to complex oligonucleotides. Oxidation of the thiol groups of pre-formed PICM from ambient oxygen yielded complexes with cross-linked cores. This type of conjugation is reversible and allows the selective dissociation of the complexes into cells; disulfide bonds should be stable in the blood while they should be cleaved in the more reducing cell environment.

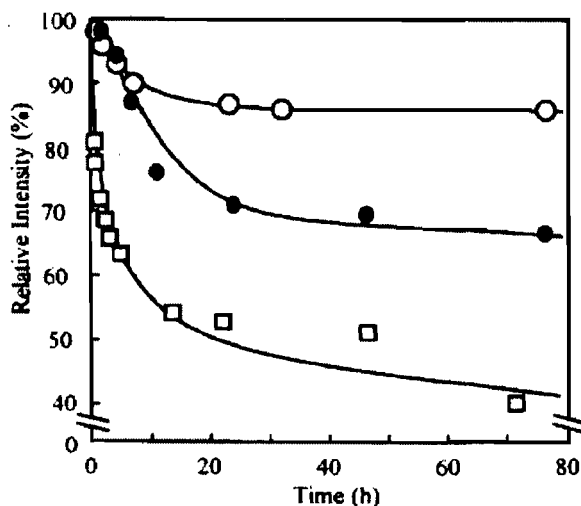


Figure 2-10. Stability of micelles against sodium dodecyl sulfate: non-polymerized PEG-*b*-P(DLLA) micelles (□); core-polymerized PEG-*b*-P(DLLA)-methacryloyl micelles (●); core-polymerized PEG-*b*-P(DLLA)-methacryloyl micelles further cross-linked with ethylene glycol dimethacrylate (○). Adapted from Kim (1999) with permission.

An alternative scheme to the chemical stabilization of the cores is to fix the shell blocks. In this light, cross-linking of pre-assembled micelle coronas can be accomplished. Such a method might present inherent limitations in that cross-linking is thought to restrain the mobility of the hydrophilic segments, which in turn reduces the entropy factor and impairs the stabilizing capabilities of the shell. Furthermore, shell cross-linking must be carried out at high dilution in order to avoid extensive intermicellar cross-linking. Armes and colleagues have successfully addressed these issues by using ABC triblock copolymers rather than conventional AB diblocks (Bütün 2000; Liu 2002). ABC triblock copolymers yield onion-like micelles for which the inner corona (B) can be selectively cross-linked. For instance, a bifunctional alkyl iodide was used to quaternize (and cross-link) the tertiary amine units of the center segment of PEG-*block*-poly(2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate)-*block*-poly(2-(*N,N*-diethylamino)ethyl methacrylate) triblocks (Liu 2002).

The PEG outer corona provides the steric repulsions that ensure minimal interpenetration of the micelles just as minimal intermicellar cross-linking.

One concern associated with such chemical stabilization of micelles is that it may impair the end elimination of the system, especially in the case of non-biodegradable polymers. Cross-linked or polymerized micelles are often large entities that can no longer be eliminated by glomerular filtration. Likewise, cross-linking may impair the biodegradability of some polymers. Small assemblies that topologically mimic the micelle architecture but that present covalently bound surfactant chains have been synthesized. These nanocarriers, referred to as unimolecular polymeric micelles (UPM), consist of single macromolecules such that their formation and dissociation are intrinsically independent on polymer concentration (no apparent CAC). UPM can be obtained from both dendrimers and star-block copolymers (Figure 2-11), with the latter form involving fewer synthetic steps and being simpler to prepare. We have reported the synthesis of amphiphilic star-shaped UPM composed of poly(ϵ -caprolactone)-*block*-poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) (Lele 2002b) and of amphiphilic pH-responsive UPM composed of poly(ethylmethacrylate-*co*-methacrylic acid)-*block*-poly((ethylene glycol)methacrylate) (Jones 2002). While the pH-responsive UPM were shown to exist as individual entities in water (~10-20 nm), the former star-polymers aggregated to yield multi-molecular assemblies with sizes ranging between 100-150 nm at 0.2 %(*w/w*). We were able to demonstrate the capability of these UPM to encapsulate and solubilize a fluorescent hydrophobic probe (pyrene) and hydrophobic drugs such as progesterone and indomethacin

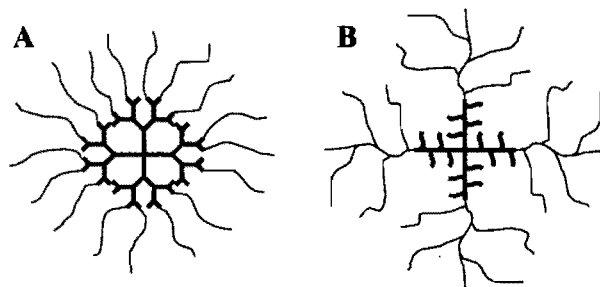


Figure 2-11. Sketch of dendrimer (A) and star-shaped copolymer-based (B) UPM.

3.4 Polymers in Drug Delivery

A collection of amphiphilic and charged block copolymers has been investigated for the preparation of water-soluble nanocarriers (Table 2-II). It is readily seen that while there exists only a limited selection of hydrophilic segments, a variety of core-forming blocks is available. One polymer widely used as the shell forming component is PEG. PEG is a non-biodegradable yet biocompatible polymer that presents a high degree of hydration and a large excluded volume. Hence, it has been shown to limit the attraction operating (Jones 2002) between particles and to reduce the adsorption of opsonins and proteins on carriers (Torchilin 1998). Other polymers used as hydrophilic blocks include poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) (Lele 2002a, b), poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (Benahmed 2001; Lele 2002a) (which has the ability to interact with a wide range of hydrophilic and hydrophobic pharmaceutical agents) and poly(acrylic acid) (Inoue 1998) (which presents mucoadhesive qualities (Jabbari 1993)). The corona-forming polymers generally are non-biodegradable whereas both biodegradable and non-biodegradable core segments can be encountered. The selection of a non-biodegradable over a biodegradable polymer will depend on the administration route (oral and topical vs. parenteral) and the required *in vivo* stability. Nevertheless, it has to be emphasized that the safe use of non-biodegradable delivery systems is limited to non-toxic polymers with molecular weights low enough to allow their excretion *via* the renal route (Seymour 1987). Examples of

biodegradable core-forming blocks include polyesters (such as P(DLLA), poly(D,L-glycolic acid) or poly(ϵ -caprolactone)) and most poly(L-amino acids). These polymers generally undergo hydrolysis and/or enzymatic degradation to produce bioresorbable subunits. Non-biodegradable candidates include poly(acrylates) and poly(methacrylates). This large selection of core-forming segments is precious since it allows the design of carriers presenting tailored stability or optimized drug loading capacity.

Table 2-II: Selection of polymers most often used for the preparation of micelles in drug delivery.

Core-components				Shell-components	Ref
Hydrophobic	Ref	Polyion	Ref		
Poly(D,L-lactide)	(Benahmed 2001)	Poly(2-(<i>N,N</i> -dimethylamino)	(Rungsardthong 2001)	Poly(2-ethyl-2-oxazoline)	(Kim 2002)
Poly(ethyl acrylate)	(Sant 2002; Jeong 2001)	ethyl methacrylate)		Poly(acrylic acid)	(Inoue 1998)
	(Ranger 2001)	Poly(ethyleneimine)	(Vinogradov 1999)	Poly(ethylene glycol)	(Lavasanifar 2002)
Poly(L-glycolic acid)	(Kabanov 2002)	Poly(L-aspartic acid)	(Zhang 2003)	Poly(<i>N</i> -(2-hydroxypopyl)	(Lele 2002b)
Poly(methyl methacrylate)	(Kataoka 2000)	Poly(L-lysine)	(Harada 2001)	methacrylamide)	
Poly(propylene oxide)	(Oh 1999)	Oligonucleotide	(Jeong 2003)	Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide)	(Kim 2000)
Poly(β -benzyl-L-aspartate)	(Lele 2002b; Savic 2003)			Poly(<i>N</i> -vinyl-2-pyrrolidone)	(Benahmed 2001)
Poly(γ -benzyl-L-glutamate)	(Adams 2003; Le Garrec 2002b)				
Poly(ϵ -caprolactone)	(Nakanishi 2001)				
Phospholipid residues					
Attached hydrophobic drugs					

3.5 Drug Incorporation

3.5.1 Drug loading procedures

The most direct procedure for the incorporation of hydrophobic drugs into micelles consists in their dissolution into a solution of pre-formed micelles (Figure 2-12A). Unfortunately, this simple equilibration process often results in low levels of loading given that diffusion of the drug in the PM core is slow. Instead, physical entrapment of drugs is most often achieved using either the dialysis or oil-in-water emulsion methods. The dialysis method (Figure 2-12B) involves the solubilization of both the polymer and drug in a common water-miscible organic solvent (such as ethanol or *N-N*-dimethylformamide). As the good solvent is replaced with water, the surface free energy associated with both the drug and hydrophobic segment of the copolymer increases, thereby driving their segregation into the core of drug loaded-micelles. Extensive dialysis (over several days) ensures complete removal of the organic solvents. The oil-in-water emulsion method (Figure 2-12C), on the other hand, consists in the emulsification of a water-insoluble organic drug solution into an aqueous polymer solution. The copolymer partitions at the solvent/water interface of the organic droplets and drug incorporation proceeds as the solvent evaporates. Solution casting (Figure 2-12D) is yet another method whereby a drug/polymer solid dispersion is obtained from the dissolution of both the polymer and drug in an organic solvent, followed by its evaporation. Drug-loaded micelles are obtained as the film is rehydrated with hot water. It was shown that the success of this procedure was dependent on the nature of the organic solvent employed to form the polymer/drug matrix. In an attempt to incorporate taxol in PEG-*b*-P(DLLA), Zhang *et al.* (1996) found that of an extensive list of solvents, only acetonitrile gave a clear solution following reconstitution in water. Furthermore, the use of this method remains limited to drugs and copolymers that are thermally stable. Recently, we have proposed a simple yet efficient procedure for the production of drug-loaded PM (Le Garrec 2002a). In this case, both the drug and copolymer are dissolved in a *tert*-butanol (TBA)/water mixture and the solvents freeze-

dried to yield a drug/copolymer cake (Figure 2-12E). It is thought that the presence of TBA in the solvent mixture induces the formation of a pre-micellar structure with a swollen core where the drug can easily diffuse and partition. Dynamic scattering studies revealed that the greater the TBA fraction, the larger and the more swollen the micelles (Figure 2-13). Rehydration of the freeze-dried cake produces an aqueous solution of drug-loaded micelles. Of marked interest is the fact that the drug/polymer TBA/water solution can easily be sterilized by filtration and freeze-dried under aseptic conditions. Using this method, we were able to incorporate an anticancer drug, namely paclitaxel, into PM with efficiencies reaching almost 100%.

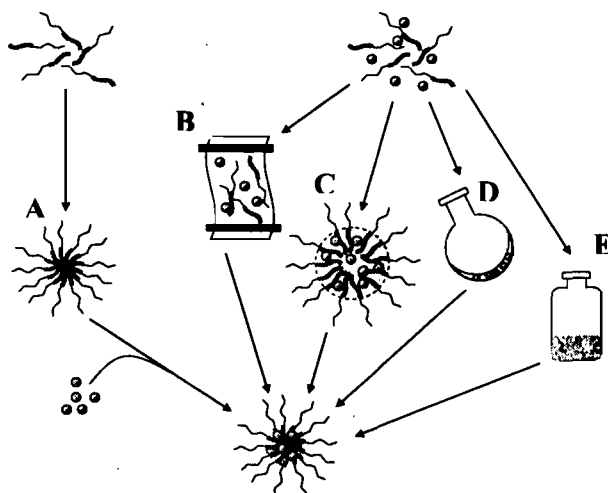


Figure 2-12. Most often used drug-loading procedures; simple equilibrium (A), dialysis (B), oil-in-water emulsion (C), solution casting (D) and freeze-drying (E).

The incorporation of charged drugs or polyanions into the core of PICM results from the straightforward mixing of an aqueous drug solution and an aqueous polymer solution (Figure 2-8B). Electrostatic interactions between the copolymer and the oppositely-charged drug provoke condensation, neutralization and self-association of the

condensates into PICM. Drug entrapment proceeds simultaneously with micelle formation (Kakizawa 2002).

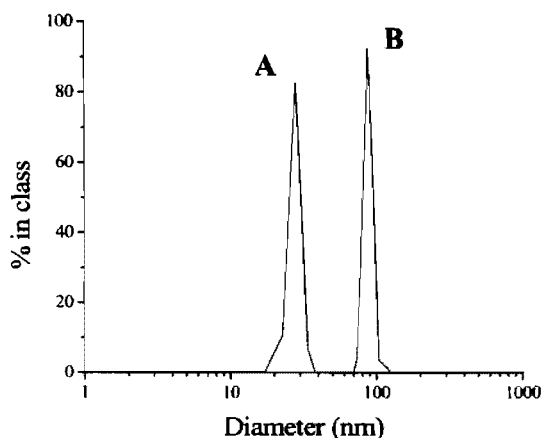


Figure 2-13. Swelling of pre-micelles with increases in the TBA fraction: no TBA (A); 60 % (v/v) TBA (B).

3.5.2 Achieving high drug loading

Optimization of the loading efficiency is crucial in order to reduce the amount of vehicle to be administered. Not only is this vital to limit the toxicity or adverse effects that could be associated with the carrier, but also to minimize the overall cost of the formulation. Furthermore, the micelle core, *i.e.* the space available for drug incorporation, only makes up a small volume of the micelle solution. This is particularly true for UPM where the free loading space is limited by the length and number of the core-forming blocks. Several properties of both the copolymer and drug are known to affect the drug loading and are discussed below.

If different loading procedures can lead to varying entrapment efficiencies, the extent of incorporation of drugs is still mostly influenced by the nature of the polymer/drug

combination. In a study where the degree of solubilization of different aromatic and aliphatic hydrocarbons in PM was evaluated, Nagarajan *et al.* (1986) showed that the affinity between the core and solubilize dictated the magnitude of incorporation. The Flory-Huggins interaction parameter χ_{sc} was used as an adequate variable to correlate and evaluate solubilization in block copolymer micelles. The value of χ_{sc} can be computed as follows:

$$\chi_{sc} = \frac{(\delta_s - \delta_c)^2 V_s}{RT}$$

where δ_s and δ_c are the Scatchard-Hildebrand solubility parameters of the solubilize and core-forming polymer block respectively, and V_s the molar volume of the solubilize. The lower the interaction parameter χ_{sc} , the greater the compatibility between the solubilize and the micelle core. Note that χ_{sc} may even be negative for cases in which specific interactions such as electrostatic or ionic interactions are involved. The relevance of the Flory-Huggins interaction parameter to predict the loading efficiency is of great importance in that it shows that no universal delivery system is likely to be ever designed; each drug presents unique properties that will be best complimented by selective copolymer systems (Allen 1999).

The above discussion reveals that the maximum drug loading is reached when the nature of the core-forming block better suits the drug to be loaded. However, caution must be exercised when attempting to use the Flory-Huggins interaction parameter quantitatively. The loading capacity of micelles can also be influenced by other important variables such as the occurrence of interactions between the drug and hydrophilic block of the copolymer (Benahmed 2001). We have shown that higher entrapment efficiencies could be attained when using poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) rather than PEG as the hydrophilic segment. Drugs with low χ_{sc} (*i.e.* high affinity) for both the core and shell blocks are likely to be solubilized in the core of micelles but also at the core/shell interface, and even within the shell (Allen 1999). Likely, the efficiency of drug incorporation can be affected by the

length of both the core-forming and corona-forming blocks (Torchilin 2001). The longer the hydrophobic block, the larger the hydrophobic core or cargo space available, and the higher the ability to entrap hydrophobic drugs. In contrast, a significant increase in the hydrophilic block length can result in an increase of the CAC, which reflects a smaller fraction of amphiphilic copolymers present in micellar form and a drop in the hydrophobic volume available for solubilization. Furthermore, copolymers presenting increased hydrophilic block lengths will experience increased surface densities and produce small particles with reduced cargo space. Another factor affecting drug loading is the state of the core. While crystallinity enhances micelle stability, it may well reduce drug loading. Crystalline cores are highly ordered and their physical cross-linking reduces the free cargo space and hinders diffusion of drugs into the core (Müller 2002). Finally, entrapment efficiencies can depend on the initial amount of drug to be solubilized. Trying to solubilize larger amounts of drug than what can be accommodated by the micelle core can induce precipitation of the drug and reduce the loading yield.

3.6 Drug Release

It was emphasized how PM need to retain their integrity following the large *in vivo* dilution for applications such as passive targeting and sustained release. Moreover, maximization of the drug loading was generally shown to be crucial given the small cargo volume available. An issue now to be addressed is the identification of the parameters affecting the drug release and effectiveness of the system.

One such parameter is micelle stability. It is obvious that dissociation of micelles into single chains will free entrapped molecules. Likely, erosion or biodegradation of the carrier will provoke the escape of drug molecules. In cases where the system is stable, slowly biodegraded or non-biodegradable, drug release will instead depend on the rate of diffusion from the micelle. The rate of diffusion was shown to be influenced by various

factors, most of which concomitantly affecting micelle stability and drug loading. Of those factors, one can state the core-forming block length, the physical state of the core, cross-linking of the corona segments, and compatibility of the copolymer/drug couple. For instance, an increase in the length of the core forming block is known to favor the self-association of amphiphilic copolymers into micelles and to provide a larger cargo space where more drug can be accommodated. The consequence on drug release is such that drugs located in the core have to diffuse through a longer path (larger core radius) and present a slower release rate (Jeong 1998). Alternatively, the physical state of the micelle core, whether solid-like or liquid-like, was shown to influence micelle stability; micelles presenting crystalline or highly viscous cores are more stable given that the mobility of their hydrophobic segments is limited. Likewise, the movement of a drug from a glassy core will be slower than from a more mobile core. Teng *et al.* (1998) revealed that the diffusion constant of a fluorescent probe from a polystyrene core was smaller than from a poly(*tert*-butyl acrylate) core; this relationship qualitatively correlates with the respective glass transition temperatures of the core components (*i.e.* 100 vs. 40-43 °C). In turn, cross-linking of the corona-forming blocks has a two-fold effect in that it yields micelles with increased stability but affects the permeability of the corona and the period within which drugs diffuse (Rösler 2001). A factor that influences concurrently drug release and drug incorporation is the polymer/drug compatibility. Just as the Flory-Huggins interaction parameter was used to predict the extent of drug incorporation, it can be used to infer the characteristics of drug release of a system. Generally speaking, the stronger the interaction between the drug and the core-forming block, the slower its release from the micelle. It is further expected that drugs located at the core/corona interface or within the corona will diffuse faster than those located in the core (Teng 1998) and often accounts for burst releases. It should be understood from the above observations that excessive micelle stabilization and drug incorporation may negatively influence a drug's potency by impairing its release from micelles. Clearly, it is fundamental to find a proper balance.

between micelle stability, loading level and the ability of the system to dissociate or release its contents.

Other properties influencing the release kinetics inherent to the drug molecule include its molecular volume and its physical state in the core of micelles. A relationship between the molecular volume and diffusion constant can be easily obtained by studying differences in the release rates of different probes from a particular micellar system (Teng 1998). It can be extrapolated that the larger the molecular volume, the smaller the diffusion constant and the release rate. The physical state of a drug in the micelle core can alter the drug release profile. Jeong *et al.* (1998) showed that an increase in the amount of clonazepam loaded into PEG-*block*-poly(γ -benzyl L-glutamate) micelles (12.1 to 32.8 %*(w/w)*) resulted in a slower drug release. Differential scanning calorimetry thermograms revealed that crystallization of the drug occurred at the higher loading.

3.7 Pharmaceutical Applications

3.7.1 Non-targeted micelles

It is one thing to picture micelles with targeted properties and behavior yet another to evidence their *in vitro* and *in vivo* applicability. Excitingly, there are numerous instances where the formulation of drugs as PM reduced the cytotoxicity, increased the maximum tolerated dose or permitted passive accumulation at target sites while accounting for similar to improved therapeutic effects compared to control formulations. Adams *et al.* (2003) have incorporated amphotericin B into the core of PEG-*block*-poly(*N*-hexyl-L-aspartamide)-stearic acid PM. In its monomeric form, amphotericin B is a membrane-disruptive drug used to treat systemic fungal diseases. However, its direct administration is associated with self-aggregation, lost of selectivity and systemic toxicity. It was shown that amphotericin B exists in its monomeric form when incorporated into PM such that the non-selective hemolysis of mammalian red blood cells could be prevented *in vitro*. Moreover, drug-

loaded PM retained potent *in vivo* antifungal activity as compared to the standard clinical Fungizone[®] formulation. Kim *et al.* (2001) have been successful in incorporating paclitaxel, a water-insoluble anticancer agent, into the core of PEG-*b*-P(DLLA) micelles. Solubilization of the drug into PM reduced its toxicity, as evidenced from both increases in the maximum tolerated dose and lethal dose (LD₅₀). Meanwhile, the reduction of toxicity allowed increased paclitaxel doses and improved antitumor efficiency with respect to the Cremophor[®] EL formulation. Finally, Mizumura *et al.* (2001) prepared cisplatin-loaded PM using a PEG-*block*-poly(aspartic acid) copolymer. Treatment of solid tumor-bearing mice resulted in higher and more sustained levels of drug in the tumor tissue and remarkably eliminated the nephrotoxicity usually encountered with free cisplatin. In the meantime, reduction of cisplatin toxicity did not attenuate its anticancer activity. This last example clearly demonstrates the feasibility of passive targeting, *i.e.* favoring the local accumulation of PM through the enhanced permeability and retention effect. Finest selectivity and improved efficiency could theoretically be achieved by using systems which respond to external stimuli (such as pH and temperature variations) or by attaching specific ligands to the exposed hydrophilic end. These rather intricate targeting mechanisms are referred to as active targeting.

3.7.2 Targeted micelles

Many pathological processes are associated with local temperature increases and/or acidosis. Hence, micellar devices have been designed to trigger and/or enhance drug release in response to specific stimuli. For example, Zhang *et al.* (2003) have recently synthesized PICM composed of a polycationic dendrimer zinc porphyrin (a potential photosensitizer in photodynamic therapy) and PEG-*block*-poly(aspartic acid). The stability of the system was shown to be pH-dependent, with the micelles adopting a substable (less stable) state at pH values lower than 6.2. On the basis of these results, it is speculated that PICM could adopt a

substable state upon accumulation into solid tumors (where the local pH should be significantly lower than for normal tissue (Engin 1995)) and locally dissociate to free the porphyrin.

Drugs administered by the oral route experience a pH gradient as they transit from the stomach to the jejunum. Our research group has developed an expertise in the preparation of pH-sensitive nanocarriers for the oral delivery of hydrophobic drugs. PEG-stabilized PM and UPM presenting methacrylic acid, ethylacrylate and/or methylacrylate units as the core forming blocks were synthesized (Sant 2002; Jones 2002). It is hypothesized that the carboxylic acid groups of the methacrylic acid units become ionized as the micelles are directed towards the jejunum, thereby weakening the hydrophobic-hydrophobic interactions that segregate the drug in the micelle core (Figure 2-14). pH-induced variations of the release profile of progesterone-loaded UPM were monitored *in vitro*. While the diffusion rate from stable non-biodegradable micelles is solely dictated by the drug diffusion constant, release from our system was additionally promoted by a change in the partition of the drug between the micelle core and aqueous environment (Sant 2002). Other hydrophobic drugs, namely indomethacin, ketoconazole and fenofibrate, were successfully incorporated into the core of our pH-responsive PM using both the dialysis and oil-in-water emulsion methods.

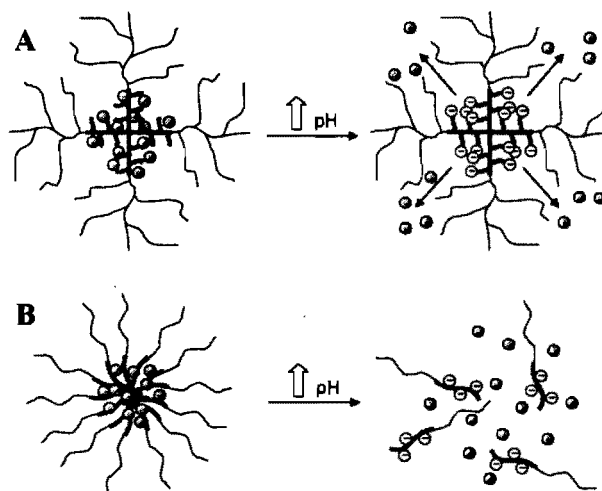


Figure 2-14. Proposed release mechanisms of hydrophobic drugs following ionization of pH-sensitive UPM (A) and PM (B).

Changes in pH ensuing from the endocytosis of drug-loaded pH-sensitive carriers can account for increases in drug efficiency. For instance, PM composed of 4,4'-azobis(4-cyano-*N,N*-dioctadecyl)pentanamide as the lipophilic segment and poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-methacrylic acid-*co*-*N*-vinyl-2-pyrrolidone) as the hydrophilic shell were used to incorporate aluminum chloride phthalocyanine (Le Garrec 2002b). These micelles exhibited equal if not greater activity than a control Cremophor[®] EL formulation to inhibit tumor growth. This apparent increase in efficiency was attributed to a difference in the intracellular drug distribution. It was argued that following endocytosis, the pH-responsive PM undergo a phase transition, thereby destabilizing the endosomal/lysosomal membrane and increasing the drug cytoplasmic concentration (Le Garrec 2002b; Taillefer 2001). Destabilization of the endosomal/lysosomal compartments is also feasible using amine-containing polymers. In fact, the capture of protons by buffering amino groups was shown to play a role in the disruption of such organelles (Boussif 1995). Consequently, we synthesized block copolymers composed of PEG and different aminoethyl methacrylate derivatives for the preparation of pH-sensitive PICM (Dufresne 2002). The

physicochemical properties of the copolymers and their PICM were evaluated using a model polyanionic drug, namely heparin. The onset of micellization and/or dissociation was shown to be pH-dependent and to vary with the nature of the amine. Alternatively, Jeong *et al.* (2003) prepared PICM composed of an oligonucleotide-PEG diblock and a peptide (KALA) as the polycation. An acid-labile linkage was introduced between the oligonucleotide and PEG and permitted the cleavage of oligonucleotide-PEG conjugates located in acidic endosomal compartments. Meanwhile, the KALA peptide (a fusogenic peptide) destabilized the endosomal/lysosomal compartments and facilitated the transfer of the oligonucleotide to the cytoplasm. The authors were able to obtain as much as 70% inhibition in proliferation of smooth muscle cells in comparison to non-treated cells.

Up till this point, we have mostly discussed PM systems with highly hydrated, nonionic hydrophilic shells such as PEG. The shell-components, primarily selected to hinder non-specific interactions and increase blood circulation times, may prevent cell internalization (De Jaeghere 2000). Hence, systems presenting ligands at their water-exposed surface have been designed to enhance their selective binding and internalization by cells. A variety of molecules including antibodies (Ulbrich 2003), peptides (Vinogradov 1999) and sugar moieties (Lim 2000a) have been used to achieve cell targeting. For example, transferrin molecules have been attached at the surface of polyelectrolytes complexes composed of an oligonucleotide and cationic copolymer (Vinogradov 1999). Modification of the PICM surface by transferrin increased the oligonucleotide cellular levels by 80 times that of the free oligonucleotide. This increased cellular uptake was separately evidenced by an increased fluorescence of cells transfected with a labeled transferrin-modified complex. At last, modification of the micelle surface accounted for an increased inhibition of the functional activity of multiple drug resistant cells *in vitro*. Recently, a novel synthetic procedure was proposed to ease the preparation of sugar-conjugated block copolymers and to support the synthesis of systems with various compositions and pharmaceutical applications (Bes 2003). It was proposed that the polymerization of diverse (meth)acrylates including poly(ethylene glycol)methyl ether

methacrylate (PEGMA), acrylic acid, and 2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate could be directly carried out by atom transfer radical polymerization using sugar-derived initiators. The authors were able to demonstrate the selectivity of galactose-poly(PEGMA)-*block*-poly(benzyl methacrylate) micelles for a lectin column.

As we gain more expertise in the preparation of delivery systems capable of targeting specific tissues and cells, increasing interest is directed towards targeting subcellular compartments. An elegant study conducted by Savic *et al.* (2003) revealed that it is possible to alter the subcellular localization or distribution of a hydrophobic agent through its incorporation into PM. In this particular case, micelles composed of a fluorescent-labeled PEG-*block*-poly(ϵ -caprolactone) copolymer were selectively located in the cytoplasm (along with several cytoplasm organelles) while they were excluded from the nucleus. Hopefully, further studies will be conducted to fully elucidate the structure/property relationships dictating the subcellular micelle distribution.

3.8 Conclusion

It was hypothesized that the small size and hydrophilic shell of PM should confer prolonged systemic circulation time to the system. Such a characteristic would in turn allow PM to reach regions of the body that usually are little accessible and to specifically accumulate in malignant or inflamed tissues. Passive accumulation of PM is an attractive property that could account for increased drug efficiency, minimized toxicity and might even permit the administration of higher doses. Furthermore, targeted PM can be prepared by introducing stimuli-responsive polymers or by attaching recognition groups at the micelle surface. However, it must be emphasized that micelles need to be stable towards large dilutions for any of these applications to be achievable. Both the thermodynamic stability and kinetic stability are tunable and can be improved by varying the nature of the hydrophobic block, increasing the hydrophobic/hydrophilic balance, increasing the

hydrophobic block length or by accommodating hydrophobic molecules in the core. Alternatively, micelle stabilization can be achieved by either cross-linking the core or corona of pre-formed micelles or by designing intrinsically stable UPM. It should be stressed that many of the factors dictating micelle stability also affect and influence the extent of drug solubilization, release kinetics and pharmaceutical applications. In the end, PM rise as very attractive drug delivery systems in that their physicochemical properties and *in vivo* fate are interrelated and can be fine-tuned.

3.9 Acknowledgements

Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Canada Research Chair Program is acknowledged. The authors extend their gratitude to Marc A. Gauthier for his critical reading of the manuscript.

4 Bibliographie

Adams, M.L., Andes, D.R. and Kwon, G.S. (2003). Amphotericin B encapsulated in micelles based on poly(ethylene oxide)-*block*-poly(L-amino acid) derivatives exerts reduced *in vitro* hemolysis but maintains potent *in vivo* antifungal activity. *Biomacromolecules*.

Akhtar, S. and Benter, I.F. (2007). Nonviral delivery of synthetic siRNAs *in vivo*. *J Clin Invest* 117(12): 3623-3632.

Akinc, A., Zumbuehl, A., Goldberg, M., Leshchiner, E.S., Busini, V., Hossain, N., Bacallado, S.A., Nguyen, D.N., Fuller, J., Alvarez, R., Borodovsky, A., Borland, T., Constien, R., de Fougerolles, A., Dorkin, J.R., Narayanannair Jayaprakash, K., Jayaraman, M., John, M., Koteliensky, V., Manoharan, M., Nechev, L., Qin, J., Racie, T., Raitcheva, D., Rajeev, K.G., Sah, D.W., Soutschek, J., Toudjarska, I., Vornlocher, H.P., Zimmermann,

- T.S., Langer, R. and Anderson, D.G. (2008). A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat. Biotechnol.* **26**(5): 561-569.
- Allen, C., Maysinger, D. and Eisenberg, A. (1999). Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **16**: 3-27.
- Ameziane, N., Bogard, M. and Lamoril, J. (2005). Principes généraux de la thérapie génique. *Principes de biologie moléculaire et biologie clinique*. Elsevier, Elsevier Masson: 705 pages.
- Anderson, D.G., Lynn, D.M. and Langer, R. (2003). Semi-automated synthesis and screening of a large library of degradable cationic polymers for gene delivery. *Angew Chem Int Ed* **42**(27): 3153-3158.
- Arigita, C., Zuidam, N.J., Crommelin, D.J.A. and Hennink, W.E. (1999). Association and dissociation characteristics of polymer/DNA complexes used for gene delivery. *Pharm. Res.* **16**(10): 1534-1541.
- Astriab-Fisher, A., Sergueev, D.S., Fisher, M., Shaw, B.R. and Juliano, R.L. (2000). Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide-oligonucleotide conjugates. *Biochem Pharmacol* **60**(1): 83-90.
- Atkins, P.W. (1997). Macromolecules and colloids. *Physical Chemistry*. P. W. Atkins. New York, Oxford University Press: 679-714.
- Bally, M.B., Harvie, P., Wong, F.M.P., Kong, S., Wasan, E.K. and Reimer, D.L. (1999). Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **38**(3): 291-315.
- Banga, A.K., Bose, S. and Ghosh, T.K. (1999). Iontophoresis and electroporation: comparisons and contrasts. *Int. J. Pharm.* **179**(1): 1-19.
- Benahmed, A., Ranger, M. and Leroux, J.-C. (2001). Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone)-*block*-poly(D, L-lactide). *Pharm. Res.* **18**(3): 323-328.

- Bes, L., Angot, S., Limer, A. and Haddleton, D.M. (2003). Sugar-coated amphiphilic block copolymer micelles from living radical polymerization: recognition by immobilized lectins. *Macromolecules* **36**: 2493-2499.
- Biet, E., Larue, L. and Dutreix, M. (2003). Homologous recombination and gene targeting. *C. R. Biol* **326**(1): 51-64.
- Bijsterbosch, M.K., Rump, E.T., De Vruhe, R.L.A., Dorland, R., van Veghel, R., Tivel, K.L., Biessen, E.A.L., van Berkel, T.J.C. and Manoharan, M. (2000). Modulation of plasma protein binding and *in vivo* liver cell uptake of phosphorothioate oligodeoxynucleotides by cholesterol conjugation. *Nucleic Acids Res.* **28**(14): 2717-2725.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(August 1995): 7297-7301.
- Brandén, L.J., Mohamed, A.J. and Smith, C.I.E. (1999). A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nat Biotechnol* **17**(8): 784-787.
- Braunecker, W.A. and Matyjaszewski, K. (2007). Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Prog. Polym. Sci.* **32**(1): 93-146.
- Brown, D.A., Kang, S.H., Gryaznov, S.M., DeDionisio, L., Heidenreich, O., Sullivan, S., Xu, X. and Nerenberg, M.I. (1994). Effect of Phosphorothioate Modification of Oligodeoxynucleotides on Specific Protein-Binding. *J. Biol. Chem.* **269**(43): 26801-26805.
- Bütün, V., Wang, X.-S., de Paz Banez, M.V., Robinson, K.L., Billingham, N.C., Armes, S.P. and Tuzar, Z. (2000). Synthesis of shell cross-linked micelles at high solids in aqueous media. *Macromolecules* **33**(1): 1-3.
- Capecchi, M.R. (1980). High Efficiency Transformation by Direct MicroInjection of DNA into Cultured Mammalian Cells. *Cell* **22**(2): 479-488.

- Chen, C., Smye, S.W., Robinson, M.P. and Evans, J.A. (2006). Membrane electroporation theories: a review. *Med Biol Eng Comput* **44**(1-2): 5-14.
- Choi, J., Choi, J., Suh, H. and Park, J. (2001). Effect of poly(ethylene glycol) grafting on polyethylenimine as a gene transfer vector in vitro. *Bull. Korean Chem. Soc.* **22**(1): 46-52.
- Chu, T.C., Twu, K.Y., Ellington, A.D. and Levy, M. (2006). Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res.* **34**(10).
- Ciolina, C., Byk, G., Blanche, F., Thuillier, V., Scherman, D. and Wils, P. (1999). Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin alpha. *Bioconjugate Chem.* **10**(1): 49-55.
- Coessens, V., Pintauer, T. and Matyjaszewski, K. (2001). Functional polymers by atom transfer radical polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **26**: 337-377.
- Cowland, J.B., Hother, C. and Gronwaek, K. (2007). MicroRNAs and cancer. *Apmis* **115**(10): 1090-1106.
- Creutz, S., van Stam, J., De Schryver, F.C. and Jérôme, R. (1998). Dynamics of poly((dimethylamino)alkyl methacrylate-*block*-sodium methacrylate) micelles. Influence of hydrophobicity and molecular architecture on the exchange rate of copolymer molecules. *Macromolecules* **31**: 681-689.
- Dautry, F. and Ribet, C. (2004). RNA interference : towards a functional genomics in mammalian cells ? *Med Sci* **20**(8-9): 815-819.
- De Jaeghere, F., Allémann, E., Feijen, J., Kissel, T., Doelker, E. and Gurny, R. (2000). Cellular uptake of PEO surface-modified nanoparticles: evaluation of nanoparticles made of PLA:PEO diblock and triblock copolymers. *J. Drug Target.* **8**(3): 143-153.
- De Smedt, S.C., Demeester, J. and Hennink, W.E. (2000). Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm. Res.* **17**(2): 113-126.

- Dean, D.A. (1997). Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp. Cell Res.* **230**(2): 293-302.
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* **271**(30): 18188-18193.
- Dubruel, P., Christiaens, B., Rosseneu, M., Vandekerckhove, J., Grooten, J., Goossens, V. and Schacht, E. (2004). Buffering properties of cationic polymethacrylates are not the only key to successful gene delivery. *Biomacromolecules* **5**(2): 379-388.
- Dubruel, P., De Strycker, J., Westbroek, P., Bracke, K., Temmerman, E., Vandervoort, J., Ludwig, A. and Schacht, E. (2002). Synthetic polyamines as vectors for gene delivery. *Polymer International* **51**(10): 948-957.
- Dufresne, M.H., Fournier, E., Jones, M.-C., Ranger, M. and Leroux, J.C. (2003). Block copolymer micelles - engineering versatile carriers for drugs and biomacromolecules. *Challenge in drug delivery for the new millennium*. R. Gurny. Saint-Priest, Bulletin technique Gattefossé. **96**: 87-102.
- Dufresne, M.H., Ranger, M. and Leroux, J.C. (2002). Physicochemical characterization of polyion complex micelles formed by polyanionic drug - amino copolymer interactions. *AAPS Pharm. Sci.* **4**(4): W4071.
- Duguid, J.G., Li, C., Shi, M., Logan, M.J., Alila, H., Rolland, A., Tomlinson, E., Sparrow, J.T. and Smith, L.C. (1998). A physicochemical approach for predicting the effectiveness of peptide-based gene delivery systems for use in plasmid-based gene therapy. *Biophys. J.* **74**(6): 2802-2814.
- Dujardin, N., Staes, E., Kalia, Y., Clarys, P., Guy, R. and Pr at, V. (2002). *In vivo* assessment of skin electroporation using square wave pulses. *J. Controlled Release* **79**(1-3): 219-227.

- Dujardin, N., Van der Smissen, P. and Preat, V. (2001). Topical gene transfer into rat skin using electroporation. *Pharm. Res.* **18**(1): 61-66.
- Dunn, S.E., Brindley, A., Davis, S.S., Davies, M.C. and Illum, L. (1994). Polystyrene-poly(ethylene glycol) (PS-PEG2000) particles as model systems for site specific drug delivery. 2. The effect of PEG surface density on the *in vitro* cell interaction and *in vivo* biodistribution. *Pharm. Res.* **11**(7): 1016-1022.
- Elouahabi, A. and Ruyschaert, J.M. (2005). Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Molecular Therapy* **11**(3): 336-347.
- Engin, K., Leeper, L.D., Cater, J.R., Thistlethwaite, A.J., Tupchong, L. and McFarlane, J.D. (1995). Extracellular pH distribution in human tumours. *Int. J. Hyperthermia* **11**(2): 211-216.
- Fattal, E., Dubernet, C. and Couvreur, P. (2001). Liposome-based formulations for the delivery of oligonucleotides. *STP Pharma Sci.* **11**(1): 31-44.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M. (1987). Lipofection - a Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**(21): 7413-7417.
- Fischer, D., Dautzenberg, H., Kunath, K. and Kissel, T. (2004). Poly(diallyldimethylammonium chlorides) and their *N*-methyl-*N*-vinylacetamide copolymer-based DNA-polyplexes: role of molecular weight and charge density in complex formation, stability, and *in vitro* activity. *Int. J. Pharm.* **280**(1-2): 253-269.
- Funhoff, A.M., van Nostrum, C.F., Koning, G.A., Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M.E., Crommelin, D.J.A. and Hennink, W.E. (2004). Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH. *Biomacromolecules* **5**(1): 32-39.
- Fuoss, R.M. and Sadek, H. (1949). Mutual Interaction of Polyelectrolytes. *Science* **110**(2865): 552-554.

- Gabrielson, N.P. and Pack, D.W. (2006). Acetylation of polyethylenimine enhances gene delivery via weakened polymer/DNA interactions. *Biomacromolecules* **7**(8): 2427-2435.
- Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S.B. and Minsky, A. (1993). Mode of Formation and Structural Features of DNA Cationic Liposome Complexes Used for Transfection. *Biochemistry* **32**(28): 7143-7151.
- Glover, D.J., Lipps, H.J. and Jans, D.A. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat. Rev. Genet.* **6**(4): 299-310.
- Görlich, D. and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**: 607-660.
- Gosselin, M.A., Guo, W. and Lee, R.J. (2001). Efficient gene transfer using reversibly cross-linked low molecular weight polyethylenimine. *Bioconjugate Chem.* **12**: 989-994.
- Grosse, S., Aron, Y., Thévenot, G., François, D., Monsigny, M. and Fajac, I. (2005). Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. *J. Gene Med.* **7**(10): 1275-1286.
- Hafez, I.M., Maurer, N. and Cullis, P.R. (2001). On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther.* **8**(15): 1188-1196.
- Harada, A., Togawa, H. and Kataoka, K. (2001). Physicochemical properties and nuclease resistance of antisense-oligonucleotides entrapped in the core of polyion complex micelles composed of poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **13**: 35-42.
- Heath, W.H., Senyurt, A.F., Layman, J. and Long, T.E. (2007). Charged polymers via controlled radical polymerization and their implications for gene delivery. *Macromol. Chem. Phys.* **208**(12): 1243-1249.
- Herweijer, H. and Wolff, J.A. (2007). Gene therapy progress and prospects: Hydrodynamic gene delivery. *Gene Ther.* **14**(2): 99-107.

- Hudson, A.J., Normand, N., Ackroyd, J. and Akhtar, S. (1999). Cellular delivery of hammerhead ribozymes conjugated to a transferrin receptor antibody. *Int. J. Pharm.* **182**(1): 49-58.
- Hughes, M.D., Hussain, M., Nawaz, Q., Sayyed, P. and Akhtar, S. (2001). The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes. *Drug Discov. Today* **6**(6): 303-315.
- Iijima, M., Nagasaki, Y., Okada, T., Kato, M. and Kataoka, K. (1999). Core-polymerized reactive micelles from heterotelechelic amphiphilic block copolymers. *Macromolecules* **32**: 1140-1146.
- Inoue, T., Chen, G., Nakamae, K. and Hoffman, A.S. (1998). An AB block copolymer of oligo(methyl methacrylate) and poly(acrylic acid) for micellar delivery of hydrophobic drugs. *J. Controlled Release* **51**: 221-229.
- Jabbari, E., Wisniewski, N. and Peppas, N.A. (1993). Evidence of mucoadhesion by chain interpenetration at poly(acrylic acid) mucin interface using ATR-FTIR spectroscopy. *J. Controlled Release* **26**(2): 99-108.
- Järver, P. and Langel, Ü. (2004). The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation. *Drug Discovery Today* **9**(9): 395-402.
- Jeong, J.H., Kim, S.W. and Park, T.G. (2003). Novel intracellular delivery system of antisense oligonucleotide by self-assembled hybrid micelles composed of DNA/PEG conjugate and cationic fusogenic peptide. *Bioconjugate Chem.* **14**: 473-479.
- Jeong, J.H. and Park, T.G. (2001). Novel polymer-DNA hybrid polymeric micelles composed of hydrophobic poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) and hydrophilic oligonucleotides. *Bioconjugate Chem.* **12**: 917-923.
- Jeong, Y.-I., Cheon, J.-B., Kim, S.-H., Nah, J.-W., Lee, Y.-M., Sung, Y.-K., Akaike, T. and Cho, C.-S. (1998). Clonazepam release from core-shell type nanoparticles *in vitro*. *J. Controlled Release* **51**: 169-178.

- Jin, J., Achenbach, J.C., Zhu, S.P. and Li, Y.F. (2005). Complexation of well-controlled low-molecular weight polyelectrolytes with antisense oligonucleotides. *Colloid Polym. Sci.* **283**(11): 1197-1205.
- Jones, M.-C. and Leroux, J.-C. (1999). Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **48**: 101-111.
- Jones, M.-C., Ranger, M. and Leroux, J.-C. (2002). Novel pH-sensitive unimolecular micelles as oral drug delivery systems for lipophilic compounds. *AAPS Pharm. Sci.* **4**(4): W4069.
- Juliano, R.L. (2006). Intracellular delivery of oligonucleotide conjugates and dendrimer complexes. *Annal NY Acad Sci.* **1082**: 18-26.
- Kabanov, A., P, L., Vinogradov, S. and Alakhov, V. (2002). Pluronic R block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**: 223-233.
- Kabanov, A.V. and Kabanov, V.A. (1995). DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjugate Chem.* **6**: 7-20.
- Kabanov, A.V. and Kabanov, V.A. (1998). Interpolyelectrolyte and block ionomer complexes for gene delivery: physico-chemical aspects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **30**(1-3): 49-60.
- Kakizawa, Y., Harada, A. and Kataoka, K. (2001). Glutathione-sensitive stabilization of block copolymer micelles composed of antisense DNA and thiolated poly(ethylene glycol)-*block*-poly(L-lysine): a potential carrier for systemic delivery of antisense DNA. *Biomacromolecules* **2**(2): 491-497.
- Kakizawa, Y. and Kataoka, K. (2002). Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**: 203-222.
- Kataoka, K., Harada, A. and Nagasaki, Y. (2001). Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**: 113-131.

Kataoka, K., Matsumoto, T., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Fukushima, S., Okamoto, K. and Kwon, G.S. (2000). Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(β -benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *J. Controlled Release* **64**: 143-153.

Kawabata, K., Takakura, Y. and Hashida, M. (1995). The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: Involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm. Res.* **12**(6): 825-830.

Kichler, A., Leborgne, C., Coeytaux, E. and Danos, O. (2001). Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J. Gene Med.* **3**(2): 135-144.

Kim, C., Lee, S.C., Kwon, I.C., Chung, H. and Jeong, S.Y. (2002). Complexation of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-*block*-poly(ϵ -caprolactone) micelles with multifunctional carboxylic acids. *Macromolecules* **35**: 193-200.

Kim, I.-S., Jeong, Y.-I., Cho, C.-S. and Kim, S.-H. (2000). Core-shell type polymeric nanoparticles composed of poly(L-lactic acid) and poly(*N*-isopropylacrylamide). *Int. J. Pharm.* **211**: 1-8.

Kim, J.-H., Emoto, K., Iijima, M., Nagasaki, Y., Aoyagi, T., Okano, T., Sakurai, Y. and Kataoka, K. (1999). Core-stabilized polymeric micelle as potential drug carrier: increased solubilization of taxol. *Polym. Adv. Technol.* **10**: 647-654.

Kim, S.C., Kim, D.W., Shim, Y.H., Bang, J.S., Oh, H.S., Kim, S.W. and Seo, M.H. (2001). *In vivo* evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *J. Controlled Release* **72**: 191-202.

Kloeckner, J., Wagner, E. and Ogris, M. (2006). Degradable gene carriers based on oligomerized polyamines. *Eur. J. Pharm. Sci.* **29**(5): 414-425.

Kren, B.T. and Steer, C.J. (2002). The application of DNA repair vectors to gene therapy. *Curr Opin Biotechnol* **13**(5): 473-481.

- Krieg, A.M., Tonkinson, J., Matson, S., Zhao, Q., Saxon, M., Zhang, L.M., Bhanja, U., Yakubov, L. and Stein, C.A. (1993). Modification of Antisense Phosphodiester Oligodeoxynucleotides by a 5' Cholesteryl Moiety Increases Cellular Association and Improves Efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**(3): 1048-1052.
- Kurreck, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1628-1644.
- Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C. and Erdmann, V.A. (2002). Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **30**(9): 1911-1918.
- Kursa, M., Walker, G.F., Roessler, V., Ogris, M., Roedl, W., Kircheis, R. and Wagner, E. (2003). Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer. *Bioconjugate Chem.* **14**(1): 222-231.
- Kwon, G.S. and Kataoka, K. (1995). Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **16**: 295-309.
- Lam, J.K.W., Ma, Y., Armes, S.P., Lewis, A.L., Baldwin, T. and Stolnik, S. (2004). Phosphorylcholine-polycation diblock copolymers as synthetic vectors for gene delivery. *J. Control. Release* **100**(2): 293-312.
- Lavasanifar, A., Samuel, J. and Kwon, G. (2002). Poly(ethylene oxide)-*block*-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**: 169-190.
- Le Garrec, D., Kabbaj, M. and Leroux, J.-C. (2002a). Preparation of sterile stabilized nanodispersions. US Patent Appl. US. **10**.
- Le Garrec, D., Taillefer, J., van Lier, J.E., Lenaerts, V. and Leroux, J.-C. (2002b). Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model. *J. Drug Target.* **10**(5): 429-437.
- Leahy, P., Carmichael, G.G. and Rossomando, E.F. (1996). Novel biotinylated plasmid expression vectors retain biological function and can bind streptavidin. *Bioconjugate Chem.* **7**(5): 545-551.

- Lechardeur, D., Sohn, K.J., Haardt, M., Joshi, P.B., Monck, M., Graham, R.W., Beatty, B., Squire, J., O'Brodovich, H. and Lukacs, G.L. (1999). Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.* **6**(4): 482-497.
- Lele, B.S. and Leroux, J.-C. (2002a). Synthesis and micellar characterization of novel amphiphilic A-B-A triblock copolymers of *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide or *N*-vinyl-2-pyrrolidone with poly(ϵ -caprolactone). *Macromolecules* **35**: 6714-6723.
- Lele, B.S. and Leroux, J.-C. (2002b). Synthesis of novel amphiphilic star-shaped poly(ϵ -caprolactone)-*block*-poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) by combination of ring-opening and chain transfer polymerization. *Polymer* **43**: 5595-5606.
- Leonetti, J.P., Mechti, N., Degols, G., Gagnor, C. and Lebleu, B. (1991). Intracellular Distribution of Microinjected Antisense Oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**(7): 2702-2706.
- Li, S., Deshmukh, H.M. and Huang, L. (1998). Folate-mediated targeting of antisense oligodeoxynucleotides to ovarian cancer cells. *Pharm. Res.* **15**(10): 1540-1545.
- Lim, D.W., Yeom, Y.I. and Park, T.G. (2000a). Poly(DMAEMA-NVP)-*b*-PEG-galactose as gene delivery vector for hepatocytes. *Bioconjugate Chem.* **11**: 688-695.
- Lim, Y.B., Han, S.O., Kong, H.U., Lee, Y., Park, J.S., Jeong, B. and Kim, S.W. (2000b). Biodegradable polyester, poly[α -(4-aminobutyl)-L-glycolic acid], as a non-toxic gene carrier. *Pharm Res* **17**(7): 811-816.
- Litzinger, D.C., Brown, J.M., Wala, I., Kaufman, S.A., Van, G.Y., Farrell, C.L. and Collins, D. (1996). Fate of cationic liposomes and their complex with oligonucleotide *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* **1281**(2): 139-149.
- Liu, F., Song, Y.K. and Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* **6**(7): 1258-1266.

- Liu, S., Weaver, J.V.M., Tang, Y.T., Billingham, N.C. and Armes, S.P. (2002). Synthesis of shell cross-linked micelles with pH-responsive cores using ABC triblock copolymers. *Macromolecules* **35**: 6121-6131.
- Ludtke, J.J., Zhang, G., Sebestyén, M.G. and Wolff, J.A. (1999). A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *J. Cell Sci.* **112**(12): 2033-2041.
- Lukacs, G.L., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N. and Verkman, A.S. (2000). Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* **275**(3): 1625-1629.
- Luo, D. and Saltzman, W.M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol* **18**(1): 33-37.
- Luten, J., van Steenis, J.H., van Someren, R., Kemmink, J., Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M.E., Koning, G.A., Crommelin, D.J.A., van Nostrum, C.F. and Hennink, W.E. (2003). Water-soluble biodegradable cationic polyphosphazenes for gene delivery. *J. Control. Release* **89**(3): 483-497.
- Lynn, D.M. and Langer, R. (2000). Degradable poly(β -amino esters): Synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA. *J. Am. Chem. Soc* **122**(44): 10761-10768.
- Manickam, D.S. and Oupicky, D. (2006). Polyplex gene delivery modulated by redox potential gradients. *Journal of Drug Targeting* **14**(8): 519-526.
- Mann, M.J., Gibbons, G.H., Hutchinson, H., Poston, R.S., Hoyt, E.G., Robbins, R.C. and Dzau, V.J. (1999). Pressure-mediated oligonucleotide transfection of rat and human cardiovascular tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**(11): 6411-6416.
- Marcusson, E.G., Bhat, B., Manoharan, M., Bennett, C.F. and Dean, N.M. (1998). Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides dissociate from cationic lipids before entering the nucleus. *Nucleic Acids Res.* **26**(8): 2016-2023.

- Mascotti, D.P. and Lohman, T.M. (1990). Thermodynamic Extent of Counterion Release Upon Binding Oligolysines to Single-Stranded Nucleic-Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**(8): 3142-3146.
- Matyjaszewski, K. and Xia, J.H. (2001). Atom transfer radical polymerization. *Chem. Rev.* **101**(9): 2921-2990.
- Merdan, T., Kunath, K., Fischer, D., Kopecek, J. and Kissel, T. (2002). Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm. Res.* **19**(2): 140-146.
- Michel, T., Martinand-Mari, C., Debart, F., Lebleu, B., Robbins, I. and Vasseur, J.J. (2003). Cationic phosphoramidate α -oligonucleotides efficiently target single-stranded DNA and RNA and inhibit hepatitis C virus IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res* **31**(18): 5282-5290.
- Mislick, K.A. and Baldeschwieler, J.D. (1996). Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**(22): 12349-12354.
- Mizumura, Y., Matsumura, Y., Hamaguchi, T., Nishiyama, N., Kataoka, K., Kawaguchi, T., Hrushesky, W.J.M., Moriyasu, F. and Kakizoe, T. (2001). Cisplatin-incorporated polymeric micelles eliminate nephrotoxicity, while maintaining antitumor activity. *Jpn. J. Cancer Res.* **92**: 328-336.
- Müller, R.H., Radtke, M. and Wissing, S.A. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**: S131-S155.
- Mundargi, R.C., Babu, V.R., Rangaswamy, V., Patel, P. and Aminabhavi, T.M. (2008). Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Controlled Release* **125**(3): 193-209.

- Nagarajan, R., Barry, M. and Ruckenstein, E. (1986). Unusual selectivity in solubilization by block copolymer micelles. *Langmuir* **2**: 210-215.
- Nakanishi, T., Fukushima, S., Okamoto, K., Suzuki, M., Matsumura, Y., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y. and Kataoka, K. (2001). Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *J. Controlled Release* **74**: 295-302.
- Neu, M., Germershaus, O., Mao, S., Voigt, K.H., Behe, M. and Kissel, T. (2007). Crosslinked nanocarriers based upon poly(ethylene imine) for systemic plasmid delivery: *In vitro* characterization and *in vivo* studies in mice. *J. Control. Release* **118**(3): 370-380.
- Neu, M., Sitterberg, J., Bakowsky, U. and Kissel, T. (2006). Stabilized nanocarriers for plasmids based upon cross-linked poly(ethylene imine). *Biomacromolecules* **7**(12): 3428-3438.
- Neves, C., Byk, G., Scherman, D. and Wils, P. (1999). Coupling of a targeting peptide to plasmid DNA by covalent triple helix formation. *FEBS Lett* **453**(1-2): 41-45.
- Ogris, M., Brunner, S., Schüller, S., Kircheis, R. and Wagner, E. (1999). PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* **6**(4): 595-605.
- Ogris, M., Steinlein, P., Kursa, M., Mechtler, K., Kircheis, R. and Wagner, E. (1998). The size of DNA/Transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther* **5**(10): 1425-1433.
- Oh, I., Lee, K., Kwon, H.-Y., Lee, Y.-B., Shin, S.-C., Cho, C.-S. and Kim, C.-K. (1999). Release of adriamycin from poly(γ -benzyl-L-glutamate)/poly(ethylene oxide) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **181**: 107-115.
- Ohmichi, T., Kuwahara, M., Sasaki, N., Hasegawa, M., Nishikata, T., Sawai, H. and Sugimoto, N. (2005). Nucleic acid with guanidinium modification exhibits efficient cellular uptake. *Angewandte Chemie-International Edition* **44**(41): 6682-6685.

- Olivares, E.C., Hollis, R.P., Chalberg, T.W., Meuse, L., Kay, M.A. and Calos, M.P. (2002). Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat. Biotechnol.* **20**(11): 1124-1128.
- Ou, M., Wang, X.L., Xu, R.Z., Chang, C.W., Bull, D.A. and Kim, S.W. (2008). Novel biodegradable poly(disulfide amine)s for gene delivery with high efficiency and low cytotoxicity. *Bioconjugate Chem.* **19**(3): 626-633.
- Oupický, D., Carlisle, R.C. and Seymour, L.W. (2001). Triggered intracellular activation of disulfide crosslinked polyelectrolyte gene delivery complexes with extended systemic circulation *in vivo*. *Gene Ther.* **8**(9): 713-724.
- Pack, D.W., Hoffman, A.S., Pun, S. and Stayton, P.S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**(7): 581-593.
- Papisov, I.M. and Litmanovich, A.A. (1989). Molecular "Recognition" in Interpolymer Interactions and Matrix Polymerization. *Adv Pol Sci* **90**: 139-179.
- Pector, V., Backmann, J., Maes, D., Vandenbranden, M. and Ruyschaert, J.M. (2000). Biophysical and structural properties of DNA•diC₁₄-amidine complexes - Influence of the DNA/lipid ratio. *J. Biol. Chem.* **275**(38): 29533-29538.
- Pintauer, T. and Matyjaszewski, K. (2008). Atom transfer radical addition and polymerization reactions catalyzed by ppm amounts of copper complexes. *Chem. Soc. Rev.* **37**(6): 1087-1097.
- Plank, C., Mechtler, K., Szoka, F.C. and Wagner, E. (1996). Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum. Gene Ther.* **7**(12): 1437-1446.
- Pooga, M., Soomets, U., Hällbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., Kahl, U., Hao, J.X., Xu, X.J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Bartfai, T. and Langel, Ü. (1998). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission *in vivo*. *Nat Biotechnol* **16**(9): 857-861.

- Pouton, C.W., Lucas, P., Thomas, B.J., Uduehi, A.N., Milroy, D.A. and Moss, S.H. (1998). Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J Controlled Release* **53**(1-3): 289-299.
- Pozharski, E. and MacDonald, R.C. (2003). Lipoplex thermodynamics: Determination of DNA-cationic lipid interaction energies. *Biophys. J.* **85**(6): 3969-3978.
- Raju, B.B., Winnik, F.M. and Morishima, Y. (2001). A look at the thermodynamics of the association of amphiphilic polyelectrolytes in aqueous solutions: strengths and limitations of isothermal titration calorimetry. *Langmuir* **17**(14): 4416-4421.
- Ranger, M., Jones, M.C., Yessine, M.A. and Leroux, J.C. (2001). From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization method to supramolecular assemblies. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **39**: 3861-3874.
- Record, M.T., Woodbury, C.P. and Lohman, T.M. (1976). Na⁺ Effects on Transitions of DNA and Polynucleotides of Variable Linear Charge-Density. *Biopolymers* **15**(5): 893-915.
- Rejman, J., Bragonzi, A. and Conese, M. (2005). Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol Ther* **12**(3): 468-474.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S. and Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **377**: 159-169.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V. and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides - A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* **278**(1): 585-590.
- Rifai, A., Brysch, W., Fadden, K., Clark, J. and Schlingensiepen, K.H. (1996). Clearance kinetics, biodistribution, and organ saturability of phosphorothioate oligodeoxynucleotides in mice. *Am. J. Pathol.* **149**(2): 717-725.

Rosenberg, S.A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R.A., Moen, R., Karson, E.M., Lotze, M.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., Merino, M.J., Culver, K., Miller, A.D., Blaese, R.M. and Anderson, W.F. (1990). Gene-Transfer into Humans - Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *N Engl J Med* **323**(9): 570-578.

Rösler, A., Vandermeulen, G.W.M. and Klok, H.-A. (2001). Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**: 95-108.

Roth, C.M. and Sundaram, S. (2004). Engineering synthetic vectors for improved DNA delivery: Insights from intracellular pathways. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **6**: 397-426.

Rungsardthong, U., Deshpande, M., Bailey, L., Vamvakaki, M., Armes, S.P., Garnett, M.C. and Stolnik, S. (2001). Copolymers of amine methacrylate with poly(ethylene glycol) as vectors for gene therapy. *J. Controlled Release* **73**: 359-380.

Rungsardthong, U., Ehtezazi, T., Bailey, L., Armes, S.P., Garnett, M.C. and Stolnik, S. (2003). Effect of polymer ionization on the interaction with DNA in nonviral gene delivery systems. *Biomacromolecules* **4**(3): 683-690.

Sakamoto, T., Miyazaki, E., Aramaki, Y., Arima, H., Takahashi, M., Kato, Y., Koga, M. and Tsuchiya, S. (2004). Improvement of dermatitis by iontophoretically delivered antisense oligonucleotides for interleukin-10 in NC/Nga mice. *Gene Ther.* **11**(3): 317-324.

Sant, V.P. and Leroux, J.-C. (2002). Synthesis of poly(ethylene glycol)-*b*-poly(ethyl acrylate-*co*-methacrylic acid) and preparation of pH sensitive supramolecular aggregates as carriers of hydrophobic drugs. *AAPS Pharm. Sci.* **4**(4): W4087.

Sant, V.P., Smith, D. and Leroux, J.C. (2004). Novel pH-sensitive supramolecular assemblies for oral delivery of poorly water soluble drugs: preparation and characterization. *J. Controlled Release* **97**: 301-312.

- Savic, R., Luo, L., Eisenberg, A. and Maysinger, D. (2003). Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles. *Science* **300**: 615-618.
- Scott, W.G. and Klug, A. (1996). Ribozymes: Structure and mechanism in RNA catalysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**(6): 220-224.
- Sebestyén, M.G., Ludtke, J.J., Bassik, M.C., Zhang, G., Budker, V., Lukhtanov, E.A., Hagstrom, J.E. and Wolff, J.A. (1998). DNA vector chemistry: The covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nat Biotechnol* **16**(1): 80-85.
- Seymour, L.W., Duncan, R., Strohalm, J. and Kopeček, J. (1987). Effect of molecular weight (M_w) of *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats. *J. Biomed. Mater. Res.* **21**: 1341-1358.
- Shi, N., Boado, R.J. and Pardridge, W.M. (2000). Antisense imaging of gene expression in the brain *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(26): 14709-14714.
- Simmons, C.G., Pitts, A.E., Mayfield, L.D., Shay, J.W. and Corey, D.R. (1997). Synthesis and membrane permeability of PNA-peptide conjugates. *Bioorg Med Chem Lett* **7**(23): 3001-3006.
- Sonawane, N.D., Szoka, F.C. and Verkman, A.S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* **278**(45): 44826-44831.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R.K., Racie, T., Rajeev, K.G., Röhl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Koteliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M. and Vornlocher, H.P. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* **432**(7014): 173-178.

Stein, C.A. and Cheng, Y.C. (1993). Antisense Oligonucleotides as Therapeutic Agents - Is the Bullet Really Magical. *Science* **261**(5124): 1004-1012.

Sternberg, B., Sorgi, F.L. and Huang, L. (1994). New Structures in Complex Formation between DNA and Cationic Liposomes Visualized by Freeze-Fracture Electron Microscopy. *FEBS Lett* **356**(2-3): 361-366.

Sundaram, S., Lee, L.K. and Roth, C.M. (2007). Interplay of polyethyleneimine molecular weight and oligonucleotide backbone chemistry in the dynamics of antisense activity. *Nucleic Acids Res.* **35**(13): 4396-4408.

Sundaram, S., Viriyayuthakorn, S. and Roth, C.M. (2005). Oligonucleotide structure influences the interactions between cationic polymers and oligonucleotides. *Biomacromolecules* **6**(6): 2961-2968.

Taillefer, J., Brasseur, N., van Lier, J.E., Lenaerts, V., Le Garrec, D. and Leroux, J.-C. (2001). In-vitro and in-vivo evaluation of pH-responsive polymeric micelles in a photodynamic cancer therapy model. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**: 155-166.

Tang, M.X. and Szoka, F.C. (1997). The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther* **4**: 823-832.

Teng, Y., Morrison, M.E., Munk, P. and Webber, S.E. (1998). Release kinetics studies of aromatic molecules into water from block polymer micelles. *Macromolecules* **31**: 3578-3587.

Torchilin, V.P. (1998). Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals. *J. Microencapsulation* **15**(1): 1-19.

Torchilin, V.P. (2001). Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J. Controlled Release* **73**: 137-172.

Toub, N., Malvy, C., Fattal, E. and Couvreur, P. (2006). Innovative nanotechnologies for the delivery of oligonucleotides and siRNA. *Biomed. Pharmacother.* **60**(9): 607-620.

- Ulbrich, K., Etrych, T., Chytil, P., Jelinkova, M. and Rihova, B. (2003). HEMA copolymers with pH-controlled release of doxorubicin. *In vitro* cytotoxicity and *in vivo* antitumor activity. *J. Controlled Release* **87**: 33-47.
- Vacik, J., Dean, B.S., Zimmer, W.E. and Dean, D.A. (1999). Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Ther.* **6**: 1006-1014.
- van de Wetering, P., Cherng, J.-Y., Talsma, H., Crommelin, D.J.A. and Hennink, W.E. (1998). 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents. *J. Controlled Release* **53**: 145-153.
- van de Wetering, P., Cherng, J.-Y., Talsma, H. and Hennink, W.E. (1997). Relation between transfection efficiency and cytotoxicity of poly(2-dimethylamino)ethyl methacrylate/plasmid complexes. *J. Controlled Release* **49**: 59-69.
- van Zuylen, L., Verweij, J. and Sparreboom, A. (2001). Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Invest. New Drugs* **19**: 125-141.
- Verbaan, F.J., Oussoren, C., Snel, C.J., Crommelin, D.J.A., Hennink, W.E. and Storm, G. (2004). Steric stabilization of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-based polyplexes mediates prolonged circulation and tumor targeting in mice. *J. Gene Med.* **6**: 64-75.
- Vinogradov, S., Batrakova, E., Li, S. and Kabanov, A. (1999). Polyion complex micelles with protein-modified corona for receptor-mediated delivery of oligonucleotides into cells. *Bioconjugate Chem.* **10**: 851-860.
- von Gersdorff, K., Sanders, N.N., Vandenbroucke, R., De Smedt, S.C., Wagner, E. and Ogris, M. (2006). The internalization route resulting in successful gene expression depends on polyethylenimine both cell line and polyplex type. *Mol. Ther.* **14**(5): 745-753.
- Waehler, R., Russell, S.J. and Curiel, D.T. (2007). Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **8**(8): 573-587.
- Wagstaff, K.M. and Jans, D.A. (2007). Nucleocytoplasmic transport of DNA: enhancing non-viral gene transfer. *Biochem. J.* **406**: 185-202.

- Wells, D.J. (2004). Gene therapy progress and prospects: Electroporation and other physical methods. *Gene Ther.* **11**(18): 1363-1369.
- Wickstrom, E. (1986). Oligodeoxynucleotide stability in subcellular extracts and culture media. *J. Biochem. Biophys. Methods* **13**(23): 97-102.
- Wiethoff, C.M. and Middaugh, C.R. (2003). Barriers to nonviral gene delivery. *J. Pharm. Sci.* **92**(2): 203-217.
- Wilds, C.J. and Damha, M.J. (2000). 2'-Deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleosides and oligonucleotides (2'F-ANA): synthesis and physicochemical studies. *Nucleic Acids Res.* **28**(18): 3625-3635.
- Wilson, H.L., Dar, A., Napper, S.K., Marianela Lopez, A., Babiuk, L.A. and Mutwiri, G.K. (2006). Immune mechanisms and therapeutic potential of CpG oligodeoxynucleotides. *Int. Rev. Immunol.* **25**(3-4): 183-213.
- Wolfert, M.A., Dash, P.R., Nazarova, O., Oupický, D., Seymour, L.W., Smart, S., Strohal, J. and Ulbrich, K. (1999). Polyelectrolyte vectors for gene delivery: Influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconjugate Chem.* **10**(6): 993-1004.
- Wong, S.Y., Pelet, J.M. and Putnam, D. (2007). Polymer systems for gene delivery-past, present, and future. *Prog Polym Sci* **32**(8-9): 799-837.
- Xu, Y., Hui, S.W., Frederik, P. and Szoka, F.C. (1999). Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes. *Biophys. J.* **77**(1): 341-353.
- Xu, Y.H. and Szoka, F.C. (1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* **35**(18): 5616-5623.
- Yessine, M.A., Meier, C., Petereit, H.U. and Leroux, J.C. (2006). On the role of methacrylic acid copolymers in the intracellular delivery of antisense oligonucleotides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **63**(1): 1-10.

- Yokoyama, M., Fukushima, S., Uehara, R., Okamoto, K., Kataoka, K., Sakurai, Y. and Okano, T. (1998). Characterization of physical entrapment and chemical conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for *in vivo* delivery to a solid tumor. *J. Controlled Release* **50**: 79-92.
- You, Y.Z., Manickam, D.S., Zhou, Q.H. and Oupický, D. (2007). Reducible poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate): Synthesis, cytotoxicity, and gene delivery activity. *J. Controlled Release* **122**(3): 217-225.
- Young, L.S., Searle, P.F., Onion, D. and Mautner, V. (2006). Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *Journal of Pathology* **208**(2): 299-318.
- Zamaratski, E., Pradeepkumar, P.I. and Chattopadhyaya, J. (2001). A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *J. Biochem. Biophys. Methods* **48**(3): 189-208.
- Zamore, P.D. (2001). RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol* **8**(9): 746-750.
- Zanta, M.A., Belguise-Valladier, P. and Behr, J.P. (1999). Gene delivery: A single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**(1): 91-96.
- Zauner, W., Ogris, M. and Wagner, E. (1998). Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **30**(1-3): 97-113.
- Zelphati, O., Nguyen, C., Ferrari, M., Felgner, J., Tsai, Y. and Felgner, P.L. (1998a). Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery. *Gene Ther.* **5**(9): 1272-1282.
- Zelphati, O. and Szoka, F.C. (1996). Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**(21): 11493-11498.
- Zelphati, O., Uyechi, L.S., Barron, L.G. and Szoka, F.C. (1998b). Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes

and on their interactions with cells. *Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab* **1390**(2): 119-133.

Zhang, G.-D., Nishiyama, N., Harada, A., Jiang, D.-L., Aida, T. and Kataoka, K. (2003). pH-sensitive assembly of light-harvesting dendrimer zinc porphyrin bearing peripheral groups of primary amine with poly(ethylene glycol)-*b*-poly(aspartic acid) in aqueous solution. *Macromolecules* **36**: 1304-1309.

Zhang, G., Budker, V. and Wolff, J.A. (1999). High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* **10**(10): 1735-1737.

Zhang, G., Gao, X., Song, Y.K., Vollmer, R., Stolz, D.B., Gasiorowski, J.Z., Dean, D.A. and Liu, D. (2004). Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther.* **11**(8): 675-682.

Zhang, X., Jackson, J.K. and Burt, H.M. (1996). Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *Int. J. Pharm.* **132**: 195-206.

Zhang, Z.Y. and Smith, B.D. (2000). High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: Membrane bending model. *Bioconjugate Chem.* **11**(6): 805-814.

Zuhorn, I.S., Engberts, J.B.F.N. and Hoekstra, D. (2007). Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *Eur Biophys J* **36**(4-5): 349-362.

CHAPITRE 3 - Study of the Micellization Behavior of Different Order Amino Block Copolymers with Heparin

Publié dans *Pharm. Res.* (2004) 21: 160-169

Reproduit avec la permission de Springer Science and Business Media

Marie-Hélène Dufresne and Jean-Christophe Leroux*

Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal,
P.O. Box 6128, Downtown Station, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

*Corresponding author:

Tel: (514) 343-6455

Fax: (514) 343-7738

E-mail



1 Abstract

Purpose. To prepare and characterize copolymers presenting different pendant amino groups and to study their ability to form polyelectrolyte complexes with heparin. The responsiveness of the complexes to variations in pH and ionic strength was correlated to the nature of the copolymers.

Methods. Copolymers composed of different aminoethyl methacrylate monomers were synthesized by atom transfer radical polymerization (ATRP) from a poly(ethylene glycol) macroinitiator. Copolymers were characterized by gel permeation chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Micellization properties were assessed by atomic force microscopy, multi-angle static light scattering, and dynamic light scattering on complexes formed from the addition of heparin to a solution of polymer.

Results. Primary, tertiary and quaternary amine-based diblock copolymers with molecular weights ranging from 4,900 to 7,400 and low polydispersity indexes were prepared. The synthesis of a copolymer bearing primary amines was achieved for the first time by ATRP. Micellization was found to be pH and polymer-dependent. All polymers interacted with heparin at acidic pH to yield monodisperse assemblies of less than 30 nm. Complexes dissociated in response to increases in ionic strength.

Conclusions. Electrostatic interactions between the amino copolymers and heparin triggered the formation of small, monodisperse and stable complexes that present great potential as oral drug delivery systems.

Keywords: polyion complex micelles, atom transfer radical polymerization, cationic copolymers, heparin.

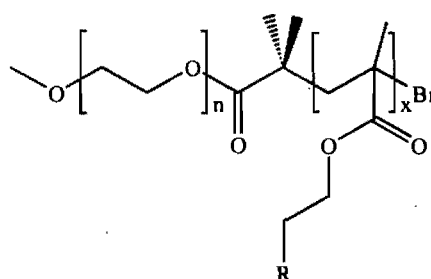
2 Introduction

Heparin is a macromolecular glycosaminoglycan with anticoagulant properties. It is one of the drugs most widely used in North America for preventing and treating deep vein thrombosis and pulmonary embolisms. Unfortunately, its administration is restricted to the parenteral route as its oral bioavailability is impaired by a short half-life, large molecular size and overall negative charge. Current treatments require careful patient monitoring and therefore point to the development of new lower-cost and patient-friendly formulations. Several strategies have been explored to increase the oral bioavailability of heparin. These are generally aimed either at the neutralization of its negative charges (to prevent electrostatic repulsions between the drug and gastrointestinal mucosa) or the protection of the drug from pH and enzymatic degradation. Examples include the use of absorption enhancers (such as ethylenediaminetetraacetic acid (Windsor 1961) or sulfonated surfactants (Engel 1969)), chemical modifications (deoxycholic acid–heparin conjugates (Lee 2001)) and particulate carrier systems (Sakuragawa 1981). However, these approaches have only had limited success. Currently, the most effective formulation is the co-administration of heparin with *N*-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate (Baughman 1998), an absorption enhancer which improves heparin's oral absorption in humans. Though promising, this formulation is not yet optimal in that the anticoagulant activity only lasts 4 h at doses higher than those usually recommended for humans. Recently, the use of polymeric carriers has attracted considerable attention as the technology can simultaneously protect a drug from the surroundings, provide a controlled and sustained release, and potentially account for increased absorption. In this light, heparin-loaded micro- and nanoparticles composed of blends of 2 biodegradable polymers (namely poly(ϵ -caprolactone) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)) and 2 non-biodegradable cationic polymethacrylates (Eudragit[®] RS and RL) were proposed by Maincent and coworkers (Jiao 2002a; Jiao 2002b). These systems presented anticoagulant activity in a rabbit model for up to 7 h at doses close to those commonly administered by

the intravenous route. We now intend to exploit the properties of polymeric carrier systems by introducing a new formulation of heparin as polyion complex micelles (PICM).

PICM generally result from favorable interactions between a charged diblock copolymer and an oppositely charged polyion (Kataoka 2001). The formation of PICM is best described as the sequential complexation of the polyions through electrostatic interactions followed by the self-association of the condensates into micelles. Neutralization of the charged segments indeed yields water-insoluble moieties that contribute to a decrease in the entropy of the system. To offset this entropy loss the neutralized segments withdraw from the aqueous phase and self-assemble into micelles presenting a core/shell architecture. The formation of PICM was shown to be concentration-dependent and the critical association concentration of such systems has been evaluated by either monitoring changes in the intensity of pyrene fluorescence emission (Kabanov 1996) or in the apparent molecular weight (Harada 2001) with concentration. PICM have been designed for the delivery of charged drugs such as oligonucleotides (Kataoka 1996), DNA (Kakizawa 2002) and enzymes (Harada 1998). They present numerous advantages including their straightforward synthesis, self-assembly in aqueous medium and narrow size distribution. Furthermore, entrapment of the drug in the core was shown to protect it from *in vivo* metabolism or enzymatic degradation (Harada 2001). Polymers commonly used for the delivery of polyanionic drugs include polyethylenimine (PEI) (Boussif 1995), poly(L-lysine) (Kataoka 1996), polyamidoamide (PAMAM) (Kukowska-Latallo 1996), and poly[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate] (PDMAEMA) (Rungsardthong 2001). All polymers, except for PDMAEMA, present primary amines which are mostly protonated at physiological pH. Furthermore, PEI and PAMAM possess higher order amines that are responsible for their increased buffering capacity. Clearly, the order (*i.e.* degree of substitution) of the amines confers certain characteristic properties to the drug/polymer complexes. In this study, block copolymers of poly(ethylene glycol) (PEG) and moieties bearing different amino groups (Figure 3-1) were synthesized in order to evaluate the relationship between the different order amines and

their complexation behavior with heparin. The polymerization of different alkylated derivatives of 2-(*N*-amino)ethyl methacrylate provided a range of primary, tertiary and quaternary amine-based complexes.



Where R stands for :

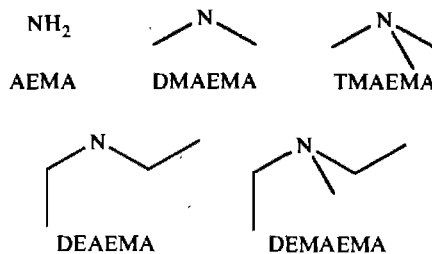


Figure 3-1. Structure of the amino diblock copolymers studied.

All copolymers were synthesized by a robust and versatile controlled polymerization method known as atom transfer radical polymerization (ATRP). ATRP allows for the control of molecular weight and polydispersity of polymer chains as well as their composition (Davis 2001), architecture (Angot 2000) and end-group functionality (Coessens 1999). The success of ATRP lies in the establishment of a dynamic equilibrium between propagating radicals and dormant polymer chains so as to keep the actual concentration of active species much lower than the total concentration of chains, thus reducing radical-radical termination and enhancing control over the polymerization reaction (Matyjaszewski 1997). Despite its capability of polymerizing a wide range of

monomers, the polymerization of methacrylates presenting pendant amino groups remains difficult. This is because amines can provoke the displacement of the ligand from the metal complex (Coessens 2001), and in the case of primary amines, react with the halogen end group of the initiator or of the growing polymer chain (Coessens 1999). Under appropriate reaction conditions, we were able to exploit ATRP for the synthesis of copolymers presenting different amino groups. To the best of our knowledge, this is the first report in which ATRP was successfully used to produce polymers bearing pendant primary amino groups.

3 Materials and Methods

3.1 Materials

Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa (molecular weight (MW) of ~6,000) was purchased from Sigma (St. Louis, MO). 2-(*N*-amino)ethyl methacrylate hydrochloride (AEMA) was obtained from Polysciences Inc. (Warrington, PA) and used as received. All other chemicals were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) and used as received, except for 2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) and 2-(*N,N*-diethylamino)ethyl methacrylate (DEAEMA), which were vacuum-distilled prior to polymerization. Tetrahydrofuran (THF) was dried over sodium with benzophenone as indicator, and dichloromethane (DCM) was dried over calcium chloride.

3.2 Instrumentation

3.2.1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Analyses

All ^1H NMR spectra were recorded on a Bruker NMR spectrometer operating at 300 MHz (Bruker, Milton, Ontario, Canada). Solutions were prepared in deuterated chloroform (CDCl_3), methanol (CD_3OD) or water (D_2O).

3.2.2 Molecular Weight Determination

Number- (M_n) and weight-average (M_w) MWs were determined by gel permeation chromatography (GPC) using an Alliance GPCV 2000 system (Waters, Milford, MA) equipped with a differential refractive index detector. GPC analyses were performed in THF (HPLC grade) using 3 Waters Styragel columns (HR1, HR3 and HR4) in series at a flow rate of 1.0 ml/min and a temperature of 40 °C. A calibration curve was obtained with near-monodisperse PEG standards.

3.2.3 Dynamic Light Scattering (DLS) and Multi-Angle Static Light Scattering (MASLS) Measurements

The mean hydrodynamic diameter, size distribution, and scattering intensity of PICM were determined using a Malvern Autosizer 4800 equipped with a 488 nm uniphase argon-ion laser (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.). Measurements were performed in triplicate at a scattering angle of 90° and a temperature of 25°C. The CONTIN program was used to extract size distributions from the auto-correlation functions. Alternatively, MASLS measurements were conducted at 25°C at 8 angles ranging from 50 to 120° for a minimum of 3 concentrations. All samples were passed through 0.45 and 0.22- μm nylon filters prior to analysis. The M_w s of the complexes were extracted from

Equation 1, which describes the intensity of light scattered from a dilute solution of macromolecules:

$$\frac{Kc}{R_0} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2 A_2 c + 3 A_3 c^2 \quad [1]$$

In this equation, c stands for the solution concentration in both polymer and heparin, R_0 is the Rayleigh ratio of the solution while A_2 and A_3 are the second and third virial coefficients. K is in turn defined by:

$$K = \frac{4 \pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2}{\lambda^4 N} \quad [2]$$

where n_0 is the refractive index of the solvent, λ the laser wavelength *in vacuo*, and N Avogadro's number. The specific refractive index increments (dn/dc) were determined using a differential Rudolph J157 automatic refractometer (Rudolph Research Analytical, Flanders, NJ), at a wavelength of 589.3 nm.

3.2.4 Atomic Force Microscopy (AFM) Imaging

The topographic data of the complexes was collected using a Nanoscope III Dimension 3100 atomic force microscope (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). Imaging was performed in tapping mode with a silicon tip (tapping mode etched Si probes – RTESP7) operating at a 300 KHz resonant frequency and a 42 N/m constant force. Samples were prepared by letting a drop of an acidic aqueous solution of PICM (polymer concentration of 0.2 mg/ml, pH 5) dry on a freshly cleaved mica surface at room temperature. PICM were formed at a -/+ molar charge ratio of 1.5.

3.3 Synthesis of poly(ethylene glycol) ATRP macroinitiator (α - (2-bromoisobutyrylate)- ω -methylPEG)

Fifteen grams of MeO-PEG-OH ($M_n = 2,000$, 7.5 mmol) was dried with toluene by azeotropic distillation, dissolved in 70 ml anhydrous THF and chilled for 20 min in an ice-water bath in presence of triethylamine (2.4 ml, 17.2 mmol). 2-bromoisobutyryl bromide (6.5 ml, 33.5 mmol) was added dropwise, the reaction mixture was warmed to room temperature and allowed to react for 48 h (Ranger 2001). The reaction was stopped by adding DCM and washing with 10% aqueous HCl. The organic phase was then extracted with 1 M NaOH, brine, and dried over magnesium sulfate. Solvents were evaporated under reduced pressure. The crude extract was dissolved in a minimum of DCM and precipitated in diethyl ether. The product was recovered by simple filtration.

$^1\text{H NMR}$ (δ , ppm, CDCl_3): 4.33 (2H, t), 3.65 (180H, m), 3.38 (3H, s), 1.94 (6H, s).

Yield: 70%, after precipitation.

3.4 Synthesis of 2-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl methacrylate (AEMABoc)

A suspension of AEMA in anhydrous DCM (0.30 M) was stirred for 10 min in an ice-water bath. Freshly distilled triethylamine was then added (1.1 Eq) and the reaction mixture stirred for 20 min. A solution of bis(*tert*-butyl)dicarbonate in DCM (1.1 Eq in sufficient DCM to bring AEMA to a final concentration of 0.27 M) was added, the reaction mixture warmed to room temperature and allowed to react for 24 h. The reaction was stopped by extracting the organic phase with water, 1 M HCl, saturated aqueous sodium bicarbonate, and brine. The organic extract was dried over sodium sulfate and the solvent was removed *in vacuo* to give a crude crystalline product that was used without further purification.

¹H NMR (δ, ppm, CDCl₃): 6.13 (1H, d), 5.60 (1H, t), 4.78 (1H, broad s), 4.21 (2H, t), 3.45 (2H, q), 1.95 (3H, s), 1.45 (9H, s). Yield: 93%.

3.5 ATRP polymerization

Polymerization of monomers was performed in solution using α-(2-bromoisobutyrylate)-ω-methylPEG as the ATRP macroinitiator. The PEG ATRP macroinitiator (1 Eq) was dissolved in distilled THF along with 16-25 Eq of the monomer to a final monomer concentration of 0.5 or 0.8 M. Concurrently, Cu(I)Br (1.1 Eq) and *N,N,N',N',N''*-pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA, 1.1 Eq) were mixed in a second round bottom flask. The contents of both reaction vessels were purged with argon for 15-20 min, after which the PEG/monomer solution was transferred to the metal complex activator using a two-head syringe. Polymerization was typically carried out at 65°C for 16 h. The polymerization reaction was stopped by dilution with an ethanol/THF solution (final ethanol concentration of 10%) and removal of the copper complex by filtration on a silica gel column using THF as eluent. Evaporation of the solvents under reduced pressure provided crude polymers that were purified by dialysis against water (Spectra/Por no.1, MW cutoff 6,000-8,000) for at least 48 h and recovered by freeze-drying (using a FreeZone 6 system, Labconco, Kansas City, MO).

3.5.1 PEG-*b*-P(AEMABoc)

¹H NMR (δ, ppm, CDCl₃): 5.54 (16H, broad s), 4.01 (32H, broad s), 3.65 (185H, m), 3.39 (3H, s + 32H, broad s), 1.84 (36H, m), 1.45 (160H, s), 1.26-0.89 (6H, s + 46H, m).

3.5.2 PEG-*b*-P(DMAEMA)

¹H NMR (δ, ppm, CDCl₃): 4.08 (33H, broad s), 3.65 (176H, m), 3.38 (3H, s), 2.59 (33H, broad s), 2.30 (96H, s), 1.98-1.83 (31H, m), 1.14-0.90 (6H, s + 46H, m). Yield: 25%, after purification.

3.5.3 PEG-*b*-P(DEAEMA)

¹H NMR (δ, ppm, CDCl₃): 3.99 (25H, broad s), 3.65 (175H, m), 3.39 (3H, s), 2.70 (25H, broad s), 2.58 (50H, m), 1.98-1.81 (24H, m), 1.26-0.90 (6H, s + 77H, t + 39H, m). Yield: 31%, after purification.

3.6 Deprotection of PEG-*b*-P(AEMABoc) to its hydrochloride salt derivative PEG-*b*-P(AEMA)

Crude polymer extracts were dissolved in 3 M HCl/EtOAc to a final amine concentration of 0.15 N. The reaction was carried out for 2½ h after which solvents were removed under reduced pressure. The polymer was dissolved in ethanol, dialyzed against water, and recovered by freeze-drying.

¹H NMR (δ, ppm, D₂O): 4.21 (34H, broad s), 3.66 (165H, m), 3.34 (3H, s), 3.25 (34H, broad s), 1.99 (31H, m), 1.16-0.90 (6H, s + 50H, m). Yield: 28%, after purification.

3.7 Transformation of PEG-*b*-P(DMAEMA) and PEG-*b*-P(DEAEMA) into PEG-*b*-poly[2-(*N,N,N*-trimethylamino)ethyl methacrylate] (PEG-*b*-P(TMAEMA))

and PEG-*b*-poly[2-(*N,N,N*-diethylmethylamino)ethyl methacrylate] (PEG-*b*-P(DEMAEMA)), respectively.

Alkylation of the tertiary amine groups of the methacrylate residues was done in order to introduce permanent positive charges on the nitrogen atoms. An excess of methyl iodide (2 Eq with respect to amino groups) was added to a solution of polymer in water (30 mg/ml). Methylation was carried for 3 and 4 h for PEG-*b*-P(DMAEMA) and PEG-*b*-P(DEAEMA), respectively. The quaternized polymers were purified by dialysis against water and recovered by freeze-drying.

3.7.1 PEG-*b*-P(TMAEMA)

¹H NMR (δ , ppm, CD₃OD): 4.56 (33H, broad s), 4.09 (32H, broad s), 3.64-3.36 (181 H, m + 150 H, broad s + 3H, s), 2.07 (32H, broad s), 1.31-1.06 (6H, s + 51H, m). Yield: 76%, after purification.

3.7.2 PEG-*b*-P(DEMAEMA)

¹H NMR (δ , ppm, CD₃OD): 4.54 (24H, broad s), 3.96 (24H, broad s), 3.64 (47H, broad s + 170H, m), 3.36 (3H, s), 3.31 (CD₃OD + broad s), 2.06 (24H, broad s), 1.47 (72H, broad s), 1.23-1.09 (6H, s + 37H, m). Yield: 59%, after purification.

3.8 Potentiometric titrations

Titration curves were generated by first titrating the polymer solutions (1 mg/mL) to low pH using 0.01 N HCl, so as to ensure complete dissolution of the polymers. Changes in pH values were then monitored with a portable Accumet AP61 pH-meter (Fisher Scientific, Montreal, Qc, Canada) following incremental additions of a standardized 0.01 N NaOH solution. The apparent pK_a values were calculated from Equation 3:

$$\text{pK}_a = \text{pH} - \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) \quad [3]$$

α is defined as the ratio C_{N^+}/C_m , where C_{N^+} stands for the effective concentration of protonated amino groups and C_m is the monomeric concentration in methacrylates. Assuming that all added hydroxide ions are able to deprotonate the amine groups, a fair approximation of C_{N^+} is calculated using the effective concentration of NaOH added (Lee 1999).

3.9 Effect of heparin/polymer molar charge ratio on micelle formation

Specific amounts of a concentrated heparin solution (60 mg/ml) were added to a solution of polymer (5 mg/ml) in an acetate buffer (16.6 mM sodium acetate, 83.4 mM acetic acid, pH 4) to yield complexes with +/- molar charge ratios varying from 0 to 2.95. The density of charges on heparin was assumed to be of 5 mEq/g. DLS analyses were performed after each incremental addition of heparin. Both the stock heparin and polymer solutions were passed through 0.22- μm nylon filters prior to experimentation.

3.10 Effect of pH on micelle formation

PICM of heparin (-/+ molar charge ratio of 1.5) were prepared to final polymer concentrations of 1 mg/ml. The pH of the preparations was acidified with 1 N HCl to ~4 and sequentially increased to ~11 using 1 N NaOH. Aliquots were sampled after each incremental addition of NaOH, passed through 0.45- μm filters and analyzed by DLS. Size data was only recorded for samples with high enough scatter counts (above the detection limit).

3.11 Effect of salt concentration on micelle stability

Stoichiometric PICM of heparin were prepared as acidified aqueous solutions (pH ~4) with final polymer concentrations of 5-7.5 mg/ml. Specific volumes of a 5 M NaCl solution were added to yield solutions with salt concentrations ranging from 0 to 1.2 M. Both the PICM and stock salt solutions were passed through 0.45- μ m nylon filters. DLS analyses were performed after each incremental addition of salt. Size data was only recorded for samples with high enough scatter counts (above the detection limit).

3.12 Effect of freeze-drying on PICM integrity

Stoichiometric PICM of heparin were prepared in an acetate buffer (67.8 mM sodium acetate, 32.2 mM acetic acid, pH 5) to final polymer concentrations of 2.5 mg/ml. Comparatively, stoichiometric PICM of heparin were prepared as acidified aqueous solutions (pH ~5) with final polymer concentrations of 2.5 mg/ml. Solutions were passed through 0.45- μ m nylon filters prior to initial DLS analysis. The samples were then frozen overnight at -80 °C and freeze-dried for 48 h. Changes in micelle size were evaluated by DLS after resuspension of the dried cakes in deionized water.

4 Results and Discussion

4.1 Polymer synthesis

ATRP is a radical polymerization method that allows the preparation of polymers with controlled and diverse compositions. Its success lies in its ability to combine fast initiation rates with low concentrations of propagating radicals. This critical equilibrium

between growing radicals and dormant species is function of the nature of the transition metal/ligand catalyst complex used. It then becomes of crucial importance that the species to be reacted do not interfere with the ATRP equilibrium. Accordingly, the polymerization of methacrylates presenting pendant amino groups becomes challenging for two reasons. First, displacement of the ligand on the metal complex by the growing polymer chain could occur. ATRP ligands often present amino groups used for coordination to the metal catalyst; monomers bearing amines are direct competitors to the ligand and can disturb the sensitive metal/ligand equilibrium. This problem can be overcome by using polydentate ligands (Coessens 2001) given that their chelating effect confers them an enhanced stability. PMDETA is one such polydentate ligand and was selected as it presents both fast rates of activation and deactivation, thus rendering its metal complexes very active catalysts (Matyjaszewski 2001). Secondly, side reactions between the free amines and the halogen end group of the macroinitiator and/or growing polymer chain are to be anticipated. Coessens *et al.* (1999) have shown that bromide end groups are available for nucleophilic substitution reactions to yield polymers with amino end groups. These authors additionally revealed that under the experimental conditions used during typical ATRP processes, interactions of the end bromine group with tertiary amines were negligible, while they could take place with primary amines. The combination of these adverse interactions advocates that great care must be taken during the ATRP of amine bearing monomers and calls for the protection of the primary amine groups. In this light, the *tert*-butoxycarbonyl (Boc) protective group was introduced on AEMA prior to its polymerization. Boc was selected as it reduces the accessibility of the lone amine electron pair through both steric hindrance and its electron-withdrawing activity. Furthermore, Boc can be easily cleaved under mild acidic condition (3 M HCl/EtOAc), leaving the ester bonds of the polymer intact. Under proper reaction conditions, ATRP allowed for the preparation of well defined cationic copolymers originating from a PEG-based unit.

Table 3-I: Characteristics of the diblock copolymers and their heparin-based PICM.

Description	M _n ^a (theo)	M _n ^b (NMR)	M _n ^c (GPC)	PI ^d	Conversion degree (M _{n,NMR} /M _{n,theo})	PICM diameter (nm) ^e [PI]	PICM MW ^e	Aggregation number ^f	Rehydrated PICM diameter (nm) ^e [PI]
PEG ₄₅ - <i>b</i> -P(AEMA) ₁₆ ^g	5,800	5,800	3,800	1.17	1.00	25 [0.16]	340,000	41	24 [0.16]
PEG ₄₅ - <i>b</i> -P(DMAEMA) ₁₆	4,700	4,900	3,900	1.23	1.04	31 [0.11]	446,000	53	44 (20%) 190 (80%) ^h
PEG ₄₅ - <i>b</i> -P(TMAEMA) ₁₆	6,900	7,400	-	-	1.07	31 [0.08]	496,000	45	35 [0.19]
PEG ₄₅ - <i>b</i> -P(DEAEMA) ₁₃	5,100	4,500	4,700	1.16	0.88	32 [0.15]	692,000	80	342 [1.00]
PEG ₄₅ - <i>b</i> -P(DMAEMA) ₁₂	7,400	5,900	-	-	0.80	32 [0.09]	380,000	40	40 [0.30]

PICM, polyion complex micelles; M_n, number-average molecular weight; PI, polydispersity index; MW, molecular weight; theo, theoretical.

^a Calculated from feed composition.

^b Evaluated by ¹H NMR.

^c Evaluated by GPC relative to PEG standards.

^d Polydispersity index derived using MWs obtained by relative analysis.

^e Stoichiometric PICM were prepared in an acetate solution (pH 5.0).

^f The aggregation number refers to the number of polymer chains per micelle and was calculated by dividing the PICM MW by the average MW of a single stoichiometric polymer/heparin condensate.

^g MW data is that of PEG-*b*-P(AEMABoc) while the PICM were synthesized using PEG-*b*-P(AEMA).

^h Numbers in parenthesis represent the population distribution. PIs were not available.

4.2 Characterization of diblock copolymers

The MW characteristics and polydispersity indexes (PIs) of the polymers are reported in Table 3-I. M_ns were evaluated by ¹H NMR from the integration of the two methylene groups of the pendant aminoethyl segments with respect to that of the methoxy group of the PEG macroinitiator. The ¹H NMR spectra of PEG-*b*-P(AEMABoc) and its derivative PEG-*b*-P(AEMA) are shown as examples in Figure 3-2. Figure 3-2B confirms the complete deprotection of the primary amine through the disappearance of the peak at 1.45 ppm (assigned to the Boc *tert*-butyl group). Note that the -NH₂ signal is lost given that these protons are easily exchanged with the surrounding deuterated solvent (D₂O). M_ns were also determined by GPC relative to PEG standards. MWs calculated from both techniques reasonably correlated, with the GPC results being invariably underestimated. GPC analyses further allowed for the evaluation of PIs. PIs were relatively low (≤ 1.23), as

expected for controlled polymerization processes. Table 3-I additionally reveals that the reaction conditions (*i.e.* in presence of the Cu(I)Br/PMDETA complex at 65 °C in THF) are suitable for the polymerization of both the AEMABoc and DMAEMA derivatives but are inadequate for DEAEMA; degrees of conversion of PEG-*b*-P(DEAEMA) are maximized at ~80-88 % of the feed.

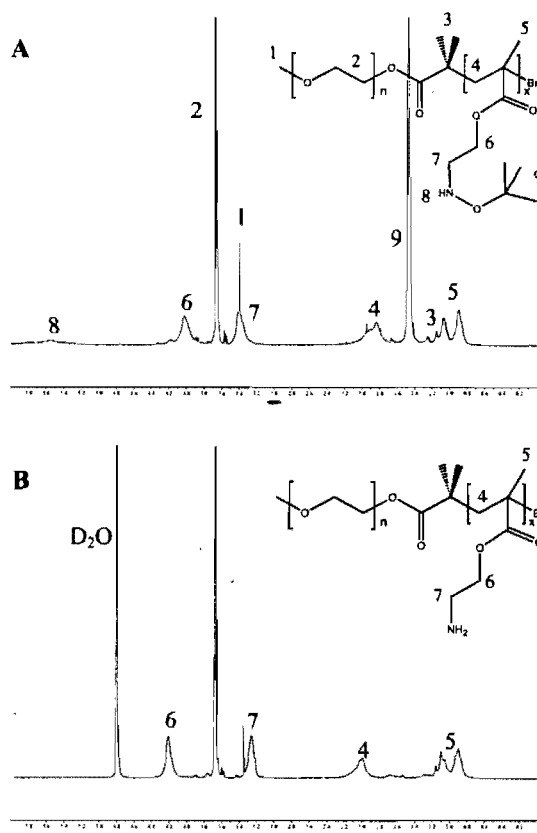


Figure 3-2. ¹H NMR spectra of diblock copolymer PEG-*b*-P(AEMABoc) in CDCl₃ (A) and of its deprotected equivalent PEG-*b*-P(AEMA) in D₂O (B).

4.2.1 Potentiometric titrations

PEG-*b*-P(TMAEMA) and PEG-*b*-P(DEMAEMA) copolymers were not titrated as their amino groups are quaternized. Figure 3-3A illustrates the variations in pH expressed against α for the PEG-*b*-P(AEMA), PEG-*b*-P(DMAEMA) and PEG-*b*-P(DEAEMA) copolymers. The copolymers all behave as weak bases and present buffering capacities, as evidenced by the presence of plateaus. pK_a values were directly extracted from the titration curves and correspond to the pH value at $\alpha = 0.5$. pK_a s of 7.13 ± 0.01 , 6.58 ± 0.07 and 6.75 ± 0.02 were obtained for the conjugate acids of PEG-*b*-P(AEMA), PEG-*b*-P(DMAEMA) and PEG-*b*-P(DEAEMA), respectively. pK_a values measured for PEG-*b*-P(DMAEMA) and PEG-*b*-P(DEAEMA) are in agreement with those found in the literature (Lee 1999; Prádný 1985). These results indicate that PEG-*b*-P(AEMA) should form polyelectrolyte complexes over a broader pH range as it is the most basic of all 3 copolymers.

In a past study, Prádný and Ševčík (1985) monitored the potentiometric behavior of PDMAEMA in water/ethanol solutions and observed a dependence between the apparent pK_a and α that was attributed to conformational transitions. Authors explained that as α varies from 0 to 1, the conformation of the polymeric chains changes from statistical coils to extended chains due to electrostatic repulsions between the amino groups. Figure 3-3B plots the apparent pK_a values of PEG-*b*-P(AEMA), PEG-*b*-P(DMAEMA) and PEG-*b*-P(DEAEMA) and illustrates their dependence on α . Both PEG-*b*-P(AEMA) and PEG-*b*-P(DMAEMA) exhibit similar curves with drops of their apparent pK_a by unity as α varies from 0 to 1. Such profiles correlate well to the classical coiled/extended transition brought about by the ionization of the amino groups. However, divergences were observed for the PEG-*b*-P(DEAEMA) copolymer. The apparent pK_a vs. α curve presented a plateau in the region of neutrality (*i.e.* up to 18% ionization) indicating that no conformational changes took place. This can be rationalized by the fact that the DEAEMA segments are sufficiently hydrophobic to trigger the self-association of the block copolymer chains into micelles (see section entitled "Effect of pH on Micelle Formation, below, for further details).

Electrostatic repulsions ensuing from ionization of the amines eventually led to dissociation of the micelles and extension of the polymeric chains.

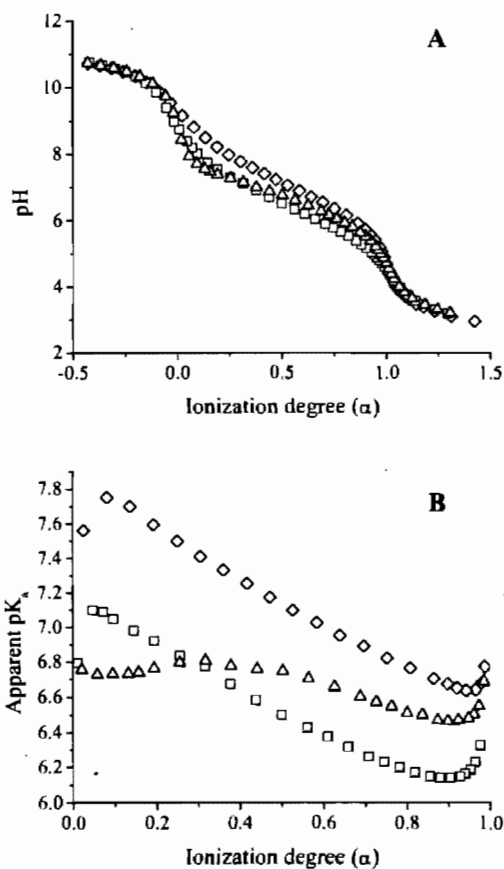


Figure 3-3. pH (A) and apparent pK_a (B) of PEG-*b*-P(AEMA) (\diamond), PEG-*b*-P(DMAEMA) (\square) and PEG-*b*-P(DEAEMA) (\triangle) copolymers as a function of α . Polymer solutions (1 mg/ml) were first acidified with HCl and titrated with 0.01 N NaOH. Complete ionization occurs at $\alpha = 1$.

4.3 Characterization of PICM

4.3.1 Effect of heparin/polymer molar charge ratio on micelle formation

Variations in micelle size, distribution and scattering intensity of heparin-based PICM were monitored by DLS as a function of the heparin/polymer molar charge ratio. Complexes were prepared in acidic buffered solutions (pH 4) so as to ensure that every amino group of the polymers was protonated. Heparin remains ionized in these conditions given that its least acidic group has a pK_a of 3.13 (Wang 1991). Figure 3-4A specifically illustrates the dependence of PEG-*b*-P(AEMA) PICM on the heparin feed. This titration profile was roughly subdivided into three main regions, the first of which corresponds to an excess of polymer (domain I). The initial scattering intensity (drug-free polymer solution) was very low, indicating that the polymer was soluble in water and that its chains existed as unimers. Addition of heparin slowly led to increases in both particle size and scattering intensity. This behavior is supportive of a mechanism where micelle formation is driven by electrostatic interactions. Careful examination of these first assemblies most often revealed the presence of two populations and was associated to high PIs. It is as if both free polymeric chains and PICM coexisted simultaneously.

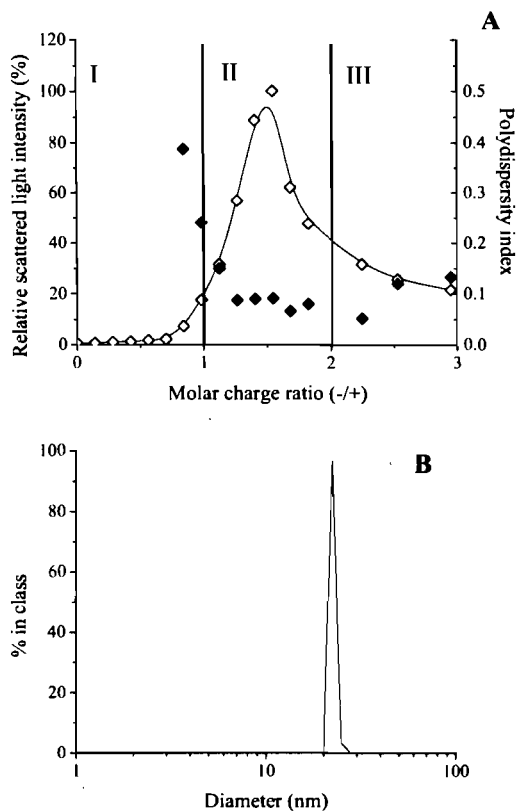


Figure 3-4. Effect of heparin/polymer molar charge ratio (A) on the scattering intensity (◇) and polydispersity index (◆) of micelles prepared in an acetate buffer pH 4. The scattering intensity is expressed relative to the maximum scattering count observed. The curve was further subdivided in 3 regions corresponding respectively to domains of excess polymer (I), near stoichiometry (II), and excess heparin (III). A typical size distribution of stoichiometric PEG-*b*-P(AEMA)/heparin PICM prepared in an acetate buffer pH 4 (B) is also shown.

Subsequent addition of heparin eventually resulted in a domain of near stoichiometry (domain II). In this region, every ionized polymer and heparin units electrostatically interacted to yield neutral PICM with narrow size distributions. PIs lower than 0.1 were observed and confirmed that the PICM were evenly distributed and monodisperse. A typical representation of the scattering measurements is presented in Figure 4-4B and illustrates the narrowness of the complexes' size distribution. An AFM

image of the PEG-*b*-P(AEMA)/heparin complexes is presented in Figure 3-5. It can be seen that the complexes most often have spherical shapes (~ 20 nm) and that their size distribution is narrow. The MW and aggregation number of similar stoichiometric assemblies were evaluated by MASLS (Table 3-I). It was found that PICM were composed of 40-80 polymer chains and that the aggregation number increased with increasing hydrophobicity of the monomeric core units.

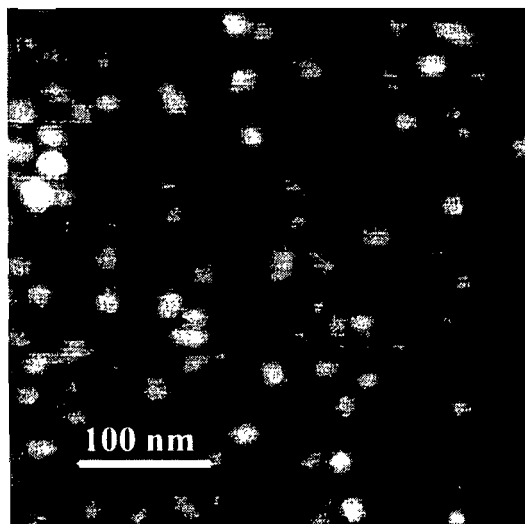


Figure 3-5. AFM image of PEG-*b*-P(AEMA)/heparin PICM. Polyelectrolyte complexes were prepared as an acidified aqueous solution (pH 5) at a \pm molar charge ratio of 1.5. Imaging was performed in tapping mode in air.

The third region of the heparin titration profile (Figure 3-4A) in turn corresponded to the situation where a marked excess in heparin was met (domain III). Increases in the ratio of heparin progressively induced a decrease in micelle size (data not shown), and concomitantly, scattering intensity. These micelles retained an extremely narrow size distribution and exhibited a single population, unlike micelles formed under an excess of polymer. Such observations suggest that micelle formation proceeded in a non-stoichiometric way in that the polymeric chains evenly distributed on the heparin molecules

to yield assemblies with excess negative charges. Similar profiles were obtained for the titration of PEG-*b*-P(DMAEMA), PEG-*b*-P(TMAEMA), PEG-*b*-P(DEAEMA), and PEG-*b*-P(DEMAEMA) with heparin (data not presented).

4.3.2 Effect of pH on micelle formation

It was evidenced from the potentiometric titrations (Figure 3-3) that the copolymers presented different basic properties. Their capability to form polyelectrolyte complexes at a given pH should therefore relate to their composition. The latter was investigated by determining the influence of pH (and α) on micelle formation. Figure 3-6A presents variations in scattering intensity following changes in pH for PEG-*b*-P(AEMA), PEG-*b*-P(DMAEMA) and PEG-*b*-P(DEAEMA), while variations in particle size are shown in Figure 4-6B. The scattering counts of both PEG-*b*-P(AEMA) and PEG-*b*-P(DMAEMA) were low in basic environment, suggesting that their chains existed as unimers. In these conditions, the copolymers are completely unionized and are unable to electrostatically interact with heparin. Lowering the pH progressively protonated the amines and induced electrostatic interactions at a critical pH value. Micellization was translated as increases in both size and scattering intensity. This threshold pH value varies between polymers and closely correlates to the basicity of the amino groups (*i.e.* the pH at which they get ionized). It can be extrapolated from Figure 4-3A that ionization of PEG-*b*-P(AEMA) and PEG-*b*-P(DMAEMA) begins at pH 9.4 and 8.9, respectively; these values intimately correspond to the pH at which their condensation to heparin was initiated (Figure 3-6, arrows 1 and 2). PICM were observable from that point on since both the copolymers and heparin existed as ionized species. Control measurements performed on solutions of PEG-*b*-P(AEMA), PEG-*b*-P(DMAEMA) or heparin demonstrated that the components individually existed as unimers throughout the whole pH-range studied (data not shown).

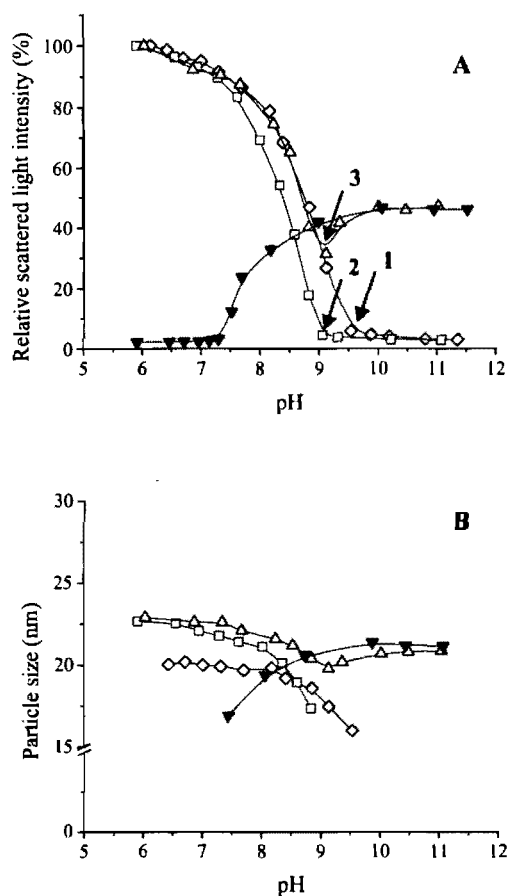


Figure 3-6. Effect of pH on scattering intensity (A) and particle diameter (B) of PEG-*b*-P(AEMA) (◇), PEG-*b*-P(DMAEMA) (□), and PEG-*b*-P(DEAEMA) (△) based PICM. The effect of pH on the scattering intensity and particle diameter of PEG-*b*-P(DEAEMA) (▼) chains (without heparin) is also shown. Arrows indicate the onset of ionization and complexation. PICM complexes were prepared as aqueous solutions with $-/+$ molar charge ratios of 1.5. The scattering intensity is expressed relative to the maximum scattering count observed per polymer.

PEG-*b*-P(DEAEMA) is peculiar in that pH has an effect on the self-assembly of the polymer itself (Figure 3-6A). In the absence of heparin, the unionized DEAEMA units were sufficiently hydrophobic to trigger their segregation into the core of micelles (Lee 1999) with diameters of ~ 20 nm. PEG-*b*-P(DEAEMA) chains retained their ability to

form micelles up to 18% ionization (pH 7.4), after which they broke apart. This property of PEG-*b*-P(DEAEMA) greatly altered the pH-responsiveness profile of the PEG-*b*-P(DEAEMA)/heparin system. As opposed to the PEG-*b*-P(AEMA) and PEG-*b*-P(DMAEMA) copolymers, the PEG-*b*-P(DEAEMA) chains gathered, in basic conditions, into micelles from which the polyanionic heparin was most likely precluded. Acidifying the milieu gradually protonated the amino groups, allowing for the incorporation of heparin molecules and the formation of larger polyelectrolyte assemblies. Once again, the pH at which ionization of the polymer begins (pH 9.0, Figure 3-3A) compares well to the pH at which electrostatic interactions appear (arrow 3).

4.3.3 Effect of ionic strength on micelle stability

It is predicted that the stability of PICM will be strongly dependent on the ionic strength of the surroundings. The presence of salts can indeed compete with the polymer/heparin electrostatic interactions, thereby destabilizing the PICM (Harada 1997). The influence of salt concentration on the stability of micelles was therefore studied by measuring the scattering intensity (Figure 3-7A) and size (Figure 3-7B) of micelles at various NaCl concentrations. As a general trend, an increase in ionic strength was associated with a slight increase in the mean diameters of the micelles, up to NaCl concentrations of about 0.1 M. The most probable explanation is that the complexes presented a slight net charge that provided electrostatic repulsions between polymer chains and limited their self-association. Addition of salt screened these charges, reduced electrostatic repulsions and allowed for more chains to aggregate into the core of larger micelles (Lee 2002). This effect was particularly pronounced for the PICM of PEG-*b*-P(DEAEMA) given that the shielded DEAEMA units are the most hydrophobic. Further increases in NaCl concentrations eventually led to decreases in both micelle size and light scattering intensity, thus indicating the dissociation of the complexes. Of all polymers,

PEG-*b*-P(AEMA) was the most stable, exhibiting 94% of its initial scattering intensity under physiological isotonic conditions (0.15 M NaCl).

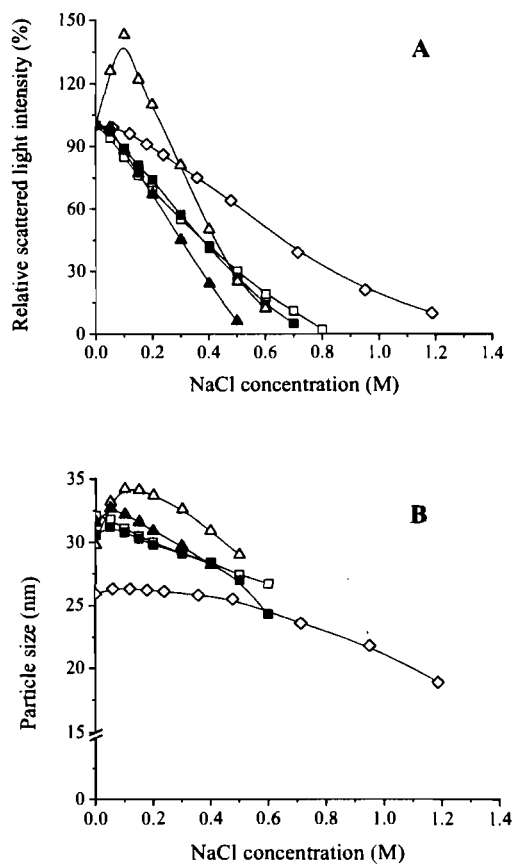


Figure 3-7. Effect of ionic strength on scattering intensity (A) and particle diameter (B) of PEG-*b*-P(AEMA) (◇), PEG-*b*-P(DMAEMA) (□), PEG-*b*-P(TMAEMA) (■), PEG-*b*-P(DEAEMA) (△) and PEG-*b*-P(DMAEMA) (▲) based PICM. Polyelectrolyte complexes were prepared as acidified aqueous solutions (pH 4) with $-/+$ molar charge ratios of 1. The scattering intensity is expressed relative to the initial scattering count.

4.3.4 Effect of freeze-drying on PICM integrity

It is expected that aqueous solutions of heparin-based PICM will have limited stability due to possible chemical and physical degradation processes. Lyophilization is a method of choice to grant acute stability and suitable shelf-life to labile therapeutic systems. For example, lyophilization was successfully used to store oligonucleotide/PEG-polyamine complexes without modifying the size of the complexes (Vinogradov 1998). Its effect on the integrity of PICM prepared in an acetate buffer (pH 5) was thus investigated and is summarized in Table 3-I. It can be readily seen that the PEG-*b*-P(AEMA), PEG-*b*-P(TMAEMA) and PEG-*b*-P(DEMAEMA) complexes withstood both the freezing and drying procedures. The resuspended carriers indeed present unaltered or slightly increased diameters. The greatest impact of lyophilization lied in increased PIs for the rehydrated PICM. PEG-*b*-P(DMAEMA) and PEG-*b*-P(DEAEMA) complexes, however, did not tolerate freeze-drying as satisfactorily. Resuspended PEG-*b*-P(DMAEMA) PICM presented two populations while there was a marked precipitation of the PEG-*b*-P(DEAEMA) complexes. This phenomenon was attributed to the presence of salts in the preparations. To illustrate this hypothesis, we prepared complexes as acidic aqueous solutions and showed that the lyophiles presented sizes and population distributions comparable to that of the mother-complexes (data not shown). One possible explanation is that there is an increase in the local concentration of polymer, heparin and buffer salts at the onset of freezing. It is known that as the preparation cools down, it reaches a temperature where pure ice first begins to crystallize out of solution and induces the isolation and concentration of the solution components (Randolph 1997). Increased concentrations in buffer salts can contribute to partial dehydration the PEG corona and interpenetration of micelle cores (Jain 2000), thereby accounting for the formation of larger micelles and even micellar aggregation. This mechanism is in agreement with the observation that the aggregation of the lyophiles increased with increasing hydrophobicity of the complexes.

5 Conclusion

ATRP was successfully used to prepare copolymers presenting primary, tertiary and quaternary amino groups. Electrostatic interactions between the amino copolymers and heparin triggered the formation of small and monodisperse polyelectrolyte complexes with properties dependent on the substitution of their constituents. For instance, copolymers bearing primary amines were shown to form complexes under the widest pH range and to yield assemblies stable to ionic strength variations. Hydrophobicity was also shown to play a role, generally inducing the formation of complexes of larger diameters. Future studies will aim at relating the stability of the PICM to the oral bioavailability of heparin. The combination of conditions such as increases in ionic strength and basification of the surroundings as the complexes transit from the stomach to the jejunum are expected to induce the *in vivo* dissociation of the complexes (along with heparin release). Furthermore, the release profile should also be subject to extreme dilution and possible electrostatic interactions between the cationic blocks and the negatively charged intestinal mucosa and mucus.

6 Acknowledgements

Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Canada Research Chair Program is acknowledged. Authors extend their gratitude to Marc A. Gauthier and Marie-Christine Jones for their critical reading of the manuscript and helpful discussions.

7 References

- Angot, S., Taton, D. and Gnanou, Y. (2000). Amphiphilic stars and dendrimer-like architectures based on poly(ethylene oxide) and polystyrene. *Macromolecules* **33**: 5418-5426.
- Baughman, R.A., Kapoor, S.C., Agarwal, R.K., Kisicki, J., Catella-Lawson, F. and FitzGerald, G.A. (1998). Oral delivery of anticoagulant doses of heparin. A randomized, double-blind, controlled study in humans. *Circulation* **98**: 1610-1615.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(August 1995): 7297-7301.
- Coessens, V. and Matyjaszewski, K. (1999). Synthesis of polymers with amino end groups by atom transfer radical polymerization. *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.* **A36**(5&6): 811-826.
- Coessens, V., Pintauer, T. and Matyjaszewski, K. (2001). Functional polymers by atom transfer radical polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **26**: 337-377.
- Davis, K.A. and Matyjaszewski, K. (2001). ABC triblock copolymers prepared using atom transfer radical polymerization techniques. *Macromolecules* **34**: 2101-2107.
- Engel, R.H. and Riggi, S.J. (1969). Effect of sulfated and sulfonated surfactants on the intestinal absorption of heparin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **130**: 879-884.
- Harada, A. and Kataoka, K. (1997). Formation of stable and monodisperse polyion complex micelles in aqueous medium from poly(L-lysine) and poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.* **A34**(10): 2119-2133.
- Harada, A. and Kataoka, K. (1998). Novel polyion complex micelles entrapping enzyme molecules in the core: preparation of narrowly-distributed micelles from lysosyme and poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer in aqueous medium. *Macromolecules* **31**: 288-294.

- Harada, A., Togawa, H. and Kataoka, K. (2001). Physicochemical properties and nuclease resistance of antisense-oligonucleotides entrapped in the core of polyion complex micelles composed of poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **13**: 35-42.
- Jain, N.J., Aswal, V.K., Goyal, P.S. and Bahadur, P. (2000). Salt induced micellization and micelle structures of PEO/PPO/PEO block copolymers in aqueous solution. *Colloids Surf. A: Physicochemical Engineering Aspects* **173**: 85-94.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Hoffart, V., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M. and Maincent, P. (2002a). Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits. *J. Pharm. Sci.* **91**(3): 760-768.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., Lecompte, T. and Maincent, P. (2002b). *In vitro* and *in vivo* evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. *Circulation* **105**: 230-235.
- Kabanov, A.V., Bronich, T.K., Kabanov, V.A., Yu, K. and Eisenberg, A. (1996). Soluble stoichiometric complexes from poly(*N*-ethyl-4-vinylpyridinium) cations and poly(ethylene oxide)-*block*-polymethacrylate anions. *Macromolecules* **29**: 6797-6802.
- Kakizawa, Y. and Kataoka, K. (2002). Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**: 203-222.
- Kataoka, K., Harada, A. and Nagasaki, Y. (2001). Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**: 113-131.
- Kataoka, K., Togawa, H., Harada, A., Yasugi, K., Matsumoto, T. and Katayose, S. (1996). Spontaneous formation of polyion complex micelles with narrow distribution from antisense oligonucleotide and cationic block copolymer in physiological saline. *Macromolecules* **29**: 8556-8557.

- Kukowska-Latallo, J.F., Bielinska, A.U., Johnson, J., Spindler, R., Tomalia, D.A. and Baker Jr, J.R. (1996). Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4897-4902.
- Lee, A.S., Bütün, V., Vamvakaki, M., Armes, S.P., Pople, J.A. and Gast, A.P. (2002). Structure of pH-dependent block copolymer micelles: charge and ionic strength dependence. *Macromolecules* **35**: 8540-8551.
- Lee, A.S., Gast, A.P., Bütün, V. and Armes, S.P. (1999). Characterizing the structure of pH dependent polyelectrolyte block copolymer micelles. *Macromolecules* **32**: 4302-4310.
- Lee, Y.-K., Nam, J.H., Shin, H.-C. and Byun, Y. (2001). Coagulation of low-molecular-weight heparin and deoxycholic acid for the development of a new oral anticoagulant agent. *Circulation* **104**: 3116-3120.
- Matyjaszewski, K. (1997). Mechanistic and synthetic aspects of atom transfer radical polymerization. *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.* **A34**(10): 1785-1801.
- Matyjaszewski, K., Göbelt, B., Paik, H.-J. and Horwitz, C.P. (2001). Tridendate nitrogen-based ligands in Cu-based ATRP: a structure-activity study. *Macromolecules* **34**: 430-440.
- Prádný, M. and Ševčík, S. (1985). Precursors of hydrophilic polymers, 3^a) The potentiometric behaviour of isotactic and atactic poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate) in water/ethanol solutions. *Makromol. Chem.* **186**: 111-121.
- Randolph, T.W. (1997). Phase separation of excipients during lyophilization: effects on protein stability. *J. Pharm. Sci.* **86**(11): 1198-1203.
- Ranger, M., Jones, M.C., Yessine, M.A. and Leroux, J.C. (2001). From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization method to supramolecular assemblies. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **39**: 3861-3874.

- Rungsardthong, U., Deshpande, M., Bailey, L., Vamvakaki, M., Armes, S.P., Garnett, M.C. and Stolnik, S. (2001). Copolymers of amine methacrylate with poly(ethylene glycol) as vectors for gene therapy. *J. Controlled Release* **73**: 359-380.
- Sakuragawa, N., Takahashi, K., Ueno, M. and Horikoshi, I. (1981). Oral administration of heparin. *Acta Med. Biol.* **29**(1): 33-37.
- Vinogradov, S.V., Bronich, T.K. and Kabanov, A.V. (1998). Self-assembly of polyamine-poly(ethylene glycol) copolymers with phosphorothioate oligonucleotides. *Bioconjugate Chem.* **9**: 805-812.
- Wang, H.M., Loganathan, D. and Linhardt, R.J. (1991). Determination of the pK_a of gluronic acid and the carboxy groups of heparin by ¹³C-nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. *Biochem. J.* **278**: 689-695.
- Windsor, E. and Cronheim, G.E. (1961). Gastro-intestinal absorption of heparin and synthetic heparinoids. *Nature* **190**(4772): 263-264.

CHAPITRE 4 - Characterization of polyion complex micelles designed to address the challenges of oligonucleotide delivery

Pharm. Res. (2008), DOI : 10.1007/s11095-008-9591-6

Reproduit avec la permission de Springer Science and Business Media


Marie-Hélène Dufresne, Mahmoud Elsabahy and Jean-Christophe Leroux*

¹Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal,
P.O. Box 6128, Downtown Station, Montreal (QC) H3C 3J7, Canada

*Corresponding author:

Tel: (514) 343-6455

Fax: (514) 343-7738

E-mail: 

1 Abstract

Purpose. To optimize oligonucleotide (ODN)-based polyion complex micelles (PICMs) by studying the effects of polymer composition and length on their properties.

Methods. Atom transfer radical polymerization was used to synthesize copolymers with increasing hydrophilic nonionic and cationic block lengths. PICMs were prepared by mixing the copolymers and ODN at various nitrogen-to-phosphate (N/P) ratios and characterized by gel electrophoresis and dynamic light scattering. The stability of the complexes towards dissociation was tested using a competitive assay with heparin. Finally, protection of the incorporated ODN against DNase I degradation was evaluated.

Results. A library of copolymers composed of poly(ethylene glycol) (PEG) and poly(aminoethyl methacrylate) (PAEMA) and/or poly((dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA) was synthesized. All polymers efficiently interacted with the ODN at N/P ratios approaching 1.5. Narrowly distributed but easily dissociable PICMs were obtained using PEG 5000 and short DMAEMA chains. Shortening the PEG block to 2000, increasing the number of cationic units and using AEMA produced more stable complexes but at the cost of colloidal properties. All polymers were able to protect the ODN from nuclease degradation.

Conclusions. PEG 3000-based PICMs possess good colloidal properties, intermediate stability towards dissociation and adjustable buffering capacity, making them potentially useful for the delivery of nucleic acid drugs.

Keywords: Polymeric micelles, oligonucleotide, (dimethylamino)ethyl methacrylate, atom transfer radical polymerization, polymer composition.

2 Introduction

The use of nucleic acids such as plasmid DNA, antisense oligonucleotides (ODNs) or small interfering RNAs (siRNAs) is an elegant approach to treat numerous diseases spanning from infections (Bunnell 1998) to cancer (McNeish 2004) to genetic anomalies (van Deutekom 2003; Ferrari 2002). Its success, however, is greatly limited by the inherent physicochemical properties of the genetic material to be delivered. It is now broadly recognized that the rapid degradation of these molecules by nucleases (Agrawal 1991; Wickstrom 1986), their short blood half-life (Rifai 1996) and inadequate entry into cells (Hughes 2001) call for the chemical modification of the nucleic acids (Kurreck 2003) and/or the utilization of specialized delivery systems (De Smedt 2000; Mastrobattista 2006; Pack 2005; Putnam 2006).

Polyion complex micelles (PICMs) decorated with a targeting ligand are conceptually one of the best vehicles available thus far for the delivery of nucleic acid drugs. PICMs result from cooperative electrostatic interactions between the genetic material and a cationic copolymer presenting a water-soluble nonionic segment. Upon complexation, the charge-compensated nucleic acid/cationic chains self-assemble into a micellar core while the hydrophilic segments form a protecting corona (Kabanov 1995; Kataoka 1996). The corona not only confers solubility and colloidal stability to the system but also shields any cationic charges. Complexes with surface cationic charges are known to unspecifically interact with blood components and non-target cells, leading to short blood half-life and toxicity when *in vivo* applications are sought (Plank 1996; Ogris 1999).

If a lot of insight on the physicochemical properties of complexes and transfection efficiency has been gained by studying the interaction of plasmid DNA with cationic polymers, it appears that the extrapolation of this knowledge to the various genetic materials (such as siRNAs, ODNs, etc.) does not always hold. For instance, the effects of poly(ethylene glycol) (PEG) chain length and density on the physicochemical properties and transfection efficiency of complexes based on branched poly(ethyleneimine) (PEI)-

graft-PEG were shown to vary whether the genetic material used was plasmid DNA (Petersen 2002), phosphodiester ODN (Brus 2004) or siRNA (Mao 2006). Likewise, the *in vitro* performance of a branched PEI of particular molecular weight (MW) was affected by the chemistry of the ODN used (phosphodiester *vs.* phosphorothioate) (Sundaram 2007). Differences in the interactions between ODNs of various structures (linear or hairpin structured ODNs) and a polymer have also been reported (Sundaram 2005).

In the same way, all polymers cannot be expected to interact similarly with the genetic material. For instance, it has been shown that a single atom modification could greatly influence the strength of the interactions between a polymer and DNA, thereby affecting the properties of the complexes and transfection efficiency (Ramsay 2002; van de Wetering 1999). Variations in the strength of the interaction between polymer and DNA also arise depending on the substitution on the amino group (*i.e.* primary *vs.* tertiary *vs.* quaternary) (Arigita 1999; Wolfert 1999). Furthermore, the balance between the nonionic hydrophilic and the cationic chain lengths greatly contributes to the properties of the complexes and to their transfection efficiency. In a systematic study, Lam *et al.* (2004) have observed higher condensation of plasmid DNA and improved transfection efficiency for polymers with increasing cationic segments. However, this was at the cost of colloidal properties. Clearly, the intrinsic physicochemical properties (MW, hydrophilic nonionic/cationic balance, aqueous conformation, density of charges, etc.) of both the nucleic acid and polymer will promote different interactions and affect the performance of the complexes. This strongly evidences the need to optimize a gene delivery system for a specific genetic material/polymer pair.

In line with the above statement, the aim of this work was to optimize *phosphorothioate* ODN-based complexes by studying the effects of polymer composition and length on their properties. We selected an ODN with the *phosphorothioate* chemistry as it remains one of the most widely employed and successful chemical modification of ODNs, conferring high stability to the ODN without compromising its mechanism of action (Kurreck 2003). Derivatives of 2-aminoethyl methacrylate (AEMA) were in turn chosen to

make up the cationic segment because of their facile controlled polymerization (Dufresne 2004; Dufresne 2005; Heath 2007) and commercial availability as different order amines. These two aspects are exploited herein to prepare a 33-member block copolymer library in which the chain length and buffering capacity of the polymers are methodically varied. To the best of our knowledge, there is only one other study dealing with the optimization of PICMs of a *phosphorothioate* ODN and an AEMA derivative (Desphande 2002). Specifically, Desphande *et al.* (2002) looked at the effects of the architecture (linear, brush or comb) of copolymers of PEG and 2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) on ODN complexation. Seeing that the work presented herein focuses on different aspects of PICM self-assembly, namely on the effects of PEG chain length, number of cationic repeat units and nature of these units on the interactions of the polymers with the ODN, both studies nicely complement one another. Furthermore, this study systematically investigates for the first time PICMs containing AEMA, a monomer bearing primary amino groups, which we hypothesize will allow us to adjust the buffering capacity of the polymers and be beneficial for complex stability.

3 Materials and Methods

3.1 Materials

A twenty-mer antisense phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide (ODN; 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA) and its 5'-fluorescein-labeled derivative were supplied by Medicorp Inc. (Montreal, QC, Canada). AEMA·HCl was obtained from Polysciences Inc. (Warrington, PA) and protected with bis(*tert*-butyl)dicarbonate as described previously (Dufresne 2004). The product (AEMABoc) was purified by silica gel chromatography (ethyl acetate/hexanes; 50/50 *v/v*) prior to use. Polyethylene glycol monomethyl ether (MeO-PEG-OH; $M_n=3000$) was provided by Nektar (Huntsville, AL). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) and used as received, except

for the following: tetrahydrofuran (THF) was passed through PureSolv™ drying columns (Innovative Technologies, Newburyport, MA), triethylamine was dried over calcium hydride and purified by distillation, and DMAEMA was vacuum-distilled prior to polymerization.

3.2 Techniques

¹H NMR spectra were recorded on a Bruker NMR spectrometer operating at 400 MHz (Milton, ON, Canada). Solutions were either prepared in deuterated chloroform or in deuterated water. Gel permeation chromatography (GPC) measurements were performed in THF using an Alliance GPCV 2000 system (Waters, Milford, MA) equipped with a differential refractive index detector. Adequate molecular weight separation was achieved using 3 Waters Styragel columns (HT2, HT3 and HT5) in series at a flow rate of 1.0 ml/min and a temperature of 40°C. A calibration curve was obtained with near-monodisperse PEG standards. Elemental analysis was used to determine the molar content of amino groups per gram of polymer. The measurements were conducted in an oxidative atmosphere at 1021°C using a thermal conductivity probe (Fisons Instruments EA 1108 C, H, N, S Elemental Analyzer, Beverly, MA). The mean hydrodynamic diameter, size distribution, and scattering intensity of the micelles were determined using a Malvern Autosizer 4800 equipped with a 488-nm uniphase argon-ion laser (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.). Measurements were performed in triplicate at a scattering angle of 90° and a temperature of 25°C. The CONTIN program was used to extract size distributions from the auto-correlation functions. Size measurements falling out of the particle size range of the instrument (*i.e.* >5000 nm) are shown as qualitative information only.

3.3 Synthesis of atom transfer radical polymerization (ATRP) macroinitiators

MeO-PEG-OH ($M_n=2000, 3000, \text{ and } 5000$) were converted to ATRP macroinitiators by reaction with 2-bromoisobutryl bromide as reported elsewhere (Ranger 2001; Dufresne 2004). Briefly, PEG was dissolved in anhydrous THF to a final concentration of 100 g/l and stirred for 15 min in the presence of triethylamine (10 eq). 2-Bromoisobutryl bromide (4 eq) was then added dropwise and the reaction was carried out for 48 h at room temperature. The crude product was solubilized in dichloromethane and purified by successive washings with 10% HCl, 1 N NaOH, and brine. The organic phase was dried over magnesium sulfate and the ATRP macroinitiator precipitated in diethyl ether.

3.4 Synthesis of cationic block copolymers

The polymerization reactions were carried out as follows: the PEG macroinitiator (1 eq) was solubilized in THF in one flask while the monomers (DMAEMA and/or AEMABoc – 10 to 40 eq), 1,4,7,10,10-hexamethyltriethylenetetramine (1.4 eq), Cu(I)Br (1 eq), and Cu(II)Br₂ (0.25 eq) were solubilized in THF in a second reactor. Both solutions were degassed for 20 min with argon. The polymerization was initiated by transferring the macroinitiator to the monomer mixture using a two-head syringe. In all cases, the final monomer concentration was set to 0.8 M. The reactions were typically conducted for 16 h at 65°C, after which the copper complexes were removed by filtration through a silica gel column. All polymer extracts containing AEMABoc were dissolved in 3 M HCl/EtOAc (50 mg/ml) and reacted for 1 h in order to cleave the Boc protecting groups. The reaction was stopped by diluting with water and washing twice with EtOAc. The aqueous phase (containing the protonated polymer) was collected, dialyzed for 48 h against water (molecular weight cut-off 6000-8000) and freeze-dried to afford purified polymer.

Copolymers of DMAEMA were treated in an equivalent fashion whereby they were dissolved in 1.5 N HCl, washed twice with EtOAc and dialyzed against water.

3.5 Potentiometric titrations

Apparent pK_a values were calculated from the titration curves of the copolymers as described previously (Dufresne 2004). pK_a s were then used to determine the buffering capacity (β) of the copolymers at pH 5.5 according to equation 1.

$$\beta = 2.3C_m \frac{K_a [H_3O^+]}{(K_a + [H_3O^+])^2} \quad [1]$$

The pH value of 5.5 was selected to mimic a transfection experiment wherein the complexes would have been internalized *via* endocytosis. The concentration C_m then refers to the methacrylate monomer concentration (*i.e.* AEMA + DMAEMA) that would be found in the endosome. Assuming that typical transfection experiments are efficiently performed at 200 nM ODN (*i.e.* 2.75 $\mu\text{g/ml}$) (Yessine 2006) and that ideal PICMs are obtained at a nitrogen-to-phosphate (N/P) ratio of 1.5, C_m becomes 1.14×10^{-5} M.

3.6 Incorporation of ODN (gel electrophoresis)

PICMs were prepared in 10 mM Tris, pH 7.4 at N/P ratios varying from 0.5 to 3 using an ODN solution spiked with fluorescein-labeled ODN (25 mol%). Samples were mixed with glycerol and loaded onto a 20% (w/v) acrylamide gel prepared with a tris-borate-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer adjusted to pH 7.4. Following migration, the ODN was visualized by UV irradiation using a ChemiImager 5500 imaging system (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA).

3.7 Micelle formation as ascertained by dynamic light scattering (DLS)

3.7.1 Effect of N/P ratio

Specific amounts of a copolymer solution (2-3 mg/ml) were added to a solution of ODN (0.1 mg/ml) in 10 mM Tris, pH 7.4 to yield complexes with N/P ratios varying from 0 to 3. DLS analyses were performed 45 min after each incremental addition of polymer. Both the stock polymer and ODN solutions were passed through 0.22- μ m nylon filters prior to experimentation.

3.7.2 Effect of ionization degree

PICMs of PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ were prepared in 10 mM Tris, pH 6.9 at an N/P ratio of 1.5 (final ODN concentration of 0.1 mg/ml). Both the stock polymer and ODN solutions were passed through 0.22- μ m nylon filters prior to experimentation. Size measurements were compared to those obtained above for PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ and PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₆ at pH 7.4 and N/P ratio of 1.5.

3.8 Stability of micelles by a displacement assay

PICMs were prepared in 10 mM Tris, pH 7.4 at an N/P ratio of 1.5 (final ODN concentration of 2.75 μ g/ml) and incubated at room temperature for 30 min in presence of ethidium bromide (EtBr) (1 eq per base pair). Increasing amounts of low molecular weight heparin (sodium salt from porcine intestinal mucosa, MW of \sim 3000 g/mol) were then added and the complexes incubated for an additional 75 min. The fluorescence of free EtBr (F_i), ODN/EtBr (F_o), and EtBr/PICM after addition of heparin (F_h) was recorded on a Safire

plate reader (Tecan, Medford, MA; $\lambda_{\text{ex}} = 523 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 587 \text{ nm}$). Relative fluorescence values were calculated from equation 2:

$$\text{Relative fluorescence} = \frac{(F_h - F_i)}{(F_o - F_i)} \times 100 \quad [2]$$

An increase in relative fluorescence is indicative of the destabilization of the micelles.

3.9 Protection against DNase I degradation

The ability of the PICMs to protect the ODN against enzymatic degradation was performed as described previously (Yessine 2007). PICMs were prepared at an N/P ratio of 1.5 using an ODN solution spiked with 50 mol% fluorescein-labeled ODN (final ODN concentration of 44 $\mu\text{g/ml}$). The complexes (as well as a control solution of ODN) were incubated with DNase I ($\geq 2000 \text{ kU/mg}$ protein activity, used at a 50 U/ μg ODN concentration) in presence of 5 mM MgCl_2 at 37°C for pre-determined periods of time. Degradation was stopped by addition of EDTA (final concentration of 8.3 mM) and the ODN freed in presence of an excess heparin. Samples were then treated with formamide and loaded onto a 20% (w/v) acrylamide gel. The ODN was visualized by UV irradiation and the amount of intact ODN quantified relative to the signal of an intact ODN sample.

4 Results and Discussion

4.1 Polymer synthesis

A library of polymers with varying hydrophilic (PEG MW of 2000, 3000 and 5000) and cationic (10-40 monomeric units) block lengths was prepared in order to shed light on the effects of polymer composition on PICM self-assembly. The nature of the amino group was also varied using AEMA - a primary amine, DMAEMA - a tertiary amine, and their

mixtures to adjust the buffering capacity of the cationic segment. The structures of the various copolymers are depicted in Figure 4-1 while the details of their compositions are presented in Table 4-I, Table 4-II and Table 4-III.

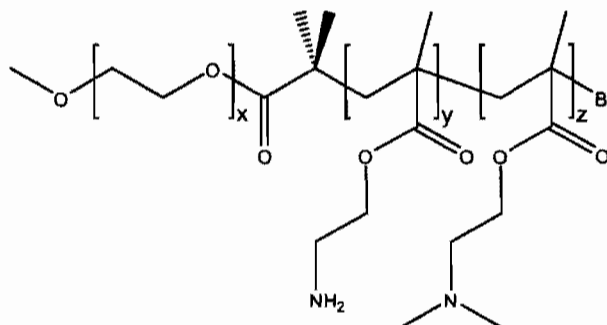


Figure 4-1. Structure of the copolymers studied where x corresponds to the number of ethylene oxide (EO) repeat units while y and z correspond to the number of AEMA and DMAEMA methacrylate units, respectively. The value x is equal to 45, 68 or 113 for PEG 2000, 3000 or 5000, respectively, while y and z vary between 0 and 40.

Table 4-I. Characteristics of the copolymers of the AEMA series.

Copolymer ^a	GPC ^b			¹ H NMR		Elemental Analysis	
	M _n	M _w	PI	M _n ^c	Nitrogen content ^c (mol/g polymer) × 10 ³	Nitrogen weight %	Nitrogen content ^c (mol/g polymer) × 10 ³
PEG ₄₅ -b-PAEMA ₁₂	3100	3800	1.23	4200	2.93	4.01	2.86
PEG ₄₅ -b-PAEMA ₂₃	4500	5900	1.31	5900	3.83	5.23	3.73
PEG ₄₅ -b-PAEMA ₂₈	5300	7000	1.33	6800	4.12	5.73	4.09
PEG ₄₅ -b-PAEMA ₃₅	6000	8100	1.35	7900	4.39	6.07	4.33
PEG ₄₅ -b-PAEMA ₄₁	6600	8800	1.33	8900	4.57	6.29	4.49
PEG ₆₈ -b-PAEMA ₁₃	4400	5200	1.18	5200	2.39	3.35	2.39
PEG ₆₈ -b-PAEMA ₂₀	5200	6100	1.18	6500	3.09	4.24	3.03
PEG ₆₈ -b-PAEMA ₂₆	6200	7000	1.14	7500	3.48	4.62	3.30
PEG ₆₈ -b-PAEMA ₃₀	6400	7400	1.17	8200	3.70	5.01	3.58
PEG ₆₈ -b-PAEMA ₃₈	7100	8500	1.20	9500	4.02	5.44	3.88
PEG ₁₁₃ -b-PAEMA ₁₁	6200	7300	1.17	7000	1.59	2.21	1.58
PEG ₁₁₃ -b-PAEMA ₁₇	6900	8100	1.17	8000	2.17	2.92	2.09
PEG ₁₁₃ -b-PAEMA ₂₁	7500	9000	1.20	8700	2.45	3.44	2.46
PEG ₁₁₃ -b-PAEMA ₃₁	8000	9700	1.21	10,300	3.03	4.10	2.93
PEG ₁₁₃ -b-PAEMA ₃₆	8800	10,500	1.19	11,200	3.25	4.36	3.11

^aCopolymers are labeled as PEG_x-b-PAEMA_y where x is the number of EO repeat units based on PEG MW and y is the number of methacrylate repeat units determined by ¹H NMR.

^bGPC data is for the protected (Boc) crude copolymers prior to purification.

^cM_n by ¹H NMR and nitrogen content (both by ¹H NMR and elemental analysis) were calculated assuming full ionization of the monomer (*i.e.* MW=166.6 g/mol for the hydrochloride salt of AEMA).

The block copolymers were prepared by ATRP from a PEG macroinitiator, as described previously (Dufresne 2004). In this case, however, CuBr₂ was used to favor the formation of diblock copolymers. Indeed, as suggested by Lenoir *et al.* (2006), the presence of Cu(II) salts slows down the propagation rate in comparison to the initiation rate, thereby increasing the initiation efficiency. Addition of CuBr₂ turned out to be particularly crucial for the synthesis of the copolymers with the shortest cationic chains. The shift of the GPC polymer peak to higher MW and the presence of a unimodal MW distribution both suggest that diblock copolymers were indeed obtained (data not shown). Polymers with polydispersity indices (PI) within the 1.15-1.3 range were typically found.

Table 4-II. Characteristics of the copolymers of the DMAEMA series.

Copolymer ^a	GPC ^b			¹ H NMR		Elemental Analysis	
	M _n	M _w	PI	M _n ^c	Nitrogen content ^c (mol/g polymer) × 10 ³	Nitrogen weight %	Nitrogen content ^c (mol/g polymer) × 10 ³
PEG ₄₅ - <i>b</i> -PDMAEMA ₁₃	2800	3400	1.2	4600	2.76	3.76	2.69
PEG ₄₅ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₃	3600	4300	1.18	6500	3.47	4.48	3.20
PEG ₄₅ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₈	4000	4700	1.18	7500	3.69	4.69	3.35
PEG ₄₅ - <i>b</i> -PDMAEMA ₃₄	4400	5200	1.17	8700	3.90	5.04	3.59
PEG ₄₅ - <i>b</i> -PDMAEMA ₄₀	4900	5900	1.18	9800	4.04	5.20	3.71
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PDMAEMA ₁₃	4000	4700	1.18	5600	2.25	3.05	2.18
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₀	4500	5200	1.15	6900	2.82	3.86	2.76
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₅	4800	5600	1.16	8000	3.12	4.13	2.95
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PDMAEMA ₃₁	5400	6300	1.17	9100	3.37	4.48	3.20
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PDMAEMA ₃₅	5600	6700	1.19	9800	3.51	4.54	3.24
PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -PDMAEMA ₁₀	5200	5800	1.12	7000	1.40	2.06	1.50
PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -PDMAEMA ₁₇	5800	6700	1.15	8400	2.01	2.74	1.96
PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₃	6500	7700	1.17	9600	2.41	3.26	2.33
PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₇	6900	8500	1.22	10,400	2.62	3.48	2.48
PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -PDMAEMA ₃₃	7300	8700	1.19	11,500	2.85	3.83	2.74

^aCopolymers are labeled as PEG_x-*b*-PDMAEMA_z, where x is the number of EO repeat units based on PEG MW and z is the number of methacrylate repeat units determined by ¹H NMR.

^bGPC data is for the crude copolymers prior to purification.

^cM_n by ¹H NMR and nitrogen content (both by ¹H NMR and elemental analysis) were calculated assuming full ionization of the monomer (*i.e.* MW=193.7 g/mol for the hydrochloride salt of DMAEMA).

Table 4-III. Characteristics of the AEMA/DMAEMA copolymers

Copolymer ^a	GPC ^b			¹ H NMR	Elemental Analysis		Titration		
	M _n	M _w	PI	M _n ^c	Nitrogen content ^c (mol/g polymer) ×10 ³	Nitrogen weight %	Nitrogen contents ^c (mol/g polymer) ×10 ³	pK _a	Buffering capacity (mol/L) ×10 ⁶
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₆	6200	7000	1.14	7500	3.48	4.62	3.30	6.95	0.43
PEG ₆₈ - <i>b</i> -P(AEMA ₁₉ - <i>co</i> -DMAEMA ₅)	5500	6700	1.20	7300	3.29	4.44	3.17	6.78	0.62
PEG ₆₈ - <i>b</i> -P(AEMA ₁₃ - <i>co</i> -DMAEMA ₁₂)	5700	6700	1.17	7600	3.26	4.25	3.03	6.64	0.82
PEG ₆₈ - <i>b</i> -P(AEMA ₆ - <i>co</i> -DMAEMA ₁₉)	5100	5800	1.13	7800	3.19	4.16	2.97	6.54	1.00
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₅	4800	5600	1.16	8000	3.12	4.13	2.95	6.51	1.06

^aCopolymers are labeled as PEG_x-*b*-P(AEMA_y-*co*-DMAEMA_z) where x is the number of EO repeat units based on PEG MW and y and z are the numbers of methacrylate repeat units determined by ¹H NMR.

^bGPC data is for the protected (Boc) crude copolymers prior to purification.

^cM_n by ¹H NMR and nitrogen content (both by ¹H NMR and elemental analysis) were calculated assuming full ionization of the monomer (*i.e.* MW=166.6 g/mol and MW=193.7 g/mol for the hydrochloride salts of AEMA and DMAEMA, respectively).

The cationic block length was controlled by increasing the monomer:macroinitiator ratio. The polymer composition was determined by ^1H NMR by comparing the intensity of the peaks of the cationic segment (peaks at ~ 4.0 ppm (2H) or ~ 2.6 ppm (2H) corresponding to the methylene groups of the pendant chain of the methacrylate monomers) to that of the PEG block (3.64 ppm; peak of known intensity based on MW). The polymer composition was confirmed by elemental analysis based on the nitrogen weight content of the copolymers. Results by ^1H NMR and elemental analysis correlated well yet a small discrepancy was obtained; the nitrogen contents obtained by elemental analysis were systematically lower than those calculated by ^1H NMR. The greatest difference observed was for the copolymers of the DMAEMA series and never exceeded 9%. This can be explained by the combined effects of the presence of trace water (affecting elemental analysis data) and uncertainties on both the intensity of the PEG ^1H NMR peak and on the real ionization degree of the amine-containing units.

Polymers with mixtures of AEMA and DMAEMA were further characterized by titration to determine their pK_a and to establish potential correlations between ionization degree and interaction with ODN. It is shown that the pK_a decreases from 6.95 to 6.51 as the fraction of DMAEMA increases over that of AEMA (Table 5-III). In parallel, copolymers with the tertiary amine (DMAEMA) present a 2.4-fold increase in buffering capacity compared to those with the primary amine (AEMA). A closer look at the data reveals that the buffering capacity can be fine tuned by varying the relative amount of the two cationic monomers.

4.2 Effect of N/P ratio on micelle formation

4.2.1 Incorporation of ODN

Complete incorporation of the ODN in the complexes can be evidenced by gel electrophoresis through both the disappearance of the migration band corresponding to the

free ODN and a decrease in the fluorescence signal of the ODN (due to self-quenching following incorporation of the fluorophore in the core of the micelles). As can be seen in **Error! Reference source not found.** A-C for the copolymers of the AEMA series, complete incorporation of the ODN occurs at an N/P ratio of 1. At this ratio, however, a smeared band is still observed at high MW, corresponding to partially neutralized complexes. As the N/P ratio increases, this band progressively disappears, suggesting that all negative charges are effectively complexed. Comparison of Figure 4-2 A-C further indicates that the presence of increasingly long PEG segments does not hamper ODN complexation. This is in line with the results of Deshpande *et al.* (2002) who have shown good ODN binding of all their PEG/DMAEMA polymers, irrespective of architecture.

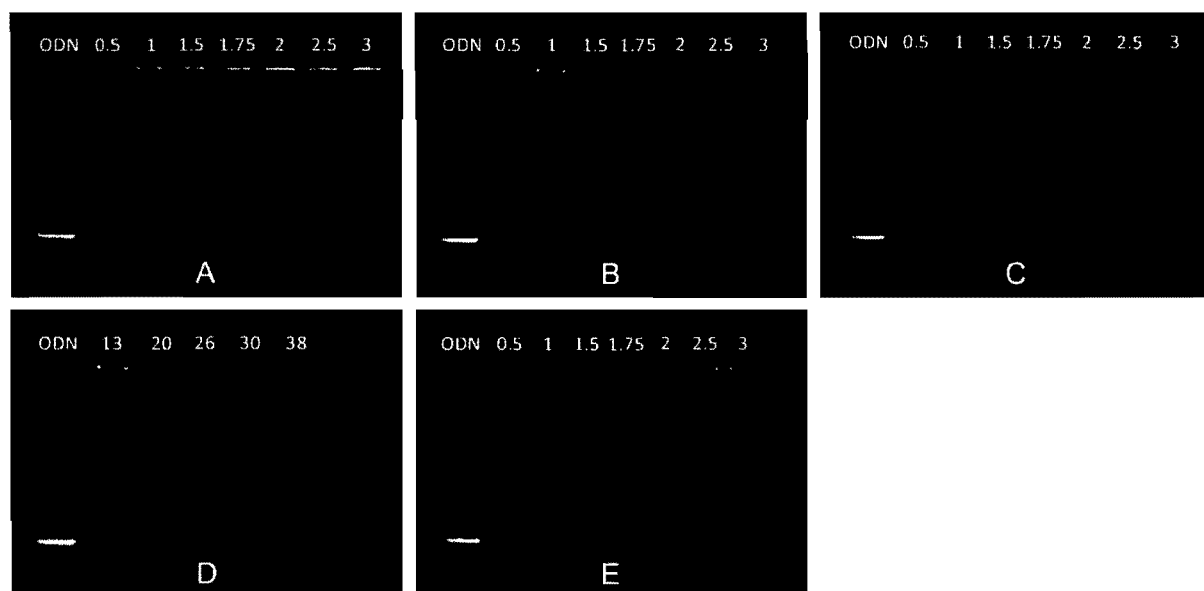


Figure 4-2. Gel electrophoresis of PICMs prepared at N/P ratios varying from 0.5 to 3 using PEG₄₅-*b*-PAEMA₂₃ (A), PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₀ (B), PEG₁₁₃-*b*-PAEMA₂₁ (C) and PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₀ (E). PICMs prepared at the fixed N/P ratio of 1.75 using polymers of the PEG₆₈-*b*-AEMA series with increasing cationic block lengths are also shown (D).

The effect of the cationic block length on ODN incorporation was also studied by preparing micelles at the N/P ratio of 1.75 with polymers of the PEG₆₈-*b*-PAEMA series (Figure 4-2D). As can be seen, all polymers were able to efficiently complex the ODN. However, a smeared band at high MW was observed for the copolymers with the lowest number of cationic repeat units. This band eventually disappeared as the number of cationic units reached 26, suggesting that increased cooperativity leads to more efficient interaction with the ODN.

A similar general behavior was observed for the copolymers of the DMAEMA series (results for PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₀ are presented in Figure 4-2E). For those polymers, complete ODN incorporation also occurred at the N/P ratio of 1 despite the differences in pK_a and ionization degree between DMAEMA and AEMA. Rungsardthong *et al.* (2003) have reported an analogous behavior for calf thymus DNA/DMAEMA complexes prepared from PDMAEMA of decreasing ionization degree (*i.e.* prepared at pHs 4.0, 6.0, 7.4 and 8.0). It was shown that even at high pH the complexes interacted stoichiometrically with the DNA. This was attributed to the fact that the presence of a strong acid like DNA could induce the protonation of the weak cationic DMAEMA units. Our results further evidence differences between the complexes of AEMA and DMAEMA, with smearing still observed at the high N/P ratio of 3 for DMAEMA (Figure 4-2E). The presence of smeared bands at high N/P ratios suggests that complexes based on DMAEMA are less stable than those based on AEMA; the stability of the complexes will be studied in more details later in the manuscript.

4.2.2 Colloidal Properties

The effect of the N/P ratio on the colloidal properties of the micelles was also studied and is presented in Figure 4-3 for the copolymer PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₆. A first observation (valid for all polymers) is that the scattering intensity increases as the N/P ratio reaches 1.5 and then slowly decreases at higher N/P ratios. For PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₆, the

increase in scattering intensity correlates with larger sizes (compare sizes close to 1.5 vs. at low N/P ratios) and probably follows from an increase in the hydrophobicity of the AEMA segment due to complete charge compensation. However, for polymers having high ethylene oxide (EO)/cationic balances, and therefore greater levels of steric stabilization, this increase in size is not significant and cannot justify the observed increase in scattering intensity (data not shown). Another reasonable explanation is that as more polymer is added to go from low N/P ratios to ratios closer to neutrality, the number of micelles increases, leading to higher scattering intensity. Alternatively, Dautzenberg *et al.* (2003) have shown that the maximum in scattering intensity was associated with an increase in the mean polymer weight fraction of individual PICMs, reflecting an increase in the density or compactness of the micelles. It is therefore suggested that the increase in scattering intensity observed here at the N/P ratio of 1.5 is due to the combined effects of the number of micellar assemblies and of hydrophobicity on size and density of the micelles.

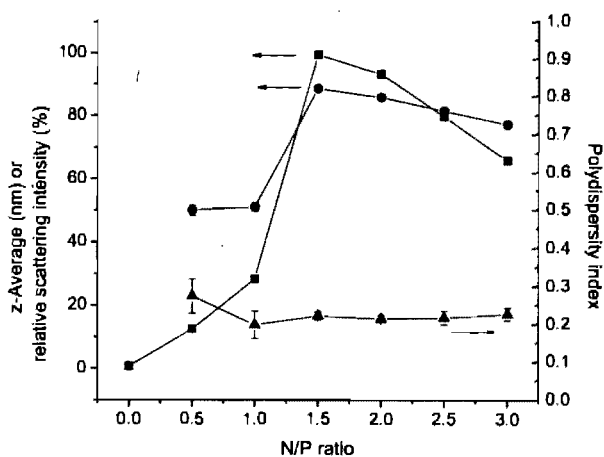


Figure 4-3. Colloidal properties of PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₆ micelles prepared at N/P ratios varying from 0.5 to 3. Effects of N/P ratio on average diameter (z-Average; ●), scattering intensity (■) and PI (▲) are shown. Mean ± standard deviation (SD) (n = 3).

Although admittedly not striking in Figure 4-3, another important finding of these experiments is that the evolution of the PI with N/P ratio follows an opposite trend to that of scattering intensity, *i.e.* PI is minimal at N/P ratios of 1-1.5 and slowly increases when departing from that range. This trend was paralleled with the tendency of micelles prepared at N/P ratios below and above 1.5 to present multi-modal size distributions (data not shown). This phenomenon was particularly significant for polymers having low EO/cationic unit balances (sterically less stable).

4.3 Effect of polymer composition and length on micelle formation

The effects of the PEG chain length, number of cationic monomeric units and nature of the amino group on micelle properties were further studied at the N/P ratio of 1.5 and are summarized in Figure 4-4A. By comparing the traces for the polymers of the PEG₄₅-*b*-PAEMA, PEG₆₈-*b*-PAEMA and PEG₁₁₃-*b*-PAEMA series (filled symbols), it is clearly seen that the size of the complexes decreases as the PEG chain length increases. This trend falls in line with what was observed for other polyelectrolyte complexes (Lam 2004; Glodde 2006) and can be attributed to the increased steric hindrance associated with the longer PEG blocks. The hydrophilic chains indeed become bulkier as their length increases so that the micelles are constrained to adopt a conformation that maximizes the space between the hydrophilic segments. This occurs when the micelles present a higher radius of curvature, *i.e.* when the core of the micelles is smaller. Although not shown here, a comparable behavior was observed when comparing polymers of the PEG₄₅-*b*-PDMAEMA, PEG₆₈-*b*-PDMAEMA and PEG₁₁₃-*b*-PDMAEMA series.

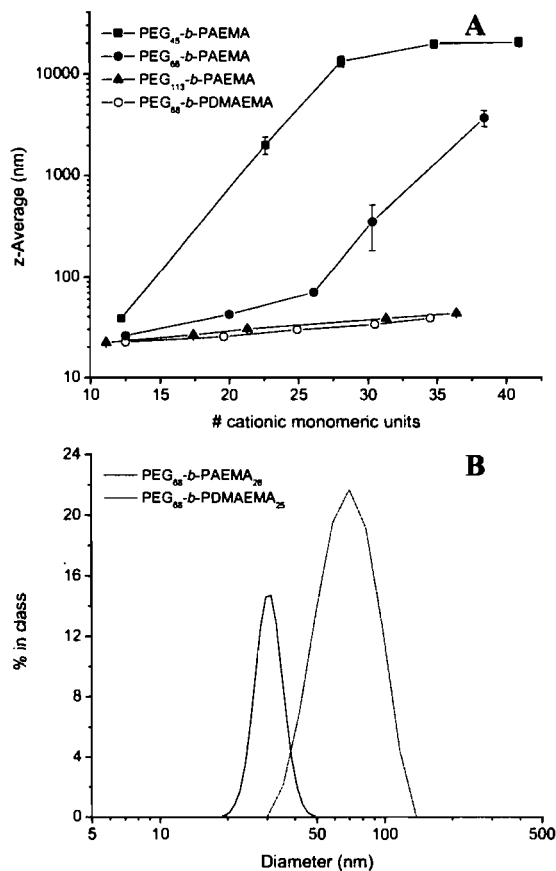


Figure 4-4. Average diameter (z-average) of PICMs prepared at the N/P ratio of 1.5. Mean \pm SD ($n = 3$) is shown (A). Typical size distributions of micelles of PEG₆₈-b-PDMAEMA₂₅ and PEG₆₈-b-PAEMA₂₆ are also presented (B).

A closer look at the data within each polymer series reveals that the size of the PICMs increases as the number of core-forming monomeric units increases (*e.g.* from 22 to 43 nm for polymers of the PEG₁₁₃-b-PAEMA series). This trend comes as no surprise and was reported previously for other polyelectrolyte complexes (Harada 2001; Scales 2006; Glodde 2006). Of interest is the fact that there seems to be a critical EO/cationic unit balance that needs to be reached in order to achieve colloidal stability. Indeed, multi-modal size distributions, and in some cases macroscopic aggregation, were observed for samples

of the PEG₄₅-*b*-PAEMA series having 23 cationic units and more and for samples of the PEG₆₈-*b*-PAEMA series having 30 cationic units and more. This corresponds to EO/AEMA ratios of 2.0 and 2.3, respectively (or to nitrogen densities of 3.83×10^{-3} and 3.70×10^{-3} mol nitrogen/g of polymer, respectively). This critical ratio is never reached for polymers of the PEG₁₁₃-*b*-PAEMA series so that unimodal and relatively monodisperse (PI of ~ 0.14) micelles are obtained throughout. Aggregation of the PICMs as the cationic block length increases can be rationalized by an increase in the likelihood of interpolymer bridgings (chain entanglements) to take place between the micelles. Alternatively, it can be argued that an increase in the number of cationic units will shift the EO/hydrophobic balance of the charged-compensated segments such that the PEG chains are no longer able to impart solubility to the micelles. Aggregated particles then result from hydrophobic-hydrophobic interactions between exposed neutral cores.

The effect of the nature of the amino group on the properties of the PICMs can finally be evidenced from Figure 4-4 for PEG₆₈ copolymers (compare traces with filled and empty circle symbols). It appears that going from the cationic unit AEMA to the DMAEMA unit leads to a decrease in size from ~ 70 to 30 nm and a decrease in PI from 0.20 to 0.10 (compare size distributions in Figure 4-4B). This trend could follow from the different ionization degrees of the polymers (37% for AEMA vs. 24% for DMAEMA at pH 7.4). To evaluate the contribution of ionization degree on micelle size, PICMs of PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ were prepared in 10 mM Tris pH 6.9 and compared to those of PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₆ obtained at pH 7.4. At pH 6.9, the DMAEMA units are ionized to the same extent as the AEMA units at pH 7.4. The size of the DMAEMA micelles did not considerably change from pH 7.4 to pH 6.9 (data not shown), suggesting that such small variations in ionization degree do not contribute to the differences observed between AEMA and DMAEMA. Another explanation could be that the presence of two extra methyl groups on the amino group of DMAEMA hinders the fit and the interaction between the cation and the phosphate groups of the ODN (van de Wetering 1999). The interactions between the ODN and the AEMA units would be comparatively stronger, leading to

seemingly more hydrophobic segments and possibly higher aggregation numbers (and micellar diameters).

4.4 Effect of polymer composition and length on the stability of micelles towards dissociation

In those experiments, the micelles were incubated with an anionic macromolecule that can typically be found in the blood stream (heparin). Both the ODN and heparin can interact with the cationic polymer and a competition for the cationic sites is therefore set. At high enough concentrations, heparin will eventually occupy all cationic sites, thereby expelling the ODN out of the micellar system. If on the basis of colloidal properties alone it appeared that long PEG chains and short cationic blocks were advantageous, an opposite trend was found when studying the stability of the PICMs towards dissociation. Figure 4-5A shows that the longer the PEG chain is, the less stable the micelles. This can be understood considering that a longer PEG chain results in polymers with a higher hydrophilic/hydrophobic balance and expectedly higher critical aggregation concentrations. For those polymers, the concentration of unmicellized charge-compensated uni/oligomers, which are more accessible for displacement by heparin, is higher. Destabilization by another polyanion therefore becomes easier as the PEG length increases. This is evidenced with twice as much fluorescence recovered in the case of PEG 5000 compared to PEG 2000-based micelles (Error! Reference source not found.A). Alternatively, an increase in the cationic block length results in additional cooperative interactions and in stronger binding (Jin 2005). The effect on PICM stability towards dissociation is that the micelles become more stable as the number of cationic repeat units increases (Figure 4-5B). Interestingly, a critical EO/cationic unit ratio for optimal stability is also observed, *i.e.* decreasing the EO/cationic unit ratio below 2.6 does not additionally contribute to the stability of the micelles. This correlates to the situation where micellar aggregation was

observed (Figure 4-4A). Finally, while copolymers of DMAEMA lead to nicely distributed micelles, they concomitantly produce assemblies vulnerable to competition and dissociation, with up to 63% fluorescence recovered compared to 17% for similar copolymers of AEMA (Figure 4-5C). This suggests stronger interactions between the AEMA segments and the ODN. As postulated above, increased interactions could follow from a better fit between the cationic groups of AEMA and the phosphate groups of the ODN. The results of Figure 4-5C further show that it is possible to adjust the stability of the micelles simply by varying the relative proportion of the primary vs. tertiary amines of the polymer. Indeed, intermediate properties are found for copolymers with both AEMA and DMAEMA.

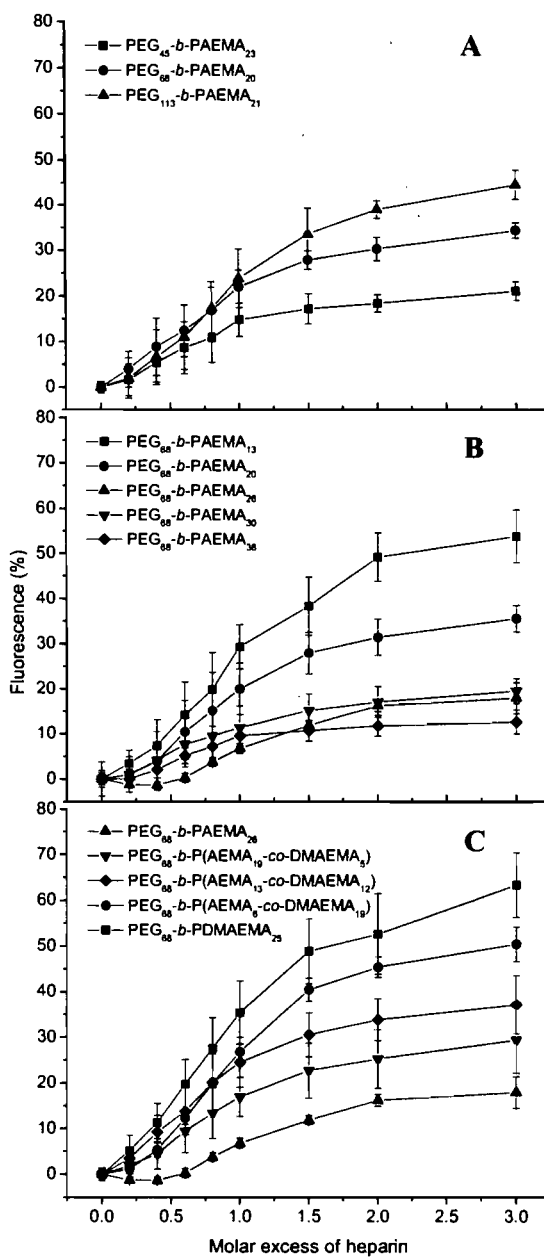


Figure 4-5. Destabilization of micelles in presence of the competitive polyanion heparin. The effects of the PEG chain length (A), number of cationic monomeric units (B) and nature of the amino group (C) on PICM stability are shown. An increase in fluorescence is indicative of the release of entrapped ODN and of the destabilization of the micelles. Mean \pm SD ($n = 3$).

4.5 Effect of polymer composition and length on protection of the ODN against DNase I degradation

In the previous section, correlations between polymer composition, PICM stability and release of ODN from the assemblies were established. Similar trends were expected to follow regarding the ability of the micelles to protect the ODN against enzymatic degradation. Indeed, Elsabahy *et al.* (2008) have shown that PICMs composed of a PEG-ODN conjugate and higher generations of polyamidoamine dendrimers were not only increasingly stable against dissociation but could protect the ODN more efficiently against enzymatic degradation. Likewise, they showed that decreasing the PEG chain length from 20,000 to 10,000 helped protecting the ODN.

In the present manuscript, the DNase I concentration was adjusted so that degradation of the naked ODN would occur in the span of a few hours. As can be seen in Figure 4-6 (star symbols), 62% of the naked ODN was degraded within 6 h of incubation with DNase I. As expected, incorporation of the ODN in the core of micelles prevented the action of the enzyme. Surprisingly, all micellar systems protected the ODN to the same extent, regardless of the PEG chain length (panel A), the number of cationic monomeric units (panel B) and nature of the amino group (panel C). This could be explained by the fact that, in all cases, the DNase I was unable to access the entrapped ODN, be it through the steric hindrance provided by the PEG chains or the protection ensured by complexation with the cationic segment.

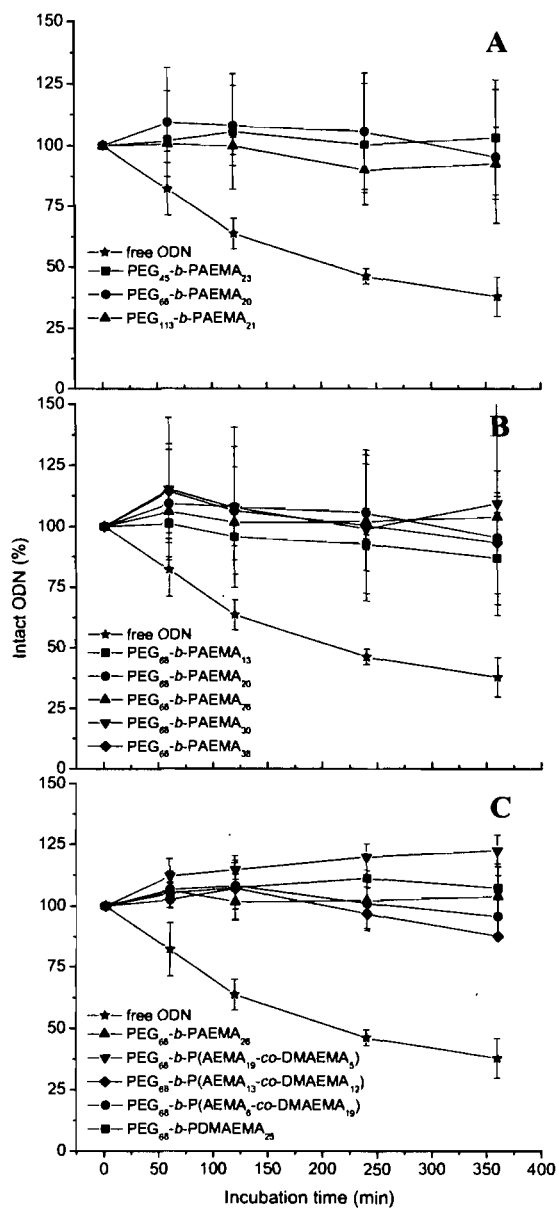


Figure 4-6. The ability of the PICMs to protect the ODN against DNase I degradation (50 U/ μ g ODN, 37°C, pH 7.4) is shown as a function of the PEG chain length (A), number of cationic monomeric units (B) and nature of the amino group (C) of the copolymers. Mean \pm SD (n = 3).

5 Conclusion

This work provides a systematic understanding of the effects of polymer composition on the properties of ODN-based micelles that should help rationally address the challenges of ODN delivery. For instance, the results show that if high stability is required, increased interactions between the polymer and ODN are desirable. This can be achieved either by augmenting the number of cationic units or by using AEMA as the cationic monomer. Alternatively, control over the size of the particles is possible by varying the EO/cationic unit ratio. In this case, an increase in the PEG chain length and the use of DMAEMA will both lead to smaller sizes and narrowly distributed micelles. Finally, if high buffering capacity is critical, the DMAEMA units should be favoured over the AEMA units.

With such information at hand, an evaluation of which copolymers should best address the challenges of ODN delivery can be attempted. The polymers of the PEG₄₅-*b*-PAEMA series show enhanced stability towards dissociation, which could prove advantageous considering the rapid dilution and exposure to blood components that will follow from intravenous injection. PICMs composed of PEG₄₅-*b*-PAEMA, however present sizes that may not be optimal for long circulating properties and passive targeting through the enhanced permeation and retention effect (Gaucher 2005). Increasing the PEG chain length of the copolymers could solve this issue, but this will be at the cost of micelle stability. At the cellular level, the higher buffering capacity of the DMAEMA copolymers might be desirable to promote endosomal escape of the ODN *via* the so-called “proton-sponge” mechanism (Boussif 1995). Furthermore, assuming that their micelles can reach their target site intact, copolymers of the PEG₁₁₃-*b*-PDMAEMA series should be preferred since they present the lowest stability towards dissociation. In this case, low stability is desirable to increase the cytoplasmic/nuclear availability of the ODN (Arigita 1999).

Clearly, the physical requirements of a gene delivery system for overcoming both extracellular and intracellular barriers can be quite different so that the optimal polymer

properties to fulfill one or another of the challenges of gene delivery can be opposing. Overall, copolymers of the type PEG₆₈-*b*-P(AEMA-*co*-DMAEMA) lead to micelles that present good colloidal properties, intermediate stability towards dissociation and adjustable buffering capacity, indicating that they are interesting polymers for future *in vitro* and *in vivo* studies.

6 Acknowledgments

This work was financially supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canada Research Chair Program. M.H.D. further acknowledges graduate research scholarships from NSERC and Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies.

7 References

- Agrawal, S., Tamsamani, J. and Tang, J.Y. (1991). Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7595-7599.
- Arigita, C., Zuidam, N.J., Crommelin, D.J.A. and Hennink, W.E. (1999). Association and dissociation characteristics of polymer/DNA complexes used for gene delivery. *Pharm. Res.* **16**(10): 1534-1541.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(August 1995): 7297-7301.
- Brus, C., Petersen, H., Aigner, A., Czubayko, F. and Kissel, T. (2004). Physicochemical and biological characterization of polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol)

- block copolymers as a delivery system for oligonucleotides and ribozymes. *Bioconjugate Chem.* **15**(4): 677-684.
- Bunnell, B.A. and Morgan, R.A. (1998). Gene therapy for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**(1): 42-56.
- Dautzenberg, H., Konak, C., Reschel, T., Zintchenko, A. and Ulbrich, K. (2003). Cationic graft copolymers as carriers for delivery of antisense-oligonucleotides. *Macromol. Biosci.* **3**(8): 425-435.
- De Smedt, S.C., Demeester, J. and Hennink, W.E. (2000). Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm. Res.* **17**(2): 113-126.
- Deshpande, M.C., Garnett, M.C., Vamvakaki, M., Bailey, L., Armes, S.P. and Stolnik, S. (2002). Influence of polymer architecture on the structure of complexes formed by PEG-tertiary amine methacrylate copolymers and phosphorothioate oligonucleotide. *J. Control. Release* **81**: 185-199.
- Dufresne, M.H., Gauthier, M.A. and Leroux, J.C. (2005). Thiol-functionalized polymeric micelles: From molecular recognition to improved mucoadhesion. *Bioconjugate Chem.* **16**(4): 1027-1033.
- Dufresne, M.H. and Leroux, J.C. (2004). Study of the micellization behavior of different order amino block copolymers with heparin. *Pharm. Res.* **21**(1): 160-169.
- Elsabahy, M., Zhang, M., Gan, S.M., Waldron, K.C. and Leroux, J.C. (2008). Synthesis and enzymatic stability of PEGylated oligonucleotide duplexes and their self-assemblies with polyamidoamine dendrimers. *Soft Matter* **4**: 294-302.
- Ferrari, S., Geddes, D.M. and Alton, E.W.F.W. (2002). Barriers to and new approaches for gene therapy and gene delivery in cystic fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* **54**(11): 1373-1393.
- Gaucher, G., Dufresne, M.H., Sant, V.P., Kang, N., Maysinger, D. and Leroux, J.C. (2005). Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J. Control. Release* **109**(1-3 Special Issue SI): 169-188.

- Glodde, M., Sirsi, S.R. and Lutz, G.J. (2006). Physicochemical properties of low and high molecular weight poly(ethylene glycol)-grafted poly(ethylene imine) copolymers and their complexes with oligonucleotides. *Biomacromolecules* **7**(1): 347-356.
- Harada, A., Togawa, H. and Kataoka, K. (2001). Physicochemical properties and nuclease resistance of antisense-oligonucleotides entrapped in the core of polyion complex micelles composed of poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **13**: 35-42.
- Heath, W.H., Senyurt, A.F., Layman, J. and Long, T.E. (2007). Charged polymers via controlled radical polymerization and their implications for gene delivery. *Macromol. Chem. Phys.* **208**(12): 1243-1249.
- Hughes, M.D., Hussain, M., Nawaz, Q., Sayyed, P. and Akhtar, S. (2001). The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes. *Drug Discov. Today* **6**(6): 303-315.
- Jin, J., Achenbach, J.C., Zhu, S.P. and Li, Y.F. (2005). Complexation of well-controlled low-molecular weight polyelectrolytes with antisense oligonucleotides. *Colloid Polym. Sci.* **283**(11): 1197-1205.
- Kabanov, A.V., Vinogradov, S.V., Suzdaltseva, Y.G. and Alakhov, V.Y. (1995). Water-soluble block polycations as carriers for oligonucleotide delivery. *Bioconjugate Chem.* **6**(6): 639-643.
- Kataoka, K., Togawa, H., Harada, A., Yasugi, K., Matsumoto, T. and Katayose, S. (1996). Spontaneous formation of polyion complex micelles with narrow distribution from antisense oligonucleotide and cationic block copolymer in physiological saline. *Macromolecules* **29**: 8556-8557.
- Kurreck, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1628-1644.
- Lam, J.K.W., Ma, Y., Armes, S.P., Lewis, A.L., Baldwin, T. and Stolnik, S. (2004). Phosphorylcholine-polycation diblock copolymers as synthetic vectors for gene delivery. *J. Control. Release* **100**(2): 293-312.

- Lenoir, S., Pagnouille, C., Detrembleur, C., Galleni, M. and Jerome, R. (2006). New antibacterial cationic surfactants prepared by atom transfer radical polymerization. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **44**(3): 1214-1224.
- Mao, S., Neu, M., Germershaus, O., Merkel, O., Sitterberg, J., Bakowsky, U. and Kissel, T. (2006). Influence of polyethylene glycol chain length on the physicochemical and biological properties of poly(ethylene imine)-graft-poly(ethylene glycol) block copolymer/SiRNA polyplexes. *Bioconjugate Chem.* **17**(5): 1209-1218.
- Mastrobattista, E., van der Aa, M.A.E.M., Hennink, W.E. and Crommelin, D.J.A. (2006). Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**(2): 115-121.
- McNeish, I.A., Bell, S.J. and Lemoine, N.R. (2004). Gene therapy progress and prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes. *Gene Ther.* **11**(6): 497-503.
- Ogris, M., Brunner, S., Schüller, S., Kircheis, R. and Wagner, E. (1999). PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* **6**(4): 595-605.
- Pack, D.W., Hoffman, A.S., Pun, S. and Stayton, P.S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**(7): 581-593.
- Petersen, H., Fechner, P.M., Martin, A.L., Kunath, K., Stolnik, S., Roberts, C.J., Fischer, D., Davies, M.C. and Kissel, T. (2002). Polyethylenimine-*graft*-poly(ethylene glycol) copolymers: Influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjugate Chem.* **13**(4): 845-854.
- Plank, C., Mechtler, K., Szoka, F.C. and Wagner, E. (1996). Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum. Gene Ther.* **7**(12): 1437-1446.
- Putnam, D. (2006). Polymers for gene delivery across length scales. *Nat. Mater.* **5**(6): 439-451.

- Ramsay, E. and Gumbleton, M. (2002). Polylysine and polyornithine gene transfer complexes: A study of complex stability and cellular uptake as a basis for their differential in-vitro transfection efficiency. *J. Drug Target.* **10**(1): 1-9.
- Ranger, M., Jones, M.C., Yessine, M.A. and Leroux, J.C. (2001). From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization method to supramolecular assemblies. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **39**: 3861-3874.
- Rifai, A., Brysch, W., Fadden, K., Clark, J. and Schlingensiepen, K.H. (1996). Clearance kinetics, biodistribution, and organ saturability of phosphorothioate oligodeoxynucleotides in mice. *Am. J. Pathol.* **149**(2): 717-725.
- Rungsardthong, U., Ehtezazi, T., Bailey, L., Armes, S.P., Garnett, M.C. and Stolnik, S. (2003). Effect of polymer ionization on the interaction with DNA in nonviral gene delivery systems. *Biomacromolecules* **4**(3): 683-690.
- Scales, C.W., Huang, F.Q., Li, N., Vasilieva, Y.A., Ray, J., Convertine, A.J. and McCormick, C.L. (2006). Corona-stabilized interpolyelectrolyte complexes of SiRNA with nonimmunogenic, hydrophilic/cationic block copolymers prepared by aqueous RAFT polymerization. *Macromolecules* **39**(20): 6871-6881.
- Sundaram, S., Lee, L.K. and Roth, C.M. (2007). Interplay of polyethyleneimine molecular weight and oligonucleotide backbone chemistry in the dynamics of antisense activity. *Nucleic Acids Res.* **35**(13): 4396-4408.
- Sundaram, S., Viriyayuthakorn, S. and Roth, C.M. (2005). Oligonucleotide structure influences the interactions between cationic polymers and oligonucleotides. *Biomacromolecules* **6**(6): 2961-2968.
- van de Wetering, P., Moret, E.E., Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M.E., van Steenberg, M.J. and Hennink, W.E. (1999). Structure-activity relationships of water-soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for nonviral gene delivery. *Bioconjugate Chem.* **10**: 589-597.
- van Deutekom, J.C.T. and van Ommen, G.J.B. (2003). Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **4**(10): 774-783.

- Wickstrom, E. (1986). Oligodeoxynucleotide stability in subcellular extracts and culture media. *J. Biochem. Biophys. Methods* **13**(23): 97-102.
- Wolfert, M.A., Dash, P.R., Nazarova, O., Oupický, D., Seymour, L.W., Smart, S., Strohm, J. and Ulbrich, K. (1999). Polyelectrolyte vectors for gene delivery: Influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconjugate Chem.* **10**(6): 993-1004.
- Yessine, M.A., Dufresne, M.H., Meier, C., Petereit, H.U. and Leroux, J.C. (2007). Proton-actuated membrane-destabilizing polyion complex micelles. *Bioconjugate Chem.* **18**(3): 1010-1014.
- Yessine, M.A., Meier, C., Petereit, H.U. and Leroux, J.C. (2006). On the role of methacrylic acid copolymers in the intracellular delivery of antisense oligonucleotides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **63**(1): 1-10.

CHAPITRE 5 - Thiol-Functionalized Polymeric Micelles: From Molecular Recognition to Improved Mucoadhesion

Publié dans *Bioconjugate Chem.* (2005) 16:1027-1033

Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society

Marie-Hélène Dufresne[†], Marc A. Gauthier[‡], Jean-Christophe Leroux^{†*}


[†]Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal,
P.O. Box 6128, Downtown Station, Montreal (QC), Canada, H3C 3J7

[‡]Department of Chemistry, University of Montreal, P.O. Box 6128, Downtown Station,
Montreal (QC), Canada, H3C 3J7

*Corresponding author:

Tel: (+514) 343-6455

Fax: (+514) 343-6871

E-mail: 

1 Abstract

Surface-modified colloids which can selectively interact with biological species or surfaces show promise as drug delivery systems. However, the preparation of such targeted devices remains challenging, especially when considering polyion complex micelles for which side reactions with the ionic core components (typically carboxylic acid or amino groups) can occur. To solve this issue, an innovative synthetic strategy is proposed and used to prepare an asymmetric poly(ethylene glycol)-*block*-poly(2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate) copolymer presenting a thiol group at the end of the poly(ethylene glycol) chain. Thiol groups are highly appealing given that they react almost exclusively and quantitatively with maleimides under physiological conditions, thereby facilitating the chemical functionalization of the copolymer. The simplicity of the derivatization procedure is illustrated by preparing model biotin-capped copolymers. The biotinylated copolymers are shown to self-assemble with an oligonucleotide in aqueous media to form polyion complex micelles with biotin groups at their outer surface. These micelles are capable of molecular recognition toward streptavidin. Alternatively, thiol-decorated (nonderivatized) micelles are prepared and show improved mucoadhesion through the formation of disulfide bonds with mucin. Finally, intermicellar disulfide bonds are generated under oxidative conditions to promote the formation of stimuli-responsive micellar networks.

2 Introduction

Colloids which can selectively interact with biological species or surfaces show promise as nanoscopic biosensors, diagnostic tools, and therapeutic devices. For instance, liposomes decorated with monoclonal antibodies are currently being investigated as immunosensors (Hianik 1999) and targeted drug carriers (Lukyanov 2004). Other examples include folate-decorated lipid nanoparticles which have been studied for their greater antitumor activity (Stevens 2004), and polyester nanoparticles which achieve specific cellular interaction through ligands attached to their surface via avidin-biotin coupling (Gref 2003; Nobs 2004). Polymeric micelles (10-100 nm) are yet other examples of colloids which would greatly benefit from surface modification. Polymeric micelles typically result from the self-assembly of amphiphilic copolymers in a selective solvent above a threshold concentration (Allen 1999). Micellization can also proceed through the complexation, neutralization, and self-association of oppositely charged polyions (Harada 1999), these structures being referred to as polyion complex micelles (PICM). Both polymeric micelles and PICM possess core-shell architectures with sequestering capabilities which account for their use as solubilizers (Le Garrec 2004; Kwon 2003), DNA delivery vectors (van de Wetering 1998), and bionanoreactors (Jaturanpinyo 2004). If nanocarriers such as micelles have the ability to passively accumulate in specific pathological areas, their therapeutic efficiency can be further enhanced by attaching targeting devices on their surface (Torchilin 2003; Merdan 2003). However, the surface modification of micelles can be very challenging, especially for PICM given that their ionic core components (typically amino or carboxylic acid groups) can interfere with conventional coupling reactions.

Surface-functionalization of colloids with recognition molecules is typically achieved using bifunctional spacers which obey standard acid/amine coupling chemistry. Drawbacks of such procedures include poor labeling efficiency, defects in the tethered structure, and formation of side products which are often difficult to eliminate. An

alternative (and preferred) strategy is to synthesize heterotelechelic polymers directly from functionalized initiators. For instance, Bes *et al.* (2003) have used glucose and galactose derivatives to initiate the polymerization of poly(ethylene glycol) (PEG) methyl ether methacrylate and benzyl methacrylate. The resulting block copolymers were shown to form tethered micelles in the presence of water and were capable of selective affinity for a lectin column. Alternatively, Kataoka's group has devoted significant effort into designing heterobifunctional PEG macroinitiators which can be discriminately modified at one chain end. Among such macroinitiators, α -acetal- ω -methanesulfonate PEG and α -acetal- ω -hydroxyl PEG were successfully used to prepare cationic block copolymers which self-assembled with DNA into acetal- and aldehyde-decorated PICM (Kataoka 1999; Wakebayashi 2004). In light of this, we propose an alternate synthetic scheme for the preparation of a heterotelechelic macroinitiator possessing a thiol group at one extremity and a hydroxyl group at the other (namely α -*tert*-butanethio- ω -hydroxyl PEG, *t*Bu-S-PEG-OH). This work further illustrates how *t*Bu-S-PEG-*block*-poly(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate) (*t*Bu-S-PEG-*b*-PDMAEMA) copolymers can be used to prepare targeted micelles, mucoadhesive assemblies, and redox-sensitive polymeric networks (Figure 5-1). The synthetic approach proposed herein judiciously takes advantage of thiols for biorelated applications. Terminal thiol groups are very interesting given their ability to react selectively and quantitatively with maleimides or thiols under physiological conditions, thereby facilitating the functionalization of the polymer (van Dijk-Wolthuis 1999; Nobs 2003). Thiols have also been used in the biomedical field in order to increase the mucoadhesion of drug delivery systems (Bernkop-Schnürch 2004) and to stabilize nanoassemblies through the formation of disulfide bridges (Kakizawa 2001).

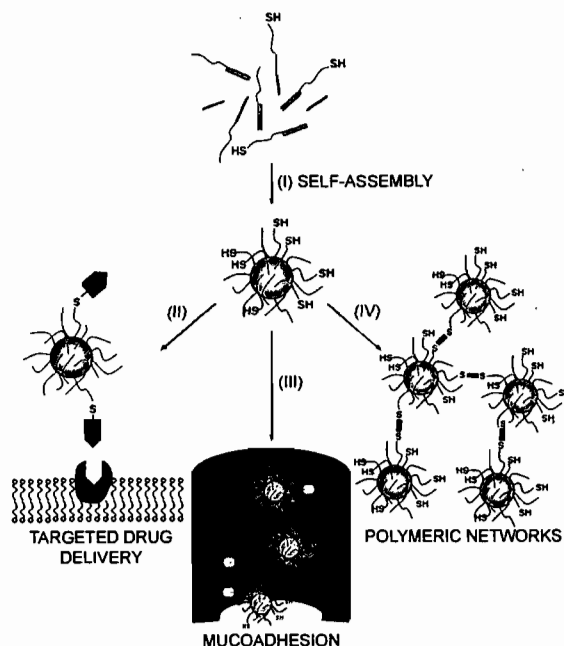


Figure 5-1. Preparation and uses of thiolated PICM. Oppositely charged copolymers (cationic copolymer shown in yellow and anionic biomacromolecule shown in green) self-assemble in aqueous media into surface-modified polymeric micelles (I). These micelles can be reacted with proteins or antibodies for targeted drug delivery applications (II), or used as such for improved mucoadhesion (through the formation of disulfide bonds with mucus) (III) and formation of redox-sensitive polymeric networks (IV).

3 Experimental Procedures

3.1 Materials

A 20-mer antisense phosphorothioate oligodeoxiribonucleotide (ODN; 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA-3') and its fluorescein-labeled derivative (labeled at the 5' end via a phosphorothioate bond) were prepared by Medicorp Inc. (Montreal, QC, Canada). Streptavidin coated plates (binding capacity of ≥ 12 pmol biotin per well) were obtained from Thermo Electron Corporation (Vantaa, Finland). Porcine stomach mucin

immobilized on a polygalactose gel was purchased from EY Laboratories Inc. (San Mateo, CA) and transferred to Bio-Spin chromatography columns (Bio-Rad Laboratories Ltd, Mississauga, ON, Canada). The 4-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid reagent (HABA; used for the spectrometric determination of biotin levels) was bought as a ready-to-use HABA/avidin lyophilized powder (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and used as received, except for the following: tetrahydrofuran (THF) was dried over sodium with benzophenone as indicator; *tert*-butyl mercaptan was dried over calcium oxide, distilled under argon, and stored over molecular sieves; ethylene oxide (EO) was passed through a sodium hydroxide column, dried over CaH₂, and cryodistilled prior to use; triethylamine was dried over potassium hydroxide and purified by distillation; 2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) was vacuum-distilled prior to polymerization.

3.2 Techniques

¹H NMR spectra were recorded on a Bruker NMR spectrometer operating at 300 MHz. Solutions were either prepared in deuterated chloroform (CDCl₃) or water (D₂O). Gel permeation chromatography (GPC) measurements were performed in THF using an Alliance GPCV 2000 system (Waters, Milford, MA) equipped with a differential refractive index detector. Adequate molecular weight separation was achieved using three Waters Styragel columns (HR1, HR3, and HR4) in series at a flow rate of 1.0 mL/min and a temperature of 40 °C. A calibration curve was obtained with near-monodisperse PEG standards. The mean hydrodynamic diameter, size distribution, and scattering intensity of the micelles were determined using a Malvern Autosizer 4800 equipped with a 488-nm uniphase argon-ion laser (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.). Measurements were performed in triplicate at a scattering angle of 90° and a temperature of 25 °C. The CONTIN program was used to extract size distributions from the autocorrelation functions.

3.3 Synthesis of asymmetric *t*Bu-S-PEG-OH

tert-Butyl mercaptan was used to initiate the anionic polymerization of EO in the presence of various molar ratios of potassium naphthalene. Anhydrous THF, potassium naphthalene (0.3 M solution in THF), and *tert*-butyl mercaptan were loaded into a sealed 100-mL round-bottom flask. The components were allowed to react for at least 10 min to ensure the formation of thiolates (evidenced as white precipitates), at which point liquid EO was added using a two-head needle. The polymerization reaction was carried out for 48 h and the product was recovered by precipitation in diethyl ether. ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 3.68 (250H, m, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$), 2.75 (2H, t, $\text{CH}_2\text{SC}(\text{CH}_3)_3$), 1.89 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 1.33 (9H, s, $\text{CH}_2\text{SC}(\text{CH}_3)_3$). Trifluoroacetic anhydride was added to the NMR tube in order to shift the signal of the methylene group adjacent to the terminal hydroxyl group and allow for the determination of the thiol functionalization degree. ^1H NMR (CDCl_3 with 7.5% (v/v) trifluoroacetic anhydride) δ (ppm): 4.50 (2H, t, $\text{CH}_2\text{OCOCF}_3$), 3.68 (250H, m, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$), 2.75 (2H, t, $\text{CH}_2\text{SC}(\text{CH}_3)_3$), 1.33 (9H, s, $\text{CH}_2\text{SC}(\text{CH}_3)_3$).

3.4 Synthesis of block ionomers

PEG ($M_n = 2000$, $M_w/M_n = 1.08$) and *t*Bu-S-PEG-OH ($M_n = 2900$, $M_w/M_n = 1.03$) were converted to atom transfer radical polymerization (ATRP) macroinitiators by reaction with 2-bromoisobutyryl bromide (Ranger 2001). Basically, PEG was dissolved in anhydrous THF and stirred for 15 min in the presence of triethylamine (10 equiv). 2-bromoisobutyryl bromide (4 equiv) was then added dropwise and the reaction carried out for 48 h at room temperature. The crude product was solubilized in dichloromethane and purified by successive washings with 10% HCl, 1 N NaOH, and brine. The organic phase was dried over magnesium sulfate and the ATRP macroinitiator precipitated in diethyl

ether. The polymerization reactions were then carried out as follows: the macroinitiator (1 equiv), DMAEMA (15 equiv), *N,N,N',N',N''*-pentamethyldiethylenetriamine (1.4 equiv) and Cu(I)Br (0.7 equiv) were solubilized in THF and degassed for 20 min with argon. The polymerization reaction was initiated by bringing the reaction medium to 60 °C for 16 h, after which the copper catalyst was removed by filtration through a silica gel column. Polymers were purified by dialysis (molecular weight cutoff of 3500) and recovered by freeze-drying. MeO-PEG₄₅-*b*-PDMAEMA₁₇: $M_n = 4800$, $M_w/M_n = 1.23$. ¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 4.14 (34H, broad s, COOCH₂CH₂N(CH₃)₂), 3.67 (180H, m, (CH₂CH₂O)_n), 3.35 (3H, s, CH₃O(CH₂CH₂O)_n), 2.71 (34H, broad s, COOCH₂CH₂N(CH₃)₂), 2.30 (102H, broad s, COOCH₂CH₂N(CH₃)₂), 2.10-1.70 (34H, m, (CH₂C(CH₃))_n), 1.20-0.78 (6H, s, C(CH₃)₂(CH₂-C(CH₃))_n) + 51H, m, (CH₂C(CH₃))_n). *t*Bu-PEG₆₆-*b*-PDMAEMA₁₅: $M_n = 5300$, $M_w/M_n = 1.11$. ¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 4.14 (30H, broad s, COOCH₂CH₂N(CH₃)₂), 3.67 (264H, m, (CH₂CH₂O)_n), 2.70 (30H, broad s, COOCH₂CH₂N(CH₃)₂), 2.30 (90H, broad s, COOCH₂CH₂N(CH₃)₂), 2.10-1.70 (30H, m, (CH₂C(CH₃))_n), 1.30 (9H, s, (CH₃)₃S(CH₂CH₂O)_n), 1.20-0.78 (6H, s, C(CH₃)₂(CH₂C(CH₃))_n) + 45H, m, (CH₂C(CH₃))_n).

3.5 Synthesis of thiol-terminated block ionomer

The terminal thiol group was recovered by successive cleavage of the *t*Bu unit in DMSO/trifluoroacetic acid (TFA) (Cuthbertson 2003) and reduction of the disulfide bond obtained thereafter. The polymer was first dissolved in a 10/90 (v/v) mixture of DMSO/TFA to a final polymer concentration of 20 mg/mL. The deprotection reaction was conducted for 3 h, after which the TFA was removed by rotary evaporation. The crude polymer extract was then purified by dialysis (to remove all traces of DMSO) and the product recovered by freeze-drying. This procedure allowed for the conversion of the *t*Bu-PEG₆₆-*b*-PDMAEMA₁₅ to its disulfide analogue. Free thiol group were generated by reacting the oxidized polymer with an excess of sodium borohydride in ethanol for 16 h.

The reaction was stopped by the addition of a 10% HCl/ethanol solution and the solvent removed under reduced pressure. The thiolated polymer was purified by passage through a Sephadex G25 column and recovered by freeze-drying. The thiol loading was determined to be 82 $\mu\text{mol/g}$ of polymer using Ellman's reagent (the loading was calculated against a cysteine calibration curve).

3.6 Synthesis of biotin-terminated block ionomers

The thiolated polymer was dissolved in degassed phosphate-buffered saline pH 7.4 to a final polymer concentration of 5 mg/mL. Biotin-maleimide (4-fold excess) was then added and the coupling reaction was carried out overnight. The excess biotin was removed by passage through a Sephadex G25 column and the polymer recovered by freeze-drying. The amount of biotin in the copolymers was determined by monitoring the change in absorbance accompanying the displacement of HABA by biotin from the HABA/avidin complex. The coupling efficiency was calculated to be 97%.

3.7 Preparation of PICM

The copolymers (PEG₄₅-*b*-PDMAEMA₁₇, HS-PEG₆₆-*b*-PDMAEMA₁₅, or biotin-PEG₆₆-*b*-PDMAEMA₁₅) and the ODN were separately dissolved in 10 mM Tris HCl pH 7.4. PICM were obtained by addition of the copolymer solution to the ODN solution to a final N/P ratio of 1.5.

3.8 Molecular recognition experiments

Biotinylated (with 5 mol% biotin-PEG₆₆-*b*-PDMAEMA₁₅) and nonbiotinylated PICM were prepared using the fluorescently labeled ODN. The complexes were loaded into streptavidin-coated wells in the presence or absence of free biotin (6-fold excess) and allowed to react for 1 h at 37 °C. Unbound micelles were removed by three washings with a 50 mM phosphate buffer at pH 6.8. The proportion of bound micelles was evaluated by dosing the fluorescence of the ODN using a Safire plate reader (Tecan, Medford, MA; $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$). Significant differences between the binding of the groups were evaluated by analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test. Data were considered to differ significantly when $p < 0.05$.

3.9 Mucoadhesion experiments

Immobilized porcine stomach mucin was treated with 25 mM dithiothreitol and extensively washed to generate free thiol groups. Thiolated (with 25 mol % HS-PEG₆₆-*b*-PDMAEMA₁₅) and nonthiolated PICM were immediately applied to the resin in the presence or absence of exogenous thiols (100-fold excess cystein) and allowed to react for 1 h at 37 °C. Unbound micelles were eluted by successive washings with 10 mM Tris HCl pH 7.4. The fluorescent ODN was dosed in each elution fraction to evaluate the proportion of bound micelles. At the end of the experiment, the ODN was massively eluted using a 0.1 M carbonate solution at pH 10 (condition known to disrupt micelles (Dufresne 2004)) to recover 100% of the applied material.

3.10 Aggregation of thiolated micelles

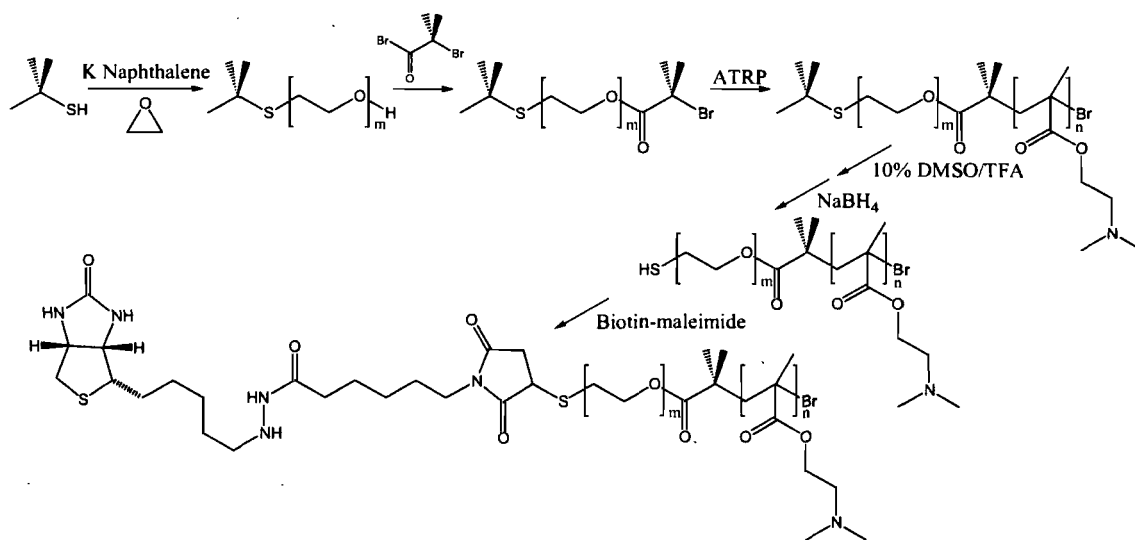
The sensitivity of thiolated (with 50 mol% HS-PEG₆₆-*b*-PDMAEMA₁₅) PICM towards oxidative (air) conditions was monitored by measuring time-dependent changes in their mean hydrodynamic diameter by dynamic light scattering (DLS). Nonthiolated PICM served as a reference. The effect of exogenous thiols and an antioxidant on micelle aggregation was evaluated by preparing thiolated micelles in the presence of 5 mM mercaptoethanol and 2.8 mM ascorbic acid, respectively.

4 Results and Discussion

4.1 Polymer synthesis

The proposed synthetic route allows for the preparation of a thiol-terminated PEG-*b*-PDMAEMA copolymer from a *t*Bu-S-PEG-OH macroinitiator (Scheme 5-1). *t*Bu-S-PEG-OH was synthesized by initiating the anionic polymerization of EO with *tert*-butyl mercaptan. Potassium naphthalene was used to activate the sulfhydryl and was found to have an effect not only on the reaction kinetics but also on the degree of end functionalization. It is seen in Figure 5-2 that a potassium naphthalene/*tert*-butyl mercaptan molar ratio of 1/1 yields complete monomer conversion but is very sensitive to water contaminants (with only 23% of the chains possessing a terminal thiol group). By reducing the proportion of potassium naphthalene, it is possible to gain control over the selectivity of the initiation reaction. However, this is achieved at the expense of the monomer conversion which only reaches 57% (when the potassium naphthalene/*tert*-butyl mercaptan ratio is 0.4/1). Subsequent reactions were therefore conducted using 50 mol% potassium naphthalene, as this metalation level gave nearly quantitative degrees of thiol functionalization (>95%) while maintaining a reasonable rate of polymerization. Polymers with molecular weight distributions lower than 1.05 were typically obtained. The molecular

weight of the *t*Bu-S-PEG-OH polymer was controlled by varying the monomer to initiator molar ratio. A typical ^1H NMR spectrum of *t*Bu-S-PEG-OH in CDCl_3 is presented in Figure 5-3A. The peak of the *tert*-butyl protons is seen at 1.32 ppm while that of the methylene protons adjacent to the thioether appears at 2.74 ppm. The degree of end functionalization was estimated by derivatizing the hydroxyl group of *t*Bu-S-PEG-OH to a trifluoroacetate using trifluoroacetic anhydride (Jo 2001). The formation of the trifluoroacetate shifted the peak of the adjacent methylene group downfield, thus separating it from the other methylene protons of PEG and allowing its quantification relative to the *tert*-butyl group.



Scheme 5-1. Synthetic route to the preparation of thiol-terminated and biotin-terminated block ionomers.

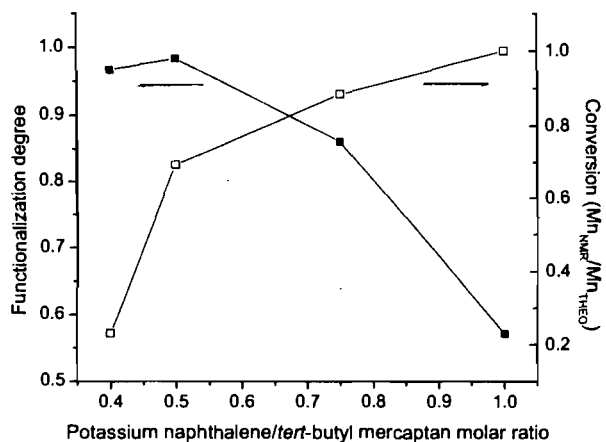


Figure 5-2. Effect of the potassium naphthalene/*tert*-butyl mercaptan molar ratio on the chain end functionalization and monomer conversion.

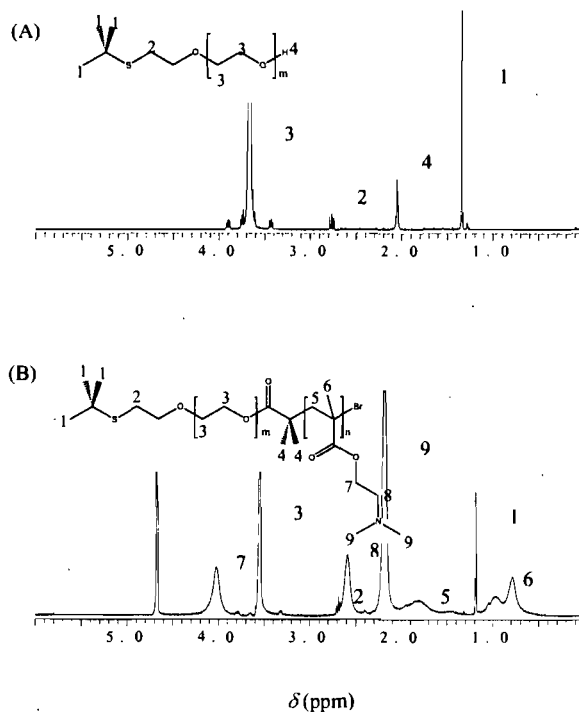


Figure 5-3. ¹H NMR spectra of *t*Bu-S-PEG-OH in CDCl₃ (A) and *t*Bu-S-PEG-*b*-PDMAEMA in D₂O (B).

PEG monomethoxyether and *t*Bu-S-PEG-OH were then converted to ATRP macroinitiators and used to prepare copolymers with varying PEG/DMAEMA molar ratios (Coessens 2001). More specifically, the copolymers selected for this study were composed of MeO-PEG₄₅-*b*-PDMAEMA₁₇ ($M_w/M_n = 1.23$) and *t*Bu-S-PEG₆₆-*b*-PDMAEMA₁₅ ($M_w/M_n = 1.11$). The *t*Bu-S-PEG-OH segment ($M_n = 2900$) was designed to be longer than the PEG monomethoxyether ($M_n = 2000$) so that the thiol groups or ligands would protrude from the micelle surface and be readily available for interaction. Indeed, studies conducted on PEGylated liposomes modified with a transduction protein revealed that the ligand needed to be accessible and nonshielded for efficient cellular interaction (Torchilin 2001). In turn, the number of DMAEMA units was kept below 20. PICM prepared from polymers with longer DMAEMA chain lengths yielded aggregated micelles with broader size distributions (data not shown). Figure 5-3B presents the ¹H NMR spectrum of *t*Bu-S-PEG₆₆-*b*-PDMAEMA₁₅ in D₂O, where the terminal *tert*-butyl protons are clearly seen at 1.30 ppm. The terminal thiol group was recovered by cleavage of the *tert*-butyl group in oxidative conditions (DMSO/TFA) followed by reduction of the disulfide bond thereby obtained.

4.2 Molecular recognition

A copolymer capped with biotin was prepared to demonstrate the ease with which targeted micelles can be generated. The functionalized copolymer was obtained through the direct coupling of HS-PEG₆₆-*b*-PDMAEMA₁₅ with a maleimide derivative of biotin. PICM composed of 5 mol % biotin-PEG₆₆-*b*-PDMAEMA₁₅, PEG₄₅-*b*-PDMAEMA₁₇, and the fluorescein-labeled ODN were prepared and found to have diameters of ~50 nm. Similar micelles made of PEG₄₅-*b*-PDMAEMA₁₇ and heparin (as the polyanion) have been previously prepared and shown to self-assemble into spherical entities, as determined by atomic force microscopy (Dufresne 2004). The ability of the biotinylated PICM to molecularly recognize streptavidin was studied by loading the micelles into streptavidin-

coated wells. The proportion of bound micelles was evaluated by dosing the fluorescence of the ODN. The latter is representative of the amount of adhered PICM given that it is a structural component of the micelles. Figure 5-4 reveals that the adhesion of PICM bearing 5 mol % biotin to streptavidin increased by a factor of 4 relative to biotin-free micelles. This result suggests that, as expected, the biotin molecules are located at the surface of the micelles and are available for interaction. The nonspecific binding observed for the nontargeted micelles probably results from electrostatic interactions between streptavidin and the micelle core components. As shown in Figure 5-4, the binding of the biotinylated PICM was greatly reduced in the presence of free biotin, confirming the specificity of the interaction. Such a protocol could be applied for the straightforward attachment of other homing devices including monoclonal antibodies and peptides via thioether linkages.

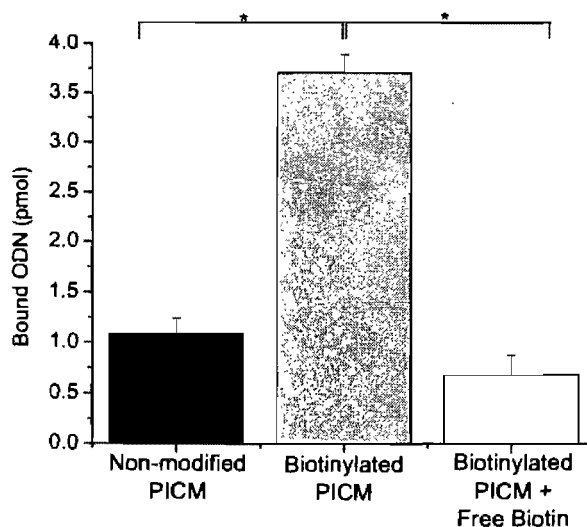


Figure 5-4. Affinity experiment showing the ability of biotinylated PICM to molecularly recognize streptavidin. Biotinylated micelles bound preferentially to streptavidin relative to nonmodified micelles. Binding of the biotinylated micelles was hindered in the presence of a 6-fold excess free biotin. Mean \pm SD ($n = 4$), * $p < 0.05$, Dunnett test.

4.3 Mucoadhesion

Another application stemming from the presence of surface sulfhydryl groups is the preparation of mucoadhesive particles for peroral drug delivery. Work by Bernkop-Schnürch and co-workers (Bernkop-Schnürch 2004) suggests that it is possible to increase the residence time of a drug delivery system in the gastrointestinal tract by modifying it with thiol groups. Surface-exposed thiols are thought to form disulfide bonds with cysteine-rich subdomains of mucus glycoproteins (Leitner 2003). We have therefore evaluated the ability of thiolated PICM to covalently bind mucin. Figure 5-5 presents the elution profile of thiolated and nonthiolated micelles applied on a mucin matrix. While 70% of the thiolated micelles were still found to adhere to the matrix after 10 washings, half of the nonthiolated micelles were released by that time. The improved mucoadhesion of the thiolated micelles can be ascribed to their increased interaction with mucin. Although seemingly marginal, this difference in mucoadhesion is in fact appreciable, considering that PEG itself is oftentimes used as an adhesion promoter. For instance, De Ascentiis *et al.* (1995) found that incorporation of PEG chains in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) microspheres significantly improved their mucoadhesion due to the penetration of the PEG chains across the mucosa-polymer interface. Likewise, Shojaei *et al.* (1997) were able to enhance the mucoadhesion of poly(acrylic acid) films by adding PEG chains to the formulation. In light of this, it is not surprising that the nonthiolated micelles themselves displayed mucoadhesion. Another consideration is the fact that the thiolated micelles examined in this study possessed a lower thiol density (30 $\mu\text{mol thiol/g}$ of micelles) than other thiolated systems studied in the literature (400-780 $\mu\text{mol thiol/g}$ of polymer) (Leitner 2003). Figure 5-5 also reveals that the adhesion of the functionalized PICM was impaired in the presence of a large excess of cysteine, with the thiolated micelles displaying an elution profile equivalent to that of the nonthiolated micelles. This observation reinforces the concept of mucoadhesion being promoted by the formation of disulfide bonds between the mucin and particle. Indeed, free cysteine molecules act as disulfide bond breaking agents which could cleave or prevent the

formation of disulfide bonds between the mucin and micelles. However, the thiolated micelles maintained their ability to bind to mucin in the presence of a small excess of cysteine (data not shown), suggesting that *in vivo* mucoadhesion may not be affected by the presence of protein digests.

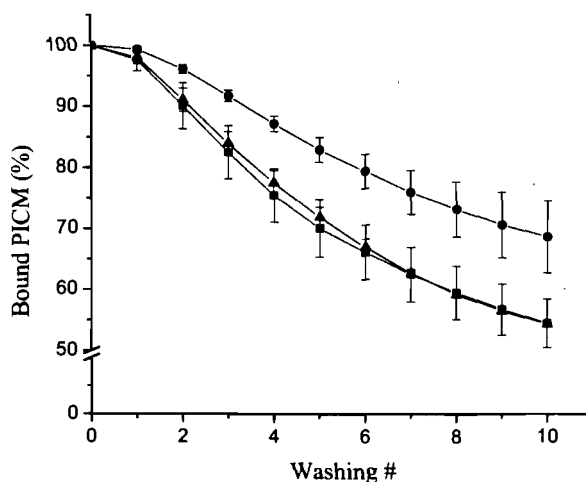


Figure 5-5. Retention of non-thiolated PICM (square) and thiolated PICM (circle) on an immobilized mucin matrix as a function of the number of washings. Thiolated PICM were also loaded on the resin in the presence of exogenous thiols (triangle) to evidence the role of the formation of disulfide bonds in the mucoadhesion. The quantity of bound micelles is expressed relative to the amount loaded. Mean \pm SD ($n = 3$).

4.4 Aggregation of thiolated micelles

If covalent bonds were formed between thiol-decorated micelles and the mucus, it is likely that they will also form between micelles. This was confirmed by studying the time-dependent stability of thiolated and non-thiolated micelles. The initial hydrodynamic diameter of the nonthiolated micelles was 60 nm while that of the thiolated micelles was 45 nm. The difference in size can be attributed to the different EO to DMAEMA molar ratios of the copolymers. A representation of the size distribution of the thiolated micelles prior to oxidation is given in Figure 5-6A. A marked association of the thiolated micelles occurred

after 6 h in oxidative (air) conditions, as observed by an increase of their mean diameter (Figure 5-6B). This aggregation was delayed in the presence of 2-mercaptoethanol and hindered in the presence of ascorbic acid (an antioxidant), clearly demonstrating that it is driven by the formation of intermicellar disulfide bonds. Furthermore, treatment with 15 mM dithiothreitol promoted the dissociation of the aggregates. The size of the micellar assemblies went from 100 nm to 65 nm within minutes of treatment with dithiothreitol, demonstrating the redox sensitivity of the system. Concomitantly, the reduction in size was associated with a marked decrease of the polydispersity index of the micelles (0.17 vs. 0.07). The aggregation of the chains achieved through disulfide bridges is potentially interesting for the design of depot formulations and eventually hydrogels. It can be hypothesized that covalently-bridged micelles administered subcutaneously could be individually released in a sustained fashion upon cleavage of the disulfide bonds in the reducing extracellular environment. These results further indicate that, when oral applications are sought, the thiolated micelles could be stored in presence of an antioxidant to preserve their integrity and mucoadhesive activity.

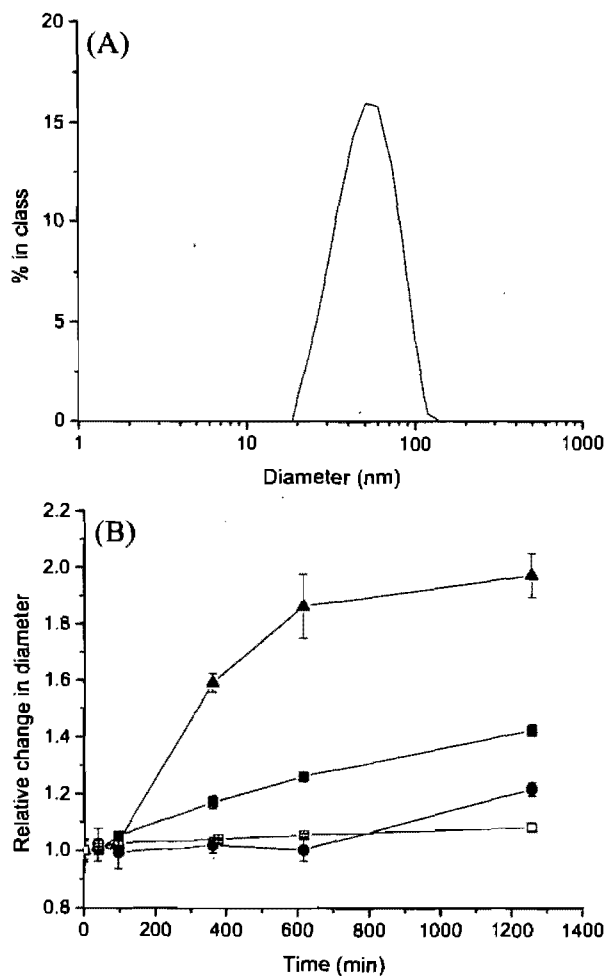


Figure 5-6. (A) Representation of the size distribution of thiolated micelles prior to oxidation. (B) Variations in the hydrodynamic diameters of non-thiolated PICM (open square) and thiolated PICM (triangle) as a function of time as determined by DLS. The presence of 5 mM 2-mercaptoethanol (square) and 2.8 mM ascorbic acid (circle) hindered the formation of disulfides between micelles. Changes in the hydrodynamic diameter of the micelles are normalized to their initial values for ease of comparison. Mean \pm SD ($n = 3$).

5 Conclusion

This work demonstrates the ease with which thiol-bearing PICM can be prepared and tailored for specific applications. The thiol groups were reacted with a maleimide derivative of biotin to produce targeted nanoparticles capable of molecular recognition. Alternatively, the thiol-decorated micelles were used as such to improve the mucoadhesion of the system or to form stimuli-responsive micellar networks fitted as a depot formulation. This synthetic approach could be easily adapted to the preparation of thiolated anionic or amphiphilic block copolymers and will undoubtedly facilitate the preparation of various surface-modified nanoparticles.

6 Acknowledgment

This work was financially supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Canada Research Chair Program. M.H.D. and M.A.G. further acknowledge graduate research scholarships from Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies.

7 References

- Allen, C., Maysinger, D. and Eisenberg, A. (1999). Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **16**: 3-27.
- Bernkop-Schnürch, A., Krauland, A.H., Leitner, V.M. and Palmberger, T. (2004). Thiomers: potential excipients for non-invasive peptide delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**: 253-263.

- Bes, L., Angot, S., Limer, A. and Haddleton, D.M. (2003). Sugar-coated amphiphilic block copolymer micelles from living radical polymerization: recognition by immobilized lectins. *Macromolecules* **36**: 2493-2499.
- Coessens, V., Pintauer, T. and Matyjaszewski, K. (2001). Functional polymers by atom transfer radical polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **26**: 337-377.
- Cuthbertson, A. and Indrevoll, B. (2003). Regioselective formation, using orthogonal cysteine protection, of an α -conotoxin dimer peptide containing four disulfide bonds. *Org. Lett.* **5**(16): 2955-2957.
- De Ascentiis, A., deGrazia, J.L., Bowman, C.N., Colombo, P. and Peppas, N.A. (1995). Mucoadhesion of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) is improved when linear poly(ethylene oxide) chains are added to the polymer network. *J. Controlled Release* **33**(1): 197-201.
- Dufresne, M.H. and Leroux, J.C. (2004). Study of the micellization behavior of different order amino block copolymers with heparin. *Pharm. Res.* **21**(1): 160-169.
- Gref, R., Couvreur, P., Barratt, G. and Mysiakine, E. (2003). Surface-engineered nanoparticles for multiple ligand coupling. *Biomaterials* **24**(24): 4529-4537.
- Harada, A. and Kataoka, K. (1999). Chain length recognition: core-shell supramolecular assembly from oppositely charged block copolymers. *Science* **283**: 65-67.
- Hianik, T., Snejdarkova, M., Sokolikova, L., Meszar, E., Krivanek, R., Tvarozek, V., Novotny, I. and Wang, J. (1999). Immunosensors based on supported lipid membranes, protein films and liposomes modified by antibodies. *Sens. Actuators B* **57**: 201-212.
- Jaturanpinyo, M., Harada, A., Yuan, X. and Kataoka, K. (2004). Preparation of bionanoreactor based on core-shell structured polyion complex micelles entrapping trypsin in the core cross-linked with glutaraldehyde. *Bioconjugate Chem.* **15**: 344-348.
- Jo, S., Shin, H., Shung, A.K., Fisher, J.P. and Mikos, A.G. (2001). Synthesis and characterization of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) macromer. *Macromolecules* **34**: 2839-2844.

- Kakizawa, Y., Harada, A. and Kataoka, K. (2001). Glutathione-sensitive stabilization of block copolymer micelles composed of antisense DNA and thiolated poly(ethylene glycol)-*block*-poly(L-lysine): a potential carrier for systemic delivery of antisense DNA. *Biomacromolecules* **2**(2): 491-497.
- Kataoka, K., Harada, A., Wakebayashi, D. and Nagasaki, Y. (1999). Polyion complex micelles with reactive aldehyde groups on their surface from plasmid DNA and end-functionalized charged block copolymers. *Macromolecules* **32**: 6892-6894.
- Kwon, G.S. (2003). Polymeric micelles for drug delivery of poorly water-soluble compounds. *Crit. Rev Ther. Drug Carrier Syst.* **20**(5): 357-403.
- Le Garrec, D., Ranger, M. and Leroux, J.C. (2004). Micelles in anticancer delivery. *Am. J. Drug Delivery* **2**(1): 15-42.
- Leitner, V.M., Walker, G.F. and Bernkop-Schnürch, A. (2003). Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus proteins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **56**: 207-214.
- Lukyanov, A.N., Elbayoumi, T.A., Chakilam, A.R. and Torchilin, V.P. (2004). Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody. *J. Controlled Release* **100**: 135-144.
- Merdan, T., Callahan, J., Petersen, H., Kunath, K., Bakowsky, U., Kopecková, P., Kissel, T. and Kopecek, J. (2003). Pegylated polyethylenimine-Fab' antibody fragment conjugates for targeted gene delivery to human ovarian carcinoma cells. *Bioconjugate Chem.* **14**(5): 989-996.
- Nobs, L., Buchegger, F., Gurny, R. and Allemann, E. (2003). Surface modification of poly(lactic acid) nanoparticles by covalent attachment of thiol groups by means of three methods. *Int. J. Pharm.* **250**: 327-337.
- Nobs, L., Buchegger, F., Gurny, R. and Allemann, E. (2004). Poly(lactic acid) nanoparticles labeled with biologically active Neutravidin™ for active targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**: 483-490.

- Ranger, M., Jones, M.C., Yessine, M.A. and Leroux, J.C. (2001). From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization method to supramolecular assemblies. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **39**: 3861-3874.
- Shojaei, A.H. and Li, X. (1997). Mechanisms of buccal mucoadhesion of novel copolymers of acrylic acid and polyethylene glycol monomethylether monomethacrylate. *J. Controlled Release* **47**(2): 151-161.
- Stevens, P.J., Sekido, M. and Lee, R.J. (2004). A folate receptor-targeted lipid nanoparticle formulation for a lipophilic paclitaxel prodrug. *Pharm. Res.* **21**(12): 2153-2157.
- Torchilin, V.P., Lukyanov, A.N., Gao, Z. and Papahadjopoulos-Sternberg, B. (2003). Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**(10): 6039-6044.
- Torchilin, V.P., Rammohan, R., Weissig, V. and Levchenko, T.S. (2001). TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**(15): 8786-8791.
- van de Wetering, P., Cherng, J.-Y., Talsma, H., Crommelin, D.J.A. and Hennink, W.E. (1998). 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents. *J. Controlled Release* **53**: 145-153.
- van Dijk-Wolthuis, W.N.E., van de Wetering, P., Hinrichs, W.L.J., Hofmeyer, L.J.F., Liskamp, R.M.J., Crommelin, D.J.A. and Hennink, W.E. (1999). A versatile method for the conjugation of proteins and peptides to poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]. *Bioconjugate Chem.* **10**: 687-692.
- Wakebayashi, D., Nishiyama, N., Itaka, K., Miyata, K., Yamasaki, Y., Harada, A., Koyama, H., Nagasaki, Y. and Kataoka, K. (2004). Polyion complex micelles of pDNA with acetal-poly(ethylene glycol)-poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) block copolymer as the gene carrier system: physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficacy. *Biomacromolecules* **5**(6): 2128-2136.

CHAPITRE 6 - Discussion

1 Synthèse des copolymères blocs

L'objectif général de cette thèse était de mettre au point des micelles polyioniques pour le transport (ciblé) de biomacromolécules thérapeutiques. À cette fin, nous avons construit une banque de polymères dans l'optique d'établir des relations structure-activité entre la composition des polymères et les propriétés physicochimiques des micelles. Ce genre d'étude requiert l'utilisation de polymères de composition définie afin de pouvoir isoler les contributions individuelles de divers paramètres. Des techniques de polymérisation contrôlées et versatiles comme la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (PRTA) prennent alors toute leur importance puisqu'elles permettent de contrôler la longueur des chaînes tout en étant compatibles avec des monomères présentant diverses fonctionnalités. Cette méthode a, entre autres, été utilisée avec succès au sein de notre groupe pour préparer des copolymères blocs comprenant des monomères hydrophobes (acrylate d'éthyle, méthacrylate de méthyle, méthacrylate d'éthyle, méthacrylate de *tert*-butyle) ou ioniques (acide méthacrylique, méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle (DMAEMA)) à partir d'un macroamorceur de poly(éthylène glycol) (PEG) (Ranger 2001). La même méthodologie a été utilisée ici afin de préparer, dans un premier temps, des copolymères possédant des groupements amine de divers degrés de substitution (amine primaire, tertiaire et quaternaire). La PRTA nous a permis, dans un deuxième temps, de construire une banque de copolymères possédant un nombre croissant d'unités monomères cationiques (10 à 40 unités) à partir de macroamorceurs de PEG de longueur variable (PEG 2000, 3000 et 5000 g/mol). Un résumé des copolymères préparés aux chapitres 3 et 4 est présenté au Tableau 6-I.

Tableau 6-I. Tableau récapitulatif de la composition des polymères préparés aux chapitres 3 et 4. Les nombres représentent le degré de polymérisation.

PEG ₄₅					PEG ₆₈		PEG ₁₁₃	
Amine 1°		Amine 3°		Amine 4°	Amine 1°	Amine 3°	Amine 1°	Amine 3°
AEMA	DMAEMA	DEAEMA	TMAEMA	DEMAEMA	AEMA	DMAEMA	AEMA	DMAEMA
12					13		11	
16					20		17	
23					26		21	
28					30		31	
35					38		36	
41					19	5		10
	13				13	12		17
	16				6	19		23
	23					13		27
	28					20		33
	34					25		
	40					31		
		13				35		
			16					
				12				

DEAEMA : méthacrylate de 2-(diéthylamino)éthyle; TMAEMA : méthacrylate de 2-(triméthylamino)éthyle; DEMAEMA : méthacrylate de 2-(diéthylméthylamino)éthyle

Certains facteurs se sont avérés cruciaux à l'obtention de polymères de faible indice de polymolécularité et aux propriétés contrôlées, et ce, particulièrement pour les copolymères de courte chaîne cationique. Ainsi, nous avons observé que les conditions employées au chapitre 3 (*N,N,N',N',N''*-pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA) comme ligand et Cu(I)Br dans des proportions 1 : 1, tétrahydrofurane, 65 °C) n'étaient pas optimales pour la préparation de polymères contenant peu de monomères aminés (~10 unités monomères). En effet, les tracés de chromatographie d'exclusion stérique de tels polymères présentaient un épaulement aux faibles masses molaires, indiquant la présence de macroamorceur résiduel. La synthèse des copolymères a donc été optimisée au chapitre 4 en changeant certains paramètres expérimentaux dont la nature du ligand et du complexe métallique.

En plus d'assurer la solubilité du complexe métallique, le rôle principal du ligand est d'ajuster le potentiel redox du métal de façon à contrôler l'équilibre entre les espèces dormantes et les espèces en croissance. De façon générale, plus un ligand est réducteur,

plus il est actif en PRTA (ce qui se traduit par une meilleure efficacité d'amorçage et une cinétique de polymérisation plus rapide). Des études de voltamétrie ont montré que le pouvoir réducteur d'un ligand augmente en fonction de son nombre d'atomes d'azote et de son caractère nucléophile (Qiu 2000). Ainsi, nous avons substitué le PMDETA, un ligand tridendate, pour le 1,1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylènetetramine, un ligand tétradentate et avons ainsi réussi à diminuer la proportion de macroamorceur résiduel. D'autre part, Lenoir *et al.* (2006) ont montré que l'ajout de Cu(II) au système catalytique pouvait aussi diminuer la proportion de macroamorceur résiduel. En effet, le Cu(II) permet de ralentir la réaction de propagation comparativement à la réaction d'amorçage et d'augmenter ainsi l'efficacité d'amorçage du système. L'ajout de Cu(II)Br₂ au système catalytique s'est avéré bénéfique et a permis de diminuer presque complètement l'épaule correspondant au macroamorceur. Ces conditions se sont révélées aussi efficaces pour la synthèse du PEG-*b*-poly(méthacrylate de 2-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino)éthyle) que du PEG-*b*-PDMAEMA.

Au moment de la publication des travaux réalisés au chapitre 3, seuls des monomères présentant des amines tertiaires avaient été polymérisés par PRTA (Zhang 1998; Coessens 2001; Matyjaszewski 2001). Les travaux des chapitres 3 ont contribué, si ce n'est que modiquement, à l'avancement de la PRTA en décrivant des conditions pour la préparation de polymères présentant des amines primaires. Un désavantage de notre approche, néanmoins, est qu'elle repose sur la protection des groupements amine avant la polymérisation. Depuis, le groupe de Armes a établi des conditions de réaction permettant la PRTA du méthacrylate d'aminoéthyle (AEMA) sans protection préalable (He 2007). Ainsi, les auteurs ont préparé des copolymères de type PEG-*b*-PAEMA (30 et 60 unités monomères) avec des indices de polymolécularité inférieurs à 1,26 dans un système isopropanol/eau (95/5 ou 80/20 *v/v*) en présence de Cu(I)Cl et de bypiridine à 50 °C.

2 Propriétés tampon

À ce jour, le poly(éthylèneimine) (PEI) demeure l'un des polymères les plus efficaces en thérapie génique (Park 2006). Son efficacité serait due à sa capacité à déstabiliser l'endosome afin de permettre le passage des acides nucléiques vers le cytoplasme. Plusieurs études suggèrent que le PEI agirait comme une éponge à protons dans l'endosome, entraînant ainsi une entrée massive de contre-ions qui augmentent la pression osmotique de l'organelle et entraînent sa lyse (Boussif 1995; Sonawane 2003). Bien que ce mécanisme soit controversé, l'évaluation de la capacité tampon des polymères (ou de leur pK_a) demeure au sein de la communauté scientifique un outil pratique servant à prédire l'efficacité de transfection d'un polymère.

Ainsi, les données montrent que les polymères de DMAEMA présentent une capacité tampon supérieure à ceux d'AEMA dans la zone de pH de 7,4 à 5,5 (Tableaux 3-I et 4-III). Une étude plus approfondie des résultats présentés aux chapitres 3 et 4 révèle de plus que les pK_a s obtenus pour le PEG₄₅-*b*-PAEMA₁₆ et le PEG₄₅-*b*-PDMAEMA₁₇ (7,1 et 6,6) sont légèrement supérieurs à ceux déterminés pour le PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₆ et le PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ (7,0 et 6,5). Ces observations s'expliquent du fait que le degré d'ionisation des groupements amine varie selon leur microenvironnement; pour une amine située le long de la chaîne de polymère, la proximité d'une autre amine ionisée déplace l'équilibre acido-basique vers la neutralité, diminuant son pK_a . À titre comparatif, le pK_a du monomère DMAEMA est 8,14 (Prádný 1985). La baisse de pK_a serait d'autant plus marquée pour les chaînes cationiques courtes à moyennes et perdrait en importance à mesure que la masse molaire augmente. En définitive, les résultats indiquent que le pK_a des chaînes cationiques est non seulement affecté par la nature du groupement amine (primaire *vs.* tertiaire) mais aussi, bien qu'à moindre échelle, par le degré de polymérisation.

3 Effet du ratio de charges sur les propriétés colloïdales des micelles

Le ratio de charges est un des paramètres critiques affectant les propriétés des micelles puisqu'il est non seulement garant du taux d'incorporation du matériel génétique dans les complexes mais affecte aussi les propriétés colloïdales de la formulation. L'effet du ratio de charges sur les propriétés des micelles a été étudié à la fois pour des micelles à base d'héparine (Figure 3-4) et d'ODN (Figure 4-3). L'héparine a d'abord été utilisée au chapitre 3 en raison de son faible coût. Pour ces études, des aliquotes d'héparine ont été ajoutées à une solution de polymère et l'intensité de la lumière diffusée, la taille des micelles et l'indice de polydispersité ont été mesurés après chaque addition. À l'inverse, des aliquotes de polymère ont été ajoutées à la solution d'ODN. Malgré des différences importantes dans le protocole expérimental et les propriétés des polyanions utilisés, les deux systèmes se comportent de façon étonnamment similaire (Figure 6-1). Dans les deux cas, les profils obtenus peuvent être arbitrairement divisés en trois régions, soit une région d'excès de polyion ($-/+ < 1$), d'interactions optimales ($-/+ \sim 1,5$) et d'excès de polymère ($-/+ > 1,75$). La région d'interaction optimale est caractérisée par un maximum de l'intensité de la lumière diffusée. Ce maximum peut s'expliquer du fait que les micelles dont les charges sont neutralisées présentent un cœur plus dense qu'aux autres ratios (Dautzenberg 2003). De plus, à ce ratio, toutes les chaînes participent à la formation de micelles et le nombre de particules est maximal. Les micelles obtenues dans cette fenêtre de ratios présentent une distribution de taille unimodale et un indice de polydispersité minimal. Une inspection des distributions de tailles obtenues de part et d'autre de cette zone idéale révèle, au contraire, la présence de systèmes sous-optimaux. Ainsi, les données du chapitre 3 semblent indiquer que les particules formées en excès de charges négatives sont non uniformes et que des chaînes d'héparine libres coexistent avec des micelles en solution. Les particules formées en excès de charges positives seraient, quant à elles, plus uniformes (*cf.* indices de polydispersité, Figure 6-1) et incorporeraient un excès de polymère cationique. Ces résultats confirment que le mécanisme d'auto-assemblage des

micelles polyioniques est spontané et indépendant de la nature des polyions (pour autant que leur densité de charges soit élevée).

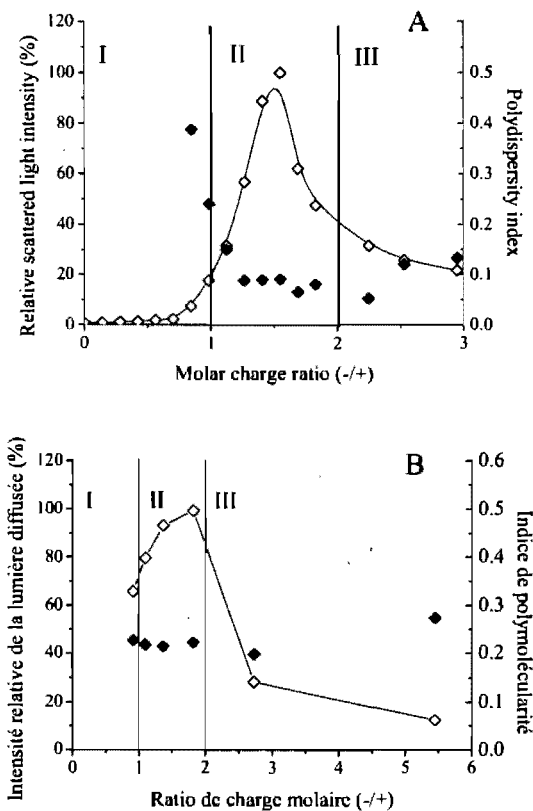


Figure 6-1. Effet du ratio de charges molaire sur les propriétés des micelles de PEG₄₅-*b*-PAEMA₁₆ et d'héparine (A) et de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₆ et d'ODN (B). Les données présentées au panneau A proviennent du chapitre 4 alors que les données du panneau B ont été adaptées du chapitre 5 en sachant que 37% des groupements amine sont ionisés à pH 7,4.

4 Effet de la composition des polyions sur les propriétés colloïdales des micelles

Il est important de comprendre les effets de la composition du polymère sur les propriétés colloïdales des micelles (taille, stabilité face à l'agrégation) sachant que les vecteurs doivent présenter des tailles supérieures à ~10 nm (pour échapper à la filtration glomérulaire) et inférieures à 200 nm (pour limiter leur capture par la rate) afin d'assurer leur circulation prolongée *in vivo* (Gaucher 2005). Les données recueillies au chapitre 3 permettent difficilement de tirer des conclusions quant à un effet de la composition des polymères sur les micelles. Ainsi, on observe que tous les polymères forment des micelles de l'ordre de 25-32 nm en présence d'héparine (Tableau 3-I) et ce, indépendamment de la nature du groupement amine (primaire, tertiaire ou quaternaire). Une analyse plus détaillée des données révèle néanmoins que les indices de polydispersité obtenus pour les micelles d'AEMA et de DEAEMA sont légèrement supérieurs à ceux obtenus pour les autres polymères (Tableau 3-I). De plus, le nombre d'agrégation des micelles de DEAEMA est d'environ deux fois supérieur à celui des autres systèmes, reflétant la nature plus hydrophobe de ce polymère.

En raison du nombre élevé de polymères synthétisés, des conclusions plus convaincantes de l'effet de la composition du polymère sur les propriétés colloïdales des micelles ont pu être tirées à partir des données recueillies au chapitre 4. En effet, 33 polymères dont la longueur de la chaîne de PEG et du segment cationique varie systématiquement ont été préparés. De manière générale, la taille et l'indice de polydispersité des micelles augmentent lorsque que le ratio monomère cationique/oxyde d'éthylène augmente (*i.e.* lorsque le nombre d'unités monomères augmente ou que la longueur de la chaîne de PEG diminue) (Figure 4-4). Plus particulièrement, des micelles sujettes à l'agrégation sont obtenues lorsque que le ratio AEMA/oxyde d'éthylène dépasse ~0,44. Il est intéressant de noter que, bien que la taille et l'indice de polydispersité des micelles de DMAEMA varient en fonction du ratio DMAEMA/oxyde d'éthylène, ces micelles demeurent stables en solution (dispersées) peu importe la composition du

polymère. Ces résultats indiquent des différences notables des interactions entre l'ODN et les amines primaires et tertiaires. Une explication plausible veut que l'interaction entre le DMAEMA et l'ODN soit encombrée comparativement à l'AEMA dû à la présence de deux groupements méthyle sur l'amine tertiaire. Les complexes DMAEMA/ODN formés seraient donc plus lâches et paraîtraient plus hydrophiles que ceux obtenus avec l'amine primaire.

Finalement, des différences ont été observées quant à la nature du polyion incorporé dans les micelles. Ainsi, alors que les micelles préparées avec l'héparine et PEG₄₅-*b*-PAEMA₁₆ présentent des tailles d'environ 25 nm (Tableau 3-I), celles provenant de la complexation de l'ODN avec un polymère dont la chaîne cationique est légèrement plus courte (PEG₄₅-*b*-PAEMA₁₂) mesurent environ 40 nm (Figure 4-4). Une augmentation de la chaîne cationique de 12 à 23 unités génère même des micelles d'ODN qui s'agrègent (Figure 4-4). Ces différences sont vraisemblablement dues à l'hydrophobie supérieure de l'ODN phosphorothioate (PS) comparativement à l'héparine. Une tendance similaire a été obtenue lorsqu'un dérivé d'ODN de type acide nucléique 2'-fluoro arabino a été utilisé en place de l'ODN PS (communications personnelles avec Nada Takia Wazen). Des micelles agrégées et instables ont été obtenues avec PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₆, un polymère qui pourtant produit des micelles relativement bien définies avec l'ODN PS, confirmant l'effet de l'hydrophobie sur les propriétés colloïdales des micelles produites.

5 Effet de la composition du polymère sur la stabilité des micelles face à la dissociation

La stabilité des complexes face à la dissociation est critique autant *in vivo* qu'*in vitro*. Si l'affinité entre les acides nucléiques et le polymère cationique est trop faible, les complexes risquent de se dissocier prématurément dans le sang. D'un autre côté, une affinité trop forte pourrait compromettre la libération intracellulaire du matériel génétique et limiter l'activité de transfection (Gabrielson 2006).

Au chapitre 3, la stabilité des complexes face à la dissociation a été étudiée en mesurant l'effet de l'addition de chlorure de sodium sur l'intégrité des micelles (Figure 3-7). Les résultats montrent que, de tous les candidats, les polymères présentant des groupements amine primaire produisent les micelles les plus stables. Ces résultats ont été corroborés au chapitre 4 en étudiant la stabilité face à la dissociation des micelles d'ODN dans le cadre d'essais de compétition menés avec l'héparine (Figure 4-5). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la stabilité accrue des complexes à base d'amine primaire. Par exemple, certaines études indiquent que le degré d'ionisation affecte le nombre de charges disponibles pour interagir avec le matériel génétique et, en contrepartie, la stabilité des complexes (Rungsardthong 2003; Arigita 1999). En accord avec cette hypothèse, nous avons observé que le copolymère PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₆, ionisé à 37% à pH 7,4, forme des complexes plus stables que le copolymère PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅, ionisé à 24%. Par contre, cet argument ne permet pas d'expliquer la stabilité accrue des micelles présentant des amines primaires comparativement aux micelles présentant des amines quaternaires (Figure 3-7). De plus, en considérant que les expériences du chapitre 3 ont été conduites à pH 4 (alors que tous les groupements amine, indépendamment de leur nature, étaient ionisés), des facteurs autres que le degré d'ionisation doivent être évoqués afin de comprendre les différences observées. Par exemple, il est envisageable que les chaînes alkyles des amines tertiaires et quaternaires (méthyle ou éthyle) encombrant l'interaction entre le polymère et la chaîne anionique et génèrent des complexes moins stables comparativement à l'amine primaire.

Les études présentées au chapitre 3 en présence de sel (Figure 3-7) révèlent aussi que les micelles demeurent pratiquement intactes lorsqu'exposées à 0,15 M de chlorure de sodium (solution isotonique au plasma), laissant supposer qu'une fois dans le sang, ces micelles maintiendront leur taille et pourront circuler de manière prolongée.

6 Transferrine en tant que ligand

Grâce à leur couronne hydrophile, les micelles polyioniques sont neutres et interagissent peu avec les protéines (Ogris 1999). Si ces propriétés sont avantageuses *in vivo* afin d'assurer un long temps de circulation, elles diminuent significativement l'interaction avec les cellules et l'internalisation des complexes dans le tissu cible (Lam 2004; Petersen 2002). Il est possible de promouvoir la capture des micelles en leur greffant en périphérie des molécules de reconnaissance qui seront reconnues puis internalisées par des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules. Dans cette optique, nous avons entrepris de modifier la surface des micelles avec un ligand d'intérêt clinique, la transferrine sérique. Ces résultats font suite aux travaux réalisés au chapitre 5 et sont décrits ici pour la première fois.

La transferrine sérique est une glycoprotéine dont la fonction est de lier et de transporter les ions ferriques des sites d'apport à la circulation systémique, puis aux cellules et tissus (Qian 2002). Elle est constituée d'une seule chaîne glycoprotéique de 700 acides aminés (80,000 Da) qui s'organise en deux lobes structurellement similaires désignés lobes N et C. Chaque lobe comprend à son tour deux domaines distincts sertissant une fissure hydrophobe où se lie l'ion Fe^{3+} . Chaque lobe peut héberger un seul ion ferrique de sorte que chaque molécule de transferrine transporte, au maximum, deux ions Fe^{3+} . Les ions Fe^{3+} ne se lient à la transferrine qu'en présence d'anions (tel le bicarbonate) qui participent à joindre le fer à la protéine. La liaison du fer à son site d'attache entraîne un changement de conformation de la transferrine, affectant l'affinité de cette dernière pour son récepteur. Ainsi, les récepteurs à la transferrine ont plus d'affinité pour la protéine diferrique (holo-transferrine) que monoferrique ou libre (apo-transferrine) (Young 1984; Qian 2002). Les récepteurs à la transferrine sont exprimés par toutes les cellules nucléées du corps dont les hépatocytes, les monocytes (macrophages), les cellules intestinales ou encore les cellules de la barrière hémato encéphalique (Qian 2002). Par contre, les niveaux d'expression du récepteur diffèrent d'une lignée cellulaire à l'autre et sont particulièrement élevés pour les cellules en division telles les cellules tumorales et les cellules en culture (à raison de 10,000-100,000 molécules par cellule), permettant théoriquement un ciblage des cellules

tumorales *in vivo* (Qian 2002). Une fois internalisées, les molécules de transferrine subissent un changement de conformation suivant la baisse de pH rencontrée lors de la maturation des endosomes. Ce changement de conformation se traduit par une baisse d'affinité entre les ions de fer et la protéine et facilite leur libération. À ce stade, la majorité des molécules d'apo-transferrine, toujours liées à leur récepteur, sont recyclées vers la surface de la cellule puis libérées.

7 Préparation de micelles ciblées et essais de liaison cellulaire

Les stratégies les plus couramment utilisées pour attacher un ligand à la surface de nanoparticules reposent sur des réactions de couplage de type amine/acide. Malheureusement, ces réactions sont incompatibles avec les copolymères d'AEMA qui présentent des amines primaires tout au long de leur chaîne cationique. Ainsi, une voie de synthèse alternative a été élaborée au chapitre 5 (Schéma 5-1) afin de préparer des copolymères présentant un groupement thiol en bout de chaîne. Cette stratégie permet le couplage d'un ligand présentant un groupement maléimide (*via* la formation d'un thioéther stable) ou d'un ligand thiolé (*via* la formation d'un pont disulfure clivable) au polymère avec une interférence minimale des groupements amine. Ces réactions peuvent être réalisées en milieu aqueux à pH physiologique, permettant le greffage de molécules de reconnaissance fragiles telles des protéines et anticorps.

Au chapitre 6, cette voie de synthèse a été utilisée avec succès pour préparer des micelles ciblées avec une petite molécule modèle, la biotine. Les données recueillies lors d'expériences *in vitro* dans des conditions simulées indiquent que les molécules de ciblage se retrouvent bel et bien à la surface des micelles et interagissent de manière spécifique avec leur substrat. Suivant ces résultats prometteurs, nous avons appliqué la méthode à la préparation de conjugués transferrine-PEG-*b*-PAEMA (*i.e.* Tf-PEG₉₅-*b*-PAEMA₂₂). Une

représentation schématique de l'approche synthétique employée est présentée au Schéma 6-1 alors que le détail de la procédure expérimentale se retrouve à l'annexe 1.

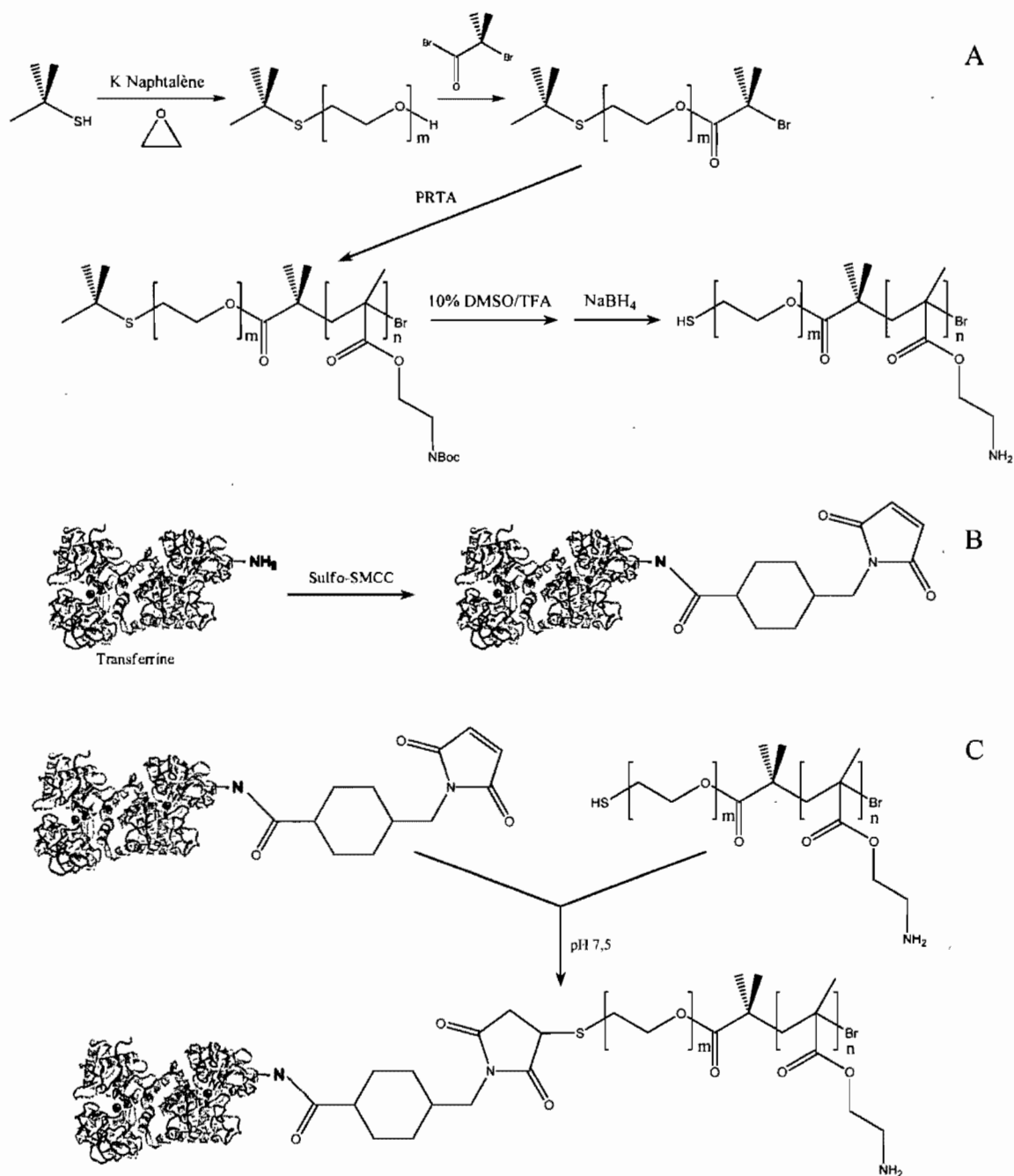


Schéma 6-1. Voie de synthèse utilisée pour la préparation de polymères conjugués à la transferrine. (A) Synthèse d'un copolymère thiolé. Dans une première étape, un PEG-thioéther est préparé en amorçant la polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène

par le *tert*-butyl mercaptan. Le PEG-thioéther est ensuite utilisé comme macroamorceur pour la PRTA du segment cationique. Le groupement thioéther est finalement déprotégé puis réduit pour générer un groupement thiol au bout de la chaîne de PEG du copolymère. (B) Synthèse de transferrine-maléimide. Un groupement amine (aléatoire) de la protéine réagit avec le groupement acide carboxylique activé du sulfo-SMCC pour produire directement la transferrine-maléimide. (C) Synthèse du conjugué transferrine-PEG-*b*-PAEMA. La transferrine-maléimide est incubée avec le polymère thiolé fraîchement réduit. La réaction se fait en milieu aqueux à pH physiologique, des conditions assurant l'intégrité la transferrine.

Pour ces essais, nous avons choisi de coupler l'holo-transferrine plutôt que l'apo-transferrine aux chaînes polymères. En effet, l'holo-transferrine est plus stable que son analogue apo en solution. De plus, puisque la protéine holo se retrouve dans sa configuration finale (*i.e.* repliée sur les ions de fer, avec le domaine de liaison inaccessible), il a été postulé que le couplage du groupement maléimide (Schéma 6-1B) devrait minimalement interférer avec la liaison du fer et la reconnaissance de la protéine par son récepteur.

La purification du conjugué transferrine-polymère s'est avérée plus difficile que celle du conjugué biotine-polymère décrite au chapitre 6 compte tenu du fait que la transferrine est une macromolécule. En effet, la différence de masse molaire entre les conjugués transferrine-polymère et les molécules de transferrine libres est faible (88,000 vs. 80,000), proscrivant la séparation des produits sur la base de leur taille. Par conséquent, nous avons utilisé une colonne échangeuse de cations afin de lier sélectivement les chaînes de Tf-PEG₉₅-*b*-PAEMA₂₂ (et potentiellement des chaînes polymères non réagies) et éliminer la transferrine libre. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler au pH de 6,5 afin d'ioniser suffisamment la chaîne polymère et d'assurer la liaison efficace de celle-ci à la colonne; le point isoélectrique de l'holo-transferrine étant de 5,2, la protéine n'est pas retenue par la colonne à ce pH. Nous avons ainsi obtenu le polymère Tf-PEG₉₅-*b*-PAEMA₂₂ avec une efficacité de couplage de 74%.

Des micelles ciblées à la transferrine ont ensuite été préparées en ajoutant l'ODN à un mélange de Tf-PEG₉₅-*b*-PAEMA₂₂ et de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₆ de manière à ce que 10% des chaînes de la micelle présentent un groupement transferrine. En effet, puisque

l'incorporation du polymère et de l'ODN dans les micelles polyioniques est pratiquement quantitative, la densité de ligands à la surface des micelles peut être ajustée en variant tout simplement la quantité de polymère marqué à inclure dans la formulation. Il est à noter que les propriétés des micelles préparées avec Tf-PEG₉₅-*b*-PAEMA₂₂ risquent d'être affectées significativement comparativement à leurs analogues non ciblés. En effet, la transferrine est une molécule hydrophile qui affecte la balance hydrophile/cationique du polymère de sorte qu'une diminution de la taille est à prévoir. Cette hypothèse est appuyée par des résultats préliminaires qui montrent que la taille des micelles ciblées est de l'ordre de 45 nm (dans le milieu de culture cellulaire Tris 10 mM pH 7,4/Opti-MEM; 50/50 (v/v)) comparativement à ~80 nm pour les micelles contrôles. Sachant que la taille peut affecter la voie d'internalisation et l'efficacité de transfection des complexes (chapitre 2, section 2.6.1.1), cette contribution devra être considérée lors de l'interprétation des futurs essais d'efficacité.

La capture des micelles par les cellules A549 a été évaluée par cytométrie en flux, une méthode qui permet de mesurer le niveau de fluorescence de cellules une à une. Pour ce faire, nous avons incorporé une fraction d'ODN marqué à la fluorescéine dans la composition des micelles (annexe 1). Des études préalables ont montré qu'au maximum 40 % des chaînes d'ODN pouvaient porter une molécule de fluorescéine, au-delà de quoi la proximité des fluorophores dans le cœur de la micelle entraînait le « *quenching* » du signal fluorescent. Les résultats de capture obtenus pour des micelles fluorescentes contrôles et ciblées sont présentés à la Figure 6-2. Il est à noter que, selon le protocole utilisé ici, la méthode ne permet pas de différencier les complexes liés à la surface des cellules de ceux internalisés. Les résultats montrent tout de même que la présence de transferrine permet d'augmenter l'interaction avec les cellules. Les données suggèrent de plus que les molécules de transferrine se retrouvent à la surface des micelles et sont disponibles pour interagir avec leur récepteur.

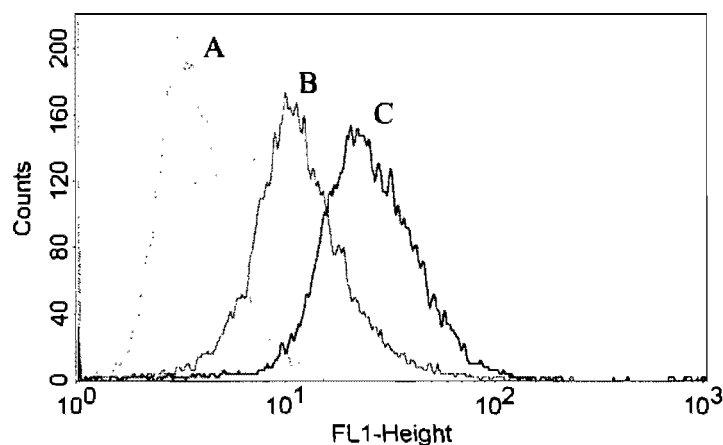


Figure 6-2. Capture des micelles (ciblées ou non) par les cellules A549. Le profil de fluorescence basale des cellules est représenté en A avec, en abscisse, l'intensité de fluorescence (unités arbitraires) et, en ordonnée, le nombre de cellules. Les profils B et C illustrent respectivement la capture des micelles polyioniques contrôles et modifiées à la transferrine.

Bien que concluants, les essais présentés à la Figure 6-2 sont quelque peu décevants dans la mesure où la capture des micelles ciblées n'est que faiblement augmentée. Ce résultat peut être expliqué de plusieurs façons. D'une part, l'intensité de fluorescence des micelles utilisées était relativement faible en raison de la limite imposée par le « *quenching* » de la fluorescence dans le cœur des micelles. D'autre part, la fluorescence de la fluorescéine est connue pour diminuer en fonction du pH, particulièrement dans la zone de 5-9. En supposant qu'une fois liées à leur récepteur les micelles ciblées soient internalisées par endocytose dépendante de la clathrine, il est raisonnable de supposer que la baisse de pH rencontrée lors de la maturation des endosomes inhibe leur fluorescence. Ainsi, l'intensité de fluorescence des micelles internalisées serait sous-estimée. Finalement, il est possible qu'une partie des micelles soit redirigée vers la surface des cellules lors du recyclage des molécules de transferrine. Dans cette éventualité, les micelles seraient internalisées efficacement mais redirigées vers la surface, de sorte que leur internalisation nette soit faible.

Les résultats de cette section suggèrent que des efforts supplémentaires devraient être engagés dans la mise au point des micelles ciblées afin d'augmenter les chances de succès des futures études d'efficacité. Ces efforts devraient être dirigés à la fois vers des études physicochimiques visant à étudier les caractéristiques (taille, stabilité) des micelles ciblées et des études *in vitro* visant à expliquer la faible internalisation des micelles ciblées. Une fois ces paramètres élucidés, les prochaines études viseront à évaluer l'efficacité de transfection des micelles ciblées et, potentiellement, à établir des relations structure-activité entre les propriétés physicochimiques des micelles et leur activité thérapeutique.

8 Conclusions et perspectives

Dans un premier temps, la PRTA nous a permis de préparer une série de copolymères de type PEG-*bloc*-poly(méthacrylate d'(alkylamino)éthyle) de faibles indices de polymolécularité. Ces polymères variaient de par la nature de leur groupement amine (primaire, tertiaire, quaternaire ou leur mélange), la longueur de leur chaîne de PEG ($M_n = 2000, 3000$ et 5000 g/mol) et la longueur de leur segment cationique (10-40 unités de répétition). Ces polymères ayant des propriétés définies, il nous a été possible d'établir, dans un deuxième temps, des relations structure-activité entre la composition des polymères et les caractéristiques des micelles obtenues. Ainsi, les travaux réalisés dans cette thèse montrent que plusieurs paramètres influencent l'interaction de ces polymères avec des polyanions tels l'héparine et les acides nucléiques.

D'une part, le ratio de charges $-/+$ affecte les propriétés colloïdales des micelles formées et le degré d'incorporation du polyion dans le vecteur. Les données indiquent que des micelles homogènes sont obtenues à un ratio $-/+$ de 1,5 et ce, indépendamment de la nature du polyion. À ce ratio, le cœur des micelles est dense et une seule population de particules est obtenue (*i.e.* toutes les chaînes participent à la formation de micelles). De plus, tous les polymères sont capables d'incorporer efficacement l'ODN. D'autre part, la nature du groupement amine affecte l'interaction entre le segment cationique et le polyanion. Par exemple, le nombre d'agrégation et l'indice de polydispersité des micelles

obtenues avec le monomère DEAEMA sont plus élevés que ceux des autres monomères, indiquant une contribution de l'hydrophobie sur les propriétés d'auto-assemblage. De plus, il semble que la présence de chaînes alkyles sur les amines tertiaires et quaternaires encombre et affaiblit les interactions électrostatiques du polymère avec le polyion. Cet effet se traduit par une stabilité moindre des micelles d'amines tertiaires et quaternaires en présence de sels ou d'un polyanion compétiteur comparativement aux micelles d'AEMA (amine primaire). De plus, la longueur de la chaîne de PEG et du segment cationique affecte les propriétés colloïdales et la stabilité des micelles face à la dissociation. De manière générale, la taille et l'indice de polydispersité des micelles augmentent lorsque que le ratio monomère cationique/oxyde d'éthylène augmente (*i.e.* lorsque le nombre d'unités monomères augmente ou que la longueur de la chaîne de PEG diminue) Parallèlement, une augmentation du ratio monomère cationique/oxyde d'éthylène génère des particules de plus en plus stables face à la dissociation.

Dans un troisième temps, une méthodologie a été élaborée afin de préparer des micelles dont la surface était décorée de molécules de reconnaissance. Pour ce faire, des copolymères possédant un thiol en bout de chaîne ont été synthétisés puis couplés à des ligands présentant un groupement maléimide. La méthode s'est avérée compatible au couplage de petites (biotine) et de grosses (transferrine) molécules de ciblage. Les résultats obtenus *in vitro* avec les deux ligands sont prometteurs. En effet, les deux types de micelles ont démontré une reconnaissance moléculaire.

Les travaux futurs avec l'héparine viseront à évaluer la capacité des micelles à augmenter la biodisponibilité orale de cet agent anticoagulant. À cet effet, des essais préliminaires au cours desquels des micelles de PEG₄₅-*b*-PAEMA₁₆ et PEG₄₅-*b*-PAEMA₁₆ ont été encapsulées, sous forme de poudre lyophilisée, dans des capsules enrobées d'un film gastrorésistant ont été réalisés. Des deux formulations testées, seules les micelles d'AEMA administrées par gavage à des rats à jeun semblent avoir marginalement augmenté la biodisponibilité de l'héparine. Par contre, les travaux présentés au chapitre 5 laissent croire que des résultats plus encourageants pourraient être obtenus avec les micelles thiolées, qui sont mucoadhésives. De plus, les travaux du groupe de Berknop-

Schnürch réalisés avec des polymères thiolés (Clausen 2001, 2000) suggèrent que les micelles thiolées pourraient perméabiliser les jonctions serrées de l'épithélium intestinal, indiquant un deuxième mécanisme par lequel ces micelles pourraient augmenter la biodisponibilité de l'héparine.

Les travaux futurs avec l'ODN, quant à eux, viseront à évaluer et optimiser l'efficacité de transfection des micelles ciblées *in vitro* et *in vivo*. À cet effet, les données recueillies jusqu'à présent seront profitables puisqu'elles nous ont permis de comprendre la contribution individuelle des propriétés des polymères sur les caractéristiques des micelles. Des résultats préliminaires de cytotoxicité *in vitro* révèlent qu'à dose d'ODN égale, les micelles sont significativement moins toxiques que les lipoplexes. Ces résultats sont encourageants dans l'éventualité d'essais *in vivo*. Néanmoins, il faut garder à l'esprit qu'il n'est pas toujours possible d'établir un parallèle entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*. En effet, les conditions assurant l'efficacité de transfection dans les cellules s'opposent à celles assurant l'efficacité de transfection suite à une administration systémique. Par exemple, alors qu'une stabilité accrue des micelles face à la dissociation est une condition *sine qua non* à leur circulation prolongée *in vivo*, une trop grande stabilité empêche la dissociation des micelles une fois dans la cellule et compromet l'activité du matériel génétique. Afin de remédier à ce problème et d'assurer l'efficacité de transfection des micelles à la fois *in vitro* et *in vivo*, il est envisageable d'introduire un polymère membrano-lytique dans la composition de micelles stables. En effet, des travaux conduits dans notre laboratoire montrent qu'en plus de déstabiliser la membrane endosomale, l'incorporation de polymères de type poly(acide (méth)acrylique d'alkyle) dans les micelles provoque la déstabilisation partielle des complexes en milieu acide et favorise la distribution des chaînes d'ODN ainsi libérées dans le noyau (Yessine 2007).

9 Bibliographie

- Arigita, C., Zuidam, N.J., Crommelin, D.J.A. and Hennink, W.E. (1999). Association and dissociation characteristics of polymer/DNA complexes used for gene delivery. *Pharm. Res.* **16**(10): 1534-1541.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(August 1995): 7297-7301.
- Clausen, A.E. and Bernkop-Schnürch, A. (2000). In vitro evaluation of the permeation-enhancing effect of thiolated polycarbophil. *J. Pharm. Sci.* **89**(10): 1253-1261.
- Clausen, A.E. and Bernkop-Schnürch, A. (2001). Thiolated carboxymethylcellulose: in vitro evaluation of its permeation enhancing effect on peptide drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **51**(1): 25-32.
- Coessens, V., Pintauer, T. and Matyjaszewski, K. (2001). Functional polymers by atom transfer radical polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **26**: 337-377.
- Dautzenberg, H., Konak, C., Reschel, T., Zintchenko, A. and Ulbrich, K. (2003). Cationic graft copolymers as carriers for delivery of antisense-oligonucleotides. *Macromol. Biosci.* **3**(8): 425-435.
- Gabrielson, N.P. and Pack, D.W. (2006). Acetylation of polyethylenimine enhances gene delivery via weakened polymer/DNA interactions. *Biomacromolecules* **7**(8): 2427-2435.
- Gaucher, G., Dufresne, M.H., Sant, V.P., Kang, N., Maysinger, D. and Leroux, J.C. (2005). Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J. Control. Release* **109**(1-3 Special Issue SI): 169-188.
- He, L.H., Read, E.S., Armes, S.P. and Adams, D.J. (2007). Direct synthesis of controlled-structure primary amine-based methacrylic polymers by living radical polymerization. *Macromolecules* **40**(13): 4429-4438.

- Lam, J.K.W., Ma, Y., Armes, S.P., Lewis, A.L., Baldwin, T. and Stolnik, S. (2004). Phosphorylcholine-polycation diblock copolymers as synthetic vectors for gene delivery. *J. Control. Release* **100**(2): 293-312.
- Lenoir, S., Pagnouille, C., Detrembleur, C., Galleni, M. and Jerome, R. (2006). New antibacterial cationic surfactants prepared by atom transfer radical polymerization. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **44**(3): 1214-1224.
- Matyjaszewski, K. and Xia, J.H. (2001). Atom transfer radical polymerization. *Chem. Rev.* **101**(9): 2921-2990.
- Ogris, M., Brunner, S., Schüller, S., Kircheis, R. and Wagner, E. (1999). PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* **6**(4): 595-605.
- Park, T.G., Jeong, J.H. and Kim, S.W. (2006). Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**(4): 467-486.
- Petersen, H., Fechner, P.M., Martin, A.L., Kunath, K., Stolnik, S., Roberts, C.J., Fischer, D., Davies, M.C. and Kissel, T. (2002). Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: Influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjugate Chem.* **13**(4): 845-854.
- Prádný, M. and Ševčík, S. (1985). Precursors of hydrophilic polymers, 3^a) The potentiometric behaviour of isotactic and atactic poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate) in water/ethanol solutions. *Makromol. Chem.* **186**: 111-121.
- Qian, Z.M., Li, H.Y., Sun, H.Z. and Ho, K. (2002). Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.* **54**(4): 561-587.
- Qiu, J., Matyjaszewski, K., Thouin, L. and Amatore, C. (2000). Cyclic voltammetric studies of copper complexes catalyzing atom transfer radical polymerization. *Macromol. Chem. Phys.* **201**(14): 1625-1631.

- Ranger, M., Jones, M.C., Yessine, M.A. and Leroux, J.C. (2001). From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization method to supramolecular assemblies. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **39**: 3861-3874.
- Rungsardthong, U., Ehtezazi, T., Bailey, L., Armes, S.P., Garnett, M.C. and Stolnik, S. (2003). Effect of polymer ionization on the interaction with DNA in nonviral gene delivery systems. *Biomacromolecules* **4**(3): 683-690.
- Sonawane, N.D., Szoka, F.C. and Verkman, A.S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* **278**(45): 44826-44831.
- Yessine, M.A., Dufresne, M.H., Meier, C., Peterleit, H.U. and Leroux, J.C. (2007). Proton-actuated membrane-destabilizing polyion complex micelles. *Bioconjugate Chem.* **18**(3): 1010-1014.
- Young, S.P., Bomford, A. and Williams, R. (1984). The Effect of the Iron Saturation of Transferrin on Its Binding and Uptake by Rabbit Reticulocytes. *Biochem. J.* **219**(2): 505-510.
- Zhang, X., Xia, J.H. and Matyjaszewski, K. (1998). Controlled/"living" radical polymerization of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate. *Macromolecules* **31**(15): 5167-5169.

Annexe 1 – Ciblage des micelles à la transferrine

1 Procédure Expérimentale

1.1 Produits

Le monomère méthacrylate de 2-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino)éthyle (AEMABoc) et le polymère poly(éthylène glycol)₆₈-*bloc*-poly(méthacrylate d'aminoéthyle)₂₆ (PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₆) ont été synthétisés, purifiés et caractérisés tel que décrit au chapitre 5. La résine Thiopropyl Sepharose 6B a été obtenue chez GE Healthcare Bio-Sciences Inc. (Baie d'Urfé, Qc, Canada). L'agent de couplage sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC) et le kit de dosage des protéines à l'acide bicinchonique (BCA) ont été achetés chez Pierce (via Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Un oligodésoxyribonucléotide (ODN) phosphorothioate inhibant la protéine kinase C- α (5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA) et son analogue marqué à la fluorescéine en position 5' ont été synthétisés par Medicorp Inc. (Montréal, QC, Canada). Les produits utilisés lors des essais cellulaires, incluant les milieux de culture « *Dulbecco's Modified Eagle Medium* » (DMEM) et Opti-MEM[®], ont été commandés chez (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Tous les autres produits ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) et utilisés tels quels, à l'exception (i) du tétrahydrofuranne (THF) qui a été séché sur colonne PureSolv[™] (Innovative Technologies, Newburyport, MA), (ii) du *tert*-butyl mercaptan qui a été successivement séché sur oxyde de calcium, distillé sous argon and entreposé en présence de tamis moléculaire, (iii) de l'oxyde d'éthylène (OE) qui a été passé sur une colonne d'hydroxyde de sodium puis séché sous agitation en présence d'hydrure de calcium pour être finalement cryo-distillé avant usage et (iv) du triéthylamine qui a été distillé en présence d'hydrure de calcium.

1.2 Caractérisation des polymères

Des spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (^1H RMN) ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker opérant à 400 MHz (Bruker, Milton, ON, Canada). Les solutions ont été préparées dans du chloroforme ou de l'eau deutériés. Les masses molaires en nombre (M_n) et en masse (M_m) des polymères ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (CES) sur un système Alliance GPCV 2000 (Waters, Milford, MA) équipé de trois colonnes Waters Styragel (HT2, HT3 and HT5) en série et d'un détecteur d'indice de réfraction. Les analyses ont été conduites à 40°C dans du THF à un débit de 1.0 mL/min. Une courbe de calibration a été obtenue à partir d'échantillons de poly(éthylène glycol) (PEG) de masse molaire connue

1.3 Synthèse de α -*tert*-butanethio- ω -hydroxyl poly(éthylène glycol) (*t*Bu-S-PEG-OH)

Le polymère asymétrique *t*Bu-S-PEG-OH a été synthétisé à partir du *tert*-butyl mercaptan tel que décrit au chapitre 6. Brièvement, du THF anhydre, le *tert*-butyl mercaptan et une solution de naphthalène potassique (solution à 0,3 M dans du THF, 0,5 équivalent vs. le mercaptan) ont été transférés dans un ballon de 100 mL. Les produits ont été agités pendant 10 min pour permettre la formation de thiolates (apparaissant sous forme de précipités blancs), après quoi l'OE sous forme liquide a été ajouté à l'aide d'une canule. Les réactions de polymérisation ont typiquement été conduites durant 48 h à température ambiante et le produit isolé par précipitation sur éther diéthylique. Analyse CES : $M_n = 4200$, indice de polymolécularité (IP) = 1,05. Analyse RMN : 83% d'efficacité d'initiation.

1.4 Synthèse du macroinitiateur pour la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (PRTA)

Le polymère *t*Bu-S-PEG-OH a été converti en macroinitiateur pour la PRTA tel que décrit au chapitre 4 pour le α -methoxy- ω -hydroxyl PEG.

1.5 Synthèse du copolymère thiolé

Le copolymère de type *t*Bu-S-PEG-*b*-PAEMABoc a été synthétisé selon les conditions optimisées au chapitre 5 pour les polymères flanqués d'un groupement méthoxy. La déprotection des groupements *t*Bu et Boc a été réalisée en dissolvant le polymère dans une solution de diméthylsulfoxyde et d'acide trifluoroacétique (TFA) (15/85 *v/v*) à une concentration finale en polymère de 8 mg/mL et en laissant agiter pendant 20 min. Un maximum de TFA a ensuite été éliminé par évaporation sous vide puis la solution a été diluée avec de l'eau avant d'être extraite deux fois avec un demi-volume d'acétate d'éthyle. Le pH de la phase aqueuse (contenant le polymère) a été neutralisé puis la solution a été transférée dans un sac de dialyse (MWCO 6000-8000). La dialyse a été poursuivie pendant 48 h et le produit final séché par lyophilisation. Cette procédure a permis la conversion du groupement *t*Bu en un pont disulfure (entre 2 chaînes de polymère). Les groupements thiol ont ensuite été obtenus en solubilisant le polymère oxydé dans de l'éthanol puis en agitant durant 16 h en présence d'un excès de borohydrure de sodium. La réaction a été arrêtée par l'addition d'une solution éthanolique d'acide hydrochlorique (10% *m/v*). Les solvants ont été évaporés sous vide jusqu'à l'obtention d'une solution de polymère concentrée qui a immédiatement été appliquée sur la résine Thiopropyl Sepharose 6B, une résine sélective pour les produits thiolés, selon le protocole du fabricant. Le polymère a finalement été élué en présence de dithio-1,4-thréitol (DTT) puis purifié par passage sur résine Sephadex G25 conditionnée dans de l'eau. Les aliquotes contenant le polymère thiolé ont été identifiées à l'aide du réactif d'Ellman, combinées et lyophilisées. Analyse CES : $M_n = 6200$, IP = 1,14; analyse RMN : $M_n = 7900$, degré de polymérisation = 22.

1.6 Synthèse de transferrine-maléimide

À 10 mg de transferrine (Tf; diférique) dissous dans 0,9 mL d'un tampon phosphate (100 mM phosphate de sodium, 150 mM NaCl, pH 7,5) a été ajouté 0,1 mL d'une solution de sulfo-SMCC à 2,7 mg/mL (soit un excès molaire de 5× comparativement à la Tf). La réaction a été conduite 1 h sous agitation puis le sulfo-SMCC non réagi a été éliminé par passage sur résine Sephadex G25 (conditionnée dans le même tampon phosphate). La Tf-maléimide ainsi obtenue était conservée à 4°C et typiquement utilisée dans les 3 h suivant sa synthèse.

1.7 Synthèse du conjugué Tf-PEG-*b*-PAEMA

Le polymère thiolé obtenu ci-dessus étant sensible à l'oxydation, il a été fraîchement réduit avant son couplage à la Tf-maléimide. Pour ce faire, le polymère a été solubilisé à une concentration de 2,41 mg/mL dans du tampon phosphate contenant du DTT (25 mM). La solution a été purgée sous argon puis la réaction de réduction a été conduite pendant 4 h. Le polymère thiolé a été purifié sur résine Sephadex G25 (conditionnée dans du tampon phosphate dégazé) en prenant soin d'appliquer un flot d'argon continu au-dessus de la colonne et dans les fioles servant à récolter l'éluant. Les fractions contenant le polymère ont ensuite été ajoutées à la Tf-maléimide sans délai à un ratio molaire Tf/polymère de 1,2 et la réaction de couplage réalisée sous argon pendant 18 h. Des tests préliminaires avaient permis d'établir le profil d'élution du polymère et de déterminer le rendement de la colonne (87%). Le milieu réactionnel a ensuite été acidifié à un pH de 6,5 par l'ajout de quelques microlitres d'hydrochlorure de sodium 1 N puis appliqué sur une résine échangeuse de cations (Hi-Trap SP HP, 1 mL). La colonne a été rincée avec une solution d'acide 4-morpholine-éthanesulfonique (MES) 20 mM, NaCl 1 M (pH 6,5) à un débit de 1 mL/min afin d'éliminer la Tf libre (ou non réagie). Le polymère, toujours retenu, a été élué en traitant la colonne avec une solution de MES 20 mM, NaCl 3M à pH 6,5 (à un

débit de 1 mL/min). Le tampon de la solution de polymère a ensuite été échangé pour du Tris 10 mM à pH 7,4 par passage sur résine Sephadex G25. Les aliquotes contenant le conjugué polymère-Tf ont été identifiées à l'aide du BCA puis combinées. La concentration finale en conjugué polymère-Tf a été établie par la méthode BCA en utilisant, cette fois, une courbe de calibration établie à partir de solutions d'albumine bovine sérique de concentrations connues (un facteur de correction de 0,883 a été appliqué pour convertir les concentrations de l'albumine à la Tf). Les échantillons ont finalement été traités avec un équivalent de citrate de fer (soit 2 ions de fer par molécule de Tf) en présence de carbonate de sodium, divisés en aliquotes, rapidement congelés à -50°C puis conservés à -20°C. L'efficacité de couplage était de 73%.

1.8 Préparation des micelles (ciblées ou non)

Les micelles ont été préparées à un ratio N/P de 1,5 dans du tampon Tris 10 mM pH 7,4 en combinant, dans l'ordre, le tampon, une solution d'ODN à 0,1 mg/mL (dont 40% des chaînes étaient marquées à la fluorescéine), le conjugué polymère-Tf (10% des chaînes de polymère totales) puis le polymère PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₆, le tout dans un volume final de 275 µL. Les micelles contrôles non ciblées ont été préparées à l'identique en omettant toutefois le conjugué le polymère-Tf. Les micelles ont été conservées sous agitation pendant 45 min à température ambiante après quoi la tonicité de la solution a été ajustée en ajoutant un volume équivalent de tampon Tris 10 mM et NaCl 300 mM à pH 7,4. Les micelles ont finalement été diluées avec du milieu Opti-MEM[®] (soit 550 µL) avant d'être ajoutées aux cellules. La concentration finale d'ODN était de 400 nM.

1.9 Capture cellulaire des micelles

Des cellules A549 (soit 4×10^5 cellules viables dans 1 mL de milieu DMEM) ont été déposées dans des plaques à 6 puits puis incubées 3 h à 37 °C sous atmosphère humide afin de leur permettre de bien adhérer. Les cellules ont ensuite été traitées avec du mésylate

de desferrioxamine (concentration finale de 50 mM) puis incubées pendant 24 h additionnelles. Le lendemain, les cellules ont été lavées 3 fois avec 1 mL d'Opti-MEM[®] puis ont été incubées sous agitation avec 1 mL de micelles (ciblées ou non) à 37°C. Après 2 h, les cellules ont été lavées à 2 reprises avec 1 mL de tampon phosphate salin (66 mM, NaCl 75 mM, pH 7,4) (TPS) froid, fixées avec une solution fraîchement préparée de formaldéhyde (1% dans du TPS), lavées une dernière fois avec 1 mL de TPS puis resuspendues dans 0,5 mL de TPS. La capture cellulaire a été estimée en déterminant l'intensité de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 530/30 \text{ nm}$) de 10000 cellules à l'aide d'un cytomètre en flux de type FacsCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Les données présentées sont représentatives de 3 expériences.