

Université de Montréal

**De l'utilisation des copolymères d'acide méthacrylique
dans le transport intracellulaire des oligonucléotides
antisens**

par

Marie-Andrée Yessine

Faculté de Pharmacie

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

Octobre 2006

© Marie-Andrée Yessine, 2006



QV

'105

U58

2006

v.021

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

De l'utilisation des copolymères d'acide méthacrylique dans le transport intracellulaire des
oligonucléotides antisens

présentée par :
Marie-Andrée Yessine

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Prof. Albert Adam, président-rapporteur
Prof. Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche
Prof. Marc Servant, membre du jury
Prof. Elias Fattal, examinateur externe

Résumé

Suite à une administration locale ou systémique, les oligonucléotides antisens (ODNs) sont rapidement dégradés par les nucléases, faiblement capturés par les cellules cibles et incapables d'atteindre leur site d'action (*i.e.* le cytoplasme ou le noyau) en quantité suffisante. Afin de pallier à ces problèmes, une variété de vecteurs synthétiques ont été développés. Cependant, qu'ils soient administrés seuls ou à l'aide de vecteurs, les ODNs pénètrent dans les cellules par endocytose. Par conséquent, le vecteur employé doit assurer leur passage dans le cytoplasme afin d'éviter que les ODNs ne se retrouvent séquestrés dans les endosomes/lysosomes où ils sont généralement dégradés. Étant donné que le pH des endosomes est légèrement acide (5,0-6,5), des copolymères d'acide méthacrylique (MAA) sensibles au pH ont été proposés pour améliorer la biodisponibilité intracellulaire des ODNs. En effet, suite à une diminution du pH du milieu, ces polymères subissent un changement de conformation leur permettant de déstabiliser les membranes lipidiques. Dans un premier temps, les travaux réalisés dans la présente thèse ont démontré que pour déstabiliser efficacement les membranes à pH acide, les polymères doivent présenter une transition de phase abrupte et être suffisamment hydrophobes. Dans un deuxième temps, un copolymère de MAA et un ODN modèle ont été incorporés avec succès dans deux types de vecteurs : un système nanoparticulaire et un système micellaire. Les nanoparticules ont une charge résiduelle positive et sont donc capturées efficacement par des cellules en culture. Ce système a permis de confirmer que les copolymères de MAA augmentent l'activité antisens de l'ODN en facilitant son transfert de l'endosome au cytoplasme des cellules. Les micelles, quant à elles, sont neutres, solubles en milieu aqueux et stables dans des conditions physiologiques. Par conséquent, elles présentent des caractéristiques physico-chimiques plus adaptées à une administration systémique. Dans l'ensemble, les résultats obtenus montrent que les copolymères de MAA sont des molécules très versatiles premièrement parce que leurs propriétés peuvent être facilement modulées en modifiant leur composition chimique et, deuxièmement, parce qu'ils peuvent être aisément intégrés dans différents systèmes

d'administration des médicaments. De plus, étant donné leur changement conformationnel à pH acide, ces polymères potentialisent l'activité biologique des ODNs *in vitro* et s'avèrent extrêmement prometteurs pour la vectorisation de matériel génétique *in vivo*.

Mots-clés : copolymères d'acide méthacrylique, polymères endosomolytiques, oligonucléotides antisens, sensibilité au pH, systèmes d'administration des médicaments, transport intracellulaire, nanoparticules, micelles

Abstract

The biological activity of antisense oligonucleotides (ODNs) is often compromised by their rapid degradation by nucleases, poor cellular uptake and inability to reach their intracellular site of action (*i.e.* cytoplasm or nucleus) in sufficient amount. To circumvent these problems, a variety of synthetic vehicles have been investigated. However, regardless of whether the ODN is formulated or free, it will enter cells *via* the endocytosis pathway. Thus, it is essential for the vector to promote the cytoplasmic release of the ODNs from the endosomal/lysosomal compartments where they are generally degraded. Given that endosomes exhibit a slightly acidic pH (5.0-6.5), pH-sensitive methacrylic acid (MAA) copolymers can be used to achieve such a goal. Indeed, MAA copolymers can destabilize membrane bilayers following a pH-triggered conformational change. The work realized in this thesis showed that for efficient membrane destabilization at acidic pH, the polymers must present an abrupt phase transition while being sufficiently hydrophobic. An MAA copolymer and a model ODN were successfully incorporated within two different types of vehicles: a nanoparticulate and a micellar system. The nanoparticles bear a positive surface charge and, consequently, are efficiently internalized into cultured cells. The *in vitro* experiments confirmed that the MAA copolymers increase the biological activity of the ODN by facilitating its transfer from the endosomes to the cytoplasm of the cells. On the other hand, micelles are neutral, soluble in aqueous media and stable in physiological conditions. Therefore, they present better physico-chemical properties for clinical applications. Taken together, the results obtained show that the properties of the MAA copolymers can be easily modulated by modifying their chemical composition. Their versatility is also demonstrated by the fact that they can be readily integrated within different drug delivery systems. Finally, given their pH-dependent conformational change, the polymers potentiate the biological activity of ODNs *in vitro* and are very promising for the transport and delivery of genetic material *in vivo*.

Keywords : methacrylic acid copolymers, endosomolytic polymers, antisense oligonucleotides, pH-sensitivity, drug delivery systems, intracellular delivery, nanoparticles, micelles

Table des matières

Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures	xiv
Liste des sigles et des abréviations	xxiv
Remerciements.....	xxix
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
Partie 1: Les oligonucléotides antisens et les vecteurs synthétiques développés pour leur administration	1
1. Les ribozymes	3
2. Les petits ARN interférants	4
3. Les oligonucléotides antisens.....	7
3.1 Mécanismes d'action des ODNs.....	7
3.2 Sélection de la séquence optimale.....	9
3.3 Composition des ODNs	9
3.3.1 Les modifications de première génération.....	10
3.3.2 Les modifications de deuxième génération	12
3.3.3 Les modifications de troisième génération	14
3.3.3.1 Les acides nucléiques peptidiques	14
3.3.3.2 Les acides nucléiques verrouillés	15
3.3.3.3 Les ODNs morpholino	16
4. Les défis inhérents à l'administration des ODNs.....	17
5. La vectorisation des ODNs	18
5.1 Les vecteurs viraux.....	19
5.2 Les vecteurs synthétiques.....	21
5.2.1 Les vecteurs à base de lipides	21
5.2.1.1 Encapsulation dans des liposomes conventionnels.....	22

5.2.1.2	Encapsulation dans des liposomes sensibles au pH	23
5.2.1.3	Encapsulation dans des virosomes.....	26
5.2.1.4	Complexation à des lipides ou liposomes cationiques	27
5.2.2	Les vecteurs à base de polymères.....	33
5.2.2.1	Conjugaison/complexation à des polymères cationiques.....	33
5.2.2.1.1	La poly(L-lysine).....	33
5.2.2.1.2	Le poly(éthylèneimine).....	36
5.2.2.1.3	Les poly(méthacrylates).....	38
5.2.2.1.4	Les dendrimères de poly(amidoamine).....	39
5.2.2.2	Les conjugués macromoléculaires	40
5.2.2.3	Les nanoparticules	42
5.2.2.4	Les microsphères	44
5.2.3	Les vecteurs à base de peptides	46
5.2.3.1	La protamine	47
5.2.3.2	Les peptides fusogènes pH-sensibles.....	47
5.2.3.3	Les peptides de translocation.....	48
6.	Conclusion.....	51
	Références.....	53

Partie 2: Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and

	endosomal escape of biomacromolecules	88
	Abstract.....	89
1.	Introduction	90
2.	pH-dependent conformational behaviour of anionic polyelectrolytes.....	91
2.1	Carboxylated homopolymers.....	91
2.1.1	Effect of ionization on polymer conformation	91
2.1.2	Short-range versus long-range interactions	96
2.1.3	Controversial issues.....	98
2.2	Carboxylated copolymers.....	100

2.2.1	Acrylic and methacrylic acid copolymers.....	100
2.2.2	Maleic acid copolymers.....	101
2.2.3	N-isopropylacrylamide (NIPAM) copolymers.....	102
3.	Interaction of anionic polyelectrolytes with membrane bilayers.....	103
3.1	Polymer-lipid interaction at neutral pH.....	104
3.2	pH-dependent polymer-lipid complexation.....	107
3.2.1	Poly(alkylacrylic acid) derivatives.....	107
3.2.2	NIPAM copolymers.....	110
3.2.3	Succinylated poly(glycidol)s (SucPG).....	110
3.2.4	Poly(β -malic acid).....	111
4.	Drug delivery applications: enhanced endosomal escape of biomolecules.....	112
4.1	Formation of complexes/conjugates.....	113
4.2	pH-sensitive liposomes.....	115
5.	Concluding remarks.....	117
	Acknowledgements.....	118
	References.....	118
	 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	 135
	 CHAPITRE 2: Characterization of the membrane-destabilizing properties of different pH-sensitive methacrylic acid copolymers.....	 138
	Abstract.....	139
1.	Introduction.....	140
2.	Materials and methods.....	142
2.1	Materials.....	142
2.2	Purification and molecular weight determination.....	142
2.3	Evaluation of the precipitation pH of methacrylic acid copolymers.....	143
2.4	Study of the pH-dependent conformational transition of copolymers by pyrene fluorescence.....	143

2.5	Hemolysis assays	143
2.6	Assessment of copolymer-lipid interaction using liposomes as membrane models.....	144
2.7	Measurement of liposome size by dynamic light scattering (DLS).....	145
2.8	Labeling of copolymer B with fluoresceinamine and study of adsorption.....	145
2.9	Evaluation of the cellular toxicity of copolymers by MTT assay.....	146
2.10	Evaluation of the cellular toxicity of copolymers by LDH assay.....	147
3.	Results	147
3.1	MW determination.....	147
3.2	Evaluation of the pH-dependent conformational transition of MAA copolymers	148
3.3	Evaluation of the membrane-destabilizing properties of copolymers at neutral and acidic pH.....	151
3.4	Adsorption study to RBC	154
3.5	Cytotoxicity assays	155
4.	Discussion	157
4.1	Molecular weight determination	157
4.2	Evaluation of copolymer-lipid interaction at neutral pH.....	158
4.3	Evaluation of copolymer-lipid interaction upon decrease in pH.....	160
	Acknowledgements	163
	References.....	163

CHAPITRE 3: On the role of methacrylic acid copolymers in the intracellular delivery of antisense oligonucleotides

	delivery of antisense oligonucleotides	169
	Abstract.....	170
1.	Introduction	171
2.	Materials and methods.....	172
2.1	Purification and characterization of the copolymers	172
2.2	Cell culture	173

2.3	Hemolysis assays	174
2.4	Preparation of cationic liposomes and cationic lipid/ODN complexes.....	174
2.5	Gel electrophoresis	175
2.6	Assessment of ODN antisense activity.....	175
2.7	Evaluation of the cellular toxicity of complexes by MTT assay.....	176
2.8	Effect of metabolic inhibitors on ODN delivery	176
2.9	Labeling of copolymer with rhodamine.....	177
2.10	Flow cytometry	177
2.11	Intracellular distribution of ODN and copolymer.....	177
2.12	Statistical analysis.....	178
3.	Results	178
3.1	Characterization of the different MAA copolymers	178
3.2	Inhibition of PKC- α expression and cytotoxicity experiments	180
3.3	Interaction of ternary complexes with cancer cells	183
4.	Discussion	188
	Acknowledgements	192
	References.....	193
	 CHAPITRE 4: Proton-actuated membrane-destabilizing polyion complex micelles	198
	Abstract.....	199
1.	Introduction	200
2.	Experimental procedures	201
2.1	Materials.....	201
2.2	Preparation of the ternary polyion complex micelles (PICM).....	202
2.3	Determination of the critical association concentration	202
2.4	Dynamic light scattering, multiangle static light scattering and zeta potential measurements.....	202
2.5	Transmission electron microscopy imaging.....	203
2.6	Nuclear magnetic resonance analysis	204

2.7	Enzymatic degradation of ODN incorporated into the ternary PICM	204
2.8	Assessment of membrane-destabilizing properties of micelles using liposomes as an endosomal membrane model	205
2.9	Intracellular distribution of the ODN.....	205
3.	Results and discussion	206
	Acknowledgements	212
	References.....	212
	Supporting information.....	215
	 CHAPITRE 5 : DISCUSSION.....	 219
	Références.....	230
	 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	 233
	Références.....	234

Liste des tableaux

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Partie 1 : Les oligonucléotides antisens et les vecteurs synthétiques développés pour leur administration.

Tableau 1.	Principaux ligands utilisés pour cibler les ODNs <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	20
Tableau 2.	Exemples de formulations de liposomes cationiques disponibles commercialement et utilisées pour véhiculer des ODNs	29

Partie 2 : Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and endosomal escape of biomacromolecules

Table 1.	Forces attributed to stabilization of the compact state of PMAA	99
----------	---	----

CHAPITRE 2: Characterization of the membrane-destabilizing properties of different pH-sensitive methacrylic acid copolymers

Table 1.	Molecular weight and precipitation pH of the different copolymers tested.....	148
----------	---	-----

CHAPITRE 3: On the role of methacrylic acid copolymers in the intracellular delivery of antisense oligonucleotides

Table 1.	Chemical composition and molecular weight of the different copolymers tested.....	173
Table 2.	Size and zeta potential of the lipid particles	180

CHAPITRE 4: Proton-actuated membrane-destabilizing polyion complex micelles

Table 1.	Characteristics of the ternary PICM.....	207
----------	--	-----

CHAPITRE 5: DISCUSSION

Tableau 1.	Masse molaire et pH de précipitation des différents copolymères étudiés	221
Tableau 2.	Taille et potentiel zêta des nanoparticules et des micelles ternaires à pH 7,4.	224

Liste des figures

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Partie 1 : Les oligonucléotides antisens et les vecteurs synthétiques développés pour leur administration.

- Figure 1. Comparaison des différentes stratégies permettant de réguler à la baisse l'expression d'un gène. Les oligonucléotides antisens, les ribozymes et les petits ARNs interférants se lient à l'ARNm par appariement Watson-Crick ce qui résulte ultimement en l'inhibition de la synthèse d'une protéine spécifique. Schéma adapté de Kurreck (2003) avec la permission de Blackwell Publishing. 3
- Figure 2. Mécanisme de l'iARN..... 5
- Figure 3. Principales modifications chimiques apportées aux ODNs. A) Phosphodiester, B) Méthylphosphonate, C) Phosphorothioate, D) 2'-fluoro, E) 2'-O-méthyle, F) 2'-O-méthoxyéthyle, G) Acides nucléiques peptidiques, H) Acides nucléiques verrouillés, I) Morpholino..... 11
- Figure 4. Principaux lipides cationiques employés pour la vectorisation d'ODNs. DODAB : bromure de diméthyl dioctadécylammonium ; DOTMA : *N*-[1-(2, 3-dioléoxy)propyle]-*N,N,N*-triméthylammonium; DOTAP : 1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium propane; DMRIE : bromure de 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthylhydroxyéthylammonium; DOSPA : dioléoyl-oxypropyldiméthylammonium amidospermine; DOGS : dioctadécylamidoglycylspermine..... 28
- Figure 5. Principaux polymères cationiques utilisés pour la vectorisation d'ODNs. A) Poly(L-lysine), B) Poly(éthylénimine), C) Poly(méthacrylate de 2-diméthylaminoéthyle), D) Dendrimère de poly(amidoamine)..... 34

Partie 2: Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and endosomal escape of biomacromolecules

- Figure 1. Chemical structures of (A) PAA, (B) PMAA, (C) PEAA, (D) PPAA, (E) PBAA, (F) MAA-alkyl(meth)acrylate copolymers, (G) alternating maleic acid/alkyl vinyl ether copolymers, (H) alternating maleic acid/styrene copolymer, (I) P(NIPAM-*co*-MAA-*co*-ODA), (J) PNIPAM-Py-Gly, (K) hydrophobically modified succinylated poly(glycidol), and (L) poly(β -malic acid). 93
- Figure 2. Schematic representation of the reversible conformational change underwent by anionic, carboxylated polymers such as PMAA upon variations in pH of surrounding environment. 94
- Figure 3. Plot of pK_a (circles) and η_{red} (triangles) versus α : $c_p = 6.88 \times 10^{-4}$ g/mL (full symbols), $c_p = 9.03 \times 10^{-3}$ g/mL (open symbols). Adapted from Heitz et al. (1999) with permission from Elsevier Science. 95
- Figure 4. Comparison of experimental and calculated $P(\theta)$ values for various PAA conformations at $\alpha = 0.6$ and salt concentration of 0.025 N. The solid lines represent $P(\theta)$ values calculated for Gaussian chains (G), wormlike chains (W) and for non-Gaussian chains with the excluded volume effect (E). Adapted from Kitano et al. (1980) with permission from the American Chemical Society. 98
- Figure 5. Precipitation pH of MAA/alkyl(meth)acrylate copolymers MMA₅₀-*co*-MAA₅₀ (squares), EA₅₀-*co*-MAA₅₀ (diamonds), MA₃₅-*co*-EA₃₅-*co*-MAA₃₀ (triangles), MMA₇₀-*co*-MAA₃₀ (circles), and MA₄₅-*co*-MMA₄₅-*co*-MAA₁₀ (stars) as measured by turbidimetry at 37°C in phosphate buffer. Polymers' precipitation pH was measured as an increase in light scattering intensity at 480 nm. MMA=methyl methacrylate, EA=ethyl acrylate, MA=methyl acrylate, MAA=methacrylic acid. Reprinted from Yessine et al. (2003) with permission from Elsevier Science..... 101

- Figure 6. Variations in the ratio of the first (372 nm) and third (383 nm) peaks of pyrene emission spectrum (I_1/I_3 ratio) (open symbols) and fluorescence lifetime (full symbols) with neutralization degree α for PMAA (squares), alternating copolymer of maleic acid and styrene (circles) and alternating copolymers of maleic acid and butyl (triangles) or decyl (reversed triangles) vinyl ether at 25°C. Concentrations: 0.05 M for PMAA and maleic acid/alkyl vinyl ether copolymers; 0.025 M for maleic acid/styrene copolymer. Reprinted from Binana-Limbele and Zana (1987) with permission from the American Chemical Society..... 103
- Figure 7. (A) Chemical structure of POPC. The position of the deuterons in POPC- α - d_2 and POPC- β - d_2 are indicated in the figure. (B) ^2H NMR spectra of mixed DODAP + POPC- β - d_2 (20/80) cationic lipid bilayers as a function of added PSS in amounts corresponding to, from left to right, 0, 0.75, 1.0 and 2.0 equivalents of PSS anionic charge to DODAP cationic charge. Arrows indicate the emergence of the polyelectrolyte-bound population with a quadrupolar splitting greater than the control. A schematic picture of anionic polyelectrolyte bound to the outer leaflet of a mixed cationic + zwitterionic lipid bilayer at different anion/cation charge ratios is shown at the bottom of each spectrum. Adapted from Mitrakos and Macdonald (1997) with permission from the American Chemical Society..... 106
- Figure 8. Optical densities (relative to optical densities at pH 7.0) of 1:1.5 (w/w) DPPC/EAA-MAA copolymer mixtures in 50 mM phosphate buffer. Empty circles, triangles, full circles, empty squares and full squares refer to 100, 73, 58, 49, and 0 mol% EAA, respectively. Reprinted from Thomas et al. (1995) with permission from the American Chemical Society..... 109
- Figure 9. Intracellular trafficking pathway followed by polymer/biomolecule conjugates internalized through receptor-mediated endocytosis. pH-

sensitive anionic polymers are potentially useful membrane-destabilizing agent, since they can promote endosomal escape of internalized biomolecules into the cytoplasm before they reach the lysosomes, where degradation occurs. Once in the endosome where pH is slightly acidic, the polymer undergoes a coil-to-globule transition resulting in membrane destabilization and cytoplasmic release of the complex/conjugate. In the figure, X represents a therapeutic biomacromolecule such as a drug, peptide, DNA, or antisense oligonucleotide, conjugated to the polymer. 112

CHAPITRE 2: Characterization of the membrane-destabilizing properties of different pH-sensitive methacrylic acid copolymers

- Figure 1. Chemical structure of the MAA copolymers tested..... 148
- Figure 2. Precipitation pH of MAA copolymers A (squares), B (diamonds), C (triangles), D (circles), and E (stars) at 37°C. The copolymers were dissolved in PBS, pH 7.4. Polymer solutions were progressively acidified to pH 3.2 and aliquots were withdrawn at different pH values. Polymers precipitation pH was measured as an increase in light scattering intensity at 480 nm..... 149
- Figure 3. (A) Pyrene emission spectra in the presence of copolymer B at 37°C and pH 7.4 (lower curve) and 4.8 (upper curve) (B) Variation, with pH, of the I_1/I_3 ratio of pyrene codissolved at 37°C with the different MAA copolymers tested (data points have been removed for clarity)..... 150
- Figure 4. RBC hemolysis at physiological pH induced by MAA copolymers A (squares), B (diamonds), C (triangles), D (circles), and E (stars) at 37°C and physiological pH, as determined after a 30-min incubation by the absorbance of released hemoglobin at 541 nm. RBC suspended in

- PBS, pH 7.4, were added to copolymers dissolved in the same buffer at varying concentrations (10-10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Mean \pm SD (n=3). 151
- Figure 5. pH-dependent RBC hemolysis induced by the copolymers tested at 37°C after a 30-min incubation. (A) RBC suspended in isotonic phosphate or MES buffers of the appropriate pH were added to copolymers A (squares), B (diamonds), C (triangles), D (circles), and E (stars) dissolved in mildly alkaline saline at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final concentration). Mean \pm SD (n=3). (B) RBC hemolysis caused by copolymers B (diamonds) and C (triangles) at pH 5.0 (open) or 5.5 (closed) at various concentrations (5-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Mean \pm SD (n=3). 152
- Figure 6. Release of HPTS encapsulated in A) EPC or B) EPC:Chol:DOPE:DMPG (61:17:16:6 molar ratio) liposomes at 37°C. The vesicles were incubated for 20 min without (cross) or with copolymers A (squares), B (diamonds), C (triangles), D (circles), E (stars) at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. HPTS release from liposomes was measured by an increase in HPTS fluorescence ($\lambda_{\text{ex}}=413 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=512 \text{ nm}$). One hundred percent content release was obtained by adding Triton X-100 to the liposomes, and the data are expressed as a percentage of total HPTS release. Mean \pm SD (n=3). 153
- Figure 7. Adsorption of labeled copolymer B to RBC. The labeled copolymer was incubated with RBC for 30 min at 37°C at 75 (open bars) and 150 (closed bars) $\mu\text{g}/\text{mL}$. Samples were centrifuged at 50 g, and fluorescence of the supernatant was measured ($\lambda_{\text{ex}}=485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=530 \text{ nm}$). Measurements are expressed relative to 0% adsorption obtained by incubating the labeled copolymer with the appropriate buffer devoid of RBC. Mean \pm SD (n=4). 155
- Figure 8. Copolymer cytotoxicity on J774 cells as a function of concentration as determined by (A) MTT and (B) LDH colorimetric assays at (from left

to right) 3.125 (white), 12.5 (striped), 62.5 (black), 250 (squared) and 500 (dotted) $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mean \pm SEM (n=4)..... 156

- Figure 9. J774 cell survival, as determined by MTT assay, as a function of copolymer E concentration. The cells were incubated with (closed bars) and without (open bars) 6 μM cytochalasin B. Mean \pm SEM (n=4). 157

CHAPITRE 3: On the role of methacrylic acid copolymers in the intracellular delivery of antisense oligonucleotides

- Figure 1. pH-dependent red blood cell hemolysis induced by MAA copolymers. The copolymers were incubated with human erythrocytes for 30 min at 37°C. The samples were centrifuged, and the extent of hemolysis was measured by reading the absorbance of the supernatant at 541 nm. (A) Red blood cells suspended in isotonic phosphate or MES buffers of the appropriate pH were added to copolymers 1 (squares), 2 (triangles), 3 (diamonds), or 4 (circles) dissolved in mildly alkaline saline at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final concentration). (B) Red blood cell hemolysis caused by the copolymers at pH 5.5 at various concentrations (0.1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Symbols are the same as in (a). Values are mean \pm S.D., n=3. No hemolysis was observed in the absence of copolymer. 180
- Figure 2. Effect of charge ratio on the expression of PKC- α (closed squares) and cytotoxicity (open squares). A549 cells in serum-free medium were treated with 500 nM PDBu for 18 h and washed to remove it. Then, the cells were incubated for 4 h with either DOTAP/ODN/copolymer 4 (A) or DOTAP/DOPE/ODN (B) complexes. The ODN and copolymer concentrations were 200 nM and 40.8 μM , respectively. The [+/-] ratio was adjusted by varying the amount of cationic lipids. After the washing step, the cells were allowed to recover for an additional 20 h. Proteins were extracted, and immunoreactive PKC- α was determined

by immunoblotting. Protein level is expressed as PKC- α % control (buffer treatment). Cell survival was determined using colorimetric MTT assay. Data are expressed relative to 100% cell survival (buffer treatment). Values are mean \pm S.D., n=3-6 experiments..... 182

- Figure 3. Effect of copolymer concentration on PKC- α expression. (A) A549 cells in serum-free medium were treated with 500 nM PDBu for 18 h and washed to remove it. Then, the cells were incubated for 4 h with either ternary complexes prepared with antisense ODN (I), ternary complexes prepared with scrambled ODN (II) or complexes without copolymer (III). In all complexes, the ODN concentration was 200 nM. The [+/-] ratio was adjusted to 4/1 (open bars), 3/1 (grey bars) or 2/1 (solid bars) by varying the concentration of copolymer 4 in the ternary complexes, and the amount of cationic lipids in the DOTAP/ODN complexes. After the washing step, the cells were allowed to recover for an additional 20 h. Proteins were extracted, and immunoreactive PKC- α was determined by immunoblotting. Protein level is expressed as PKC- α % control (buffer treatment). Values are mean \pm S.D., n=3-4 experiments. * p < 0.05. (B) Representative blot of cells treated with different complexes at a 4/1 charge ratio. *Top band*, immunoreactive PKC- α isozyme. *Bottom band*, immunoreactive GAPDH, demonstrating equal loading in each lane. Cells were incubated with: lane 1, ternary complexes prepared with the antisense ODN; lane 2, ternary complexes prepared with the scrambled ODN; lane 3, complexes without copolymer prepared with the antisense ODN; lane 4, H/D buffer..... 183

- Figure 4. Cellular uptake of lipoplexes. A549 cells were incubated with DOTAP/ODN complexes \pm copolymer 4 using a fluorescein-labeled ODN and rhodamine-labeled copolymer. After a 4-h incubation period, the cells were rinsed and resuspended in PBS. The mean fluorescence intensity of 10 000 cells was measured by flow cytometry (see

“Materials and Methods”). Values are mean \pm S.D. (n=3 experiments). (A) Green fluorescence intensity of cells incubated with DOTAP/ODN complexes or ternary complexes. The ternary complexes were composed of DOTAP (80 μ M), antisense ODN (200 nM), and copolymer 4 at 40.8 μ M, 4/1 [+/-] (open bars), 57.0 μ M, 3/1 [+/-] (grey bars) or 90.5 μ M, 2/1 [+/-] (solid bars). For DOTAP/ODN complexes, the DOTAP concentration was kept constant (80 μ M), and the charge ratio was adjusted by varying ODN concentration. Zeta potentials (\pm S.D.) measured in cell culture medium are indicated for each formulation. * $p < 0.05$. Green (B) and red (C) fluorescence of cells incubated with free ODN (dotted line), 4/1 (thick line), 3/1 (dashed-dotted line) or 2/1 (thin line) ternary complexes. Dashed lines represent unstained control cells. The results shown in (B) and (C) are representative of several independent experiments..... 184

Figure 5. Effect of metabolic inhibitors on PKC- α expression. (A) A549 cells in serum-free medium were treated with 500 nM PDBu for 18 h and washed to remove it. Before complex addition, the cells were preincubated for 15 min with cytochalasin B (25 μ g/mL), or for 30 min with bafilomycin A (200 or 500 nM). Ternary complexes prepared with DOTAP (80 μ M), antisense ODN (200 nM) and copolymer 4 at 40.8 μ M, 4/1 [+/-] (open bars) or 90.5 μ M, 2/1 [+/-] (solid bars) were then added. The inhibitors were present during the 4-h incubation period. After the washing step, the cells were allowed to recover for an additional 20 h. Proteins were extracted, and immunoreactive PKC- α was determined by immunoblotting. Protein level is expressed as PKC- α % control (buffer treatment). Values are mean \pm S.D. (n=3). $p < 0.05$ relative to cells incubated in the absence of inhibitor with 4/1 (*) or 2/1 (***) complexes, respectively. (B) Representative blots of cells

treated with ternary complexes at a 4/1 or 2/1 [+/-] ratio in the presence or absence of metabolic inhibitors. *Top band*, immunoreactive PKC- α isozyme. *Bottom band*, immunoreactive GAPDH, demonstrating equal loading in each lane. Lane 1, no inhibitor; lane 2, cytochalasin B 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; lane 3, bafilomycin A 200 nM; lane 4, bafilomycin A 500 nM; lane 5, H/D buffer..... 186

- Figure 6. Intracellular distribution of the ODN and copolymer. A549 cells grown on coverslips were incubated with free ODN for 3 h (a), DOTAP/ODN complexes for 3 h (7.6 $\mu\text{M}/200$ nM, 2/1 [+/-]) (b), or DOTAP/ODN/copolymer 4 complexes (80 $\mu\text{M}/200$ nM/90.5 μM , 2/1 [+/-]) for 0.5 h (c) or 3 h (d). Complexes were prepared using a fluorescein-labeled ODN and rhodamine-labeled copolymer. After the incubation period, the cells were rinsed with PBS and fixed in a 3% (*w/v*) paraformaldehyde solution. Coverslips were mounted on slides and examined by LSCM (see “Materials and Methods”). 187

CHAPITRE 4: Proton-actuated membrane-destabilizing polyion complex micelles

- Figure 1. TEM analysis of ternary PICM at pH 7.4 (A) and 5.0 (B)..... 207
- Figure 2. $^1\text{H-NMR}$ spectra of the polymers alone and ternary PICM in deuterated Tris buffer. Pyridine was used as an internal standard. 208
- Figure 3. Stability towards nuclease degradation of naked ODN (\diamond) and ODN incorporated into ternary PICM (\square) over a 6-h period. 208
- Figure 4. HPTS release induced by the ternary micelles at 37°C and pH 7.4 (\diamond), 6.2 (\square), 5.5 (Δ) and 5.0 (\circ). Star symbols represent the release induced by free P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) at pH 5.0 at equivalent concentration. Release induced by ternary micelles prepared with PMAA, pH 5.0, is represented by (+). Mean \pm S.D. (n=3)..... 209
- Figure 5. U937 macrophages on coverslips were incubated with ternary micelles prepared with P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) (A, C) or the non endosomolytic

polymer PMAA (B, D) for 4 h at 37°C. Micelles were prepared using a fluorescein-labeled ODN and acidic organelles were stained with LysoTracker red. After a 4-h incubation period at 37°C, the cells were rinsed with cold PBS, mounted on slides, and kept on ice. Live cells were examined by LSCM 45 min (A, B) and 2 h (C, D) following the incubation period.	210
Figure 6. Schematic representation of the association/dissociation behavior of the ternary PICM as a function of pH.	211
Figure S1. pH of a solution of PEO- <i>b</i> -PAEMA (A) and p(MAA- <i>co</i> -EA- <i>co</i> -BMA) (B) as a function of α	216
Figure S2. Gel electrophoresis of ternary PICM containing the fluorescent ODN. Lane 1: ternary PICM without heparin; lane 2: ternary PICM in the presence of excess heparin; lane 3: naked ODN.	217
Figure S3. ¹ H-NMR analysis of PEO- <i>b</i> -PAEMA (A) and P(MAA- <i>co</i> -EA- <i>co</i> -BMA) (B) in deuterated Tris buffer, pH 7.4.	218
CHAPITRE 5: DISCUSSION	
Figure 1. Formation des micelles polyioniques	226
Figure 2. Représentation schématique d'un polymère encrytpé. Adapté de Murthy <i>et al.</i> (2003) avec la permission d'Elsevier Science.	227
Figure 3. Modèles proposés afin d'illustrer la formation de pores dans les membranes de phospholipides par le PEAA (voir texte pour explications). Reproduit de Chung <i>et al.</i> (1996) avec la permission de l' <i>American Chemical Society</i>	228

Liste des sigles et des abréviations

°C	degré Celcius
AA	acide acrylique
ADN	acide désoxyribonucléique
AE	acrylate d'éthyle
AEMA	méthacrylate d'aminoéthyle
AM	acrylate de méthyle
ANP	acide nucléique peptidique
ANV	acide nucléique verrouillé
AO	acide oléique
Ara-C	β -cytosine arabinoside
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BCTA	bromure de cétyltriméthylammonium
CCL	<i>cationic coated liposome</i>
CHEMS	hémisuccinate de cholestéryle
Chol	cholestérol
CPP	<i>cell penetrating peptide</i> ; peptide de translocation
DEAE-dextrane	diméthylaminoéthyle-dextrane
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle cell culture medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMPG	1,2-dimiristoylphosphatidylglycérol
DMRIE	bromure de 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthylhydroxyéthylammonium
DODAB	bromure de diméthylodioctadécylammonium
DODAP	1,2-dioléoyl-3-diméthylammonium propane

DOGS	dioctadécylamidoglycylspermine
DOPC	1,2-dioléoylphosphatidylcholine
DOPE	dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOPG	1,2-dioléoylphosphatidylglycérol
DOSPA	dioléoyl-oxypropyldiméthylammonium amidospermine
DOTAP	1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium propane
DOTMA	<i>N</i> -[1-(2, 3-dioléyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -triméthylammonium
DPPC	1,2-palmitoyl- <i>sn</i> -3-phosphatidylcholine
DPX	<i>p</i> -xylene-bis-pyridinium bromide
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
DSPE-PEG	distéaroylephosphatidyléthanolamine-poly(éthylène glycol)
EA	<i>ethyl acrylate</i>
EAA	<i>ethylacrylic acid</i>
EPC	<i>egg yolk phosphatidylcholine</i> ; phosphatidylcholine d'oeuf
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FTIR	<i>Fourier transformed infrared spectroscopy</i>
GAPDH	<i>glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase</i>
¹ H	proton
² H	<i>deuterium</i>
H/D	HEPES-dextrose
HEPES	<i>N</i> -(2-hydroxyethyl)-piperazine- <i>N'</i> -(2-ethane sulfonic acid)
HPTS	<i>8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid</i>
iARN	interférence ARN
ICAM	<i>human intracellular adhesion molecule</i> ; molécule d'adhésion intracellulaire humaine
i.p.	intrapéritonéal
i.t.	intratumoral
i.v.	intraveineux
LCST	<i>lower critical solution temperature</i>

LDH	<i>lactate dehydrogenase</i>
LiBr	<i>lithium bromide</i>
LSCM	<i>laser scanning confocal microscopy</i>
LUV	<i>large unilamellar vesicles</i>
MAA	<i>methacrylic acid; acide méthacrylique</i>
MAB	méthacrylate de butyle
MAD	méthacrylate de dodécyle
MAM	méthacrylate de méthyle
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
MLV	<i>multilamellar vesicles</i>
M_n	<i>number-average molecular weight</i>
MOE	2'-(méthoxy)éthyle
MPI	micelles polyioniques
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide</i>
MW	<i>molecular weight</i>
M_w	<i>weight-average molecular weight</i>
NIPAM	<i>N-isopropylacrylamide</i>
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
ODA	<i>octadecyl acrylate</i>
ODN	oligonucléotide antisens
OM	oligonucléotide morpholino
PAA	<i>poly(acrylic acid); poly(acide acrylique)</i>
PACA	<i>poly(alkylcyanoacrylate); poly(cyanoacrylate d'alkyle)</i>
PAMAM	poly(amidoamine)
pARNi	petit ARN interférant
PBAA	<i>poly(butylacrylic acid)</i>
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PC	phosphatidylcholine

PDBu	<i>phorbol 12,13-dibutyrate</i>
PDMAEMA	<i>poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)</i> ; poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle)
PEAA	<i>poly(ethylacrylic acid)</i> ; poly(acide éthacrylique)
PEG	poly(éthylène glycol)
PEG- <i>b</i> -PDMAEMA	poly(éthylène glycol)- <i>bloc</i> - poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle)
PEI	poly(éthylénimine)
PEO	<i>poly(ethylene oxide)</i>
PEO- <i>b</i> -PDMAEMA	<i>poly(ethylene oxide)-block-poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)</i>
PGA	<i>poly(L-glutamic acid)</i>
PHPMA	poly[<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)méthacrylamide]
PI	<i>polydispersity index</i>
PIBCA	<i>poly(isobutylcyanoacrylate)</i> ; poly(cyanoacrylate d'isobutyle)
PICM	<i>polyion complex micelles</i>
PKC- α	<i>protein kinase C-alpha</i>
PLA	<i>poly(D,L-lactic acid)</i> ; poly(<i>D,L</i> -acide lactique)
PLA-PLGA	<i>poly(lactic acid-co-glycolic acid)</i> ; poly(acide lactique- <i>co</i> -acide glycolique)
PLL	poly(<i>L</i> -lysine)
P(MAA- <i>co</i> -EA- <i>co</i> -BMA)	<i>poly(methacrylic acid-co-ethyl acrylate-co-butyl acrylate)</i>
PNIPAM	poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide)
PNIPAM-Py-Gly	<i>poly[(N-isopropylacrylamide)-N-[4-(1-pyrenyl)-butyl]-N-n-octadecylacrylamide-N-glycylacrylamide]</i>
PO	phosphodiester
POPC	<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-3-phosphatidylcholine</i>
PPAA	<i>poly(propylacrylic acid)</i> ; poly(acide propacrylique)
PS	phosphorothioate
PSS	<i>poly(styrenesulfonate)</i>

RBC	<i>red blood cells</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RMN	<i>résonance magnétique nucléaire</i>
RNAse H	<i>ribonucléase H</i>
SALP	<i>stabilized antisense lipid particle</i>
SAXS	<i>small angle X-ray scattering</i>
s.c.	<i>sous-cutané</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SPM	<i>système des phagocytes mononucléés</i>
SucPG	<i>succinylated poly(glycidol)</i>
SUV	<i>small unilamellar vesicles</i>
$T_{1/2}$	<i>temps de demi-vie; half-life</i>
TEM	<i>transmission electron microscopy</i>
THF	<i>tetrahydrofuran</i>
T_m	<i>gel-liquid phase transition temperature</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-alpha; facteur onconécrosant-alpha</i>
Tris	<i>tris(hydroxyethyl)aminoethane</i>
UV	<i>ultraviolet spectroscopy</i>
VIH	<i>virus de l'immunodéficience humaine</i>

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement le Prof. Jean-Christophe Leroux, mon directeur de recherche, qui m'a accueillie dans son groupe sans aucune hésitation et qui, dès le début, a cru en mes capacités. Au cours de toutes ces années, le Prof. Leroux a su me transmettre sa passion pour la recherche ce qui me permit d'effectuer les travaux présentés dans cette thèse dans un environnement stimulant et motivant. Il m'a offert un appui et un encadrement exceptionnels qui firent de moi non seulement une meilleure scientifique, mais aussi une meilleure personne. Ses grandes qualités de chercheur, son ardeur au travail et son intégrité font de lui un scientifique remarquable, une personne à qui je voue toute mon admiration et avec qui il me fut tellement agréable de travailler. Je garde un souvenir impérissable du séjour passé dans son laboratoire ainsi que de nos conversations scientifiques et non scientifiques. Je lui serai toujours profondément reconnaissante pour toute l'aide qu'il m'a apportée durant et pour la suite de mon parcours.

Mes plus sincères remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt et les commentaires constructifs qu'ils ont apportés à cette thèse. J'ai été honorée par la considération qu'ils ont tous portée à mes travaux.

Je voudrais remercier vivement tous mes collègues de travail, passés et présents, sans qui le laboratoire Leroux n'aurait pas été caractérisé par une aussi bonne ambiance de travail. Plus spécifiquement, je tiens à remercier Emmanuelle Roux, Dorothée Le Garrec et Claire Jarry pour l'aide précieuse qu'elles m'ont apportée surtout au cours de mes trois premières années passées à l'Université de Montréal. Un merci très spécial à Maxime Ranger pour son support inestimable apporté notamment au tout début du projet, lors de mes travaux de maîtrise. Finalement, je tiens à exprimer plus particulièrement toute ma gratitude aux trois personnes que j'ai plus intimement côtoyées durant toutes ces années soit Marie-Christine Jones, Marie-Hélène Dufresne et Pierre Simard. Marie-Christine, tu disposes d'un raisonnement et d'une logique admirables. Tu as toujours été pour moi une personne de

référence sur qui je pouvais toujours compter. Merci pour ta grande disponibilité et pour toutes les réponses que tu as apportées à mes questions. Marie-Hélène, j'ai beaucoup apprécié pouvoir discuter à plusieurs reprises de mes résultats de recherche avec toi. Tu avais souvent une suggestion pour m'aider à résoudre mes petits problèmes. J'admire ta créativité et te remercie pour ton écoute et pour tes précieux conseils. Peter, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Tu étais toujours disponible et de bonne humeur. J'ai pu compter sur ton aide un nombre incalculable de fois et pour cela, je t'en serai toujours reconnaissante. Merci pour ton dévouement et pour ta grande générosité. Tous les trois, vous êtes des amis très chers à mes yeux et je souhaite de tout coeur pouvoir bénéficier de la gentillesse et des compétences de gens comme vous au cours de ma carrière future.

Je suis reconnaissante envers les professeurs Marc Servant, Albert Adam et Pierre Moreau qui m'ont conseillé à quelques reprises durant mes études et/ou m'ont permis d'utiliser leur équipement de laboratoire. Également, je tiens à remercier Vincent Blouin, Jean-François Clément, Simon-Pierre Gravel, Kim Bujold, Giuseppe Molinaro et Sanny Moussette qui m'ont tous apporté de l'aide d'une manière ou d'une autre à un moment précis au cours de ma thèse. Merci aussi au personnel de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal pour avoir agrémente mon environnement de travail.

Je tiens à remercier vivement le Dr. Hans-Ulrich Peterreit et le Dr. Christian Meier de la compagnie Röhm Pharma pour avoir contribué au financement de mes travaux de recherche et pour m'avoir fourni les copolymères avec lesquels j'ai travaillé. Cette collaboration a été très enrichissante pour moi et a constitué un support tangible à la réalisation de mon projet.

Tout au long de mes études graduées, j'ai pu bénéficier d'un soutien financier provenant de plusieurs organismes subventionnaires tels que le Fonds Canadien d'Aide à la Recherche, la Fondation pour la Recherche en Santé (Rx&D) ainsi que le Fonds de la Recherche en Santé du Québec que je tiens à remercier. Merci également à Pfizer Canada Inc. et à la Banque de Montréal pour l'aide financière apportée aux étudiants gradués chaque année.

Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans l'appui inconditionnel de ma famille. En tout premier lieu, j'aimerais remercier du fond du cœur mes parents, Francine et Ahmed, pour croire en moi parfois plus que je ne croie en moi-même. Au cours de ma thèse, j'ai pu bénéficier constamment de leurs encouragements et de leur soutien moral qui ont été pour moi une source remarquable de motivation, surtout dans les périodes plus sombres. Chers parents, jamais je n'aurai assez de mots pour vous signifier ma gratitude. Si je suis rendue là aujourd'hui, j'estime que c'est en grande partie grâce à vous. Cette thèse et tout ce qu'elle représente vous est dédiée en témoignage de l'amour que je vous porte.

Un énorme merci à ma sœur Annie qui est pour moi une véritable inspiration. Elle est probablement une des personnes les mieux placées pour comprendre tout ce que la réalisation d'un projet de thèse implique. Je tiens à lui souligner que je serai toujours là pour elle comme elle l'a été pour moi durant toutes ces années. Merci également à mes deux frères que j'adore, Jean-Daniel et Julien.

Un merci tout spécial à mes grands-parents, Rose-Yvonne et Jean-Paul, pour l'enthousiasme qu'ils ont toujours manifesté envers mes projets, pour toutes leurs petites attentions qui font si chaud au cœur, et pour leur sagesse. Merci également à ma tante, Hélène, qui sera toujours très spéciale pour moi, ainsi qu'à mon oncle Youssef et ma tante Amina qui me sont très chers.

Je voudrais remercier mes amies Nadia Drouin, Sonia Picard et Caroline Noël qui me rappellent qu'au fond, je suis pharmacienne!

Finalement, je tiens à remercier profondément Mathieu qui a été particulièrement présent dans les derniers mois du projet. Il a su faire preuve d'une grande compréhension et s'est montré très attentif à mon égard et, pour cela, je lui dois beaucoup. Merci d'avoir été là.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Partie 1

Les oligonucléotides antisens et les vecteurs synthétiques développés pour leur administration

La thérapie génique se définit par l'introduction de matériel génétique exogène dans les cellules des patients dans le but de traiter une maladie. Longtemps perçue comme une technologie expérimentale, la médecine génétique a évolué et est aujourd'hui considérée comme une stratégie viable pour le traitement de maladies. Au cours des dernières années, une meilleure compréhension des bases génétiques de plusieurs pathologies a permis d'identifier de nombreuses conditions médicales susceptibles de bénéficier de la thérapie génique. De plus, l'achèvement du projet Génome Humain a mis à la disposition des scientifiques une multitude d'informations permettant l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Parmi les différentes stratégies de traitement employées, la plus évidente est sans doute le remplacement d'un gène manquant ou défectueux par l'insertion génomique d'un acide désoxyribonucléique (ADN) plasmidique. D'autre part, l'expression d'un gène peut être régulée à la baisse au moyen d'acides nucléiques tels que les ribozymes, les petits acides ribonucléiques (ARNs) interférants et les oligonucléotides antisens (ODNs). Ces molécules ont toutes la propriété de se lier à leur cible, souvent un ARN messager (ARNm), de façon spécifique par appariement des bases complémentaires, provoquant ainsi l'inhibition de la traduction de cet ARN en protéine (Fig. 1). Comparativement à la stratégie basée sur l'administration d'ADN plasmidique, la régulation à la baisse d'un gène est une approche moins onéreuse et plus simple étant donné que le brin d'acide nucléique n'a pas à être intégré dans le génome de l'hôte pour être actif. Toutefois, de ce fait même, il s'agit d'une solution moins permanente pour remédier à une condition médicale donnée et des administrations répétées sont donc nécessaires afin d'obtenir un effet thérapeutique soutenu. Étant donné le mécanisme d'action de cette classe d'agents thérapeutiques, les

conditions médicales pouvant potentiellement en bénéficier sont extrêmement variées et incluent le cancer, le SIDA ainsi que les troubles cardiovasculaires et neurologiques tels que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer.

Les médicaments à base d'ADN ou d'ARN possèdent l'avantage de reconnaître sélectivement leurs cibles thérapeutiques ce qui leur confère une formidable spécificité d'action. Ainsi, en principe, les effets secondaires de cette classe d'agents thérapeutiques seraient minimisés comparativement aux médicaments classiques. Cependant, malgré ces caractéristiques favorables, le nombre de succès cliniques obtenus avec ces composés demeure limité. En effet, bien que plusieurs candidats prometteurs soient présentement à un stade avancé d'études cliniques, seulement 2 produits ont été approuvés à ce jour par les agences réglementaires, soit une formulation d'ODN (Vitravene[®], États-Unis, 1998) et un adénovirus contenant un ADN plasmidique (Gencidine[®], Chine, 2003). Le développement de ces médicaments est freiné, entre autres, par leur faible capture cellulaire et leur faible stabilité dans les milieux biologiques. De plus, il est important de souligner que ces composés sont des entités pharmaceutiques dont la structure diffère totalement de celle des médicaments classiques. Par conséquent, leurs effets chez l'humain doivent être investigués en profondeur, de même que la faisabilité de leur administration à long terme. Au cours des dernières années, les connaissances concernant la distribution, le métabolisme et les mécanismes de capture cellulaire de ces agents thérapeutiques se sont considérablement améliorées. Des modifications chimiques ont permis d'augmenter substantiellement la stabilité des composés les plus susceptibles à la dégradation, tels les ODNs, et une variété de vecteurs naturels et synthétiques a été développée pour améliorer le profil pharmacocinétique et assurer le ciblage tissulaire de ces molécules. Les principales caractéristiques des médicaments à base d'ADN ou d'ARN seront décrites dans les sections suivantes en portant une attention particulière aux ODNs puisqu'ils font l'objet des études expérimentales réalisées au cours de la thèse. Par la suite, les systèmes employés pour la vectorisation des ODNs seront décrits en détails.

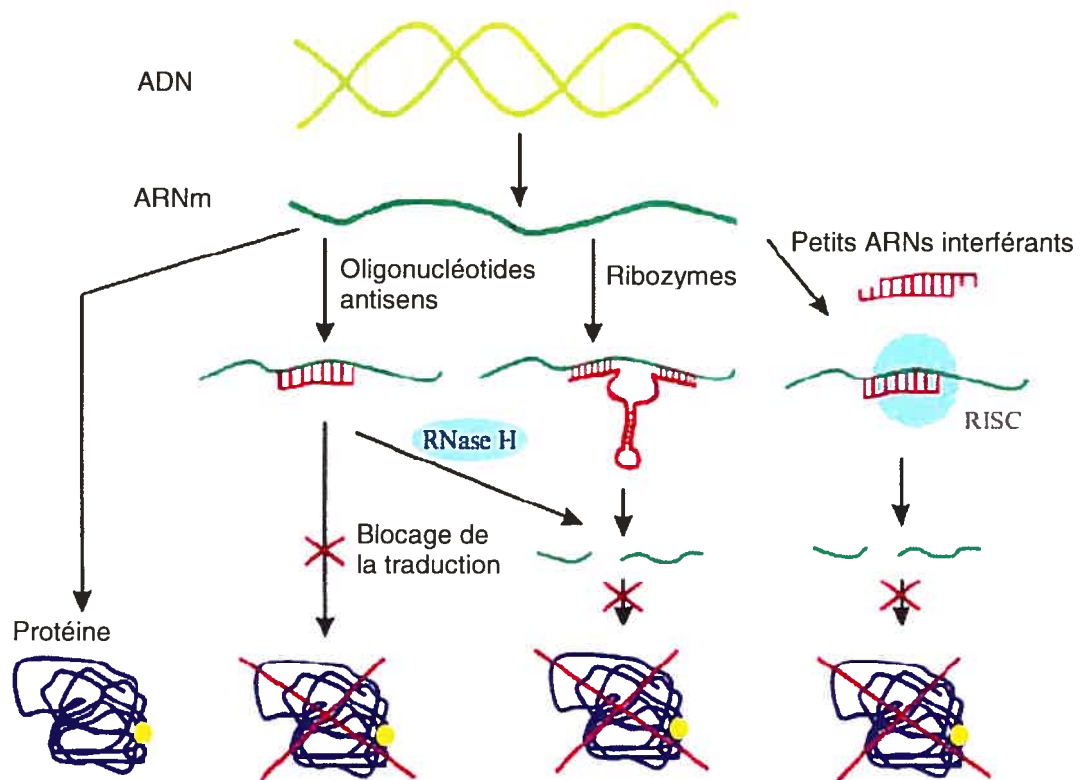


Figure 1. Comparaison des différentes stratégies permettant de réguler à la baisse l'expression d'un gène. Les oligonucléotides antisens, les ribozymes et les petits ARNs interférants se lient à l'ARNm par appariement Watson-Crick ce qui résulte ultimement en l'inhibition de la synthèse d'une protéine spécifique. Schéma adapté de Kurreck (2003) avec la permission de Blackwell Publishing.

1. Les ribozymes

Les ribozymes sont des oligoribonucléotides possédant une structure tridimensionnelle bien définie et dotés d'une activité enzymatique leur permettant de cliver des molécules d'ARNm en catalysant l'hydrolyse de liens phosphodiester (PO) et ce, de manière hautement spécifique (Cech, 1987). Les ribozymes à tête de marteau (« *hammerhead ribozyme* ») ont été les plus étudiés pour des applications médicales. Ils sont composés de deux bras capables de s'apparier avec le substrat, ainsi que d'un cœur catalytique composé de 22 nucléotides de séquence précise et de structure bien définie. Les bras du ribozyme reconnaissent leur séquence complémentaire de part et d'autre d'un triplet NUH situé sur l'ARN cible, où N est n'importe quel nucléotide, U est de l'uridine et H peut être de l'adénine, de l'uridine, de la cytosine, mais pas de la guanine (Haseloff, 1988). En présence

d'ions magnésium, le cœur catalytique du ribozyme clive l'ARN à l'extrémité 3' du triplet NUH.

Les ribozymes ont été utilisés pour inhiber l'expression d'oncogènes et la réplication virale, ainsi que dans l'étude du rôle joué par certains gènes dans les processus de développement de l'être humain (James, 1998). Dans le cadre d'applications en culture cellulaire ou *in vivo*, ils peuvent être transcrits à partir de plasmides transfectés à l'intérieur des cellules cibles ou être administrés de façon exogène. Cependant, étant donné que l'ARN est rapidement dégradé dans les milieux biologiques, les ribozymes synthétiques doivent être protégés de l'hydrolyse enzymatique afin d'assurer une efficacité optimale. L'incorporation de ribonucléotides modifiés peut augmenter la résistance aux nucléases. Toutefois, lorsque ces nucléotides sont présents dans le cœur catalytique, un changement conformationnel peut se produire menant à la réduction ou l'abolition de l'activité catalytique. Par conséquent, ces modifications ne peuvent être appliquées à tout le ribozyme (Sun, 2000). Afin d'améliorer la résistance à la dégradation, des désoxyribozymes ou ADNzymes tel que le type 10³-23' ont été synthétisés et ont montré une bonne activité catalytique (Santoro, 1997). Cependant, bien que l'ADN soit plus stable que l'ARN, son hydrolyse demeure assez rapide dans les milieux biologiques. Ainsi, dans la plupart des études biologiques, ces molécules ont été modifiées à leur tour afin d'accroître davantage leur stabilité (Sun, 2000). La résistance à la dégradation enzymatique des ribozymes/ADNzymes devra donc être améliorée avant qu'ils ne puissent constituer une approche thérapeutique viable.

2. Les petits ARN interférants

L'interférence ARN (« *RNA interference* », iARN) est un mécanisme cellulaire endogène impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique (Fig. 2). Ce phénomène a d'abord été observé chez les plantes et les champignons (Cogoni, 1997), puis chez les invertébrés. En 1998, Fire *et al.* démontraient que, chez le nématode, l'expression d'un gène pouvait être inhibée de manière prolongée suite à l'injection intracellulaire de longs fragments (> 30 nucléotides) d'ARN double brin (Fire, 1998). Ces ARNs sont reconnus dans la cellule par l'enzyme Dicer puis sont clivés en duplexes de 21-

23 nucléotides caractérisés par 2 nucléotides non hybridés à l'extrémité 3' de chaque brin. Ces fragments sont appelés petits ARNs interférants (« *small interfering RNAs* », pARNis). Dans le cytosol, les pARNis interagissent avec diverses protéines pour former le complexe RISC (« *RNA-induced silencing complex* »). La séparation des 2 brins du pARNi par un mécanisme adénosine-triphosphate (ATP)-dépendant provoque l'activation du RISC et la liaison du brin antisens à sa séquence complémentaire sur l'ARNm cible. Ce dernier est finalement clivé à environ 12 nucléotides de l'extrémité 3' du pARNi et dégradé par des nucléases. Le complexe RISC, quant à lui, est recyclé (Gilmore, 2004).

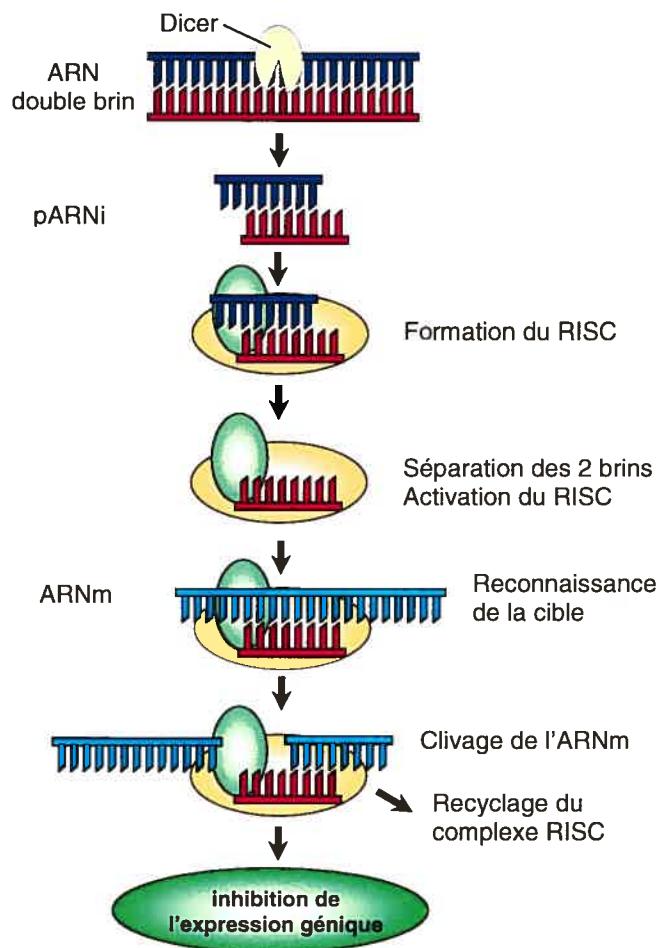


Figure 2. Mécanisme de l'iARN.

Bien qu'il fut établi assez rapidement que l'iARN était présente chez plusieurs organismes, ce n'est qu'en 2001 que l'inhibition de l'expression génique par iARN fut

démontrée chez les mammifères (*Elbashir, 2001*). Ce délai est dû entre autres au fait que l'injection de longs fragments d'ARN double brin dans le cytoplasme de cellules mammifères produit des réactions inflammatoires menant à l'activation de la voie de l'interféron, puis à l'induction de la protéine kinase PKR (*Williams, 1999*). Puisque cette dernière est connue pour inhiber le processus de traduction, son induction résulte en l'inhibition non spécifique de l'expression génique. La présence du mécanisme d'iARN chez les mammifères n'a pu être confirmée de façon non équivoque que lorsque des pARNis synthétiques furent administrés à des cellules en culture (*Elbashir, 2001*). Curieusement, la synthèse d'interféron n'est pas activée suite à l'administration de fragments d'ARN double brin < 30 paires de bases.

Dans le cadre d'applications médicales, les pARNis, tout comme les ribozymes, peuvent être transcrits dans les cellules à partir de plasmides ou être administrés de façon exogène. Les pARNis induisent une forte inhibition de l'expression génique et ce, de façon hautement spécifique. Cette efficacité peut être attribuée au fait qu'une molécule de pARNi peut cliver à elle seule plusieurs ARNm. Une étude récente démontrait que les pARNis provoquent une inhibition de l'expression génique 100-1000 fois supérieure à celle produite par les ODNs dans des cellules en culture (*Bertrand, 2002*). Toutefois, bien que très puissants, les pARNis sont rapidement dégradés dans le sérum par des ribonucléases endogènes (temps de demi-vie ($t_{1/2}$) = 5-60 min) (*Dykxhoorn, 2006*). Des modifications chimiques variées peuvent leur être apportées afin d'augmenter leur stabilité. Toutefois, cela se fait souvent au détriment de leur activité et peu d'études rapportent l'efficacité *in vivo* de pARNis modifiés (*Sontschek, 2004*). De plus, la toxicité de ces molécules est peu connue. Par conséquent, il est prématuré d'affirmer que l'iARN peut mener au développement de molécules thérapeutiques à la fois sécuritaires et efficaces.

Mentionnons finalement qu'il a été récemment découvert que des fragments d'ARNs appelés microARNs sont impliqués dans la régulation de l'expression génique chez plusieurs organismes y compris les mammifères (*Carthew, 2006*). Les microARNs sont de courts fragments (20-22 nucléotides) d'ARN simple brin produits à partir d'un ARN précurseur (pré-microARN) possédant une structure de boucle en épingle à cheveux et constitué d'environ 70 nucléotides. Dans le cytoplasme des cellules, le pré-microARN est clivé par l'enzyme Dicer en microARN mature qui est alors incorporé dans le complexe

RISC de manière similaire à ce qui a été décrit plus haut pour les pARNis. Cependant, contrairement aux pARNis, les microARNs peuvent se lier à l'ARNm même si leur séquence n'est pas tout à fait complémentaire à celle de ce dernier. Par un mécanisme qui n'est pas encore tout à fait élucidé, l'ARNm est alors clivé ou non traduit, ce qui résulte en l'inhibition de la synthèse d'une protéine spécifique (*Sevignani, 2006*). Plusieurs articles démontrent que la mutation, l'amplification ou la délétion des gènes codant pour les microARNs pourraient contribuer au développement de certaines maladies telles le cancer (*Sevignani, 2006*). Par conséquent, les microARNs pourraient éventuellement être utilisés comme agents anticancéreux, bien qu'il soit encore trop tôt pour statuer sur le potentiel thérapeutique de ces molécules.

3. Les oligonucléotides antisens

Les ODNs sont de courts fragments (17-22 nucléotides) simple brin d'ADN, d'ARN ou de leurs analogues destinés à se lier de façon complémentaire à l'ARNm ou le pré-ARNm codant pour une protéine impliquée dans une maladie, inhibant ainsi la synthèse de cette dernière. Ces molécules ont été synthétisées pour la première fois en 1967 (*Belikova, 1967*) et, 10 ans plus tard, Zamecnik et Stephenson les proposaient comme une nouvelle classe d'agents thérapeutiques après avoir constaté leur capacité à inhiber la réplication virale dans des cellules infectées par le virus du sarcome de Rous (*Zamecnik, 1978; Stephenson, 1978*). L'approche antisens est basée sur la spécificité de l'hybridation Watson-Crick et sur le fait qu'il a été estimé qu'une séquence donnée de 17 bases consécutives ne survient qu'une fois dans le génome humain.

3.1 Mécanismes d'action des ODNs

Les mécanismes exacts au moyen desquels les ODNs se lient à leur cible et inhibent la synthèse protéique ne sont pas clairement établis. Parmi les mécanismes d'action suggérés, le plus accepté implique la formation d'un duplexe entre l'ODN et l'ARNm par hybridation Watson-Crick, ce qui induit le clivage de l'ARNm par la ribonucléase H (RNase H) (*Walder, 1988*). La RNase H est une enzyme qui dégrade le brin ARN d'un

duplexe ARN-ADN (Crooke, 1998). Ce mécanisme est reconnu comme étant l'un des plus efficaces pour réduire l'expression d'un gène car après la dégradation de l'ARNm, l'ODN est libre de se lier à un autre ARNm et son effet est donc amplifié. La RNase H peut réduire le niveau de l'ARNm cible de 80-85% par rapport au niveau initial (Pirollo, 2003). L'enzyme est principalement localisée dans le noyau, mais se retrouve également dans le cytoplasme des cellules d'une variété d'organismes. Il a été démontré que le clivage par la RNase H est impliqué dans l'activité de plusieurs ODNs, dont l'ODN modèle utilisé dans cette thèse (ISIS 3521) (Dean, 1994b; Chiang, 1991). D'autres mécanismes d'action sont assez bien documentés dans la littérature. Par exemple, les ODNs conçus pour se lier à une séquence non traduite en 5' de l'ARNm ou au codon AUG initiateur de la traduction peuvent bloquer stériquement la traduction en empêchant l'assemblage du ribosome (Crooke, 1999). D'autre part, certains ODNs peuvent former une triple hélice avec l'ADN génomique double brin, ce qui entraîne l'inhibition de la transcription. Ce dernier mécanisme, aussi appelé *stratégie antigène*, a été découvert en 1987 (Le Doan, 1987; Moser, 1987). L'inhibition de la transcription résulte de la formation de ponts hydrogène de type Hoogsteen entre les pyrimidines de l'ODN et les purines d'un des brins de l'ADN cible (Prasanth, 1999).

Par ailleurs, selon leur site de liaison sur l'ARN, les ODNs pourraient agir à plusieurs étapes du métabolisme intermédiaire de ce dernier. Par exemple, ils pourraient affecter la stabilité du pré-ARNm en empêchant la polyadénylation de son extrémité 3' ou le coiffage de son extrémité 5' par une guanosine méthylée. Également, ils pourraient nuire au processus d'excision des introns, affectant ainsi l'épissage du pré-ARNm et empêchant la production d'ARNm mature. Cependant, il est à noter qu'aucune étude n'a démontré l'existence de ces mécanismes d'action de manière directe et rigoureuse (Crooke, 1999).

Finalement, certains ODNs contenant des motifs CpG (*i.e.* des dinucléotides cytosine-guanine encadrés par 2 purines en 5' et 2 pyrimidines en 3') ont la propriété de stimuler le système immunitaire et ce, indépendamment de leur activité antisens. Lorsqu'administrés chez la souris, ils activent plusieurs cellules immunitaires dont les macrophages, les lymphocytes B et les cellules tueuses naturelles (Krieg, 1995; Chace, 1997). De ce fait, ces ODNs peuvent exercer une puissante action anti-tumorale, causant la régression et même l'éradication de certaines tumeurs, comme il l'a été démontré chez des

souris porteuses de neuroblastomes (*Carpentier, 1999*). Plusieurs études sont présentement en cours afin de déterminer si ces ODNs pourraient être utilisés dans l'immunothérapie du cancer.

3.2 Sélection de la séquence optimale

En théorie, la sélection de la séquence d'acides nucléiques d'un ODN est simple puisque la composition de l'ARNm cible est connue. Cependant, l'ARNm forme des structures intramoléculaires secondaires et tertiaires complexes, de sorte que l'accessibilité de l'ODN est limitée à certaines régions (*Lima, 1992*). Par conséquent, en pratique, seulement quelques ODNs peuvent s'hybrider à leur ARNm cible. La première étape dans la sélection d'un ODN consiste donc à identifier les sites accessibles sur l'ARNm. Idéalement, ces sites ne devraient montrer aucune homologie avec d'autres gènes d'importance afin de limiter les interactions non spécifiques. Afin d'identifier les meilleurs sites d'hybridation, plusieurs méthodes *in vitro* ont récemment été développées. La majorité de ces techniques reposent sur une approche combinatoire basée sur des réactions d'anneau entre l'ARNm et une librairie d'ODNs. L'accessibilité des sites sur l'ARNm est évaluée, par exemple, par l'activité antisens des ODNs ou encore par la dégradation de duplexes ARN-ADN par la RNase H (« *RNase H mapping* »). De plus, différents programmes informatiques tels que « *mfold* » ou « *RNA structure* » ont été élaborés afin de prédire la structure secondaire de l'ARNm. Bien que ces logiciels ne permettent pas de prévoir la structure tridimensionnelle de l'ARNm *in vivo*, ils ont l'avantage de réduire substantiellement le nombre d'ODNs à tester par criblage à haut débit.

3.3 Composition des ODNs

Au cours des premiers stades de développement, les ODNs étaient constitués de liens PO naturels (Fig. 3A). Cependant, ces molécules sont rapidement dégradées dans le sérum et les milieux intracellulaires ($t_{1/2} = 10-15$ min) (*Cazenave, 1987; Wickstrom, 1986*), et n'ont donc pas atteint le stade des études cliniques. Afin de faire des ODNs une stratégie thérapeutique prometteuse, diverses modifications chimiques leur ont été apportées dans le

but d'augmenter la stabilité tout en compromettant le moins possible l'affinité et la spécificité de l'hybridation avec l'ARNm.

3.3.1 Les modifications de première génération

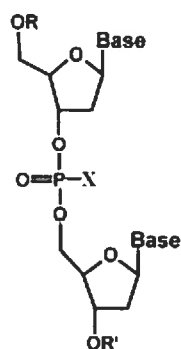
Ces modifications consistent à remplacer l'atome d'oxygène chargé du groupement phosphate par un groupement méthyle (dérivés méthylphosphonate, Fig. 3B) ou un atome de soufre (dérivés phosphorothioate (PS) Fig. 3C). Bien que les dérivés méthylphosphonate soient résistants aux nucléases (Miller, 1979), les duplexes qu'ils forment avec l'ADN (Matsukura, 1987) et l'ARN (Kean, 1994) sont moins stables que ceux formés par les dérivés PO, ce qui reflète une affinité d'hybridation moindre. Ainsi, malgré le fait qu'une étude ait démontré qu'ils sont aptes à inhiber la réplication virale *in vitro*, leur faible affinité pour l'ARN fait en sorte que de fortes concentrations (100-300 μM) sont requises pour engendrer un effet (Smith, 1986).

Parmi les ODNs modifiés, les dérivés PS sont sans aucun doute les plus communément utilisés et les plus disponibles commercialement. Jusqu'à maintenant, la plupart des ODNs évalués dans les essais cliniques sont constitués de liens PS (Pirolo, 2003; Gleave, 2005). De plus, le seul ODN approuvé à ce jour par la « Food and Drug Administration », Vitravene[®] (ISIS Pharmaceuticals et Ciba Vision) est également un dérivé PS (Marwick, 1998). Cet ODN est indiqué pour le traitement de la rétinite à cytomégalovirus chez les patients atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise. Les ODNs PS ont été synthétisés à la fin des années 60 (De Clercq, 1969). Ils ont été évalués *in vitro* pour la première fois en 1987 et se sont avérés efficaces pour inhiber la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans des lymphocyte T infectés et ce, à une concentration de 1 μM (Matsukura, 1987).

La présence de groupements thiophosphate accroît substantiellement la résistance de l'ODN à diverses exo- et endonucléases (Eckstein, 1985; Stein, 1988). La demi-vie varie de 7 à 19 h dans divers milieux biologiques tel que le sérum humain (Campbell, 1990), ce qui est considérablement plus long que pour les dérivés PO. Malgré une affinité d'hybridation légèrement plus faible comparé aux ODNs PO, les ODNs constitués de liens PS se lient à leur ARNm cible de façon spécifique et conservent leur capacité à activer la RNase H

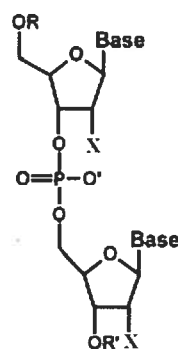
(Kibler-Herzog, 1991; Kurreck, 2003). L'ensemble de ces propriétés peut expliquer leur popularité dans les essais cliniques. En effet, en 2005, plus de 60% des candidats testés dans la cinquantaine d'études cliniques en cours étaient des dérivés PS (Aboul-Fadl, 2005).

Première génération



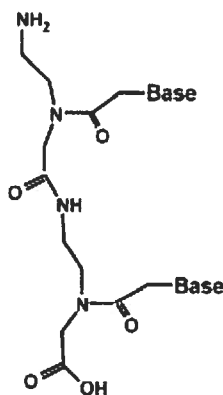
- (A) X = O⁻
 (B) X = CH₃
 (C) X = S⁻

Deuxième génération

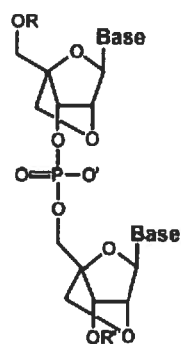


- (D) X = F
 (E) X = OCH₃
 (F) X = OCH₂CH₂OCH₃

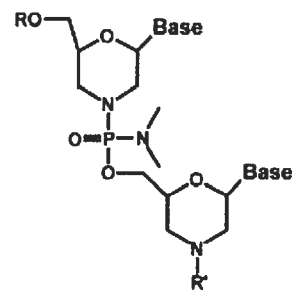
Troisième génération



(G)



(H)



(I)

Figure 3. Principales modifications chimiques apportées aux ODNs. A) Phosphodiester, B) Méthylphosphonate, C) Phosphorothioate, D) 2'-fluoro, E) 2'-O-méthyle, F) 2'-O-méthoxyéthyle, G) Acides nucléiques peptidiques, H) Acides nucléiques verrouillés, I) Morpholino.

Par ailleurs, les dérivés PS ont la particularité d'interagir fortement avec les protéines et ce, indépendamment de leur séquence (Brown, 1994; Eckstein, 2000). Cette affinité non spécifique améliore le profil pharmacocinétique des ODNs en réduisant leur élimination par filtration rénale. L'interaction avec des protéines situées à la surface et à l'intérieur des

cellules favoriserait aussi une meilleure capture cellulaire et une rétention intracellulaire accrue, respectivement, relativement aux dérivés PO (Brown, 1994; Tonkinson, 1994). Cependant, la forte affinité des dérivés PS pour les protéines ne comporte pas que des avantages. En effet, elle peut provoquer plusieurs effets non spécifiques qui peuvent être confondus avec l'effet antisens et compliquer l'interprétation des données expérimentales. Par exemple, en se liant de façon non spécifique au facteur de croissance dérivé des plaquettes, au facteur de croissance fibroblastique et à son récepteur, au récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire ainsi qu'au récepteur du facteur de croissance de l'épiderme, les dérivés PS peuvent inhiber la prolifération cellulaire (Guvakova, 1995; Fennewald, 1995; Rockwell, 1997). Bien que l'emploi de contrôles adéquats, tel un ODN aléatoire, permette de minimiser les erreurs d'interprétation, ces effets non spécifiques ont considérablement ralenti la recherche et seraient responsables de la toxicité systémique des dérivés PS. En effet, lorsqu'ils sont injectés chez les primates, les ODNs PS peuvent activer le complément et interférer avec la cascade de la coagulation (Henry, 1997; Wallace, 1996). Cela serait attribuable à la liaison des ODNs à certaines protéines plasmatiques telles que le Facteur H et différents facteurs de coagulation. Il est à noter que ces effets sont transitoires et liés à la concentration plasmatique en ODN (Levin, 1999). Ainsi, en contrôlant la dose et la vitesse d'infusion, ces effets secondaires peuvent être minimisés. En conclusion, lorsque prudemment utilisés, les dérivés PS sont une classe d'ODNs pouvant procurer une inhibition spécifique et efficace de l'expression génique.

3.3.2 Les modifications de deuxième génération

En dépit d'une résistance aux nucléases accrue par rapport aux ODNs PO, le métabolisme intracellulaire des dérivés PS peut mener à une perte graduelle d'efficacité sur une période de 48-72 h. 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 composés de seconde génération ont été élaborés en incorporant en position 2' du ribose des substituants tels un groupement 2'-fluoro (Kawasaki, 1993), un 2'-O-alkyle (Iribarren, 1990; Inoue, 1987a; McKay, 1996) ou un 2'-O-alkoxy (Baker, 1997) (Fig. 3D-F). Ces ODNs forment des complexes plus stables avec l'ARN que les dérivés PS (Freier, 1997). De plus,

ils offrent une excellente résistance envers les nucléases, surtout lorsque les liens PO sont substitués par des liens PS (*Kawasaki, 1993; Baker, 1997*). Une étude de la relation structure-activité a permis d'établir que l'affinité d'hybridation avec l'ARN est inversement proportionnelle à la taille du substituant de type 2'-O-alkyle (*Lesnik, 1993*). L'ordre de stabilité suit la séquence suivante : 2'-fluoro > 2'-O-méthyle > 2'-O-éthyle > 2'-O-propyle > 2'-O-butyle > 2'-O-pentyle. Étonnamment, cette relation n'a pas été mise en évidence pour les ODNs substitués avec des groupements 2'-O-alkoxy. En effet, malgré la présence de substituants volumineux, l'affinité d'hybridation de ces composés demeure excellente (*De Mesmaeker, 1995*). Ce comportement serait dû à la présence du groupement éthylène glycol qui permettrait à la chaîne latérale d'adopter une conformation éliminant les contraintes stériques lors de l'hybridation.

Étant donné que les analogues de deuxième génération ne sont plus constitués de désoxyribonucléotides, ils n'ont pas la capacité d'activer la RNase H. Ces molécules agiraient, au moins en partie, en empêchant la liaison du ribosome à l'ARNm, bloquant ainsi le processus de traduction (*Baker, 1997*). Cependant, pour la plupart des approches antisens, le recrutement de la RNase H demeure hautement souhaitable dans le but de potentialiser l'activité des ODNs. Afin de combiner stabilité, affinité d'hybridation et activation de la RNase H, une stratégie basée sur les « gapmères » a été développée. Les gapmères sont des ODNs chimériques constitués d'une région centrale comprenant des nucléotides de type PO ou PS, ainsi que d'un certain nombre de ribonucléotides de type 2'-O-alkyle ou 2'-O-alkoxy à chaque extrémité. Les modifications en bout de chaîne préviennent la dégradation enzymatique, alors que la région centrale est reconnue par la RNase H suite à l'hybridation de l'ODN avec l'ARNm. Il a été établi qu'un minimum de 4 et 5 nucléotides « pro-RNase H » consécutifs est nécessaire afin d'activer respectivement la RNase H d'*Escherichia Coli* (*Inoue, 1987b*) et d'origine humaine (*Monia, 1993*). Cependant, pour une inhibition optimale de l'expression génique, 6 à 8 nucléotides centraux sont requis (*McKay, 1999*).

Différentes études témoignent de l'efficacité des ODNs chimériques. Par exemple, dans une étude réalisée *in vitro*, un ODN PS de 20 bases dirigé contre la protéine kinase C- α et contenant 6 nucléotides de type 2'-O-(2-méthoxy)éthyle (2'-MOE) à chaque extrémité s'est avéré respectivement 5 et 2,5 fois plus efficace à inhiber l'expression de

l'ARNm cible comparé à ses homologues PS non modifié et PS 2'-O-méthyle (McKay, 1999). L'efficacité *in vivo* d'un ODN PS 2'-MOE a également été démontrée chez la souris après injection intrapéritonéale (i.p.) (Zhang, 2003). Mentionnons qu'il a été démontré que l'activité antisens des ODNs chimériques de type 2'-O-alkyle corrèle avec leur affinité d'hybridation avec l'ARNm (Monia, 1993). D'autre part, l'addition de modifications de type 2'-O-méthyle ou 2'-MOE à un ODN PS a entraîné une diminution des effets non spécifiques *in vitro* et *in vivo* (Yoo, 2004; Agrawal, 1997). Toutefois, étant donné qu'ils interagissent moins avec les protéines, les ODNs de deuxième génération sont éliminés de la circulation un peu plus rapidement que les dérivés PS (Geary, 2001).

3.3.3 Les modifications de troisième génération

Depuis quelques années, une variété de nucléotides modifiés a été développée afin d'améliorer davantage certaines propriétés des dérivés de seconde génération telles leur affinité d'hybridation et leur spécificité. Les modifications sont alors apportées aux liens phosphate, au sucre ou aux deux à la fois. Étant donné la grande diversité d'analogues investigués, seuls les plus prometteurs seront décrits ici.

3.3.3.1 Les acides nucléiques peptidiques

Les acides nucléiques peptidiques (ANPs) sont des analogues non ioniques des ODNs dans lesquels le squelette désoxyribose-phosphate est remplacé par un polyamide contenant des unités *N*-2-aminoéthyle glycine (Fig. 3G). Ces molécules, introduites en 1991, sont capables de s'hybrider de façon hautement spécifique à leur séquence complémentaire par appariement Watson-Crick et ce, avec une affinité remarquable (Nielsen, 1991; Egholm, 1993). La stabilité des duplexes obtenus serait due à l'absence de répulsion électrostatique entre les brins ainsi qu'à la flexibilité de la chaîne de l'ANP conférée par les liaisons aminoéthyle. Les ANPs peuvent être facilement synthétisés à grande échelle par des procédés similaires à ceux utilisés pour la synthèse des peptides (Egholm, 1992). De plus, ils sont très stables dans les milieux biologiques (Demidov, 1994).

Même si les ANPs sont des molécules non chargées, ils sont intrinsèquement hydrophiles et, de ce fait, pénètrent faiblement les membranes lipidiques (Wittung, 1995) (Simmons, 1997). Leur nature peptidique les rend incapables d'activer la RNase H et ils agiraient plutôt en bloquant la traduction de l'ARNm (Hanvey, 1992). L'efficacité de ces molécules est donc strictement basée sur la stabilité des duplexes ANP/ARN. Contrairement aux dérivés PS, les ANPs interagissent faiblement avec les protéines (Hamilton, 1996) ce qui réduit les interactions non spécifiques, mais cause une élimination rapide de la circulation par filtration glomérulaire (Mardirosian, 1997). Leur activité antisens a été démontrée pour la première fois chez les eucaryotes lorsqu'un ANP de 20 bases dirigé contre l'antigène SV40 T fut microinjecté dans des cellules en culture provoquant une réduction significative de l'expression de la protéine (Hanvey, 1992). L'activité des ces analogues a également été démontrée *in vivo*, où un ANP complémentaire à l'ARNm codant pour le récepteur de la galanine fut injecté chez le rat (Pooga, 1998). Dans cette étude, l'ANP était couplé chimiquement au transporteur peptidique *p.Antennapedia* (43-58) afin d'augmenter sa capture cellulaire.

Bien que les résultats des travaux effectués avec les ANPs soient encourageants, de nombreuses questions demeurent sans réponse. Par exemple, leur mécanisme d'action n'est toujours pas totalement élucidé et peu d'information est présentement disponible concernant les propriétés pharmacodynamiques et les effets de l'administration systémique à long terme de ces molécules.

3.3.3.2 Les acides nucléiques verrouillés

En 1998, les laboratoires de Wenger (Kosbkin, 1998b; Kosbkin, 1998a; Kumar, 1998) et Imanishi (Obika, 1998) ont simultanément décrit la synthèse d'un nouvel oligomère baptisé acide nucléique verrouillé (ANV) (« *locked nucleic acid* »). Les nucléotides des ANVs contiennent un pont méthylène reliant l'oxygène en position 2' du ribose au carbone en position 4' (Fig. 3H). Le ribose est ainsi « verrouillé » dans une conformation mimant celle de l'ARN standard. Cette structure bicyclique confère aux ANVs une affinité d'hybridation surpassant celle des ANPs (Braasch, 2002a; Wengel, 1999). Ces molécules peuvent être obtenues facilement par les méthodes de synthèse conventionnelles de l'ADN, sont

résistantes aux nucléases et ne causeraient pas de toxicité aiguë (*Wablestedt, 2000*). Puisqu'ils sont substitués en position 2' du ribose, ces analogues ne recrutent pas la RNase H et inhiberaient directement la traduction (*Wablestedt, 2000*). Toutefois, l'enzyme peut être activée par l'utilisation d'ANVs chimériques contenant une région centrale de 7-8 nucléotides ADN (*Kurreck, 2002*).

Puisque la découverte des ANVs est récente, peu d'études rapportent leur efficacité *in vitro* et *in vivo*. Les ANVs et leurs homologues chimériques peuvent inhiber efficacement l'expression génique *in vitro* lorsque dirigés contre différentes régions de l'ARNm, bien que les dérivés ciblant la région non traduite en 5' soient les plus actifs (*Braasch, 2002b*). *In vivo*, un ANV dirigé contre l'ARNm codant pour une des sous-unités de l'ARN polymérase II et administré pendant 14 jours par perfusion intraveineuse (i.v.) à des souris immunosupprimées porteuses de tumeurs prostatiques a réduit de façon importante les niveaux de la protéine et inhibé la croissance tumorale (*Fluiter, 2003*). De la même manière, un ODN chimérique s'est montré plus actif à diminuer l'expression du récepteur des opioïdes δ chez le rat qu'un ODN classique PO (*Wablestedt, 2000*). Malgré ces résultats prometteurs, il est connu que les ANVs possèdent une affinité exceptionnelle pour l'ARNm pouvant mener à une diminution de la spécificité de l'hybridation (*Fluiter, 2003*). Des études supplémentaires sont donc requises afin de déterminer si cet inconvénient sera un obstacle au développement clinique de ces molécules.

3.3.3.3 Les ODNs morpholino

Les ODNs morpholino (OMs) sont des analogues non ioniques de l'ADN dans lesquels le sucre est remplacé par un cycle morpholino et les liens PO par des liens phosphoramidate (Fig. 3I). Ces molécules sont résistantes aux nucléases (*Hudziak, 1996*), ont une affinité d'hybridation à l'ARNm similaire à celle des ODNs PO (*Sbi, 2004; Kurreck, 2003*), sont solubles dans l'eau et leur coût de production est faible. Bien qu'ils n'activent pas la RNase H, ces analogues sont plus efficaces que les dérivés PO et PS et inhibent la synthèse protéique de manière hautement spécifique (*Taylor, 1996; Washio, 2003; Ko, 2004*). *In vivo*, un OM dirigé contre le récepteur androgène a été injecté par la voie i.p. chez des souris porteuses de xénogreffes et a causé une diminution des niveaux intratumoral (i.t.) et

prostatique du récepteur (Ko, 2004). Ces résultats très prometteurs ont conduit à l'étude d'un OM (AVI-4126) en phase clinique I contre le cancer de la prostate. Cet ODN est dirigé contre le gène *c-myc* qui est impliqué dans l'hyperprolifération des cellules tumorales et la carcinogénèse. Il a été injecté en doses croissantes par la voie i.v. chez des volontaires sains et n'a causé aucun effet secondaire sérieux jusqu'à une dose totale de 90 mg (Iversen, 2003). Dans une autre étude de phase I, l'accumulation i.t. de ce même ODN a été évaluée chez des patients porteurs de tumeurs malignes du sein ou de la prostate. Des niveaux significatifs d'ODNs intacts ont été détectés dans les tissus tumoraux excisés des patients et ce, 24 h après l'administration i.v. d'une dose unique de 90 mg (Devi, 2005). Bien que ces résultats soient encourageants, l'efficacité des OMs devra être cliniquement démontrée avant qu'ils ne soient utilisés dans la thérapie du cancer.

En conclusion, les données présentement disponibles dans la littérature sur les ODNs modifiés montrent qu'à part quelques critères évidents telle la biostabilité, il est difficile de privilégier un analogue par rapport à un autre. En effet, la supériorité d'une molécule antisens donnée n'a pas encore été démontrée de manière irrévocable. Par conséquent, le choix de la structure devrait être fait suite à une comparaison directe dans un modèle expérimental précis et, jusqu'à présent, ces études comparatives sont peu nombreuses (Sazani, 2001; Sazani, 2002; Grunweller, 2003).

4. Les défis inhérents à l'administration des ODNs

Pour être efficaces, les ODNs doivent s'accumuler dans les tissus cibles après une administration systémique. Cependant, lorsqu'ils sont injectés par voie i.v. ou sous-cutanée (s.c.), ils sont éliminés rapidement de la circulation et se concentrent principalement dans le foie et les reins. Ainsi, le traitement de maladies autres que celles affectant le tissu hépatique ou rénal est problématique lors de l'administration d'ODNs sous forme libre. Par ailleurs, les ODNs doivent être résistants à la dégradation enzymatique, capturés par les cellules, puis capables d'atteindre le cytoplasme et/ou le noyau en quantité suffisante. Bien que les modifications chimiques décrites plus haut aient augmenté la résistance aux nucléases, les ODNs, modifiés ou non, pénètrent faiblement au travers des membranes cellulaires en

raison de leur taille, leur hydrophilie et leur charge négative (s'il y a lieu). La fraction d'ODNs qui pénètre dans les cellules serait capturée par endocytose (Loke, 1989; Yakubov, 1989). Toutefois, ce mécanisme est non spécifique et peut mener à la présence d'ODNs dans des tissus autres que ceux ciblés. De plus, suite à l'endocytose, les ODNs se retrouvent prisonniers des endosomes et des lysosomes. Ces organelles sont généralement considérées comme une impasse pour les ODNs. En effet, bien qu'une faible proportion parvienne à s'en échapper et rejoigne le cytoplasme par un mécanisme inconnu, la majeure partie est expulsée des cellules par exocytose ou partiellement digérée par les multiples enzymes hydrolytiques présentes dans les lysosomes (Tonkinson, 1994). Finalement, bien qu'il ait été démontré qu'une fois dans le cytoplasme, les ODNs s'accumulent dans le noyau des cellules par diffusion (Chin, 1990; Leonetti, 1991), s'ils ne sont pas suffisamment résistants à la dégradation, ils peuvent être inactivés plus ou moins rapidement par les nucléases présentes dans le cytosol. Ainsi, avant de pouvoir atteindre leur site d'action, les ODNs doivent franchir plusieurs barrières biologiques.

5. La vectorisation des ODNs

Afin de cibler spécifiquement les tissus d'intérêt, d'améliorer la capture cellulaire et d'optimiser le transport intracellulaire des ODNs, plusieurs types de vecteurs ont été élaborés. Ces derniers doivent satisfaire à un certain nombre d'exigences (Mastrobattista, 2006). Ils doivent évidemment être non toxiques, non immunogéniques, biocompatibles et idéalement biodégradables. Si ce dernier critère n'est pas rencontré, le vecteur doit pouvoir être éliminé par filtration glomérulaire de manière à prévenir son accumulation dans l'organisme. Suite à une administration systémique, le vecteur doit demeurer stable dans la circulation le plus longtemps possible afin d'éviter la libération prématurée de l'ODN dans le sang. De plus, il doit, dans la mesure du possible, éviter d'être capturé par les organes du système des phagocytes mononucléés (SPM) tels le foie, les reins, la rate et les poumons, qui sont des sites d'élimination majeurs. L'accumulation de l'ODN au site visé peut être favorisée par la prolongation des temps de circulation du vecteur. En effet, si ce dernier circule suffisamment longtemps, il pourra gagner la matrice extracellulaire du tissu cible par extravasation en exploitant, par exemple, la perméabilité accrue du lit vasculaire des tumeurs

solides. Afin de prolonger les temps de circulation du vecteur, des modifications peuvent lui être apportées telles la modulation de la charge de surface et l'inclusion de chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG). Le PEG est une macromolécule hydrophile et flexible qui crée une barrière stérique autour des vecteurs et les protège de l'interaction avec divers éléments du plasma telles que les opsonines qui accélèrent leur capture par le SPM. De plus, dans certains cas, le PEG stabilise les vecteurs et limite leur agrégation dans la circulation.

Par ailleurs, une fois dans l'interstitium, le vecteur doit se distribuer de façon optimale dans le tissu. Ce processus peut être entravé par des interactions non spécifiques avec les composantes de la matrice extracellulaire et, dans le cas des tumeurs, par une pression interstitielle élevée causée par une réduction du drainage lymphatique. Le vecteur doit également reconnaître les cellules cibles et s'y lier de manière à favoriser sa capture cellulaire par endocytose. Ce phénomène peut être grandement facilité par l'ajout d'une molécule de reconnaissance qui permet au vecteur d'être capturé uniquement par les cellules exprimant un récepteur spécifique (voir le Tableau 1 pour les principaux ligands utilisés pour le ciblage actif des ODNs). Finalement, une fois dans la cellule, le vecteur doit permettre la libération endosomale de l'ODN et ce, avant que les endosomes ne fusionnent avec les lysosomes où l'ODN peut être dégradé (*Luzio, 2000*).

Étant donné le nombre de paramètres à considérer, il est évident que le vecteur idéal doit être doté de plusieurs composantes accomplissant chacune une tâche précise. Comme nous le verrons dans les prochaines sections, rares sont ceux qui réussissent sur tous les plans. De plus, il faut noter que même s'il a été démontré que les ODNs peuvent pénétrer dans certains tissus après une administration systémique sans l'aide de vecteurs (*Monia, 1996a; Monia, 1996b*), ces derniers sont essentiels pour optimiser le profil pharmacocinétique des ODNs et pour assurer un ciblage tissulaire.

5.1 Les vecteurs viraux

Bien qu'ils ne soient pas utilisés pour véhiculer des ODNs, on ne peut passer sous silence l'emploi des vecteurs viraux étant donné l'intérêt qu'ils suscitent en thérapie génique (*Young, 2006*). Ces vecteurs sont obtenus suite au remplacement d'une partie du génome

Tableau I. Principaux ligands utilisés pour cibler les ODNs *in vitro* et *in vivo*

Ligands	Cellules cibles	Références
Asialoglycoprotéine	Hépatome humain (HepG2)	(Rajur, 1997), (Wu, 1992)
Fucose	Carcinome pulmonaire humain (A549)	(Stewart, 1996)
Mannose	Promonocytes (U937), macrophages péritonéaux Macrophages murins (J774) Macrophages alvéolaires humains Cellules de Kupffer	(Bonfils, 1992a) (Bonfils, 1992b) (Liang, 1996) (Mabato, 1997)
Galactose	Hépatocytes	(Mabato, 1997)
Facteur de croissance de l'épiderme	Carcinome pulmonaire humain (A549)	(Deshpande, 1996)
Acide folique	Carcinome ovarien (FD2008, CHO) Cellules leucémiques humaines (HL-60) Carcinome épidermique humain (KB)	(Li, 1998) (Citro, 1994) (Jeong, 2005), (Kim, 2006), (Wang, 1995)
Transferrine	Érythroblastes Cellules leucémiques humaines (HL-60) Carcinome épidermique humain (KB)	(Wagner, 1990) (Citro, 1992) (Vinogradov, 1999)
Albumine	Cellules endothéliales hépatiques	(Bartsch, 2005), (Bartsch, 2002)
Anticorps		
RVS-10	Glioblastome humain (U87-MG)	(Walker, 1995)
OX-26	Cellules endothéliales de cerveau de rat (RBE4)	(Normand-Sidiqui, 1998)
Anti-HER2	Carcinome mammaire humain (SK-BR-3, MCF-7)	(Meyer, 1998)
Anti-CD19	Lymphome humain (clone MDR41)	(Stuart, 2000b)
Anti-diasialoganglioside	Neuroblastome et mélanome humains	(Pagnan, 2000), (Pastorino, 2003)

d'un virus par un gène thérapeutique. Le premier succès dans le domaine de la médecine génétique a été obtenu grâce à ces vecteurs. En 1989, de l'ADN plasmidique était transféré dans le génome d'un humain à l'aide d'un rétrovirus (Rosenberg, 1990). Depuis ce temps, plusieurs études visant le transfert de gènes chez l'humain ont été approuvées et plus de 1100 essais cliniques sont actuellement en cours à travers le monde¹. Le trois quart de ces études sont effectuées avec des vecteurs viraux, alors que dans les 25% restants, l'ADN est administré sous forme libre ou associé à des vecteurs synthétiques. Parmi les vecteurs viraux, les adénovirus et les rétrovirus sont les plus couramment utilisés étant donné leur grande efficacité de transfection.

¹ Selon les données publiées par le *Journal of Gene Medicine* (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

En 1999, le décès d'un patient et en 2002, le développement de leucémies chez 2 enfants sont survenus suite à l'administration de vecteurs viraux (*Hacein-Bey-Abina, 2003; Lehrman, 1999; Marshall, 1999; Raper, 2003*). Ces incidents ont ralenti considérablement le développement clinique de ces véhicules et ont mis en évidence plusieurs de leurs inconvénients, tels leur antigénicité. Toutefois, cela n'a pas empêché la poursuite de la recherche dans le domaine. D'ailleurs, en 2003, la Chine a approuvé l'utilisation d'un adénovirus pour l'administration i.t. du gène *p53* indiqué en combinaison avec la radiothérapie conventionnelle pour le traitement des carcinomes squameux de la tête et du cou (*Peng, 2005*). Ainsi, bien que la prudence s'impose, l'insertion génomique d'ADN plasmidique constitue toujours aujourd'hui une approche séduisante pour remédier à certaines conditions médicales ne bénéficiant pas de traitement efficace.

5.2 Les vecteurs synthétiques

Pour pallier les inconvénients des vecteurs viraux tels que l'antigénicité et la pathogénicité, une variété de vecteurs synthétiques lipidiques, polymères et peptidiques a été développée. Ces vecteurs, qui peuvent être utilisés pour le transport d'ADN ou d'ODNs, sont plus sécuritaires, plus flexibles et plus faciles à produire que les vecteurs viraux. Cependant, ils sont moins efficaces que ces derniers et, s'ils ne sont pas optimisés pour les conditions prévalant *in vivo*, ils peuvent parfois être toxiques et instables dans la circulation. Les sections suivantes décrivent les principaux vecteurs utilisés pour l'administration d'ODNs. Il est à noter que la grande majorité des études citées ont été effectuées avec des ODNs PO ou PS, et, de ce fait, la capacité du vecteur à protéger ces ODNs de la dégradation enzymatique est un attribut souhaitable.

5.2.1 Les vecteurs à base de lipides

Ces vecteurs se présentent surtout sous la forme de liposomes constitués de lipides amphiphiles naturels ou synthétiques. Les ODNs peuvent être encapsulés à l'intérieur du liposome ou encore liés à sa surface par interactions électrostatiques. Ces vecteurs sont très versatiles. En effet, ils peuvent être préparés de manière à protéger leur contenu d'une

dégradation prématurée, augmenter leur capture cellulaire, prolonger leur temps de circulation, cibler les cellules d'intérêt et/ou induire la libération contrôlée du matériel qu'ils transportent.

5.2.1.1 *Encapsulation dans des liposomes conventionnels*

Étant donné que les ODNs sont des molécules hydrophiles, ils peuvent être encapsulés dans la cavité aqueuse de liposomes neutres (Wielbo, 1996; Klimuk, 2000) ou anioniques (Akhtar, 1991; Ponnappa, 1998). L'encapsulation peut être réalisée par évaporation en inversion de phase ou encore par la méthode classique d'hydratation-extrusion (Olson, 1979). Ces procédés permettent de contrôler facilement la taille des liposomes. L'ODN ainsi encapsulé est protégé de la dégradation par les nucléases. Toutefois, leur désavantage majeur réside dans les faibles efficacités d'incorporation obtenues (typiquement 20% et moins) et ce, surtout lorsque les liposomes sont de petite taille (<200 nm). Afin de remédier à ce problème, d'autres protocoles ont été élaborés. L'emploi d'une technique appelée « encapsulation d'un volume minimum » (« *minimum volume entrapment* ») a permis d'atteindre des efficacités d'incorporation de 50 à 70% (Thierry, 1992; Thierry, 1993). Les liposomes ainsi préparés ont été utilisés pour l'administration *in vitro* d'ODNs et sont composés de phosphatidylcholine (PC), de cholestérol (Chol) et de cardiolipide (ratio molaire 10 :7 :0.5). Le cardiolipide (diphosphatidylglycérol ou cardiolipine) est un lipide retrouvé dans la membrane mitochondriale interne de cellules métaboliquement actives telles que les cellules cardiaques et musculaires. Il interagit avec un grand nombre de protéines mitochondriales et est nécessaire au fonctionnement des complexes protéiques impliqués dans le processus de phosphorylation oxydative (Haines, 2002). L'encapsulation d'ODNs dans ces liposomes a permis de diminuer la résistance à la doxorubicine des cellules SKVLB en réduisant la synthèse de la glycoprotéine P et ce, de manière plus efficace que l'ODN libre. Cependant, la dose d'ODN requise pour engendrer cet effet était élevée (5 μ M), la toxicité de ces liposomes n'a pas été évaluée (le cardiolipide peut être toxique) et leur taille n'a pas été précisée. Par ailleurs, des efficacités d'incorporation variant entre 40 et 60% ont été obtenues récemment pour des liposomes composés de 1,2-dioléoylphosphatidylcholine (DOPC)/1,2-dioléoylphosphatidylglycérol

(DOPG) (240 nm) suite à la diminution de la force ionique du tampon d'hydratation et à l'inclusion d'une proportion de DOPG ne dépassant pas 20% (Lakkaraju, 2001). L'efficacité de ces liposomes a été démontrée *in vitro*, mais aucune étude *in vivo* n'a encore été réalisée.

Quelques études témoignent de l'activité biologique d'ODNs encapsulés dans des liposomes suite à leur administration systémique chez l'animal (Wielbo, 1996; Klimuk, 2000; Ponnappa, 1998). Cependant, étant donné les faibles efficacités d'incorporation, une dose importante de lipides doit être injectée pour produire un effet (50-300 mg/kg). Par conséquent, certains chercheurs se sont tournés vers des applications locales. Par exemple, des liposomes PC/Chol/distéaroylphosphatidyléthanolamine-PEG 2000 (DSPE-PEG) (ratio molaire 64:30:6) contenant un ODN modèle (15% d'incorporation) ont été dispersés dans un gel thermosensible de poloxamère 407 dans le but de développer une nouvelle forme pharmaceutique pour l'administration oculaire d'ODNs. Ces travaux ont démontré que les liposomes freinent la diffusion de l'ODN dans le gel et ce, jusqu'à ce qu'ils soient déstabilisés par les molécules de poloxamère libérées lors de la dissolution du gel (Bochot, 1998a). Cependant, lors de l'évaluation *in vivo* du système, des quantités très faibles d'ODN ont été retrouvées dans les différents tissus oculaires. Ainsi, les auteurs ont conclu que l'encapsulation liposomale n'est pas un moyen efficace d'administrer topiquement des ODNs (Bochot, 1998b).

5.2.1.2 Encapsulation dans des liposomes sensibles au pH

Qu'ils soient munis ou non d'un ligand, les liposomes pénètrent dans les cellules par endocytose (Zelphati, 1996a). Par conséquent, ils se retrouvent ultimement dans les lysosomes où ils sont dégradés avec leur contenu. La quantité d'ODN qui évite la dégradation et rejoint le cytoplasme est très faible ce qui peut expliquer les fortes doses requises pour engendrer les effets biologiques décrits plus haut. Afin de minimiser la dégradation lysosomale et ainsi augmenter l'efficacité et la biodisponibilité intracellulaire des ODNs, des liposomes sensibles au pH ont été développés. Ces liposomes exploitent le gradient de pH présent dans les endosomes et les lysosomes. En effet, le pH des endosomes est légèrement plus acide que celui du cytoplasme (5,0-6,5 vs. 7,4,

respectivement) et s'approche de 4,5 dans les lysosomes (*Asokan, 2002*). Cette acidification progressive est due à l'action d'une pompe membranaire H^+ ATPase et est nécessaire à l'action des diverses enzymes lysosomales.

Les liposomes sensibles au pH ont une composition lipidique leur permettant d'être stables à pH neutre, mais instables à pH acide. Ils sont constitués majoritairement d'un lipide fusogène, la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE). À cause de sa structure en cône inversé, la DOPE ne peut former de bicouches lamellaires à pH neutre et adopte plutôt une organisation en phase hexagonale inverse à la température de la pièce. Cependant, lorsqu'elle est associée avec d'autres lipides, des vésicules liposomales peuvent être obtenues. C'est le choix judicieux de ces lipides qui peut mener à l'obtention de liposomes sensibles au pH (*Collins, 1989*). Dans le cas des formulations utilisées pour véhiculer des ODNs, la DOPE a été combinée avec des lipides acides amphiphiles tels que l'acide oléique (AO) ou l'hémisuccinate de cholestéryle (CHEMS) (*Fattal, 2004*). À pH neutre, ces additifs sont ionisés et maintiennent les liposomes en phase lamellaire. Cependant, une diminution du pH du milieu entraîne leur protonation, la disparition de leur effet stabilisant et le retour à la phase hexagonale inverse. Dans l'environnement acide des endosomes, la déstabilisation des liposomes et/ou leur fusion avec la membrane endosomale favorise la libération du matériel encapsulé dans le cytoplasme des cellules.

Les liposomes sensibles au pH ont été rapidement considérés pour l'administration d'ODNs. En principe, ils potentialiseraient leur activité biologique en augmentant leur capacité à atteindre leur site d'action intracellulaire. *In vitro*, il a effectivement été démontré que les propriétés antivirales de certains ODNs sont améliorées suite à leur encapsulation dans des liposomes sensibles au pH (*Ropert, 1992; Duzgunes, 2001*). Cependant, l'efficacité des liposomes sensibles au pH ne serait pas due à la déstabilisation de la membrane endosomale, mais plutôt à une capture cellulaire accrue comparativement aux liposomes conventionnels (*Ropert, 1993*). Mentionnons que la capture des deux types de liposomes est favorisée par l'infection virale et liée à un phénomène d'endocytose « réflexe » causée par l'exocytose du virus (*Ropert, 1996*). Les liposomes sensibles au pH seraient capturés de manière plus importante par les cellules infectées à cause de la présence du DOPE, qui favoriserait l'association cellulaire des liposomes par un mécanisme non spécifique (*Fattal, 2004*). À cet égard, plusieurs études ont démontré que des liposomes DOPE:CHEMS (3:2)

sont capturés substantiellement par des cellules en culture comparativement à des liposomes conventionnels ne contenant pas de DOPE (Skalko-Basnet, 2002; Lubrich, 2000). Par ailleurs, des immunoliposomes sensibles au pH ont été préparés et se sont avérés capables d'augmenter spécifiquement la capture cellulaire (Ma, 1996) et l'activité d'ODNs (Selvam, 1996). Toutefois, il n'a pas été démontré là non plus que l'efficacité accrue de l'ODN pouvait être imputée à la sensibilité au pH des liposomes proprement dite.

In vivo, l'administration des liposomes sensibles au pH composés de DOPE et d'AO pose deux problèmes majeurs. Premièrement, ils sont rapidement opsonisés et éliminés de la circulation en s'accumulant dans les macrophages du foie et de la rate (Connor, 1986). Deuxièmement, les liposomes de taille supérieure à 200 nm s'agrègent en présence de sérum ou de plasma (Liu, 1989b). La stabilité des liposomes peut être améliorée par l'ajout de Chol, mais cela se fait au détriment de la sensibilité au pH (Liu, 1989a). Étonnamment, les liposomes ayant une taille inférieure à 200 nm ont un comportement opposé et sont stabilisés dans le plasma suite à l'insertion de protéines plasmatiques dans la bicouche lipidique (Liu, 1989b; De Oliveira, 2000). Cependant, ce phénomène provoque du même coup l'extraction des molécules d'AO, ce qui diminue la sensibilité au pH. Étant donné que le CHEMS est extrait moins facilement que l'AO, les liposomes composés de DOPE:CHEMS seraient moins susceptibles de subir cet effet (Fattal, 2004). La seule étude d'efficacité réalisée *in vivo* avec des liposomes sensibles au pH a d'ailleurs été effectuée avec des liposomes DOPE:CHEMS:Chol (ratio molaire 7:4:2) contenant un ODN dirigé contre le facteur onconécrosant-alpha (« *tumor necrosis factor-alpha*, TNF- α ») sécrété par les macrophages du foie. L'injection i.v. des liposomes (15-17 mg/kg) chez le rat a efficacement diminué les niveaux hépatique et plasmatique de TNF- α , alors que les contrôles (liposomes conventionnels et liposomes sans ODN) n'ont eu aucun effet (Ponnappa, 2001).

Bien que cette étude démontre le potentiel *in vivo* des liposomes sensibles au pH, leur administration à des tissus autres que ceux du SPM demeure problématique étant donné la rapidité du processus d'opsonisation. L'ajout de chaînes de PEG à la surface des liposomes peut permettre de limiter la capture par le SPM et de prolonger les temps de circulation. Cependant, lorsqu'ajouté à des liposomes sensibles au pH, le PEG diminue la sensibilité au pH (Slepishkin, 1997; Liu, 1990). Ainsi, bien que conceptuellement très

attractants, les liposomes sensibles au pH font face à d'importants obstacles qui restreignent leur application *in vivo*.

5.2.1.3 Encapsulation dans des virosomes

Les virosomes sont des liposomes contenant des protéines virales ancrées à leur surface. Selon leur nature, ces protéines peuvent fusionner avec la membrane cellulaire ou endosomale, permettant ainsi l'introduction du contenu des liposomes dans le cytoplasme des cellules. Pour le transport d'ODNs, les virosomes les plus étudiés sont des liposomes anioniques de composition variée complexés avec les protéines de l'enveloppe du virus Sendai inactivé (Morishita, 1993; Kondob, 2000; Matsuo, 2000; Kunisawa, 2005). Contrairement à la majorité des protéines virales, les protéines provenant du virus de Sendai peuvent fusionner directement avec la membrane cellulaire à pH physiologique, évitant ainsi la dégradation lysosomale de l'ODN (Daemen, 2005). L'enveloppe de ce paramoxyvirus est constituée de deux glycoprotéines distinctes : la neuroaminidase hémorragique et la protéine de fusion F. La neuroaminidase hémorragique est requise pour la liaison du virus à la cellule hôte. La protéine de fusion F, quant à elle, serait responsable du processus de fusion proprement dit suite à son insertion dans la membrane lipidique par interactions hydrophobes (Hoekstra, 1989; Dzan, 1996). Cette protéine est constituée de deux sous-unités, F₁ et F₂, reliées par un pont disulfure. L'activité fusogène serait localisée dans une région hydrophobe située à l'extrémité N-terminale de la sous-unité F₁. Les mécanismes moléculaires du processus de fusion ne sont par totalement élucidés. En effet, contrairement aux protéines virales subissant un changement de conformation en fonction du pH, le stimulus moléculaire responsable de la fusion à pH physiologique est plus difficilement identifiable. Dans une étude effectuée par Kumar *et al.*, l'existence d'une protéine de 45 kDa complexée par interactions hydrophobes à la protéine F et dotée d'une activité protéolytique a été mise en évidence (Kumar, 1997). La liaison de cette protéine à son substrat sur la surface de la cellule hôte entraînerait la digestion de ce dernier, provoquant simultanément le changement de conformation du complexe et facilitant ainsi l'interaction de la protéine de fusion F avec la membrane cytoplasmique. Lorsqu'administrés à des cellules en culture, les virosomes préparés avec le virus de Sendai

inactivé augmentent la capture cellulaire, améliorent la distribution intracellulaire et potentialisent l'activité des ODNs. Cependant, *in vivo*, ils sont immunogènes (Earl, 1988). De plus, ils sont compliqués à préparer, interagissent de manière non spécifique avec les cellules et sont instables dans le plasma et le sérum ce qui limite grandement leur utilisation thérapeutique (Zelphati, 1996a).

5.2.1.4 Complexation à des lipides ou liposomes cationiques

En 1987, un lipide cationique synthétique, le chlorure de *N*-[1-(2, 3-dioléyloxy)propyl]-*N,N,N*-triméthylammonium (DOTMA), était utilisé pour la première fois avec succès à des fins de transfection (Felgner, 1987). Depuis ce temps, une grande variété de lipides cationiques a été synthétisée et est maintenant disponible commercialement (Fig. 4 et Tableau 2). Encore aujourd'hui, ces formulations sont de loin les vecteurs lipidiques les plus populaires pour véhiculer de l'ADN. La plupart d'entre elles sont constituées d'un lipide cationique combiné à un lipide fusogène telle que la DOPE. Dans ce cas, des liposomes proprement dits sont obtenus. Précisons que lorsqu'utilisé seul, le lipide cationique ne s'organise pas en bicouches lamellaires et ne forme donc pas de vrais liposomes. Cependant ici afin de ne pas alourdir le texte, le terme liposome sera utilisé indistinctement.

Des « lipoplexes » sont obtenus spontanément suite à la complexation par interactions électrostatiques d'acides nucléiques et de liposomes cationiques préformés (Meidan, 2000). Dans le cas des complexes à base d'ODNs, la nature de la formulation liposomale et la composition de l'ODN peuvent influencer l'efficacité de l'interaction (Meidan, 2001; Ruozi, 2005). Par ailleurs, les propriétés physico-chimiques des lipoplexes dépendent de plusieurs facteurs tels que le ratio de charges [+/-], la force ionique du milieu ainsi que la concentration, la vitesse de mélange et l'ordre d'addition des composants (Jääskeläinen, 1994; Jääskeläinen, 1998). Habituellement, le ratio de charges final est légèrement positif afin de favoriser l'interaction des complexes avec les membranes cellulaires chargées négativement (Pires, 1999). De manière générale, le processus d'association est difficile à contrôler ce qui résulte en l'obtention de lipoplexes de taille variable (entre 250 nm et 1 µm) et plus ou moins hétérogène.

La vectorisation d'ODNs au moyen de lipides cationiques a été effectuée pour la première fois en 1992 (Bennett, 1992). L'activité biologique d'un ODN PS dirigé contre la molécule d'adhésion intracellulaire humaine (« *human intracellular adhesion molecule* », ICAM-1) et administré à l'aide de la Lipofectin[®] a été augmentée d'un facteur 1000, ce qui correspond

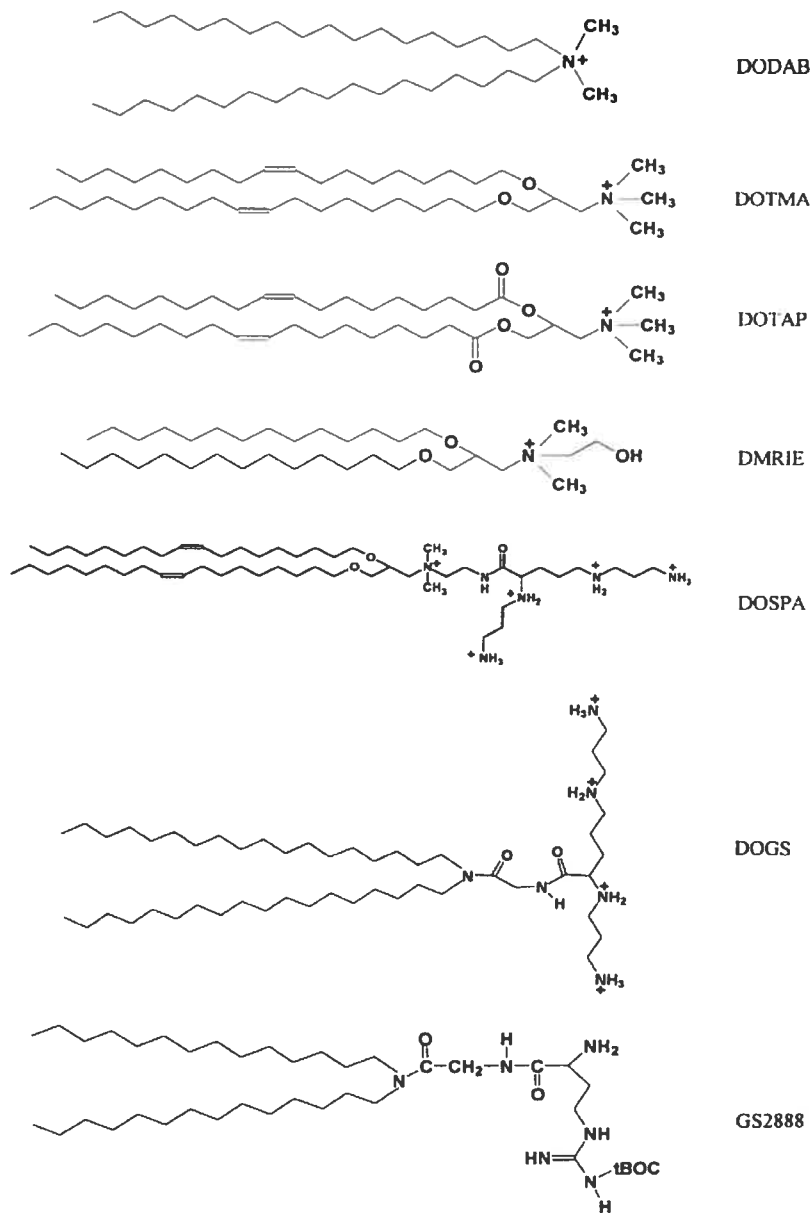


Figure 4. Principaux lipides cationiques employés pour la vectorisation d'ODNs. DODAB : bromure de diméthyl dioctadécylammonium ; DOTMA : *N*-[1-(2, 3-dioléyloxy)propyl]-*N,N,N*-triméthylammonium ; DOTAP : 1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium propane ; DMRIE : bromure de 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthylhydroxyéthylammonium ; DOSPA : dioléoyl-oxypropyldiméthylammonium amidospermine ; DOGS : dioctadécylamidoglycylspermine.

Tableau II. Exemples de formulations de liposomes cationiques disponibles commercialement et utilisées pour véhiculer des ODNs

Nom commercial	Composition ^a	Ratio molaire	Références ^b
DOTAP [®]	DOTAP	---	(Abe, 1998), (Rodríguez, 1999)
Transfectam [®]	DOGS	---	(Lavigne, 1997)
Lipofectin [®]	DOTMA/DOPE	1:1	(Bennett, 1992), (Cumin, 1993), (Bennett, 1994), (Kanamaru, 1998)
LipofectAMINE [®]	DOSPA/DOPE	3:1	(Williams, 1996)
LipofectAce [®]	DODAB/DOPE	1:2,5	(Lappalainen, 1994b), (Lappalainen, 1994a)
Cytofectine GS2888	GS2888/DOPE	2:1	(Lewis, 1996)

^a Voir la légende de la Figure 2 pour la liste des acronymes.

^b Exemples démontrant l'efficacité des différents lipoplexes *in vitro*.

à une association cellulaire 10-20 fois supérieure comparé à l'ODN libre. D'autres études exemplifiant l'efficacité *in vitro* des principales formulations liposomales utilisées pour véhiculer des ODNs sont citées dans le Tableau 2. L'excellente performance des liposomes cationiques peut être expliquée par le fait qu'en plus d'accroître substantiellement la capture cellulaire des ODNs, ils les protègent efficacement de la dégradation par les nucléases (Capaccioli, 1993; Lappalainen, 1994b) et modifient leur distribution intracellulaire en augmentant leur accumulation dans le noyau (Bennett, 1992; Lappalainen, 1994a; Cumin, 1993). Ce dernier phénomène est surtout favorisé par les formulations contenant de la DOPE. En effet, à cause de ses propriétés fusogènes, la DOPE faciliterait la déstabilisation de la membrane endosomale et le transfert des ODNs dans le cytoplasme et le noyau des cellules (Farhood, 1995). Tous ces attributs font qu'avec les liposomes cationiques, il est possible d'obtenir une activité antisens sur des cellules en culture à des concentrations en ODN de l'ordre du nanomolaire. Mentionnons que même si ces formulations peuvent être toxiques envers les cellules (Capaccioli, 1993; Lappalainen, 1994a), la concentration en lipides requise pour augmenter l'activité des ODNs est généralement beaucoup plus faible que celle induisant de la cytotoxicité.

Bien que les liposomes cationiques puissent fusionner directement avec la membrane cellulaire (Bennett, 1992; Capaccioli, 1993), il est connu aujourd'hui qu'ils pénètrent dans les cellules par endocytose (Zelphati, 1996b). En dépit du fait que plusieurs expériences aient démontré sans équivoque que les liposomes cationiques facilitent le passage des ODNs de l'endosome au cytoplasme, le mécanisme exact au moyen duquel ils y

parviennent n'a pas encore été clairement identifié. Une étude fort convaincante effectuée par Zelphati & Szoka suggère qu'après l'endocytose de lipoplexes DOTAP/ODN, le lipide cationique induirait le « flip-flop » de lipides anioniques situés principalement du côté cytoplasmique de la membrane endosomale. Ces derniers diffuseraient alors dans le complexe, neutralisant le lipide cationique et déplaçant du même coup l'ODN qui serait alors libéré dans le cytoplasme (Zelphati, 1996). Plus récemment, ce modèle a été étendu de manière à expliquer le mécanisme au moyen duquel les formulations contenant de la DOPE déstabiliseraient la membrane endosomale. En utilisant la résonance magnétique nucléaire du phosphore 31, Hafez *et al.* ont démontré que les lipides cationiques ont la capacité de promouvoir la formation de structures en phase hexagonale inverse en présence d'un lipide fusogène et de lipides anioniques (Hafez, 2001). De telles structures seraient formées avec la membrane endosomale suite au flip-flop et à la diffusion des lipides anioniques dans les lipoplexes, ce qui entraînerait la déstabilisation de l'endosome. Mentionnons finalement qu'après la capture cellulaire des lipoplexes, l'ODN se dissocierait rapidement des lipides puisque ces derniers demeurent majoritairement localisés dans le cytoplasme et ne sont jamais détectés dans le noyau des cellules (Marvsson, 1998; Lucas, 2005).

Bien que les liposomes cationiques soient extrêmement efficaces *in vitro*, plusieurs désavantages ont freiné leur application *in vivo* (Litzinger, 1997). Étant donné leur charge résiduelle positive, la plupart des formulations sont instables dans le sang. En effet, les liposomes cationiques interagissent avec de nombreux éléments du sérum, ce qui résulte en l'inhibition de leur association cellulaire et ce, qu'ils soient ou non complexés à un ODN (Litzinger, 1996). Une analyse détaillée des interactions sérum-lipoplexes a révélé que des protéines telles l'albumine, la macroglobuline et certaines lipoprotéines se lient aux complexes et altèrent la taille et le potentiel zêta des particules (Zelphati, 1998). Cette étude a également démontré que d'autres molécules présentes dans le sérum, telles l'héparine et l'acide oléique, peuvent provoquer la dissociation des complexes en rivalisant avec l'ODN pour les sites de liaison positifs.

Lorsqu'injectés dans la veine caudale chez la souris, les lipoplexes s'accumulent de manière importante dans les poumons, puis sont graduellement redistribués au foie (Litzinger, 1996; Bennett, 1996). L'accumulation transitoire dans les poumons serait causée par l'embolisation des complexes dans les capillaires pulmonaires suite à leur interaction

indésirable avec les protéines plasmatiques. Étant donné cette biodistribution particulière, des lipoplexes à base de DOTAP ont été utilisés avec succès *in vivo* pour inhiber la synthèse d'ICAM-1 dans l'endothélium pulmonaire de souris CD-1 (Ma, 2002). Toutefois, mis à part cette application précise, l'efficacité des lipoplexes *in vivo* n'a pas encore été démontrée de façon convaincante. En effet, ou bien les liposomes cationiques ne sont pas requis pour engendrer un effet (Dean, 1994a) ou encore les avantages de leur utilisation ne sont pas mis en évidence puisque l'activité de l'ODN complexé n'est pas comparée à celle de l'ODN libre (Haller, 1996).

Afin d'améliorer l'efficacité des formulations *in vivo*, des lipides cationiques de structures variées et plus stables dans le sérum ont été synthétisés (Lewis, 1996; Shi, 2001; Lindner, 2006). Cependant, aucune étude ne rapporte l'évaluation de complexes préparés à partir de ces lipides chez l'animal. Une approche plus prometteuse consiste à introduire dans la composition des liposomes des chaînes de PEG couplées à un groupement hydrophobe telle que la DSPE qui leur permet de s'ancrer dans la bicouche lipidique (Meyer, 1998). Cette stratégie permet de combiner l'efficacité de complexation des liposomes cationiques aux avantages du PEG. En effet, le PEG masque la charge positive résiduelle des complexes ce qui diminue leur interaction avec les divers éléments du plasma, minimisant ainsi l'agrégation et prolongeant les temps de circulation (Yu, 1999). Cependant, la disparition du caractère cationique des liposomes diminue leur capacité à se lier aux membranes par interactions électrostatiques. Par conséquent, la capture cellulaire et le transfert de l'ODN de l'endosome au cytoplasme sont moins efficaces (Filion, 1997; Song, 2002). Pour pallier à ce problème, une molécule de reconnaissance peut être fixée à l'extrémité de la chaîne de PEG. Alternativement, des PEG dissociables ont été développés. Ces derniers s'ancrent dans la bicouche lipidique à l'aide d'un groupement céramide. Contrairement à la DSPE, l'ancrage des PEG-céramides n'est pas permanent. En effet, ils se dissocient des liposomes à un taux qui est inversement relié à la longueur de la chaîne acyle du groupement céramide et qui peut varier de quelques minutes à plusieurs heures (Wheeler, 1999; Shi, 2002). Ainsi, le choix judicieux du dérivé PEG-céramide permet d'adapter une formulation de liposomes à un modèle expérimental donné (Hu, 2001). Suite au départ des chaînes de PEG, la charge positive nouvellement exposée favorise la capture cellulaire des complexes (Hu, 2002).

À part la simple PEGylation des lipoplexes, deux types de formulations intégrant lipides cationiques et PEG ont été développés afin de véhiculer des ODNs soit les « particules lipidiques antisens stabilisées » (« *stabilized antisense-lipid particles* », SALPs) et les « liposomes cationiques enrobés » (« *coated cationic liposomes* », CCLs). Les SALPs sont constituées d'un ODN encapsulé dans des liposomes composés de DSPC, de Chol et de 1,2-dioléoyl-3-diméthylammonium propane (DODAP), un lipide basique dont le pKa est de 6,6. Elles sont préparées en dissolvant les lipides et l'ODN dans un tampon contenant de l'éthanol ajusté à pH 4,0. À ce pH, le DODAP est chargé positivement et interagit avec l'ODN par interactions électrostatique. La préparation est ensuite dialysée contre un tampon à pH 7,6, ce qui résulte en l'obtention de liposomes pratiquement neutres contenant une grande quantité d'ODN (Semple, 2001). Afin de prévenir l'agrégation des liposomes, de la DSPE-PEG ou du PEG-céramide est inclus dans la formulation. Les CCLs, quant à eux, sont constitués d'un noyau formé par des lipoplexes DOTAP/ODN. Ce dernier est par la suite enrobé d'une couche de lipides neutres tels que la PC, le Chol et la DSPE-PEG par la technique d'évaporation en phase inversée (Stuart, 2000a). Les procédures utilisées pour incorporer les ODNs dans les SALPs et les CCLs résultent en des efficacités d'encapsulation supérieures à 70%. De plus, la taille de ces particules est inférieure à 200 nm ce qui permet leur administration par la voie i.v. Après avoir été injectées chez la souris, les deux formulations ont démontré des temps de circulation prolongés ($t_{1/2}$ =4.3 h et 12 h pour les SALPs et les CCLs, respectivement) comparé à l'ODN administré sous forme libre ($t_{1/2} < 1$ h) (Leonetti, 2001; Stuart, 2000b). Finalement, afin d'obtenir des formulations à la fois stables dans le sang et capturées de manière efficace par les cellules, différents ligands ont été fixés à l'extrémité des chaînes de PEG. Ces molécules de reconnaissance ont permis aux formulations de SALPs et de CCLs d'interagir spécifiquement avec les cellules d'intérêt *in vitro* (Zhou, 2002; Bartsch, 2005; Stuart, 2000b; Pagnan, 2000) et *in vivo* (Bartsch, 2002; Pastorino, 2003).

En conclusion, chacune des formulations lipidiques présentées possède ses avantages et ses inconvénients pour l'administration d'ODNs. Il est difficile d'identifier la meilleure formulation liposomale étant donné le manque d'études comparatives effectuées dans un même modèle expérimental. De plus, les comparaisons entre les différents

systèmes sont compliquées par le fait que la biodistribution et la pharmacocinétique des liposomes sont influencées par une multitude de facteurs tels que la taille, la charge de surface, la composition et la voie d'administration. Bien que les formulations ciblées de SALPs et surtout de CCLs semblent être prometteuses, leur efficacité *in vivo* n'a été évaluée qu'après l'administration d'une dose unique de liposomes. Par conséquent, les données recueillies jusqu'à maintenant ne permettent pas de connaître les répercussions de l'administration systémique de ces formulations à long terme.

5.2.2 Les vecteurs à base de polymères

Les polymères possèdent plusieurs atouts pour la vectorisation d'ODNs. En outre, ils peuvent être facilement adaptés à une application donnée par la variation de leur composition, de leur masse molaire ou par la présence de fonctions qui leur confèrent des propriétés physico-chimiques spécifiques ou qui permettent leur couplage à d'autres molécules. En vertu de ces caractéristiques, les vecteurs polymères sont sans aucun doute les plus versatiles disponibles sur le marché. Mentionnons toutefois que souvent, les polymères utilisés pour la vectorisation d'ODNs ne sont pas biodégradables. Dans ce cas, leur masse molaire doit être inférieure à 40 000 afin de permettre leur élimination de l'organisme par filtration glomérulaire (Seymour, 1987).

5.2.2.1 Conjugaison/complexation à des polymères cationiques

Les polymères cationiques possèdent des amines primaires, secondaires, tertiaires et/ou quaternaires ou encore d'autres types de groupements ionisables cationiques tels que des fonctions amidine qui leur permettent d'interagir avec les ODNs par interactions électrostatiques. Leur structure peut être linéaire, branchée ou dendritique. Les principaux polymères cationiques utilisés pour la vectorisation des ODNs sont décrits ci-dessous.

5.2.2.1.1 La poly(L-lysine)

Bien qu'elle possède une structure peptidique, la poly(L-lysine) (PLL) est incluse dans la catégorie des vecteurs polymères étant donné qu'il s'agit d'une macromolécule (masse molaire de 1000 à >300 000) constituée d'unités lysine répétitives (Fig. 5A). La PLL fut un des premiers polymères à être utilisé pour véhiculer de l'ADN. Les premières expériences ont été effectuées avec un ODN conjugué à la PLL de manière covalente. Pour ce faire, on procède à l'oxydation d'un résidu cytidine ajouté à l'extrémité 3' d'un ODN qu'on fait ensuite réagir avec une fonction amine primaire de la PLL. La conjugaison à la PLL a potentialisé l'activité antivirale d'ODNs dirigés contre le virus de la stomatite vésiculeuse (*Lemaitre, 1987*) et le VIH (*Stevenson, 1989; Degols, 1992*) *in vitro*. Les effets antiviraux obtenus ont été corrélés avec une augmentation de la capture cellulaire par endocytose du conjugué comparativement à l'ODN libre (*Leonetti, 1990*). Cependant, la PLL est pratiquement incapable d'induire la libération endosomale de l'ODN, ce qui peut expliquer sa plus faible efficacité de transfection comparativement à d'autres polycations. De plus, le polymère est cytotoxique, bien que sa toxicité soit moindre lorsqu'il est conjugué ou complexé à un ODN (*Lochmann, 2004*).

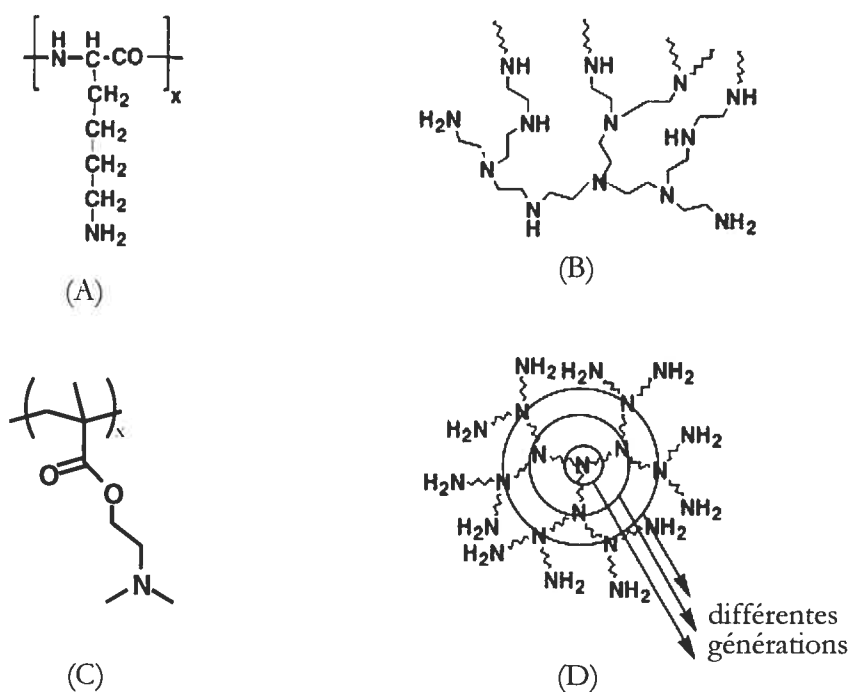


Figure 5. Principaux polymères cationiques utilisés pour la vectorisation d'ODNs. A) Poly(L-lysine), B) Poly(éthylèneimine), C) Poly(méthacrylate de 2-diméthylaminoéthyle), D) Dendrimère de poly(amidoamine).

Étant donné la faible activité antisens des conjugués ODN-PLL, des complexes contenant une molécule de reconnaissance ont été développés. Dans ces formulations, l'ODN est lié à un conjugué PLL-ligand par interactions électrostatiques. Ces vecteurs ont permis d'augmenter la capture cellulaire des ODNs et ce, de manière spécifique en ciblant des récepteurs exprimés préférentiellement sur certaines cellules. Des exemples de ligands utilisés à cet effet sont l'asialoglycoprotéine (*Wu, 1992*), des sucres tels que le mannose, le galactose et le fucose (*Liang, 1996; Stewart, 1996; Mabato, 1997*), l'acide folique (*Citro, 1994*), le facteur de croissance de l'épiderme (*Deshpande, 1996*) et la transferrine (*Wagner, 1990; Citro, 1992*) (voir Tableau 1). Mentionnons que bien que la présence d'un ligand améliore l'association cellulaire des complexes, elle ne règle généralement pas le problème de leur séquestration dans les endosomes.

La liaison covalente de la PLL au PEG et l'association de ces conjugués avec un ODN dans une solution saline provoque la formation de micelles possédant un rayon hydrodynamique d'environ 30 nm (*Kataoka, 1996*). Ces micelles sont formées suite à la neutralisation du segment PLL et de l'ODN par interactions électrostatiques. Cela conduit à la formation de complexes hydrophobes qui s'auto-assemblent en une architecture cœur-couronne, où le cœur polyionique est entouré d'une couronne de PEG qui rend le système soluble dans l'eau. Ces micelles protègent efficacement l'ODN de la dégradation par les nucléases (*Harada, 2001*). Cependant, elles se dissocient rapidement dans la circulation, libérant prématurément l'ODN. Diverses stratégies ont été tentées afin d'améliorer la stabilité du cœur micellaire. Par exemple, l'utilisation d'une PLL thiolée a permis la réticulation du cœur des micelles par formation de ponts disulfure (*Kakizawa, 2001*). Il est attendu que l'ODN soit libéré à l'intérieur des cellules suite au clivage de ces liens par le glutathion, un agent réducteur présent à forte concentration dans le cytoplasme. Cependant, afin de bénéficier de l'action du glutathion, les micelles doivent préalablement sortir de l'endosome. Rappelons que la PLL n'est pas un polymère endosomolytique et, par conséquent, il est probable qu'*in vitro*, l'activité antisens de ces micelles soit faible. D'autre part, des micelles formées par l'auto-assemblage d'un ODN et de PLLs greffées avec de courtes chaînes de poly[N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide] (PHPMA), un polymère hydrophile et flexible, ont démontré une bonne stabilité dans des conditions salines

physiologiques et en présence de sérum (Dautzenberg, 2001). Malheureusement, ce dernier concept n'a pas été évalué *in vitro*.

5.2.2.1.2 Le poly(éthylènimine)

Le poly(éthylènimine) (PEI) est probablement le vecteur polymère le plus efficace étudié jusqu'à maintenant pour administrer de l'ADN. Le PEI est une macromolécule aliphatique de structure plus ou moins branchée et contenant une très haute densité d'amines primaires, secondaires et tertiaires (Fig. 5B). À pH physiologique, 15-20% de ces amines sont protonées (Sub, 1994) ce qui permet au polymère de se lier efficacement aux ODNs par interactions électrostatiques. Les « polyplexes » résultants ont une taille inférieure à 50 nm (Brus, 2004a) et protègent efficacement les ODNs de la dégradation enzymatique (Brus, 2004b; Brus, 2002). Mentionnons toutefois que les complexes à base de PEI sont plutôt toxiques, ce qui a grandement limité leur utilisation *in vivo*.

Étant donné que seulement le cinquième des amines du PEI sont ionisées à pH neutre, le polymère possède une capacité tampon exceptionnelle à pH acide. Il a été suggéré que l'efficacité de transfection du PEI soit due à sa capacité à tamponner les endosomes (Bousif, 1995). En effet, après l'endocytose des polyplexes, les nombreuses amines du PEI capteraient les protons présents dans l'endosome. En réaction à l'ionisation des amines, des ions chlorure pénétreraient à l'intérieur de l'organelle, augmentant ainsi l'osmolarité. L'hypertonie créerait alors un appel d'eau, le gonflement, puis la déstabilisation de l'endosome. Cette propriété a été baptisée l'effet « éponge à protons » et a souvent été invoquée pour expliquer l'efficacité de transfection du PEI. Cependant, certaines expériences remettent sérieusement en question la validité de cette hypothèse. Par exemple, une étude récente a démontré qu'un PEI acétylé possédant une capacité tampon moindre que le polymère non modifié s'est avéré plus efficace pour transfecter des cellules en culture (Forrest, 2004). Le manque de corrélation entre la capacité tampon et l'efficacité de transfection a aussi été observé avec d'autres polymères cationiques (Funhoff, 2004; Kulkarni, 2005). D'autre part, des poly(méthacrylates) possédant une capacité tampon similaire à celle du PEI se sont avérés incapables de déstabiliser les endosomes (Dubrnel, 2004; Jones, 2004). Ainsi, il semble que la capacité tampon des polymères cationiques ne

puisse être systématiquement utilisée comme élément prédictif de leurs propriétés endosomolytiques.

Bien que le mécanisme d'action du PEI ne soit pas totalement élucidé, il n'en demeure pas moins que le polymère augmente l'association cellulaire et améliore la distribution intracellulaire des ODNs (*de Semir, 2002*), ce qui résulte en une potentialisation de leur activité antisens. L'efficacité du PEI *in vitro* a été démontrée chez plusieurs lignées cellulaires (*Boussif, 1995; Dheur, 1999; Kren, 1998*) et même dans des cultures primaires de neurones (*Boussif, 1995; Lambert, 1996*). Cependant, les complexes PEI/ODN sont instables en solution et forment des agrégats en quelques jours (*Brus, 2004a*). Ce problème peut être résolu par la formation de micelles suite au mélange d'un conjugué PEG-PEI et d'un ODN. En effet, la présence du PEG augmente la solubilité des complexes et minimise l'aggrégation, ce qui résulte en un système stable sur une période d'au moins 3 mois (*Vinogradov, 1998*). Glodde *et al.* ont analysé de manière détaillée les propriétés physico-chimiques de différents complexes PEG-PEI/ODN. Leur étude a révélé que la masse molaire du PEI ainsi que son degré de substitution en PEG sont des déterminants majeurs de la stabilité des complexes (*Glodde, 2006*). En effet, les complexes les plus stables sont obtenus avec des PEIs de faible masse molaire (*i.e.* ≤ 2000) contenant 10 mol% de PEG. Dans le même ordre d'idée, une étude réalisée par Fischer *et al.* a révélé que lorsque des polyplexes préparés avec un PEI substitué avec 50 mol% de PEG sont administrés par la voie i.v. chez la souris, l'ODN se dissocie rapidement du vecteur après injection (*Fischer, 2004*). La seule étude d'efficacité réalisée *in vivo* avec de tels complexes a été effectuée avec des PEI substitués avec 10 mol% de PEG. Les polyplexes ont été injectés par la voie intramusculaire chez la souris et ont augmenté localement l'activité de l'ODN dans les cellules musculaires squelettiques (*Williams, 2006*). Toutefois, étant donné la faible quantité de PEG incorporée dans ces complexes, il est possible que leur activité soit similaire à celle de particules non PEGylées. Malheureusement, la comparaison n'a pas été effectuée et il est donc difficile de porter ici un jugement objectif sur l'avantage de la PEGylation.

Dans un système semblable, le PEG est conjugué non pas au PEI, mais directement à l'ODN et des micelles sont par la suite obtenues par l'ajout de PEI. Ces systèmes ont été développés simultanément par les groupes de Kataoka (*Oishi, 2003*) et Park (*Jeong, 2003a*). Cependant, dans le premier cas, le PEG est lié à l'ODN au moyen d'un lien ester sensible

au pH ayant pour but de permettre le détachement de l'ODN dans l'endosome. L'avantage de la présence d'un tel lien reste à démontrer puisque ces micelles n'ont pas été évaluées *in vitro*. Les polyplexes développés par le groupe de Park, dans lesquels un lien amide stable unit le PEG à l'ODN, ont démontré, quant à eux, une bonne activité antisens *in vitro* et même *in vivo* (Jeong, 2003a; Jeong, 2005). Ainsi, dans ces exemples, la présence du PEG ne semble pas compromettre l'hybridation de l'ODN à son substrat. Cependant, une étude récente suggère que la présence d'un lien labile entre l'ODN et le PEG pourrait être souhaitable. En effet, lorsqu'un ODN est lié au PEG au moyen d'un pont disulfure clivable dans le cytoplasme des cellules par le glutathion, son activité antisens est augmentée de façon significative par rapport à celle d'un ODN lié au PEG au moyen d'un lien non labile (48 vs. 32% d'inhibition de la synthèse protéique, respectivement, $P < 0,05$) (Oishi, 2005).

Par ailleurs, des conjugués PEI-poloxamère (Pluronic[®]) ont été synthétisés et complexés à un ODN. Des particules micellaires de taille inférieure à 220 nm ont été formées et ont démontré une bonne stabilité en solution sur une période de 2 semaines (Vinogradov, 2004). Des polyplexes PEI-poloxamère/ODN ont été injectés par la voie s.c. chez des souris porteuses de tumeurs et se sont avérés efficaces en combinaison avec la radiothérapie conventionnelle pour augmenter l'activité anti-tumorale d'un ODN dirigé contre la protéine Ku86 (Belenkov, 2004). Il est intéressant de noter qu'en variant la longueur respective des segments de poly(oxyde de propylène) et de poly(oxyde d'éthylène), l'équilibre hydrophile-hydrophobe des poloxamères est modifié ce qui altère la biodistribution des polyplexes suite à leur administration systémique (Ochietti, 2002). Ces résultats suggèrent que les poloxamères pourraient être utilisés afin de favoriser l'accumulation préférentielle de l'ODN dans certains organes.

5.2.2.1.3 Les poly(méthacrylates)

Les poly(méthacrylates) cationiques peuvent être synthétisés de manière contrôlée avec un faible indice de polymolécularité et en une variété de structures (Vamvakaki, 1999). De plus, leur toxicité est plus faible que celle d'autres polycations (Deshpande, 2002). Le principal représentant de cette classe, le poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle) (PDMAEMA, Fig. 5C) est suffisamment ionisé à pH physiologique pour former des

complexes avec les ODNs (*Van Rompaey, 2001; Deshpande, 2002*). Cependant, étant donné l'instabilité de ces complexes en solution, la plupart des études ont été effectuées avec des conjugués PDMAEMA-PEG. De manière générale, la présence de PEG stabilise les complexes, minimise l'agrégation et augmente l'affinité du PDMAEMA pour l'ODN (*Deshpande, 2002; Jin, 2005*). La liaison de l'ODN à un conjugué de structure dibloc conduit à la formation de micelles possédant une architecture cœur-couronne (*Deshpande, 2002*). Il est intéressant de noter que ces micelles peuvent également être obtenues lorsqu'une molécule de reconnaissance telle que la biotine est fixée à l'extrémité de la chaîne de PEG (*Dufresne, 2005*).

In vitro, l'efficacité d'un copolymère composé de PDMAEMA-*bloc*-méthacrylate d'aminoéthyle (PDAEMA-*b*-AEMA, 92:8 mol%) dans lequel 25 mol% des unités AEMA ont été substituées avec du PEG 5000 a été évaluée suite à sa complexation avec un ODN dirigé contre l'ICAM-1. Après incubation des complexes (ratio polymère/ODN 4:1 *p/p*) avec des cellules humaines de carcinome pulmonaire (lignée A549), l'expression de la protéine a été réduite de façon significative (*Lucas, 2004*). Toutefois, étant donné l'excès de polymère et la faible quantité de PEG, il est probable que ces complexes soient chargés positivement. Une charge positive favorise la capture cellulaire *in vitro*, mais n'est pas souhaitable pour des applications *in vivo*. En l'occurrence, des polyplexes formés avec un copolymère de poly(triméthylammonioéthyl méthacrylate)-*bloc*-PHPMA et possédant une charge positive résiduelle (+20 mV) ont été administrés par voie la i.v. chez la souris et se sont avérés instables dans la circulation (*Read, 2000*). Ces résultats indiquent que les complexes ODN-poly(méthacrylates) ont besoin d'être optimisés pour une administration systémique. Étant donné le petit nombre d'études réalisées avec ces polyplexes *in vitro* et *in vivo*, il est présentement difficile de statuer sur le potentiel thérapeutique de ces vecteurs.

5.2.2.1.4 Les dendrimères de poly(amidoamine)

Les dendrimères de poly(amidoamine) (PAMAM) sont des polymères sphériques et hautement branchés disponibles commercialement sous forme intacte (Polyfect®) ou fragmentée (Superfect®). Ces molécules possèdent un nombre défini de groupements amine qui croît avec le nombre de générations (Fig. 5D). Étant donné la forte densité

d'amines en périphérie, ils forment des complexes très stables avec les ODNs (Delong, 1997; Yoo, 1999). Leur mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé mais on croit que, similairement au PEI, ils préviennent l'acidification des endosomes (Merdan, 2002). Les dendrimères de PAMAM ont une faible toxicité, protègent les ODNs de la dégradation, augmentent leur capture cellulaire et améliorent leur distribution intracellulaire et ce, même en présence de sérum (Bielinska, 1996; Delong, 1997; Helin, 1999b, 1999a). Étonnamment, l'ODN et le dendrimère seraient toujours associés lorsqu'ils pénètrent dans le noyau des cellules (Yoo, 2000), ce qui implique que la présence du dendrimère n'interfererait pas avec la liaison de l'ODN à l'ARNm (Bielinska, 1996). *In vitro*, l'utilisation des dendrimères a permis d'inhiber la synthèse protéique avec des concentrations en ODN de l'ordre du nanomolaire (Helin, 1999a) et même du picomolaire (Bielinska, 1996). Cependant, la performance des polyplexes dendrimères de PAMAM/ODN s'est avérée décevante chez l'animal. En effet, dans une étude réalisée chez des souris ayant des tumeurs disséminées dans la cavité péritonéale, des dendrimères de quatrième génération (G4) ont été complexés à un ODN radioactif modèle. L'accumulation i.t. de l'ODN a été évaluée par scintigraphie pendant 24 h après injection i.p des complexes. Les résultats ont montré que l'ODN s'accumule dans les tumeurs sur une période de 2 h mais que, par la suite, les niveaux intratumoraux diminuent progressivement (Sato, 2001). Ces résultats suggèrent qu'*in vivo*, les complexes ODN-dendrimères sont instables et se dissocient avec le temps. Il s'agit là d'un très bon exemple illustrant le fait que l'efficacité des vecteurs *in vitro* n'est pas garante de leur succès *in vivo*.

5.2.2.2 Les conjugués macromoléculaires

Le couplage d'un ODN à un polymère a pour objectif d'améliorer la résistance à la dégradation enzymatique et d'augmenter les temps de circulation. La macromolécule la plus utilisée à cet effet est le PEG. Ce dernier possède plusieurs propriétés favorables. Il est non toxique, non immunogène et disponible commercialement en une variété de masses molaires. Le PEG peut être introduit à l'extrémité 3' ou 5' des ODNs (Jaschke, 1994). *In vitro*, les conjugués PEG-ODN PO (masse molaire du PEG = 10-12 000) inhibent la synthèse protéique alors qu'à concentration équivalente, l'ODN libre n'a aucun effet

(Bonora, 1998; Rapoport, 2002). Cette efficacité peut être attribuée à l'accumulation intracellulaire d'une plus grande quantité d'ODNs intacts. En effet, le PEG augmente la résistance des ODNs à la dégradation enzymatique et ce, sans compromettre leur capacité d'hybridation à leur substrat (Bonora, 1997) ni l'activation de la RNase H (Vorobjev, 1999). Toutefois, étant donné la faible capture cellulaire et la piètre quantité d'ODNs parvenant à s'échapper des endosomes, l'administration de fortes doses est nécessaire pour engendrer un effet (*i.e.* 10-15 μM). Similairement, lorsqu'un ODN est couplé au PHPMA, un autre polymère flexible et hydrophile, le conjugué est faiblement capturé par les cellules et se retrouve en grande partie séquestré dans les endosomes (Wang, 1998; Jensen, 2002). Par conséquent, une concentration en ODN $> 8 \mu\text{M}$ est nécessaire afin d'inhiber dans une proportion de 90% l'activité du virus de l'hépatite B dans des cellules infectées (Jensen, 2002). Puisque l'ODN libre n'a eu aucun effet et ce, jusqu'à une concentration de 10 μM , l'activité du conjugué peut être attribuée à la stabilisation de l'ODN par le PHPMA. D'autre part, le couplage d'un ODN au poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) a également augmenté sa résistance aux nucléases (Murata, 2003a). Cependant, l'efficacité d'un tel conjugué dépend de la température. En effet, le PNIPAM est caractérisé par un point trouble qui se situe à environ 32°C en solution aqueuse (Heskins, 1968). Au-dessus de cette température, le polymère précipite. Par conséquent, un ODN lié au PNIPAM ne peut s'hybrider à son substrat qu'à une température inférieure à la température de transition (Murata, 2003b; Murata, 2003a). Les applications *in vivo* d'un tel vecteur sont donc extrêmement limitées, à moins que des modifications ne soient apportées au polymère de manière à modifier sa température de transition de phase (Taylor, 1975; Hirotsu, 1987; Chen, 1995; Kim, 1994; Dong, 1991).

À ce jour, seulement deux études ont fourni des données pharmacocinétiques sur les conjugués macromoléculaires. Les temps de circulation d'un ODN couplé en position 5' à un PEG 10 000 ou 20 000 ont été évalués après administration *i.v.* chez la souris. Les résultats ont montré que le conjugué circule de 3,5 à 5 fois plus longtemps que l'ODN libre (Zhao, 2005; Kawaguchi, 1995). Cependant, les temps de demi-vie plasmatiques demeurent courts (*i.e.* $< 45 \text{ min}$) et, par conséquent, l'impact de la présence du PEG sur l'efficacité de l'ODN après administration systémique reste à déterminer. Bien que cela n'ait pas encore été investigué dans la littérature, il est fort probable que ce type de vecteurs bénéficierait de

l'ajout d'une molécule de reconnaissance afin de minimiser les interactions non spécifiques et d'augmenter la capture cellulaire.

5.2.2.3 Les nanoparticules

Les nanoparticules sont des systèmes colloïdaux ($< 1 \mu\text{m}$) généralement préparés à partir de polymères. Selon le procédé de fabrication utilisé, des nanosphères ou des nanocapsules peuvent être obtenues. Les nanosphères sont des systèmes matriciels dans lesquels le principe actif est soit dispersé dans la masse de la particule ou encore adsorbé à sa surface. Les nanocapsules, quant à elles, sont des systèmes vésiculaires contenant un cœur aqueux ou huileux à l'intérieur duquel le principe actif est confiné. Lorsqu'administrées de façon systémique, les nanoparticules modifient la biodistribution des principes actifs qu'elles transportent. En effet, elles sont capturées principalement par les macrophages du foie et, dans une moindre mesure, par ceux de la rate, des poumons et de la moelle osseuse (Lenaerts, 1984; Nakada, 1996). Les nanoparticules pénètrent dans ces cellules par un processus d'endocytose/phagocytose et, par conséquent, se retrouvent ultimement dans des lysosomes ou des phagosomes (Fattal, 1998). Si elles ont été préparées avec un polymère biodégradable, elles seront alors dégradées en composés de faible masse molaire qui seront expulsés de la cellule et éliminés de l'organisme par excrétion rénale. Étant donné leur biodistribution et leur localisation intracellulaire, il semble que les nanoparticules soient peu adaptées au transport d'ODNs. Cependant, ces vecteurs possèdent plusieurs avantages. Ils peuvent être préparés à partir de matériaux non toxiques et biodégradables, augmentent substantiellement la capture cellulaire des ODNs et souvent les protègent de la dégradation enzymatique. De plus, afin de diminuer la capture par le SPM, des chaînes de PEG peuvent être ancrées à la surface des nanoparticules (Gref, 1994; Bazile, 1995).

La vectorisation d'ODNs a surtout été effectuée avec des nanosphères. Ces dernières peuvent être préparées à partir de divers matériaux tels que des poly(cyanoacrylate d'alkyle) (PACA) (Fattal, 1998), du poly(D,L-acide lactique) (PLA) (Berton, 1999; Berton, 2001), du poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLA-PLGA) (Aukunuru, 2003), du poly(styrène) (Fritz, 1997), des poly(méthacrylates) cationiques (Zobel, 2000), de l'alginate

(Aynie, 1999) ou de l'albumine (Arnedo, 2004; Wartlick, 2004). Certains de ces systèmes présentent toutefois des inconvénients majeurs. Par exemple, le poly(styrène) et les poly(méthacrylates) sont des polymères non biodégradables et insolubles en milieu aqueux. À l'opposé, les particules d'albumine se dégradent très rapidement et ne protègent donc pas efficacement l'ODN de la dégradation enzymatique. D'autre part, les particules d'alginate s'agglomèrent après injection i.v. ce qui résulte en leur accumulation massive dans les poumons. Ainsi, les systèmes les plus prometteurs sont les nanosphères préparées avec du PLA, du PLA-PLGA et des PACA.

Ce sont les nanosphères à base de PACA qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'études. La plupart du temps, l'ODN est adsorbé à leur surface par l'intermédiaire d'un composé chargé positivement tel que le bromure de cétyltriméthylammonium (BCTA) (Chavany, 1992; Chavany, 1994) ou le diéthylaminoéthyle-dextrane (DEAE-dextrane) (Zobel, 1997). Alors que le BCTA interagit avec des nanosphères pré-formées, le DEAE-dextrane est ajouté au mélange réactionnel avant le processus de polymérisation. Les nanosphères obtenues au moyen des deux stratégies diminuent la sensibilité des ODNs à la dégradation enzymatique. Cependant, étant donné que le DEAE-dextrane est associé plus fermement avec la matrice polymère que le BCTA, les nanosphères ODN/DEAE-dextrane sont plus stables en présence de sérum (Lambert, 2001). D'autre part, suite à leur capture cellulaire, les ODNs adsorbés sur les nanosphères préparées avec du BCTA, mais pas du DEAE-dextrane, sont détectés dans le cytoplasme des cellules. Le mécanisme de la libération endosomale n'est pas bien compris, mais il se pourrait que les propriétés tensio-actives du BCTA augmentent la perméabilité de l'endosome. *In vitro*, un ODN adsorbé sur des nanosphères de poly(cyanoacrylate d'isohexyle) a inhibé sélectivement la prolifération de cellules exprimant l'oncogène *Ha-ras* et ce, à des concentrations 100 fois inférieures à l'ODN libre (Schwab, 1994). Ce système a aussi démontré une activité antitumorale *in vivo* après injection s.c. chez des souris immunosupprimées porteuses de xénogreffes humaines (Schwab, 1994).

Après administration i.v., les ODNs adsorbés à la surface des nanosphères de PACA ne sont pas efficacement protégés de la dégradation enzymatique et subissent une désorption partielle induite par certaines protéines présentes dans le plasma (Nakada, 1996). Pour pallier à ce problème, les ODNs peuvent être incorporés dans la matrice polymère,

comme c'est le cas avec les nanosphères de PLA et de PLA-PLGA, ou encore dans le cœur de nanocapsules. L'encapsulation d'ODNs dans des nanocapsules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle) (PIBCA) possédant un cœur aqueux a été réalisée avec une efficacité d'incorporation d'environ 70% (Lambert, 2000b). Tout comme les nanosphères, les nanocapsules augmentent la capture cellulaire et améliorent la distribution intracellulaire des ODNs par un mécanisme qui pourrait encore ici impliquer l'action des détergents utilisés dans le procédé de fabrication (Tonb, 2005). *In vivo*, un ODN PS incorporé dans des nanocapsules de PIBCA a inhibé efficacement la croissance de tumeurs associées au sarcome d'Ewing chez la souris immunosupprimée après injection i.t. d'une dose cumulative aussi faible que 14,4 nanomoles (Lambert, 2000a). Dans une autre étude utilisant le même modèle animal, l'efficacité de ces nanocapsules s'est avérée comparable à celle de nanosphères préparées avec du BCTA (Maksimenko, 2003). Mentionnons qu'aucune étude n'a évalué la capacité des nanocapsules à protéger l'ODN de la dégradation enzymatique suite à une administration systémique.

5.2.2.4 Les microsphères

Les microsphères sont des systèmes particulières semblables aux nanosphères mais dont la taille varie entre 1 et 1000 μm . Elles sont le plus souvent préparées avec des polymères biodégradables. Au fur et à mesure que le polymère se dégrade, les molécules dispersées dans la matrice polymère sont libérées par diffusion. Ainsi, la vitesse de désintégration des microsphères détermine le taux de libération du principe actif. Étant donné la taille des particules ($> 1 \mu\text{m}$), les microsphères ne peuvent être injectées par voie i.v. et sont surtout implantées localement suite à une injection s.c., intramusculaire ou intrathécale (Khan, 2000). Par conséquent, elles sont surtout utilisées comme formulations dépôt pour administrer une molécule à un site spécifique ou libérer progressivement un principe actif dans la circulation. Les ODNs, qui ont une courte demi-vie dans le plasma, peuvent grandement bénéficier de l'incorporation dans un système à libération contrôlée telles que les microsphères. En effet, comparativement à l'administration d'ODNs sous forme libre, un nombre moindre d'injections et une dose plus faible sont requis pour obtenir un effet, ce qui diminue le risque de toxicité et d'effets non spécifiques (Putney, 1999).

Des mélanges PLA-PLGA sont le plus souvent utilisés pour la préparation des microsphères. Ces polymères sont non toxiques, non immunogènes, biocompatibles et inertes. De plus, la variation du ratio PLA:PLGA permet d'obtenir des taux de dégradation s'échelonnant sur une période de quelques jours à quelques mois. Les microsphères de PLA-PLGA protègent les ODNs de la dégradation enzymatique et, bien que leur préparation nécessite l'emploi de solvants, il a été démontré que le procédé de fabrication n'affecte pas l'activité biologique des ODNs (Lewis, 1998). Lorsque des ODNs sont administrés à l'aide de microsphères de PLA-PLGA, ils sont décelés dans le cytoplasme et le noyau des cellules (Akhtar, 1997; Khan, 2000). Cette distribution favorable serait simplement la conséquence de leur accumulation intracellulaire avec le temps. En effet, la diffusion lente mais constante hors des microsphères favoriserait la capture cellulaire d'une plus grande quantité totale d'ODN que lorsque des doses équivalentes d'ODNs non encapsulés sont administrées. Les microsphères potentialiseraient donc l'activité des ODNs *in vitro* (Cleek, 1997) et *in vivo* (Khan, 2000; Putney, 1999) à la fois en les protégeant de la dégradation et en les libérant progressivement dans le milieu environnant.

Afin de maximiser la capture cellulaire des ODNs, des complexes ODN/PEI ont été encapsulés dans des microsphères de PLA-PLGA (De Rosa, 2002a; De Rosa, 2002b). Le PEI améliore radicalement l'efficacité d'incorporation de l'ODN dans les microsphères (*i.e.* de 40 à 80%) et augmente substantiellement sa pénétration intracellulaire de même que son accumulation dans le noyau des cellules. La porosité des microsphères, et par conséquent le profil de libération des complexes, varie selon le ratio PEI:ODN et la quantité de sel présente dans la phase aqueuse externe lors du processus d'émulsification (De Rosa, 2003). Des microsphères contenant du PEI complexé à un ODN dirigé contre le facteur de croissance transformant β ont été administrées par la voie subconjonctivale chez le lapin et se sont avérées efficaces afin de prévenir la fibrose post-chirurgicale induite par la chirurgie filtrante effectuée dans le traitement du glaucome (Gomes dos Santos, 2006). À ce jour, il s'agit de la seule étude réalisée *in vivo* à l'aide d'un système combinant les avantages de la libération prolongée et d'une capture cellulaire accrue. Par ailleurs, d'autres types de microsphères ont été élaborés afin de véhiculer des ODNs. Par exemple, des microsphères d'alginate réticulées avec de la PLL en présence de calcium libèrent l'ODN progressivement sur une période de 24 h (Gonzalez Ferreira, 2002a). De plus, elles augmentent la

biodisponibilité d'un ODN de 25% après administration intrajéjunale chez le rat sous forme de poudre lyophilisée mais ce, seulement en présence de promoteurs d'absorption (*Gonzalez Ferreira, 2002b*). D'autre part, des microsphères de gélatine ont été produites par une technique de coacervation en présence d'ODN (*Cortesi, 1994*). Bien que les taux d'incorporation surpassent ceux des microsphères d'alginate (80% *vs.* 30-40%, respectivement), l'ODN est libéré trop rapidement (>60% en 5 h) pour qu'elles puissent constituer une approche thérapeutique viable.

En conclusion, malgré le fait que plusieurs polymères aient été évalués pour véhiculer des ODNs, la grande majorité possède des inconvénients qui les rendent impropres à l'utilisation clinique. La mauvaise performance de ces vecteurs est souvent la conséquence de leur incapacité à franchir les barrières extra et intracellulaires rencontrées suite à une administration systémique. Fort heureusement, les mécanismes d'action des différents polymères sont de mieux en mieux compris et de plus en plus d'information est disponible sur leurs relations structure-activité. Ces connaissances permettent déjà d'identifier plus clairement les attributs que doivent posséder les vecteurs polymères et mèneront probablement, dans les prochaines années, à l'élaboration de molécules et/ou de systèmes mieux adaptés aux conditions prévalant dans l'organisme.

5.2.3 Les vecteurs à base de peptides

Plusieurs peptides ont été complexés ou conjugués à des ODNs afin d'augmenter leur activité biologique. Certains de ces peptides ont été étudiés pour leurs propriétés endosomolytiques, alors que d'autres ont été investigués pour leur capacité à transporter directement l'ODN dans le cytoplasme des cellules. Le mécanisme d'action de la plupart des vecteurs peptidiques est inspiré de celui de certaines protéines virales. D'ailleurs, plusieurs d'entre eux sont d'origine virale, alors que d'autres ont une nature totalement artificielle. Les différents types de peptides utilisés pour la vectorisation d'ODNs sont décrits dans les prochaines sections. La PLL ne sera pas abordée ici étant donné qu'elle a déjà été décrite dans la section sur les vecteurs polymères.

5.2.3.1 La protamine

La protamine est un peptide cationique riche en résidus arginine capable de former spontanément par interactions électrostatiques des complexes très stables avec les ODNs. La totalité de l'ODN est complexée lorsque le ratio massique protamine:ODN est supérieur à 2 (Junghans, 2000). Les complexes, appelés « proticules », ont alors une charge de surface positive, une taille de 100-200 nm et protègent l'ODN de la dégradation enzymatique (Junghans, 2001). Lorsque des proticules contenant un ODN dirigé contre l'oncogène *c-myc* sont incubées avec des cellules U937, une diminution significative, mais modérée (*i.e.* 30-40% par rapport à l'ODN libre) de la prolifération cellulaire est observée (Junghans, 2000). Ainsi, la protamine est capable de promouvoir le passage de l'ODN de l'endosome au cytoplasme, mais son effet est modeste. Cela peut être expliqué par le fait que les proticules présentent certains inconvénients. En effet, elles s'agrègent en quelques heures en présence de sels et la dissociation intracellulaire de l'ODN et de la protamine est faible et ce, surtout lorsque les complexes sont préparés avec des dérivés PS (Dinauer, 2004). Pour pallier à ces problèmes, de l'albumine a été introduite dans les complexes. Cette dernière agit comme colloïde protecteur et freine l'agrégation en présence de sels (Lochmann, 2005). *In vitro*, les nanoparticules albumine-protamine-ODN sont peu toxiques, se dissocient plus facilement dans les cellules que les proticules et leur activité est comparable à celle de liposomes DOTAP/ODN (Weyermann, 2005). La performance de ces particules reste toutefois à déterminer chez l'animal. Mentionnons finalement qu'un peptide dérivé de l'adénovirus, baptisé peptide μ , possède une affinité pour les ODNs similaire à celle de la protamine et pourrait constituer une alternative intéressante pour le transport d'acides nucléiques (Keller, 2002).

5.2.3.2 Les peptides fusogènes pH-sensibles

Les peptides fusogènes perméabilisent les membranes en fonction du pH suite à un changement de conformation et, par conséquent, peuvent être utilisés afin de déstabiliser les endosomes. Les premiers travaux conduits à cet effet ont été accomplis par le groupe de

Szoka à la fin des années 80 avec le GALA, un peptide artificiel constitué d'unités répétitives glycine-alanine-leucine-alanine. Le GALA subit un changement de conformation lors d'une diminution du pH (Subbarao, 1987). À pH neutre, le peptide est soluble et possède une conformation aperiodique. Cependant, lorsque le pH est abaissé à une valeur de 5,0, la neutralisation des résidus acide glutamique entraîne la formation d'une hélice α bipolaire capable de déstabiliser les membranes (Parente, 1990, 1988). Étant donné son caractère anionique à pH neutre, le GALA ne peut former de complexes avec les acides nucléiques. La co-incubation du peptide et d'un ODN avec des cellules en culture n'a entraîné qu'une modeste augmentation de l'activité antisens (*i.e.* 35-40%) (Hughes, 1996). Le remplacement des résidus glycine par des lysine a permis de concevoir le KALA, un peptide cationique qui passe d'une conformation hélice α à pH 7,5 à un mélange de conformation aperiodique et d'hélice α à pH 5,0 (Wyman, 1997). Ce peptide peut former des complexes avec les ODNs à pH physiologique et facilite leur accumulation dans le noyau des cellules à un ratio de charges [+/-] de 10/1. Le KALA a également été complexé avec un ODN couplé à une chaîne de PEG de manière à former des micelles (Jeong, 2003b). Ces dernières ont été capturées plus efficacement que l'ODN libre par des cellules musculaires lisses murines (lignée A7R5) et ont exercé une activité antiproliférative accrue en inhibant l'expression de l'oncogène *c-myc*. Cependant dans cette étude, aucun contrôle n'a été effectué avec des micelles non fusogènes et il est donc difficile d'attribuer sans équivoque l'activité antisens des micelles aux propriétés fusogènes du KALA.

D'autre part, un peptide fusogène issu de l'extrémité N-terminale de la sous-unité HA-2 de l'hémagglutinine du virus de l'influenza a été couplé à un ODN dirigé contre la protéine Tat du VIH (Bongartz, 1994). Après la capture du conjugué par un processus qui semble impliquer l'endocytose, l'activité antivirale de l'ODN a été augmentée de 5 à 10 fois dans des lymphocytes infectés. Cependant, l'inhibition n'était pas spécifique à la séquence de l'ODN et le peptide possédait en lui-même des propriétés antivirales.

5.2.3.3 Les peptides de translocation

Les peptides de translocation « *cell penetrating peptides*, CPPs » ont été investigués pour leur capacité à pénétrer dans les cellules en passant directement à travers la membrane

cytoplasmique. En effet, les premières études, qui ont suscité un engouement énorme, suggéraient que, contrairement aux peptides fusogènes, les CPPs empruntent une voie indépendante de l'endocytose pour atteindre le cytosol. Cependant, la validité de ces résultats est actuellement remise en question suite à la parution de plusieurs études dans lesquelles une ré-évaluation du mécanisme d'entrée cellulaire des CPPs a été effectuée (Richard, 2003; Lundberg, 2002; Lundberg, 2003; Drin, 2003). Ces études suggèrent fortement l'implication d'un processus d'endocytose et semblent indiquer que les premiers résultats obtenus seraient en réalité des artéfacts associés aux techniques expérimentales employées pour observer les cellules. En l'occurrence, la fixation des cellules affecterait la perméabilité de la membrane cytoplasmique et, par conséquent, entraînerait l'accumulation d'une plus grande quantité de peptides dans le cytoplasme et le noyau. Plusieurs formes d'endocytose pourraient être impliquées dans la capture cellulaire des CPPs telles que l'endocytose facilitée par la clathrine, l'endocytose cavéolaire et la macropinocytose (Nori, 2005). À cause du grand nombre de résultats contradictoires et étant donné que des variations sont observées selon le type de peptide et de cellules utilisés, le mécanisme d'entrée cellulaire des CPPs fait encore aujourd'hui l'objet de controverses (Trebin, 2004).

Parmi les CPPs, les peptides Tat, la pénétratine, et le peptide VP22 ont été les plus étudiés pour le transport d'ODNs. Ces peptides ont tous une origine virale. Les peptides Tat sont des versions tronquées de la protéine virale Tat qui est impliquée dans la transcription nucléaire du VIH. Ce peptide est rapidement capturé par les cellules et s'accumule dans le noyau de ces dernières grâce à une séquence de signalisation nucléaire (« *nuclear localization sequence* », NLS) (Vives, 1997a; Vives, 1997b). La pénétratine est un peptide de 16 acides aminés issu du facteur de transcription *Antennapedia* de *Drosophila*. Il s'agit de la plus courte séquence de la protéine capable d'interagir avec les membranes (Derossi, 1994). Finalement, le VP22 est un facteur de transcription du virus *Herpes simplex* qui interagit avec la chromatine et d'autres éléments du cytosquelette. Une fois à l'intérieur des cellules, ce peptide s'accumule aussi dans le noyau malgré le fait qu'il soit dépourvu d'une NLS (Elliott, 1997).

Un ODN dirigé contre la glycoprotéine P et couplé de manière covalente au Tat ou à la pénétratine a bloqué l'expression de la protéine à des concentrations submicromolaires dans des cellules murines 3T3 (Astria-Fisher, 2000). Mentionnons que les deux mêmes

types de conjugués ont également démontré une activité antisens lorsqu'incubés avec des cellules HeLa (*Astriab-Fisher, 2002*). D'autre part, les conjugués ODN-pénétratine sont aussi efficaces pour inhiber la synthèse protéique dans des cellules neuronales. En effet, un ODN dirigé contre le précurseur du peptide β -amyloïde a démontré une activité antisens à des concentrations aussi faibles que 75 nM dans des cultures primaires de neurones (*Allinquant, 1995*). Dans un autre exemple, un ODN a entraîné la mort de cellules neuronales PC-12 en inhibant l'expression de la superoxyde dismutase Cu/Zn (*Troy, 1996*).

À la différence des deux autres peptides, les 8 acides aminés à l'extrémité C-terminale du peptide VP22 peuvent se lier à des ODNs marqués à la fluorescéine et former des particules sphériques de 0,3 à 1,0 μm de diamètre appelées « vectosomes » (*Normand, 2001*). Les particules seraient probablement obtenues par interactions électrostatiques. Les vectosomes pénètrent dans les cellules sur une période de 2 à 4 h et tendent à demeurer stables dans le cytoplasme pendant plusieurs jours. Cependant, l'irradiation du complexe avec de la lumière provoque le détachement de l'ODN qui s'accumule alors rapidement dans le noyau des cellules. Le mécanisme d'activation du complexe n'est pas vraiment compris, mais on sait qu'il requiert la présence d'un fluorochrome lié de façon covalente à l'ODN ou au peptide. Il a été proposé que l'excitation du fluorochrome présent à forte concentration dans les particules induirait la formation de molécules réactives pouvant déstabiliser le complexe et/ou la membrane de l'organelle dans laquelle ils se trouvent. L'activation des vectosomes augmente l'activité antiproliférative d'un ODN dirigé contre l'oncogène *c-raf1* dans des cellules A549 en culture (*Normand, 2001*). Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo*, où l'injection des particules par voie i.t. chez des souris immunosupprimées porteuses de xénogreffes humaines a entraîné l'inhibition de la croissance tumorale suite à leur irradiation (*Zavaglia, 2003*). Mentionnons finalement que la formation de complexes ioniques entre un ODN et un peptide nommé MPG a également été rapportée (*Morris, 1997; Deshayes, 2004*). Ce peptide de 27 acides aminés est pourvu d'une NLS chargée positivement. Les complexes MPG/ODN se forment spontanément et sont rapidement transportés dans le noyau de cellules en culture. Toutefois, l'activité de ces complexes n'a pas encore été évaluée.

En conclusion, malgré le fait que quelques études suggèrent que les conjugués ODN-peptides pénètrent dans certaines cellules au moyen d'un mécanisme indépendant de l'endocytose, il semble de plus en plus clair que l'élaboration d'un peptide capable d'éviter systématiquement la voie endosomale n'est pas réalisable. La littérature sur les vecteurs peptidiques est truffée de résultats conflictuels et il est pour l'instant difficile d'identifier clairement les attributs que doit posséder un peptide pour véhiculer efficacement des ODNs. Afin de faire progresser la recherche, plus d'études devront évaluer à la fois la capture cellulaire et l'activité biologique de complexes/conjugués ODN-peptide et ce, dans plusieurs lignées cellulaires. De plus, des données additionnelles devront être disponibles concernant les relations structure-activité des conjugués et finalement, la toxicité des peptides devra être évaluée en portant une attention particulière à leur potentiel immunogène. L'acquisition de ces connaissances est une condition *sine qua non* à l'utilisation rationnelle des peptides à des fins thérapeutiques.

6. Conclusion

Bien que les ODNs soient conceptuellement des molécules thérapeutiques prometteuses, de nombreux obstacles ont freiné leur développement clinique. Les dérivés PO ont une activité pharmacologique limitée étant donné leur sensibilité à la dégradation enzymatique. L'élaboration d'analogues chimiquement modifiés a partiellement ou totalement comblé cette lacune, mais les problèmes de faible capture cellulaire et d'interactions non spécifiques demeurent toujours non résolus. Une approche complètement différente consiste à incorporer les ODNs modifiés ou non dans différents types de vecteurs. En plus d'augmenter la résistance à la dégradation, la capture cellulaire et la biodisponibilité intracellulaire, un vecteur idéal devrait réduire le risque d'interactions non spécifiques et modifier favorablement le profil pharmacocinétique et la biodistribution des ODNs. À ce jour cependant, aucun système ne répond à tous ces critères. Cela peut être expliqué en partie par le fait qu'énormément d'efforts ont été consacrés à l'optimisation des vecteurs *in vitro*, alors que la plupart des applications *in vivo* requièrent des systèmes possédant des propriétés complètement différentes.

L'incapacité des ODNs à atteindre leur site d'action à l'intérieur de la cellule en quantité suffisante est l'une des principales raisons qui explique l'inefficacité des vecteurs synthétiques. La grande majorité d'entre eux pénètre dans les cellules par un mécanisme d'endocytose (Khalil, 2006). Par conséquent, un vecteur ne pouvant favoriser le passage de l'ODN de l'endosome au cytoplasme aura peu d'effet sur son activité et ce, même s'il remplit tous les autres critères mentionnés précédemment. Bien qu'il ait été démontré que des macromolécules telles le PEI et certains peptides fusogènes peuvent déstabiliser la membrane endosomale, leur application *in vivo* est limitée étant donné la toxicité du premier et le potentiel immunogène des seconds. Une alternative intéressante consiste en l'utilisation de macromolécules synthétiques anioniques. En effet, certains polymères dérivés de l'acide acrylique ou méthacrylique (MAA) sont capables de déstabiliser les membranes lipidiques suite à un changement de conformation induit par une diminution du pH. En effet, en milieu acide, la protonation des groupements acide carboxylique augmente l'hydrophobie du polymère qui peut alors interagir efficacement avec les membranes et entraîner leur déstabilisation. Les copolymères de MAA sont abordés dans une revue de littérature placée en deuxième partie de cette introduction dans laquelle sont décrits les principaux polyanions sensibles au pH, leur interaction avec les membranes lipidiques et leur incorporation dans différents systèmes d'administration de médicaments. Ces polymères constituent le sujet central de cette thèse qui est divisée en 3 manuscrits. Le premier manuscrit consiste en une analyse des propriétés physico-chimiques d'une série de copolymères de MAA afin d'identifier les caractéristiques que doit posséder un polymère afin d'interagir efficacement avec les membranes à pH acide tout en étant inerte et non toxique à pH physiologique. Dans le deuxième manuscrit, la capacité d'un copolymère de MAA à favoriser le passage d'un ODN de l'endosome au cytoplasme est confirmée *in vitro*. Finalement, le dernier manuscrit démontre que le copolymère et l'ODN peuvent être incorporés dans un système micellaire possédant une architecture cœur-couronne et présentant des caractéristiques prometteuses pour des applications *in vivo*.

Références

- Abe T., Suzuki S., Hatta T., Takai K., Yokota T. and Takaku H. (1998). Specific inhibition of influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein gene expression by liposomally encapsulated antisense phosphorothioate oligonucleotides in MDCK cells. *Antivir Chem Chemother* 9: 253-262.
- Aboul-Fadl T. (2005). Antisense oligonucleotides: the state of the art. *Curr Med Chem* 12: 2193-2214.
- Agrawal S., Jiang Z., Zhao Q., Shaw D., Cai Q., Roskey A., Channavajjala L., Saxinger C. and Zhang R. (1997). Mixed-backbone oligonucleotides as second generation antisense oligonucleotides: in vitro and in vivo studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2620-2625.
- Akhtar S., Basu S., Wickstrom E. and Juliano R.L. (1991). Interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipid membranes (liposomes). *Nucleic Acids Res* 19: 5551-5559.
- Akhtar S. and Lewis K.J. (1997). Antisense oligonucleotide delivery to cultured macrophages is improved by incorporation into sustained-release biodegradable polymer microspheres. *Int J Pharm* 151: 57-67.
- Allinquant B., Hantraye P., Mailleux P., Moya K., Bouillot C. and Prochiantz A. (1995). Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J Cell Biol* 128: 919-927.
- Arnedo A., Irache J.M., Merodio M. and Espuelas Millan M.S. (2004). Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide. *J Control Release* 94: 217-227.
- Asokan A. and Cho M.J. (2002). Exploitation of intracellular pH gradients in the cellular delivery of macromolecules. *J Pharm Sci* 91: 903-913.
- Astriab-Fisher A., Sergueev D., Fisher M., Shaw B.R. and Juliano R.L. (2002). Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm Res* 19: 744-754.

- 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: 83-90.
- Aukunuru J.V., Ayalasomayajula S.P. and Kompella U.B. (2003). Nanoparticle formulation enhances the delivery and activity of a vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human retinal pigment epithelial cells. *J Pharm Pharmacol* 55: 1199-1206.
- Aynie I., Vauthier C., Chacun H., Fattal E. and Couvreur P. (1999). Spongelike alginate nanoparticles as a new potential system for the delivery of antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9: 301-312.
- Baker B.F., Lot S.S., Condon T.P., Cheng-Flournoy S., Lesnik E.A., Sasmor H.M. and Bennett C.F. (1997). 2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 272: 11994-12000.
- Bartsch M., Weeke-Klimp A.H., Meijer D.K., Scherphof G.L. and Kamps J.A. (2002). Massive and selective delivery of lipid-coated cationic lipoplexes of oligonucleotides targeted in vivo to hepatic endothelial cells. *Pharm Res* 19: 676-680.
- Bartsch M., Weeke-Klimp A.H., Morselt H.W., Kimpfler A., Asgeirsdottir S.A., Schubert R., Meijer D.K., Scherphof G.L. and Kamps J.A. (2005). Optimized targeting of polyethylene glycol-stabilized anti-intercellular adhesion molecule 1 oligonucleotide/lipid particles to liver sinusoidal endothelial cells. *Mol Pharmacol* 67: 883-890.
- Bazile D., Prud'homme C., Bassoullet M.T., Marlard M., Spenlehauer G. and Veillard M. (1995). Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J Pharm Sci* 84: 493-498.
- Belenkov A.I., Alakhov V.Y., Kabanov A.V., Vinogradov S.V., Panasci L.C., Monia B.P. and Chow T.Y. (2004). Polyethyleneimine grafted with pluronic P85 enhances Ku86 antisense delivery and the ionizing radiation treatment efficacy in vivo. *Gene Ther* 11: 1665-1672.

- Belikova A.M., Zarytova V.F. and Grineva N.I. (1967). Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylenamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett* 37: 3557-3562.
- Bennett C.F., Chiang M.Y., Chan H., Shoemaker J.E. and Mirabelli C.K. (1992). Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol* 41: 1023-1033.
- Bennett C.F., Condon T.P., Grimm S., Chan H. and Chiang M.Y. (1994). Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides. *J Immunol* 152: 3530-3540.
- Bennett C.F., Zuckerman J.E., Kornbrust D., Sasmor H., Leeds J.M. and Crooke S.T. (1996). Pharmacokinetics in mice of a [³H]-labeled phosphorothioate oligonucleotide formulated in the presence and absence of a cationic lipid. *J Control Release* 41: 121-130.
- Berton M., Benimetskaya L., Allemann E., Stein C.A. and Gurny R. (1999). Uptake of oligonucleotide-loaded nanoparticles in prostatic cancer cells and their intracellular localization. *Eur J Pharm Biopharm* 47: 119-123.
- Berton M., Turelli P., Trono D., Stein C.A., Allemann E. and Gurny R. (2001). Inhibition of HIV-1 in cell culture by oligonucleotide-loaded nanoparticles. *Pharm Res* 18: 1096-1101.
- Bertrand J.R., Pottier M., Vekris A., Opolon P., Maksimenko A. and Malvy C. (2002). Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 1000-1004.
- Bielinska A., Kukowska-Latallo J.F., Johnson J., Tomalia D.A. and Baker J.R., Jr. (1996). Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res* 24: 2176-2182.
- Bochot A., Fattal E., Gulik A., Couarraze G. and Couvreur P. (1998a). Liposomes dispersed within a thermosensitive gel: a new dosage form for ocular delivery of oligonucleotides. *Pharm Res* 15: 1364-1369.
- Bochot A., Mashhour B., Puisieux F., Couvreur P. and Fattal E. (1998b). Comparison of the ocular distribution of a model oligonucleotide after topical instillation in rabbits of conventional and new dosage forms. *J Drug Target* 6: 309-313.

- Bonfils E., Depierreux C., Midoux P., Thuong N.T., Monsigny M. and Roche A.C. (1992a). Drug targeting: synthesis and endocytosis of oligonucleotide-neoglycoprotein conjugates. *Nucleic Acids Res* 20: 4621-4629.
- Bonfils E., Mendes C., Roche A.C., Monsigny M. and Midoux P. (1992b). Uptake by macrophages of a biotinylated oligo-alpha-deoxythymidylate by using mannosylated streptavidin. *Bioconjugate Chem* 3: 277-284.
- Bongartz J.P., Aubertin A.M., Milhaud P.G. and Lebleu B. (1994). Improved biological activity of antisense oligonucleotides conjugated to a fusogenic peptide. *Nucleic Acids Res* 22: 4681-4688.
- Bonora G.M., Ivanova E., Zarytova V., Burcovich B. and Veronese F.M. (1997). Synthesis and characterization of high-molecular mass polyethylene glycol-conjugated oligonucleotides. *Bioconjugate Chem* 8: 793-797.
- Bonora G.M., Tocco G., Zaramella S., Veronese F.M., Pliasunova O., Pokrovsky A., Ivanova E. and Zarytova V. (1998). Antisense activity of an anti-HIV oligonucleotide conjugated to linear and branched high molecular weight polyethylene glycols. *Farmaco* 53: 634-637.
- Boussif O., Lezoualch 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: 7297-7301.
- Braasch D.A. and Corey D.R. (2002a). Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry* 41: 4503-4510.
- Braasch D.A., Liu Y. and Corey D.R. (2002b). Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design. *Nucleic Acids Res* 30: 5160-5167.
- 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: 26801-26805.
- Brus C., Kleemann E., Aigner A., Czubayko F. and Kissel T. (2004a). Stabilization of oligonucleotide-polyethylenimine complexes by freeze-drying: physicochemical and biological characterization. *J Control Release* 95: 119-131.
- Brus C., Petersen H., Aigner A., Czubayko F. and Kissel T. (2004b). Efficiency of polyethylenimines and polyethylenimine-graft-poly (ethylene glycol) block

- copolymers to protect oligonucleotides against enzymatic degradation. *Eur J Pharm Biopharm* 57: 427-430.
- Brus C., Santi P., Colombo P. and Kissel T. (2002). Distribution and quantification of polyethylenimine oligodeoxynucleotide complexes in human skin after iontophoretic delivery using confocal scanning laser microscopy. *J Control Release* 84: 171-181.
- Campbell J.M., Bacon T.A. and Wickstrom E. (1990). Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *J Biochem Biophys Methods* 20: 259-267.
- Capaccioli S., Di Pasquale G., Mini E., Mazzei T. and Quattrone A. (1993). Cationic lipids improve antisense oligonucleotide uptake and prevent degradation in cultured cells and in human serum. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 818-825.
- Carpentier A.F., Chen L., Maltonti F. and Delattre J.Y. (1999). Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res* 59: 5429-5432.
- Carthew R.W. (2006). Gene regulation by microRNAs. *Curr Opin Genet Dev* 16: 203-208.
- Cazenave C., Chevrier M., Nguyen T.T. and Helene C. (1987). Rate of degradation of [alpha]- and [beta]-oligodeoxynucleotides in *Xenopus* oocytes. Implications for anti-messenger strategies. *Nucleic Acids Res* 15: 10507-10521.
- Cech T.R. (1987). The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes. *Science* 236: 1532-1539.
- Chace J.H., Hooker N.A., Mildenstein K.L., Krieg A.M. and Cowdery J.S. (1997). Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin Immunol Immunopathol* 84: 185-193.
- Chavany C., Le Doan T., Couvreur P., Puisieux F. and Helene C. (1992). Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as polymeric carriers for antisense oligonucleotides. *Pharm Res* 9: 441-449.
- Chavany C., Saison-Behmoaras T., Le Doan T., Puisieux F., Couvreur P. and Helene C. (1994). Adsorption of oligonucleotides onto polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles protects them against nucleases and increases their cellular uptake. *Pharm Res* 11: 1370-1378.

- Chen G. and Hoffman A.S. (1995). Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transitions over a wide range of pH. *Nature* 373: 49-52.
- Chiang M.Y., Chan H., Zounes M.A., Freier S.M., Lima W.F. and Bennett C.F. (1991). Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 266: 18162-18171.
- Chin D.J., Green G.A., Zon G., Szoka F.C., Jr. and Straubinger R.M. (1990). Rapid nuclear accumulation of injected oligodeoxyribonucleotides. *New Biol* 2: 1091-1100.
- Citro G., Perrotti D., Cucco C., D'Agnano I., Sacchi A., Zupi G. and Calabretta B. (1992). Inhibition of leukemia cell proliferation by receptor-mediated uptake of c-myc antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7031-7035.
- Citro G., Szczylik C., Ginobbi P., Zupi G. and Calabretta B. (1994). Inhibition of leukaemia cell proliferation by folic acid-polylysine-mediated introduction of c-myc antisense oligodeoxynucleotides into HL-60 cells. *Br J Cancer* 69: 463-467.
- Cleek R.L., Rege A.A., Denner L.A., Eskin S.G. and Mikos A.G. (1997). Inhibition of smooth muscle cell growth in vitro by an antisense oligodeoxynucleotide released from poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microparticles. *J Biomed Mater Res* 35: 525-530.
- Cogoni C. and Macino G. (1997). Conservation of transgene-induced post-transcriptional gene silencing in plants and fungi. *Trend Plant Sci* 2: 438-443.
- Collins D., Maxfield F. and Huang L. (1989). Immunoliposomes with different acid sensitivities as probes for the cellular endocytic pathway. *Biochim Biophys Acta* 987: 47-55.
- Connor J., Norley N. and Huang L. (1986). Biodistribution of pH-sensitive immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta* 884: 474-481.
- Cortesi R., Esposito E., Menegatti E., Gambari R. and Nastruzzi C. (1994). Gelatin Microspheres as a New Approach for the Controlled Delivery of Synthetic Oligonucleotides and Pcr-Generated DNA Fragments. *Int J Pharm* 105: 181-186.
- Crooke S.T. (1998). Molecular mechanisms of antisense drugs: RNase H. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8: 133-134.
- Crooke S.T. (1999). Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta* 1489: 31-44.

- Cumin F., Asselbergs F., Lartigot M. and Felder E. (1993). Modulation of human prorenin gene expression by antisense oligonucleotides in transfected CHO cells. *Eur J Biochem* 212: 347-354.
- Daemen T., de Mare A., Bungener L., de Jonge J., Huckriede A. and Wilschut J. (2005). Virosomes for antigen and DNA delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 451-463.
- Dautzenberg H., Zintchenko A., Konak C., Reschel T., Subr V. and Ulbrich K. (2001). Polycationic graft copolymers as carriers for oligonucleotide delivery. Complexes of oligonucleotides with polycationic graft copolymers. *Langmuir* 17: 3096-3102.
- De Clercq E., Eckstein E. and Merigan T.C. (1969). Interferon induction increased through chemical modification of a synthetic polyribonucleotide. *Science* 165: 1137-1139.
- De Mesmaeker A., Häner R., Martin P. and Moser H.E. (1995). Antisense oligonucleotides. *Acc Chem Res* 28: 366-374.
- De Oliveira M.C., Boutet V., Fattal E., Boquet D., Grognet J.M., Couvreur P. and Deverre J.R. (2000). Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. *Life Sci* 67: 1625-1637.
- De Rosa G., Quaglia F., Bochot A., Ungaro F. and Fattal E. (2003). Long-term release and improved intracellular penetration of oligonucleotide-polyethylenimine complexes entrapped in biodegradable microspheres. *Biomacromolecules* 4: 529-536.
- De Rosa G., Quaglia F., La Rotonda M.I., Appel M., Alphanhary H. and Fattal E. (2002a). Poly(lactide-co-glycolide) microspheres for the controlled release of oligonucleotide/polyethylenimine complexes. *J Pharm Sci* 91: 790-799.
- De Rosa G., Quaglia F., La Rotonda M.I., Besnard M. and Fattal E. (2002b). Biodegradable microparticles for the controlled delivery of oligonucleotides. *Int J Pharm* 242: 225-228.
- de Semir D., Petriz J., Avinyo A., Larriba S., Nunes V., Casals T., Estivill X. and Aran J.M. (2002). Non-viral vector-mediated uptake, distribution, and stability of chimeraplasts in human airway epithelial cells. *J Gene Med* 4: 308-322.
- Dean N.M. and McKay R. (1994a). Inhibition of protein kinase C- α expression in mice after systemic administration of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11762-11766.
- Dean N.M., McKay R., Condon T.P. and Bennett C.F. (1994b). Inhibition of protein kinase C- α expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits

- induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters. *J Biol Chem* 269: 16416-16424.
- Degols G., Leonetti J.P., Benkirane M., Devaux C. and Lebleu B. (1992). Poly(L-lysine)-conjugated oligonucleotides promote sequence-specific inhibition of acute HIV-1 infection. *Antisense Res Dev* 2: 293-301.
- Delong R., Stephenson K., Loftus T., Fisher M., Alahari S., Nolting A. and Juliano R.L. (1997). Characterization of complexes of oligonucleotides with polyamidoamine starburst dendrimers and effects on intracellular delivery. *J Pharm Sci* 86: 762-764.
- Demidov V.V., Potaman V.N., Frank-Kamenetskii M.D., Egholm M., Buchard O., Sonnichsen S.H. and Nielsen P.E. (1994). Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem Pharmacol* 48: 1310-1313.
- Derossi D., Joliot A.H., Chassaing G. and Prochiantz A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 269: 10444-10450.
- Deshayes S., Gerbal-Chaloin S., Morris M.C., Aldrian-Herrada G., Charnet P., Divita G. and Heitz F. (2004). On the mechanism of non-endosomal peptide-mediated cellular delivery of nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 1667: 141-147.
- Deshpande D., Toledo-Velasquez D., Thakkar D., Liang W. and Rojanasakul Y. (1996). Enhanced cellular uptake of oligonucleotides by EGF receptor-mediated endocytosis in A549 cells. *Pharm Res* 13: 57-61.
- 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.
- Devi G.R., Beer T.M., Corless C.L., Arora V., Weller D.L. and Iversen P.L. (2005). In vivo bioavailability and pharmacokinetics of a c-MYC antisense phosphorodiamidate morpholino oligomer, AVI-4126, in solid tumors. *Clin Cancer Res* 11: 3930-3938.
- Dheur S., Dias N., van Aerschot A., Herdewijn P., Bettinger T., Remy J.S., Helene C. and Saison-Behmoaras E.T. (1999). Polyethylenimine but not cationic lipid improves antisense activity of 3'-capped phosphodiester oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9: 515-525.

- Dinauer N., Lochmann D., Demirhan I., Bouazzaoui A., Zimmer A., Chandra A., Kreuter J. and von Briesen H. (2004). Intracellular tracking of protamine/antisense oligonucleotide nanoparticles and their inhibitory effect on HIV-1 transactivation. *J Control Release* 96: 497-507.
- Dong L.-C. and Hoffman A.S. (1991). A novel approach for preparation of pH-sensitive hydrogels for enteric drug delivery. *J Control Release* 15: 141-152.
- Drin G., Cottin S., Blanc E., Rees A.R. and Temsamani J. (2003). Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem* 278: 31192-31201.
- Dubrue 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: 379-388.
- Dufresne M.H., Gauthier M.A. and Leroux J.C. (2005). Thiol-functionalized polymeric micelles: from molecular recognition to improved mucoadhesion. *Bioconjugate Chem* 16: 1027-1033.
- Duzgunes N., Simoes S., Slepishkin V., Pretzer E., Rossi J.J., De Clercq E., Antao V.P., Collins M.L. and de Lima M.C. (2001). Enhanced inhibition of HIV-1 replication in macrophages by antisense oligonucleotides, ribozymes and acyclic nucleoside phosphonate analogs delivered in pH-sensitive liposomes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20: 515-523.
- Dykhhoorn D.M., Palliser D. and Lieberman J. (2006). The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther* 13: 541-552.
- Dzau V.J., Mann M.J., Morishita R. and Kaneda Y. (1996). Fusigenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11421-11425.
- Earl R.T., Hunneyball I.M., Billett E.E. and Mayer R.J. (1988). Evaluation of reconstituted Sendai virus envelopes as intra-articular drug vectors: effects on normal and experimentally arthritic rabbit knee joints. *J Pharm Pharmacol* 40: 166-170.
- Eckstein F. (1985). Nucleoside phosphorothioates. *Annu Rev Biochem* 54: 367-402.
- Eckstein F. (2000). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10: 117-121.
- Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B. and Nielsen P.E. (1993). PNA hybridizes to complementary

- oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 365: 566-568.
- Egholm M., Buchardt O., Nielsen P.E. and Berg R.H. (1992). Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone. *J Am Chem Soc* 114: 1895-1897.
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschl T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.
- Elliott G. and O'Hare P. (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88: 223-233.
- Farhood H., Serbina N. and Huang L. (1995). The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* 1235: 289-295.
- Fattal E., Couvreur P. and Dubernet C. (2004). "Smart" delivery of antisense oligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 931-946.
- Fattal E., Vauthier C., Aynie I., Nakada Y., Lambert G., Malvy C. and Couvreur P. (1998). Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. *J Control Release* 53: 137-143.
- 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 USA* 84: 7413-7417.
- Fennewald S.M. and Rando R.F. (1995). Inhibition of high affinity basic fibroblast growth factor binding by oligonucleotides. *J Biol Chem* 270: 21718-21721.
- Filion M.C. and Phillips N.C. (1997). Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochim Biophys Acta* 1329: 345-356.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. and Mello C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Fischer D., Osburg B., Petersen H., Kissel T. and Bickel U. (2004). Effect of poly(ethylene imine) molecular weight and pegylation on organ distribution and pharmacokinetics of polyplexes with oligodeoxynucleotides in mice. *Drug Metab Dispos* 32: 983-992.

- Fluiter K., ten Asbroek A.L., de Wissel M.B., Jakobs M.E., Wissenbach M., Olsson H., Olsen O., Oerum H. and Baas F. (2003). In vivo tumor growth inhibition and biodistribution studies of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 31: 953-962.
- Forrest M.L., Meister G.E., Koerber J.T. and Pack D.W. (2004). Partial acetylation of polyethylenimine enhances in vitro gene delivery. *Pharm Res* 21: 365-371.
- Freier S.M. and Altmann K.H. (1997). The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes. *Nucleic Acids Res* 25: 4429-4443.
- Fritz H., Maier M. and Bayer E. (1997). Cationic polystyrene nanoparticles: preparation and characterization of a model drug carrier system for antisense oligonucleotides. *J Colloid Interface Sci* 195: 272-288.
- Funhoff A.M., van Nostrum C.F., Koning G.A., Schuurmans-Nieuwenbroek N.M., Crommelin D.J. and Hennink W.E. (2004). Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH. *Biomacromolecules* 5: 32-39.
- Geary R.S., Watanabe T.A., Truong L., Freier S., Lesnik E.A., Sioufi N.B., Sasmor H., Manoharan M. and Levin A.A. (2001). Pharmacokinetic properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified oligonucleotide analogs in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 890-897.
- Gilmore I.R., Fox S.P., Hollins A.J., Sohail M. and Akhtar S. (2004). The design and exogenous delivery of siRNA for post-transcriptional gene silencing. *J Drug Target* 12: 315-340.
- Gleave M.E. and Monia B.P. (2005). Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 468-479.
- 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: 347-356.
- Gomes dos Santos A.L., Bochot A., Doyle A., Tsapis N., Siepmann J., Siepmann F., Schmalzer J., Besnard M., Behar-Cohen F. and Fattal E. (2006). Sustained release of nanosized complexes of polyethylenimine and anti-TGF-beta 2 oligonucleotide improves the outcome of glaucoma surgery. *J Control Release* 112: 369-381.

- Gonzalez Ferreiro M., Tillman L., Hardee G. and Bodmeier R. (2002a). Characterization of alginate/poly-L-lysine particles as antisense oligonucleotide carriers. *Int J Pharm* 239: 47-59.
- Gonzalez Ferreiro M., Tillman L.G., Hardee G. and Bodmeier R. (2002b). Alginate/poly-L-lysine microparticles for the intestinal delivery of antisense oligonucleotides. *Pharm Res* 19: 755-764.
- Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Trubetskoy V., Torchilin V. and Langer R. (1994). Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263: 1600-1603.
- Grunweller A., Wyszko E., Bieber B., Jahnel R., Erdmann V.A. and Kurreck J. (2003). Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* 31: 3185-3193.
- Guvakova M.A., Yakubov L.A., Vlodavsky I., Tonkinson J.L. and Stein C.A. (1995). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. *J Biol Chem* 270: 2620-2627.
- Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., McCormack M.P., Wulffraat N., Leboulch P., Lim A., Osborne C.S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J.I., de Saint Basile G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross F., Valensi F., Delabesse E., Macintyre E., Sigaux F., Soulier J., Leiva L.E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T.H., Le Deist F., Fischer A. and Cavazzana-Calvo M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302: 415-419.
- 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: 1188-1196.
- Haines T.H. and Dencher N.A. (2002). Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 528: 35-39.
- Haller H., Dragun D., Miethke A., Park J.K., Weis A., Lippoldt A., Gross V. and Luft F.C. (1996). Antisense oligonucleotides for ICAM-1 attenuate reperfusion injury and renal failure in the rat. *Kidney Int* 50: 473-480.

- Hamilton S.E., Iyer M., Norton J.C. and Corey D.R. (1996). Specific and nonspecific inhibition of transcription by DNA, PNA, and phosphorothioate promoter analog duplexes. *Bioorg & Med Chem Lett* 6: 2897-2900.
- Hanvey J.C., Peffer N.J., Bisi J.E., Thomson S.A., Cadilla R., Josey J.A., Ricca D.J., Hassman C.F., Bonham M.A., Au K.G. and et al. (1992). Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science* 258: 1481-1485.
- Harada A., Togawa H. and Kataoka K. (2001). Physicochemical properties and nuclease resistance of antisense-oligodeoxynucleotides 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.
- Haseloff J. and Gerlach W.L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 334: 585-591.
- Helin V., Gottikh M., Mishal Z., Subra F., Malvy C. and Lavignon M. (1999a). Cell cycle-dependent distribution and specific inhibitory effect of vectorized antisense oligonucleotides in cell culture. *Biochem Pharmacol* 58: 95-107.
- Helin V., Gottikh M., Mishal Z., Subra F., Malvy C. and Lavignon M. (1999b). Uptake and intracellular distribution of oligonucleotides vectorized by a PAMAM dendrimer. *Nucleosides & Nucleotides* 18: 1721-1722.
- Henry S.P., Giclas P.C., Leeds J., Pangburn M., Auletta C., Levin A.A. and Kornbrust D.J. (1997). Activation of the alternative pathway of complement by a phosphorothioate oligonucleotide: potential mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 810-816.
- Heskins M. and Guillet J.E. (1968). Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Macromol Sci, Chem* A2: 1441-1445.
- Hirotsu S., Hirokawa Y. and Tanaka T. (1987). Volume-phase transitions of ionized *N*-isopropylacrylamide gels. *J Chem Phys* 87: 1392-1394.
- Hoekstra D., Klappe K., Hoff H. and Nir S. (1989). Mechanism of fusion of Sendai virus: role of hydrophobic interactions and mobility constraints of viral membrane proteins. Effects of polyethylene glycol. *J Biol Chem* 264: 6786-6792.
- Hu Q., Bally M.B. and Madden T.D. (2002). Subcellular trafficking of antisense oligonucleotides and down-regulation of bcl-2 gene expression in human melanoma cells using a fusogenic liposome delivery system. *Nucleic Acids Res* 30: 3632-3641.

- Hu Q., Shew C.R., Bally M.B. and Madden T.D. (2001). Programmable fusogenic vesicles for intracellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides: enhanced cellular uptake and biological effects. *Biochim Biophys Acta* 1514: 1-13.
- Hudziak R.M., Barofsky E., Barofsky D.F., Weller D.L., Huang S.B. and Weller D.D. (1996). Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6: 267-272.
- Hughes J.A., Aronsohn A.I., Avrutskaya A.V. and Juliano R.L. (1996). Evaluation of adjuvants that enhance the effectiveness of antisense oligodeoxynucleotides. *Pharm Res* 13: 404-410.
- Inoue H., Hayase Y., Imura A., Iwai S., Miura K. and Ohtsuka E. (1987a). Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O-methyl)ribonucleotides. *Nucleic Acids Res* 15: 6131-6148.
- Inoue H., Hayase Y., Iwai S. and Ohtsuka E. (1987b). Sequence-dependent hydrolysis of RNA using modified oligonucleotide splints and RNase H. *FEBS Lett* 215: 327-330.
- Iribarren A.M., Sproat B.S., Neuner P., Sulston I., Ryder U. and Lamond A.I. (1990). 2'-O-alkyl oligoribonucleotides as antisense probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7747-7751.
- Iversen P.L., Arora V., Acker A.J., Mason D.H. and Devi G.R. (2003). Efficacy of antisense morpholino oligomer targeted to c-myc in prostate cancer xenograft murine model and a Phase I safety study in humans. *Clin Cancer Res* 9: 2510-2519.
- Jääskeläinen I., Monkkonen J. and Urtti A. (1994). Oligonucleotide-cationic liposome interactions. A physicochemical study. *Biochim Biophys Acta* 1195: 115-123.
- Jääskeläinen I., Sternberg B., Monkkönen J. and Urtti A. (1998). Physicochemical and morphological properties of complexes made of cationic liposomes and oligonucleotides. *Int J Pharm* 167: 191-203.
- James H.A. and Gibson I. (1998). The therapeutic potential of ribozymes. *Blood* 91: 371-382.
- Jaschke A., Furste J.P., Nordhoff E., Hillenkamp F., Cech D. and Erdmann V.A. (1994). Synthesis and properties of oligodeoxyribonucleotide-polyethylene glycol conjugates. *Nucleic Acids Res* 22: 4810-4817.

- Jensen K.D., Kopeckova P. and Kopecek J. (2002). Antisense oligonucleotides delivered to the lysosome escape and actively inhibit the hepatitis B virus. *Bioconjugate Chem* 13: 975-984.
- Jeong J.H., Kim S.H., Kim S.W. and Park T.G. (2005). In vivo tumor targeting of ODN-PEG-folic acid/PEI polyelectrolyte complex micelles. *J Biomater Sci Polym Ed* 16: 1409-1419.
- Jeong J.H., Kim S.W. and Park T.G. (2003a). A new antisense oligonucleotide delivery system based on self-assembled ODN-PEG hybrid conjugate micelles. *J Control Release* 93: 183-191.
- Jeong J.H., Kim S.W. and Park T.G. (2003b). 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.
- 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: 1197-1205.
- Jones R.A., Poniris M.H. and Wilson M.R. (2004). pDMAEMA is internalised by endocytosis but does not physically disrupt endosomes. *J Control Release* 96: 379-391.
- Junghans M., Kreuter J. and Zimmer A. (2000). Antisense delivery using protamine-oligonucleotide particles. *Nucleic Acids Res* 28: E45.
- Junghans M., Kreuter J. and Zimmer A. (2001). Phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotide condensation and preparation of antisense nanoparticles. *Biochim Biophys Acta* 1544: 177-188.
- 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: 491-497.
- Kanamaru T., Takagi T., Takakura Y. and Hashida M. (1998). Biological effects and cellular uptake of c-myc antisense oligonucleotides and their cationic liposome complexes. *J Drug Target* 5: 235-246.
- 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.
- Kawaguchi T., Asakawa H., Tashiro Y., Juni K. and Sueishi T. (1995). Stability, specific binding activity, and plasma concentration in mice of an oligodeoxynucleotide modified at 5'-terminal with poly(ethylene glycol). *Biol Pharm Bull* 18: 474-476.
- Kawasaki A.M., Casper M.D., Freier S.M., Lesnik E.A., Zounes M.C., Cummins L.L., Gonzalez C. and Cook P.D. (1993). Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets. *J Med Chem* 36: 831-841.
- Kean J.M., Cushman C.D., Kang H., Leonard T.E. and Miller P.S. (1994). Interactions of oligonucleotide analogs containing methylphosphonate internucleotide linkages and 2'-O-methylribonucleosides. *Nucleic Acids Res* 22: 4497-4503.
- Keller M., Tagawa T., Preuss M. and Miller A.D. (2002). Biophysical characterization of the DNA binding and condensing properties of adenoviral core peptide μ . *Biochemistry* 41: 652-659.
- Khalil I.A., Kogure K., Akita H. and Harashima H. (2006). Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev* 58: 32-45.
- Khan A., Sommer W., Fuxe K. and Akhtar S. (2000). Site-specific administration of antisense oligonucleotides using biodegradable polymer microspheres provides sustained delivery and improved subcellular biodistribution in the neostriatum of the rat brain. *J Drug Target* 8: 319-334.
- Kibler-Herzog L., Zon G., Uznanski B., Whittier G. and Wilson W.D. (1991). Duplex stabilities of phosphorothioate, methylphosphonate, and RNA analogs of two DNA 14-mers. *Nucleic Acids Res* 19: 2979-2986.
- Kim S.H., Mok H., Jeong J.H., Kim S.W. and Park T.G. (2006). Comparative evaluation of target-specific GFP gene silencing efficiencies for antisense ODN, synthetic siRNA, and siRNA plasmid complexed with PEI-PEG-FOL conjugate. *Bioconjugate Chem* 17: 241-244.
- Kim Y.-H., Bae Y.H. and Kim S.W. (1994). pH/temperature-sensitive polymers for macromolecular drug loading and release. *J Control Release* 28: 143-152.
- Klimuk S.K., Semple S.C., Nahirney P.N., Mullen M.C., Bennett C.F., Scherrer P. and Hope M.J. (2000). Enhanced anti-inflammatory activity of a liposomal intercellular

- adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotide in an acute model of contact hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 480-488.
- Ko Y.J., Devi G.R., London C.A., Kayas A., Reddy M.T., Iversen P.L., Bublely G.J. and Balk S.P. (2004). Androgen receptor down-regulation in prostate cancer with phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *J Urol* 172: 1140-1144.
- Kondoh M., Matsuyama T., Suzuki R., Mizuguchi H., Nakanishi T., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Nakanishi M., Sato M. and Mayumi T. (2000). Growth inhibition of human leukemia HL-60 cells by an antisense phosphodiester oligonucleotide encapsulated into fusogenic liposomes. *Biol Pharm Bull* 23: 1011-1013.
- Koshkin A.A., Rajwanshi V.K. and Wengel J. (1998a). Novel convenient syntheses of LNA [2.2.1] bicyclo nucleosides. *Tetrahedron Lett* 39: 4381-4384.
- Koshkin A.A., Singh S.K., Nielsen P., Rajwanshi V.K., Kumar R., Meldgaard M., Olsen C.E. and Wengel J. (1998b). LNA (locked nucleic acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron* 54: 3607-3630.
- Kren B.T., Bandyopadhyay P. and Steer C.J. (1998). In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Med* 4: 285-290.
- Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A. and Klinman D.M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-549.
- Kulkarni R.P., Mishra S., Fraser S.E. and Davis M.E. (2005). Single cell kinetics of intracellular, nonviral, nucleic acid delivery vehicle acidification and trafficking. *Bioconjugate Chem* 16: 986-994.
- Kumar M., Hassan M.Q., Tyagi S.K. and Sarkar D.P. (1997). A 45,000-M(r) glycoprotein in the Sendai virus envelope triggers virus-cell fusion. *J Virol* 71: 6398-6406.
- Kumar R., Singh S.K., Koshkin A., Rajwanshi V.K., Meldgaard M. and Wengel J. (1998). The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioates-LNA and 2'-thio-LNA. *Bioorg Med Chem Lett* 8: 2219-2222.
- Kunisawa J., Masuda T., Katayama K., Yoshikawa T., Tsutsumi Y., Akashi M., Mayumi T. and Nakagawa S. (2005). Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release. *J Control Release* 105: 344-353.

- 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: 1911-1918.
- Lakkaraju A., Dubinsky J.M., Low W.C. and Rahman Y.E. (2001). Neurons are protected from excitotoxic death by p53 antisense oligonucleotides delivered in anionic liposomes. *J Biol Chem* 276: 32000-32007.
- Lambert G., Bertrand J.R., Fattal E., Subra F., Pinto-Alphandary H., Malvy C., Auclair C. and Couvreur P. (2000a). EWS fl-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 401-406.
- Lambert G., Fattal E. and Couvreur P. (2001). Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* 47: 99-112.
- Lambert G., Fattal E., Pinto-Alphandary H., Gulik A. and Couvreur P. (2000b). Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides. *Pharm Res* 17: 707-714.
- Lambert R.C., Maulet Y., Dupont J.L., Mykita S., Craig P., Volsen S. and Feltz A. (1996). Polyethylenimine-mediated DNA transfection of peripheral and central neurons in primary culture: probing Ca^{2+} channel structure and function with antisense oligonucleotides. *Mol Cell Neurosci* 7: 239-246.
- Lappalainen K., Urtti A., Jaaskelainen I., Syrjanen K. and Syrjanen S. (1994a). Cationic liposomes mediated delivery of antisense oligonucleotides targeted to HPV 16 E7 mRNA in CaSki cells. *Antiviral Res* 23: 119-130.
- Lappalainen K., Urtti A., Soderling E., Jaaskelainen I., Syrjanen K. and Syrjanen S. (1994b). Cationic liposomes improve stability and intracellular delivery of antisense oligonucleotides into CaSki cells. *Biochim Biophys Acta* 1196: 201-208.
- Lavigne C. and Thierry A.R. (1997). Enhanced antisense inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in cell cultures by DLS delivery system. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 566-571.
- Lehrman S. (1999). Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 401: 517-518.

- Lemaitre M., Bayard B. and Lebleu B. (1987). Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 648-652.
- Lenaerts V., Nagelkerke J.F., Van Berkel T.J., Couvreur P., Grislain L., Roland M. and Speiser P. (1984). In vivo uptake of polyisobutyl cyanoacrylate nanoparticles by rat liver Kupffer, endothelial, and parenchymal cells. *J Pharm Sci* 73: 980-982.
- Leonetti C., Biroccio A., Benassi B., Stringaro A., Stoppacciaro A., Semple S.C. and Zupi G. (2001). Encapsulation of c-myc antisense oligodeoxynucleotides in lipid particles improves antitumoral efficacy in vivo in a human melanoma line. *Cancer Gene Ther* 8: 459-468.
- Leonetti J.P., Degols G. and Lebleu B. (1990). Biological activity of oligonucleotide-poly(L-lysine) conjugates: mechanism of cell uptake. *Bioconjugate Chem* 1: 149-153.
- Leonetti J.P., Mechti N., Degols G., Gagnor C. and Lebleu B. (1991). Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2702-2706.
- Lesnik E.A., Guinasso C.J., Kawasaki A.M., Sasmor H., Zounes M., Cummins L.L., Ecker D.J., Cook P.D. and Freier S.M. (1993). Oligodeoxynucleotides containing 2'-O-modified adenosine: synthesis and effects on stability of DNA:RNA duplexes. *Biochemistry* 32: 7832-7838.
- Levin A.A. (1999). A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1489: 69-84.
- Lewis J.G., Lin K.-Y., Kothavale A., Flanagan W.M., Maytteuci M.D., DePrince R.B., Mook Jr R.A., Hendren R.W. and Wagner R.W. (1996). A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3176-3181.
- Lewis K.J., Irwin W.J. and Akhtar S. (1998). Development of a sustained-release biodegradable polymer delivery system for site-specific delivery of oligonucleotides: characterization of P(LA-GA) copolymer microspheres in vitro. *J Drug Target* 5: 291-302.
- Li S., Deshmukh H.M. and Huang L. (1998). Folate-mediated targeting of antisense oligodeoxynucleotides to ovarian cancer cells. *Pharm Res* 15: 1540-1545.

- Liang W.W., Shi X., Deshpande D., Malanga C.J. and Rojanasakul Y. (1996). Oligonucleotide targeting to alveolar macrophages by mannose receptor-mediated endocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1279: 227-234.
- Lima W.F., Monia B.P., Ecker D.J. and Freier S.M. (1992). Implication of RNA structure on antisense oligonucleotide hybridization kinetics. *Biochemistry* 31: 12055-12061.
- Lindner L.H., Brock R., Arndt-Jovin D. and Eibl H. (2006). Structural variation of cationic lipids: minimum requirement for improved oligonucleotide delivery into cells. *J Control Release* 110: 444-456.
- Litzinger D.C. (1997). Limitations of cationic liposomes for antisense oligonucleotides delivery in vivo. *J Liposome Res* 7: 51-61.
- 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: 139-149.
- Liu D. and Huang L. (1989a). Role of cholesterol in the stability of pH-sensitive, large unilamellar liposomes prepared by the detergent-dialysis method. *Biochim Biophys Acta* 981: 254-260.
- Liu D. and Huang L. (1990). pH-sensitive, plasma-stable liposomes with relatively prolonged residence in circulation. *Biochim Biophys Acta* 1022: 348-354.
- Liu D.X. and Huang L. (1989b). Small, but not large, unilamellar liposomes composed of dioleoylphosphatidylethanolamine and oleic acid can be stabilized by human plasma. *Biochemistry* 28: 7700-7707.
- Lochmann D., Jauk E. and Zimmer A. (2004). Drug delivery of oligonucleotides by peptides. *Eur J Pharm Biopharm* 58: 237-251.
- Lochmann D., Weyermann J., Georgens C., Prassl R. and Zimmer A. (2005). Albumin-protamine-oligonucleotide nanoparticles as a new antisense delivery system. Part 1: physicochemical characterization. *Eur J Pharm Biopharm* 59: 419-429.
- Loke S.L., Stein C.A., Zhang X.H., Mori K., Nakanishi M., Subasinghe C., Cohen J.S. and Neckers L.M. (1989). Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3474-3478.
- Lubrich B., van Calker D. and Peschka-Suss R. (2000). Inhibition of inositol uptake in astrocytes by antisense oligonucleotides delivered by pH-sensitive liposomes. *Eur J Biochem* 267: 2432-2438.

- Lucas B., Remaut K., Sanders N.N., Braeckmans K., De Smedt S.C. and Demeester J. (2005). Towards a better understanding of the dissociation behavior of liposome-oligonucleotide complexes in the cytosol of cells. *J Control Release* 103: 435-450.
- Lucas B., Van Rompaey E., Remaut K., Sanders N., De Smedt S.C. and Demeester J. (2004). On the biological activity of anti-ICAM-1 oligonucleotides complexed to non-viral carriers. *J Control Release* 96: 207-219.
- Lundberg M. and Johansson M. (2002). Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 367-371.
- Lundberg M., Wikstrom S. and Johansson M. (2003). Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther* 8: 143-150.
- Luzio J.P., Rous B.A., Bright N.A., Pryor P.R., Mullock B.M. and Piper R.C. (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* 113 (Pt 9): 1515-1524.
- Ma D.D. and Wei A.Q. (1996). Enhanced delivery of synthetic oligonucleotides to human leukaemic cells by liposomes and immunoliposomes. *Gene Res* 20: 925-930.
- Ma Z., Zhang J., Alber S., Dileo J., Negishi Y., Stolz D., Watkins S., Huang L., Pitt B. and Li S. (2002). Lipid-mediated delivery of oligonucleotide to pulmonary endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 151-159.
- Mahato R.I., Takemura S., Akamatsu K., Nishikawa M., Takakura Y. and Hashida M. (1997). Physicochemical and disposition characteristics of antisense oligonucleotides complexed with glycosylated poly(L-lysine). *Biochem Pharmacol* 53: 887-895.
- Maksimenko A., Malvy C., Lambert G., Bertrand J.R., Fattal E., Maccario J. and Couvreur P. (2003). Oligonucleotides targeted against a junction oncogene are made efficient by nanotechnologies. *Pharm Res* 20: 1565-1567.
- 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: 2016-2023.
- Mardirossian G., Lei K., Rusckowski M., Chang F., Qu T., Egholm M. and Hnatowich D.J. (1997). In vivo hybridization of technetium-99m-labeled peptide nucleic acid (PNA). *J Nucl Med* 38: 907-913.
- Marshall E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286: 2244-2245.

- Marwick C. (1998). First "antisense" drug will treat CMV retinitis. *Jama* 280: 871.
- Mastrobattista E., van der Aa M., Hennink W.E. and Crommelin D.J.A. (2006). Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nat Rev Drug Discovery* 5: 115-121.
- Matsukura M., Shinozuka K., Zon G., Mitsuya H., Reitz M., Cohen J.S. and Broder S. (1987). Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7706-7710.
- Matsuo H., Okamura T., Chen J., Takanaga H., Ohtani H., Kaneda Y., Naito M., Tsuruo T. and Sawada Y. (2000). Efficient introduction of macromolecules and oligonucleotides into brain capillary endothelial cells using HVJ-liposomes. *J Drug Target* 8: 207-216.
- McKay R.A., Cummins L.L., Graham M.J., Lesnik E.A., Owens S.R., Winniman M. and Dean N.M. (1996). Enhanced activity of an antisense oligonucleotide targeting murine protein kinase C- α by the incorporation of 2'-O-propyl modifications. *Nucleic Acids Res* 24: 411-417.
- McKay R.A., Miraglia L.J., Cummins L.L., Owens S.R., Sasmor H. and Dean N.M. (1999). Characterization of a potent and specific class of antisense oligonucleotide inhibitor of human protein kinase C- α expression. *J Biol Chem* 274: 1715-1722.
- Meidan V.M., Cohen J.S., Amariglio N., Hirsch-Lerner D. and Barenholz Y. (2000). Interaction of oligonucleotides with cationic lipids: the relationship between electrostatics, hydration and state of aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1464: 251-261.
- Meidan V.M., Glezer J., Amariglio N., Cohen J.S. and Barenholz Y. (2001). Oligonucleotide lipoplexes: the influence of oligonucleotide composition on complexation. *Biochim Biophys Acta* 1568: 177-182.
- Merdan T., Kopecek J. and Kissel T. (2002). Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 715-758.
- Meyer O., Kirpotin D., Hong K., Sternberg B., Park J.W., Woodle M.C. and Papahadjopoulos D. (1998). Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides. *J Biol Chem* 273: 15621-15627.

- Miller P.S., Yano J., Yano E., Carroll C., Jayaraman K. and Ts'o P.O. (1979). Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* 18: 5134-5143.
- Monia B.P., Johnston J.F., Geiger T., Muller M. and Fabbro D. (1996a). Antitumor activity of a phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide targeted against C-raf kinase. *Nat Med* 2: 668-675.
- Monia B.P., Lesnik E.A., Gonzalez C., Lima W.F., McGee D., Guinosso C.J., Kawasaki A.M., Cook P.D. and Freier S.M. (1993). Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J Biol Chem* 268: 14514-14522.
- Monia B.P., Sasmor H., Johnston J.F., Freier S.M., Lesnik E.A., Muller M., Geiger T., Altmann K.H., Moser H. and Fabbro D. (1996b). Sequence-specific antitumor activity of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide targeted to human C-raf kinase supports an antisense mechanism of action in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15481-15484.
- Morishita R., Gibbons G.H., Ellison K.E., Nakajima M., Zhang L., Kaneda Y., Ogihara T. and Dzaou V.J. (1993). Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8474-8478.
- Morris M.C., Vidal P., Chaloin L., Heitz F. and Divita G. (1997). A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 25: 2730-2736.
- Murata M., Kaku W., Anada T., Sato Y., Kano T., Maeda M. and Katayama Y. (2003a). Novel DNA/polymer conjugate for intelligent antisense reagent with improved nuclease resistance. *Bioorg & Med Chem Lett* 13: 3967-3970.
- Murata M., Kaku W., Anada T., Soh N., Katayama Y. and Maeda M. (2003b). Thermo responsive DNA/polymer conjugate for intelligent antisense strategy. *Chem Lett* 32: 266-267.
- Nakada Y., Fattal E., Foulquier M. and Couvreur P. (1996). Pharmacokinetics and biodistribution of oligonucleotide adsorbed onto poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration in mice. *Pharm Res* 13: 38-43.

- Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H. and Buchardt O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254: 1497-1500.
- Nori A. and Kopecek J. (2005). Intracellular targeting of polymer-bound drugs for cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 609-636.
- Normand N., van Leeuwen H. and O'Hare P. (2001). Particle formation by a conserved domain of the herpes simplex virus protein VP22 facilitating protein and nucleic acid delivery. *J Biol Chem* 276: 15042-15050.
- Normand-Sdiqui N. and Akhtar S. (1998). Oligonucleotide delivery: uptake of rat transferrin receptor antibody (OX-26) conjugates into an in vitro immortalised cell line model of the blood-brain barrier. *Int J Pharm* 163: 63-71.
- Obika S., Nanbu D., Hari Y., Andoh J.-I., Morio K.-I., Doi T. and Imanishi T. (1998). Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O,4'-C-methylenerybonucleosides. *Tetrahedron Lett* 39: 5401-5404.
- Ochietti B., Guerin N., Vinogradov S.V., St-Pierre Y., Lemieux P., Kabanov A.V. and Alakhov V.Y. (2002). Altered organ accumulation of oligonucleotides using polyethyleneimine grafted with poly(ethylene oxide) or pluronic as carriers. *J Drug Target* 10: 113-121.
- Oishi M., Hayama T., Akiyama Y., Takae S., Harada A., Yamasaki Y., Nagatsugi F., Sasaki S., Nagasaki Y. and Kataoka K. (2005). Supramolecular assemblies for the cytoplasmic delivery of antisense oligodeoxynucleotide: polyion complex (PIC) micelles based on poly(ethylene glycol)-SS-oligodeoxynucleotide conjugate. *Biomacromolecules* 6: 2449-2454.
- Oishi M., Sasaki S., Nagasaki Y. and Kataoka K. (2003). pH-responsive oligodeoxynucleotide (ODN)-poly(ethylene glycol) conjugate through acid-labile beta-thiopropionate linkage: preparation and polyion complex micelle formation. *Biomacromolecules* 4: 1426-1432.
- Olson F., Hunt C.A., Szoka F.C., Vail W.J. and Papahadjopoulos D. (1979). Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* 557: 9-23.

- Pagnan G., Stuart D.D., Pastorino F., Raffaghello L., Montaldo P.G., Allen T.M., Calabretta B. and Ponzoni M. (2000). Delivery of c-myc antisense oligodeoxynucleotides to human neuroblastoma cells via disialoganglioside GD(2)-targeted immunoliposomes: antitumor effects. *J Natl Cancer Inst* 92: 253-261.
- Parente R.A., Nir S. and Szoka F.C., Jr. (1988). pH-dependent fusion of phosphatidylcholine small vesicles. Induction by a synthetic amphipathic peptide. *J Biol Chem* 263: 4724-4730.
- Parente R.A., Nir S. and Szoka F.C., Jr. (1990). Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. *Biochemistry* 29: 8720-8728.
- Pastorino F., Brignole C., Marimpietri D., Pagnan G., Morando A., Ribatti D., Semple S.C., Gambini C., Allen T.M. and Ponzoni M. (2003). Targeted liposomal c-myc antisense oligodeoxynucleotides induce apoptosis and inhibit tumor growth and metastases in human melanoma models. *Clin Cancer Res* 9: 4595-4605.
- Peng Z. (2005). Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* 16: 1016-1027.
- Pires P., Simoes S., Nir S., Gaspar R., Duzgunes N. and Pedroso de Lima M.C. (1999). Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1418: 71-84.
- Pirollo K.F., Rait A., Smeer L.S. and Chang E.H. (2003). Antisense therapeutics: from theory to clinical practice. *Pharmacol Ther* 99: 55-77.
- Ponnappa B.C., Dey I., Tu G.C., Zhou F., Aini M., Cao Q.N. and Israel Y. (2001). In vivo delivery of antisense oligonucleotides in pH-sensitive liposomes inhibits lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor-alpha in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 1129-1136.
- Ponnappa B.C., Dey I., Tu G.C., Zhou F., Garver E., Cao Q.N. and Israel Y. (1998). In vivo delivery of antisense oligodeoxynucleotides into rat Kupffer cells. *J Liposome Res* 8: 521-535.
- Pooga M., Soomets U., Hallbrink M., Valkna A., Saar K., Rezaei K., Kahl U., Hao J.X., Xu X.J., Wiesenfeld-Hallin Z., Hokfelt T., Bartfai T. and Langel U. (1998). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol* 16: 857-861.

- Praseuth D., Guieysse A.L. and Helene C. (1999). Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1489: 181-206.
- Putney S.D., Brown J., Cucco C., Lee R., Skorski T., Leonetti C., Geiser T., Calabretta B., Zupi G. and Zon G. (1999). Enhanced anti-tumor effects with microencapsulated c-myc antisense oligonucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9: 451-458.
- Rajur S.B., Roth C.M., Morgan J.R. and Yarmush M.L. (1997). Covalent protein-oligonucleotide conjugates for efficient delivery of antisense molecules. *Bioconjugate Chem* 8: 935-940.
- Raper S.E., Chirmule N., Lee F.S., Wivel N.A., Bagg A., Gao G.P., Wilson J.M. and Batshaw M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80: 148-158.
- Rapozzi V., Cogoi S., Spessotto P., Risso A., Bonora G.M., Quadrifoglio F. and Xodo L.E. (2002). Antigene effect in K562 cells of a PEG-conjugated triplex-forming oligonucleotide targeted to the bcr/abl oncogene. *Biochemistry* 41: 502-510.
- Read M.L., Dash P.R., Clark A., Howard K.A., Oupicky D., Toncheva V., Alpar H.O., Schacht E.H., Ulbrich K. and Seymour L.W. (2000). Physicochemical and biological characterisation of an antisense oligonucleotide targeted against the bcl-2 mRNA complexed with cationic-hydrophilic copolymers. *Eur J Pharm Sci* 10: 169-177.
- 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: 585-590.
- Rockwell P., O'Connor W.J., King K., Goldstein N.I., Zhang L.M. and Stein C.A. (1997). Cell-surface perturbations of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptors by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6523-6528.
- Rodriguez M., Noe V., Alemany C., Miralles A., Bemis V., Caragol I. and Ciudad C.J. (1999). Effects of anti-sense oligonucleotides directed toward dihydrofolate reductase RNA in mammalian cultured cells. *Int J Cancer* 81: 785-792.

- Ropert C., Lavignon M., Dubernet C., Couvreur P. and Malvy C. (1992). Oligonucleotides encapsulated in pH sensitive liposomes are efficient toward Friend retrovirus. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 879-885.
- Ropert C., Malvy C. and Couvreur P. (1993). Inhibition of the Friend retrovirus by antisense oligonucleotides encapsulated in liposomes: mechanism of action. *Pharm Res* 10: 1427-1433.
- Ropert C., Mishal Z., Jr., Rodrigues J.M., Malvy C. and Couvreur P. (1996). Retrovirus budding may constitute a port of entry for drug carriers. *Biochim Biophys Acta* 1310: 53-59.
- 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. and et al. (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: 570-578.
- Ruozi B., Battini R., Tosi G., Forni F. and Vandelli M.A. (2005). Liposome-oligonucleotides interaction for in vitro uptake by COS I and HaCaT cells. *J Drug Target* 13: 295-304.
- Santoro S.W. and Joyce G.F. (1997). A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4262-4266.
- Sato N., Kobayashi H., Saga T., Nakamoto Y., Ishimori T., Togashi K., Fujibayashi Y., Konishi J. and Brechbiel M.W. (2001). Tumor targeting and imaging of intraperitoneal tumors by use of antisense oligo-DNA complexed with dendrimers and/or avidin in mice. *Clin Cancer Res* 7: 3606-3612.
- Sazani P., Gemignani F., Kang S.H., Maier M.A., Manoharan M., Persmark M., Bortner D. and Kole R. (2002). Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues. *Nat Biotechnol* 20: 1228-1233.
- Sazani P., Kang S.H., Maier M.A., Wei C., Dillman J., Summerton J., Manoharan M. and Kole R. (2001). Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs. *Nucleic Acids Res* 29: 3965-3974.
- Schwab G., Chavany C., Duroux I., Goubin G., Lebeau J., Helene C. and Saison-Behmoaras T. (1994). Antisense oligonucleotides adsorbed to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles specifically inhibit mutated Ha-ras-mediated cell proliferation and tumorigenicity in nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10460-10464.

- Selvam M.P., Buck S.M., Blay R.A., Mayner R.E., Mied P.A. and Epstein J.S. (1996). Inhibition of HIV replication by immunoliposomal antisense oligonucleotide. *Antiviral Res* 33: 11-20.
- Semple S.C., Klimuk S.K., Harasym T.O., Dos Santos N., Ansell S.M., Wong K.F., Maurer N., Stark H., Cullis P.R., Hope M.J. and Scherrer P. (2001). Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures. *Biochim Biophys Acta* 1510: 152-166.
- Sevignani C., Calin G.A., Siracusa L.D. and Croce C.M. (2006). Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome* 17: 189-202.
- Seymour L.W., Duncan R., Strohal J. and Kopecek J. (1987). Effect of molecular weight (Mw) 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 F. and Hoekstra D. (2004). Effective intracellular delivery of oligonucleotides in order to make sense of antisense. *J Control Release* 97: 189-209.
- Shi F., Nomden A., Oberle V., Engberts J.B. and Hoekstra D. (2001). Efficient cationic lipid-mediated delivery of antisense oligonucleotides into eukaryotic cells: down-regulation of the corticotropin-releasing factor receptor. *Nucleic Acids Res* 29: 2079-2087.
- Shi F., Wasungu L., Nomden A., Stuart M.C., Polushkin E., Engberts J.B. and Hoekstra D. (2002). Interference of poly(ethylene glycol)-lipid analogues with cationic-lipid-mediated delivery of oligonucleotides; role of lipid exchangeability and non-lamellar transitions. *Biochem J* 366: 333-341.
- 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: 3001-3006.
- Skalko-Basnet N., Tohda M. and Watanabe H. (2002). Uptake of liposomally entrapped fluorescent antisense oligonucleotides in NG108-15 cells: conventional versus pH-sensitive. *Biol Pharm Bull* 25: 1583-1587.
- Slepushkin V.A., Simoes S., Dazin P., Newman M.S., Guo L.S., Pedroso de Lima M.C. and Duzgunes N. (1997). Sterically stabilized pH-sensitive liposomes. Intracellular

- delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo. *J Biol Chem* 272: 2382-2388.
- Smith C.C., Aurelian L., Reddy M.P., Miller P.S. and Ts'o P.O. (1986). Antiviral effect of an oligo(nucleoside methylphosphonate) complementary to the splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate early pre-mRNAs 4 and 5. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2787-2791.
- Song L.Y., Ahkong Q.F., Rong Q., Wang Z., Ansell S., Hope M.J. and Mui B. (2002). Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1558: 1-13.
- 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., Rohl 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: 173-178.
- Stein C.A., Subasinghe C., Shinozuka K. and Cohen J.S. (1988). Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res* 16: 3209-3221.
- Stephenson M.L. and Zamecnik P.C. (1978). Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 285-288.
- Stevenson M. and Iversen P.L. (1989). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1-mediated cytopathic effects by poly(L-lysine)-conjugated synthetic antisense oligodeoxyribonucleotides. *J Gen Virol* 70 (Pt 10): 2673-2682.
- Stewart A.J., Pichon C., Meunier L., Midoux P., Monsigny M. and Roche A.C. (1996). Enhanced biological activity of antisense oligonucleotides complexed with glycosylated poly-L-lysine. *Mol Pharmacol* 50: 1487-1494.
- Stuart D.D. and Allen T.M. (2000a). A new liposomal formulation for antisense oligodeoxynucleotides with small size, high incorporation efficiency and good stability. *Biochim Biophys Acta* 1463: 219-229.

- Stuart D.D., Kao G.Y. and Allen T.M. (2000b). A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1. *Cancer Gene Ther* 7: 466-475.
- Subbarao N.K., Parente R.A., Szoka F.C.J., Nadasdi L. and Pongracz K. (1987). pH-dependent bilayer destabilization by an amphipathic peptide. *Biochemistry* 26: 2964-2972.
- Suh J., Paik H.J. and Hwang B.K. (1994). Ionization of poly(ethylenimine) and poly(allylamine) at various pHs. *Bioorg Chem* 22: 318-327.
- Sun L.Q., Cairns M.J., Saravolac E.G., Baker A. and Gerlach W.L. (2000). Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol Rev* 52: 325-347.
- Taylor L.D. and Cerankowski L.D. (1975). Preparation of films exhibiting a balanced temperature dependence to permeation by aqueous solutions - A study of lower cosolute behavior. *J Polym Sci, Polym Chem Ed* 13: 2551-2570.
- Taylor M.F., Paulauskis J.D., Weller D.D. and Kobzik L. (1996). In vitro efficacy of morpholino-modified antisense oligomers directed against tumor necrosis factor- α mRNA. *J Biol Chem* 271: 17445-17452.
- Thierry A.R. and Dritschilo A. (1992). Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity. *Nucleic Acids Res* 20: 5691-5698.
- Thierry A.R., Rahman A. and Dritschilo A. (1993). Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 952-960.
- Tonkinson J.L. and Stein C.A. (1994). Patterns of intracellular compartmentalization, trafficking and acidification of 5'-fluorescein labeled phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides in HL60 cells. *Nucleic Acids Res* 22: 4268-4275.
- Toub N., Angiari C., Eboue D., Fattal E., Tenu J.P., Le Doan T. and Couvreur P. (2005). Cellular fate of oligonucleotides when delivered by nanocapsules of poly(isobutylcyanoacrylate). *J Control Release* 106: 209-213.
- Trehin R. and Merkle H.P. (2004). Chances and pitfalls of cell penetrating peptides for cellular drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 58: 209-223.

- Troy C.M., Derossi D., Prochiantz A., Greene L.A. and Shelanski M.L. (1996). Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. *J Neurosci* 16: 253-261.
- Vamvakaki M., Billingham N.C. and Armes S.P. (1999). Synthesis of controlled structure water-soluble diblock copolymers via oxyanionic polymerization. *Macromolecules* 32: 2088-2090.
- Van Rompaey E., Engelborghs Y., Sanders N., De Smedt S.C. and Demeester J. (2001). Interactions between oligonucleotides and cationic polymers investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Pharm Res* 18: 928-936.
- 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.
- Vinogradov S.V., Batrakova E.V., Li S. and Kabanov A.V. (2004). Mixed polymer micelles of amphiphilic and cationic copolymers for delivery of antisense oligonucleotides. *J Drug Target* 12: 517-526.
- 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.
- Vives E., Brodin P. and Lebleu B. (1997a). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272: 16010-16017.
- Vives E., Granier C., Prevot P. and Lebleu B. (1997b). Structure-activity relationship study of the plasma membrane translocating potential of a short peptide from HIV-1 Tat protein. *Lett Pept Sci* 4: 429-436.
- Vorobjev P.E., Zarytova V.F. and Bonora G.M. (1999). Oligonucleotide conjugated to linear and branched high molecular weight polyethylene glycol as substrates for RNase H. *Nucleosides & Nucleotides* 18: 2745-2750.
- Wagner E., Zenke M., Cotten M., Beug H. and Birnstiel M.L. (1990). Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3410-3414.
- Wahlestedt C., Salmi P., Good L., Kela J., Johnsson T., Hokfelt T., Broberger C., Porreca F., Lai J., Ren K., Ossipov M., Koshkin A., Jakobsen N., Skouv J., Oerum H.,

- Jacobsen M.H. and Wengel J. (2000). Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5633-5638.
- Walder R.Y. and Walder J.A. (1988). Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5011-5015.
- Walker I., Irwin W.J. and Akhtar S. (1995). Improved cellular delivery of antisense oligonucleotides using transferrin receptor antibody-oligonucleotide conjugates. *Pharm Res* 12: 1548-1553.
- Wallace T.L., Bazemore S.A., Kornbrust D.J. and Cossum P.A. (1996). Single-dose hemodynamic toxicity and pharmacokinetics of a partial phosphorothioate anti-HIV oligonucleotide (AR177) after intravenous infusion to cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 1306-1312.
- Wang L., Kristensen J. and Ruffner D.E. (1998). Delivery of antisense oligonucleotides using HPMA polymer: synthesis of A thiol polymer and its conjugation to water-soluble molecules. *Bioconjugate Chem* 9: 749-757.
- Wang S., Lee R.J., Cauchon G., Gorenstein D.G. and Low P.S. (1995). Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotides against the human epidermal growth factor receptor into cultured KB cells with liposomes conjugated to folate via polyethylene glycol. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3318-3322.
- Wartlick H., Spankuch-Schmitt B., Strebhardt K., Kreuter J. and Langer K. (2004). Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles. *J Control Release* 96: 483-495.
- Washio K., Aoe M., Toyooka S., Mushiake H., Tsukuda K. and Shimizu N. (2003). The effect of epidermal growth factor receptor antisense morpholino oligomer on non-small cell lung cancer cell line. *Oncol Rep* 10: 1967-1971.
- Wengel J. (1999). Synthesis of 3'-C- and 4'-C-branched oligodeoxynucleotides and the development of locked nucleic acid (LNA). *Acc Chem Res* 32: 301-310.
- Weyermann J., Lochmann D., Georgens C. and Zimmer A. (2005). Albumin-protamine-oligonucleotide-nanoparticles as a new antisense delivery system. Part 2: cellular uptake and effect. *Eur J Pharm Biopharm* 59: 431-438.

- Wheeler J.J., Palmer L., Ossanlou M., Graham R.W., Zhang Y.P., Hope M.J., Scherrer P. and Cullis P.R. (1999). Stabilized plasmid-lipid particles: Construction and characterization. *Gene Ther* 6: 271-281.
- Wickstrom E. (1986). Oligodeoxynucleotide stability in subcellular extracts and culture media. *J Biochem Biophys Methods* 13: 97-102.
- Wielbo D., Simon A., Phillips M.I. and Toffolo S. (1996). Inhibition of hypertension by peripheral administration of antisense oligodeoxynucleotides. *Hypertension* 28: 147-151.
- Williams B.R. (1999). PKR: a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18: 6112-6120.
- Williams J.H., Sirsi S.R., Latta D.R. and Lutz G.J. (2006). Induction of dystrophin expression by exon skipping in mdx mice following intramuscular injection of antisense oligonucleotides complexed with PEG-PEI copolymers. *Mol Ther* sous presse.
- Williams S.A., Chang L., Buzby J.S., Suen Y. and Cairo M.S. (1996). Cationic lipids reduce time and dose of c-myc antisense oligodeoxynucleotides required to specifically inhibit Burkitt's lymphoma cell growth. *Leukemia* 10: 1980-1989.
- Wittung P., Kajanus J., Edwards K., Nielsen P., Norden B. and Malmstrom B.G. (1995). Phospholipid membrane permeability of peptide nucleic acid. *FEBS Lett* 365: 27-29.
- Wu G.Y. and Wu C.H. (1992). Specific inhibition of hepatitis B viral gene expression in vitro by targeted antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 267: 12436-12439.
- Wyman T.B., Nicol F., Zelphati O., Scaria P.V., Plank C. and Szoka F.C., Jr. (1997). Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry* 36: 3008-3017.
- Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Ryte A.S., Yurchenko L.V. and Vlassov V.V. (1989). Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6454-6458.
- Yoo B.H., Bochkareva E., Bochkarev A., Mou T.C. and Gray D.M. (2004). 2'-O-methyl-modified phosphorothioate antisense oligonucleotides have reduced non-specific effects in vitro. *Nucleic Acids Res* 32: 2008-2016.
- Yoo H. and Juliano R.L. (2000). Enhanced delivery of antisense oligonucleotides with fluorophore-conjugated PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res* 28: 4225-4231.

- Yoo H., Sazani P. and Juliano R.L. (1999). PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense oligonucleotides. *Pharm Res* 16: 1799-1804.
- Young L.S., Searle P.F., Onion D. and Mautner V. (2006). Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 208: 299-318.
- Yu R.Z., Geary R.S., Leeds J.M., Watanabe T., Fitchett J.R., Matson J.E., Mehta R., Hardee G.R., Templin M.V., Huang K., Newman M.S., Quinn Y., Uster P., Zhu G., Working P.K., Horner M., Nelson J. and Levin A.A. (1999). Pharmacokinetics and tissue disposition in monkeys of an antisense oligonucleotide inhibitor of Ha-ras encapsulated in stealth liposomes. *Pharm Res* 16: 1309-1315.
- Zamecnik P.C. and Stephenson M.L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 280-284.
- Zavaglia D., Normand N., Brewis N., O'Hare P., Favrot M.C. and Coll J.L. (2003). VP22-mediated and light-activated delivery of an anti-c-raf1 antisense oligonucleotide improves its activity after intratumoral injection in nude mice. *Mol Ther* 8: 840-845.
- Zelphati O. and Szoka F.C. (1996a). Liposomes as a Carrier for Intracellular Delivery of Antisense Oligonucleotides - a Real or Magic Bullet. *J Control Release* 41: 99-119.
- Zelphati O. and Szoka F.C., Jr. (1996b). Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm Res* 13: 1367-1372.
- Zelphati O. and Szoka F.C., Jr. (1996c). Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11493-11498.
- Zelphati O., Uyechi L.S., Barron L.G. and Szoka F.C., Jr. (1998). Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim Biophys Acta* 1390: 119-133.
- Zhang H., Taylor J., Luther D., Johnston J., Murray S., Wyatt J.R., Watt A.T., Koo S., York-DeFalco C., Stecker K. and Dean N.M. (2003). Antisense oligonucleotide inhibition of Bcl-xL and Bid expression in liver regulates responses in a mouse model of Fas-induced fulminant hepatitis. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 24-33.
- Zhao H., Greenwald R.B., Reddy P., Xia J. and Peng P. (2005). A new platform for oligonucleotide delivery utilizing the PEG prodrug approach. *Bioconjugate Chem* 16: 758-766.

- Zhou W., Yuan X., Wilson A., Yang L., Mokotoff M., Pitt B. and Li S. (2002). Efficient intracellular delivery of oligonucleotides formulated in folate receptor-targeted lipid vesicles. *Bioconjugate Chem* 13: 1220-1225.
- Zobel H.P., Junghans M., Maienschein V., Werner D., Gilbert M., Zimmermann H., Noe C., Kreuter J. and Zimmer A. (2000). Enhanced antisense efficacy of oligonucleotides adsorbed to monomethylaminoethylmethacrylate methylmethacrylate copolymer nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 49: 203-210.
- Zobel H.P., Kreuter J., Werner D., Noe C.R., Kumel G. and Zimmer A. (1997). Cationic polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7: 483-493.

Partie 2

Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and endosomal escape of biomacromolecules²

Marie-Andrée Yessine and Jean-Christophe Leroux

Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal,
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

Keywords: Anionic polyelectrolytes, conformational change, membrane bilayers, endosomal release, drug delivery

² Paru dans *Adv Drug Del Rev* (2004) 56 : 99-121. Reproduit avec la permission d'Elsevier Science.

Abstract

Water-soluble synthetic polyanions are employed nowadays in a multitude of industrial and biomedical applications and are studied extensively as simplified models of natural polyelectrolytes. The most interesting feature of carboxylated polymers is undoubtedly their ability to undergo coil-to-globule conformational change upon a decrease in pH of the surrounding environment. Over the years, scientists have gained better insights into the conformational behaviour of these polymers in solution and in the presence of membrane bilayers. In addition, when used as protein models, anionic polyelectrolytes can provide valuable information on physiological processes such as domain formation in biological membranes. Recently, polyanions have been evaluated as part of drug delivery systems, either as complexes/conjugates with biomolecules, or in the preparation of pH-sensitive liposomal formulations. This article reviews the fundamental and practical aspects of pH-responsive synthetic polyanions in drug delivery. The pH-dependent conformational behaviour of these polymers in aqueous solution is described in detail using poly(methacrylic acid) as the model polymer. Since binding to cellular membranes is a fundamental issue in understanding the mechanism of action of polyanions in cytoplasmic drug delivery, studies characterizing their interactions with phospholipid bilayers at neutral as well as at acidic pH are reviewed. Finally, pH-responsive delivery systems based on these polymers are described. As the conformational properties of pH-sensitive polyanions can be easily modulated by carefully adjusting their composition, such formulations may represent an attractive strategy to improve the escape of active biomolecules from acidic endosomal compartments.

1. Introduction

Over the last four decades, water-soluble synthetic polyelectrolytes have attracted considerable interest in the scientific community. These macromolecules are employed in a wide range of industrial and biomedical applications, and are studied extensively as simplified models of natural polyelectrolytes such as nucleic acids, polysaccharides or proteins. Polymers can be used to mimic and understand the level of organization of biomembranes as well as the selectivity and specificity of enzymatic processes. Living systems are composed of a variety of macromolecules that can change their conformation and function in response to environmental stimuli. Such dynamic behaviour can be partly reproduced by charged, synthetic macromolecules. For example, weakly-charged polymers that adopt a contracted conformation in aqueous solutions are useful models to investigate the compact structures of globular proteins and the mechanisms of their denaturation (*Annfrieva, 1968*).

Among all synthetic polyelectrolytes, polyanions have been investigated for various applications in the medical field. They have been found to inhibit adjuvant arthritis and modulate phagocytic activity (*Fujiwara, 1996*). Recently, polyanions have been evaluated as part of drug delivery systems, either as complexes/conjugates with biomolecules (*Hoffman, 2000b; Hoffman, 2000a*), or in the preparation of pH-responsive liposomal formulations (*Drummond, 2000*). These polymers can be tailored to interact actively with phospholipid membranes upon external stimulation, such as acidification of the surrounding medium. This strategy has been exploited to improve the cytoplasmic delivery of therapeutically fragile macromolecules (*e.g.* DNA, proteins) that enter cells by endocytosis and end up in acidic organelles. Indeed, following cell uptake, colloidal complexes are most often trafficked rapidly from endosomes to lysosomes where degradation may occur (*Mukherjee, 1997; Mellman, 1996*). Endosomal escape can be promoted by the incorporation of a membrane-destabilizing polyelectrolyte, which releases the internalized, active compounds into the cytoplasm. In the case of liposomal formulations, vesicle destabilization under mildly acidic conditions found in endosomes leads to rapid liposomal content release before degradation takes place in the lysosomes. In addition, pH-sensitive liposomes could, in principle, be used to selectively release their contents in regions of the body where the pH is

lower than physiological due to pathological conditions (*e.g.* tumours, inflammation or infection sites) (*Yatvin, 1980*).

This paper reviews the fundamental and practical aspects of pH-responsive synthetic polyanions in drug delivery. The pH-dependent conformational behaviour of these polymers in aqueous solution is described in detail. Since binding to cellular or subcellular membranes is a fundamental issue in understanding the mechanism of action of polyanions in cytoplasmic drug delivery, studies characterizing their interactions with phospholipid bilayers at neutral as well as at acidic pH are also reviewed. Finally, the use of polyelectrolytes for the design of pH-responsive delivery systems intended to augment the cytoplasmic delivery of drugs and biomacromolecules is discussed. This review is deliberately focused on synthetic polyanions, and thus natural polyelectrolytes such as anionic polysaccharides are not within its scope.

2. *pH-dependent conformational behaviour of anionic polyelectrolytes*

The pH-dependent conformation of weak polyacids has been studied extensively using poly(methacrylic acid) (PMAA) as the model polymer. The following section is thus mainly devoted to PMAA, although the information gathered from these investigations can be largely applied to other anionic polyelectrolytes.

2.1 *Carboxylated homopolymers*

2.1.1 *Effect of ionization on polymer conformation*

In aqueous solution, the conformation of polyelectrolytes bearing pendant carboxylic acid groups is a function of pH. Upon ionization, the polymeric chain becomes more extended as a result of increased electrostatic repulsion between the charged carboxylate groups. Other interacting forces such as hydrophobic interactions and hydrogen bonding may also influence the conformation adopted by a polyelectrolyte in solution. The importance of these forces varies with the ionization degree (α) and chemical

composition of the polymer (*e.g.* presence of alkyl groups, backbone stiffness). Early studies have demonstrated that poly(acrylic acid) (PAA) behaves like a flexible polyelectrolyte and expands monotonously upon neutralization, whereas PMAA resists expansion until a critical charge density is attained (*Amisrieva, 1968; Nagasawa, 1965; Brand, 1974; Sakurai, 1993*). The difference between the behaviours of these two polymers at low pH has been attributed to the presence of hydrophobic methyl groups within the PMAA chain (Fig. 1, A, B).

While PAA is a random coil at low pH, PMAA forms a compact globule, which opens sharply when α exceeds 10 to 30% (pH 4-5). This globule-to-coil transition (Fig. 2) was described for the first time in 1951 by Katchalsky (*Katchalsky, 1951*), who studied the viscometric and potentiometric properties of PMAA solutions. He suggested that the sudden increase in viscosity observed above 10% ionization was mainly induced by changes of shape. Figure 3 compares the variation of PMAA's dissociation constant (pK_a) and reduced viscosity with α , where

$$\eta_{red} = \eta_{sp}/c \quad (1)$$

where η_{sp} is the specific viscosity and c the polymer concentration,

$$pK_a = pH + \log [(1-\alpha)/\alpha] \quad (2)$$

and

$$\alpha = [-COO^-] / ([-COO^-] + [-COOH]) \quad (3)$$

As opposed to PAA or other hydrophilic polyacids (*e.g.* poly(β -malic acid)) (*Seki, 1984b*), where pK_a increases linearly with α , the PMAA titration curve goes through a maximum at low α values. Discontinuity of the pK_a curves coincides with an abrupt viscosity increase. Abnormal PMAA behaviour at low α can be also detected by calorimetry, as unusual enthalpies of dissociation compared to PAA have been reported (*Crescenzi, 1972; Delben, 1972*). These titration profiles characterize molecules such as globular proteins and ionizable poly(α -amino acids) (*e.g.* poly(L-glutamic acid) (PGA) (*Nagasawa, 1964; Barone, 1966*)) that undergo a sharp conformational change. PMAA transition has been further characterized (*Leyte, 1964; Mandel, 1967; Leyte, 1972*), and a procedure has been proposed to derive free energy change for transition between the contracted and expanded forms (*Leyte, 1964*).

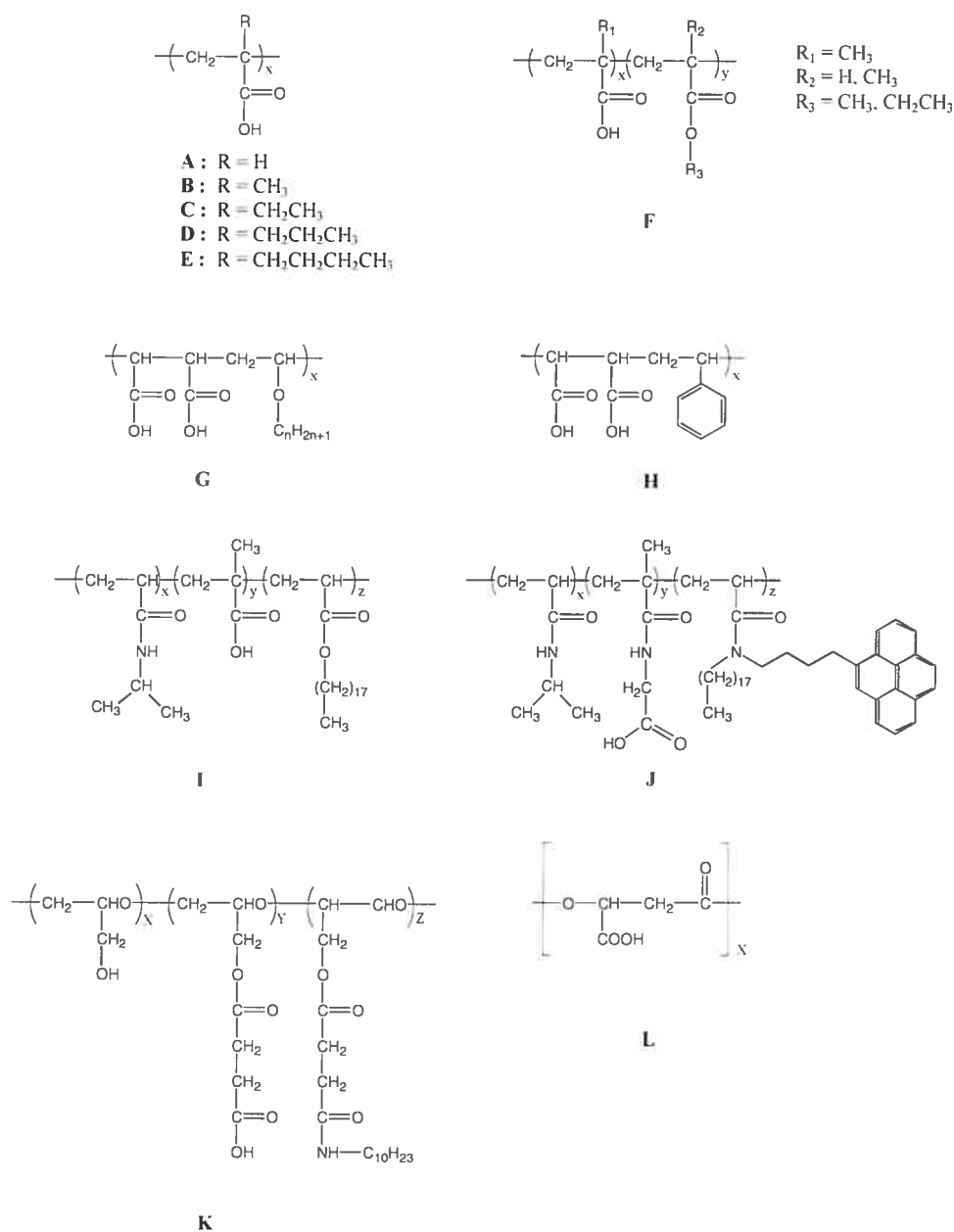


Figure 1. Chemical structures of (A) PAA, (B) PMAA, (C) PEAA, (D) PPAA, (E) PBAA, (F) MAA-alkyl(meth)acrylate copolymers, (G) alternating maleic acid/alkyl vinyl ether copolymers, (H) alternating maleic acid/styrene copolymer, (I) P(NIPAM-*co*-MAA-*co*-ODA), (J) PNIPAM-Py-Gly, (K) hydrophobically modified succinylated poly(glycidol), and (L) poly(β -malic acid).

Because of the simplicity of its structure, PMAA is considered a model compound for understanding the behaviour of more complex polyelectrolytes such as proteins. Thus, its pH-induced conformational change has been investigated under different conditions. For instance, salts have been shown to stabilize the compact form and to spread the

transition over a larger range of α due to screening effects (Leyte, 1964; Anufrieva, 1968; Nagasawa, 1965). This has confirmed the hypothesis that the transition is caused by repulsion between fixed charges along the chain. Other factors, such as polymer concentration (Heitz, 1999) (Fig. 3), tacticity (Nagasawa, 1965; Leyte, 1972; Davenport, 1980a), molecular weight (Olea, 1999) and temperature (Joyce, 1981; Sakurai, 1993), have been demonstrated to affect PMAA conformational behaviour in aqueous solution.

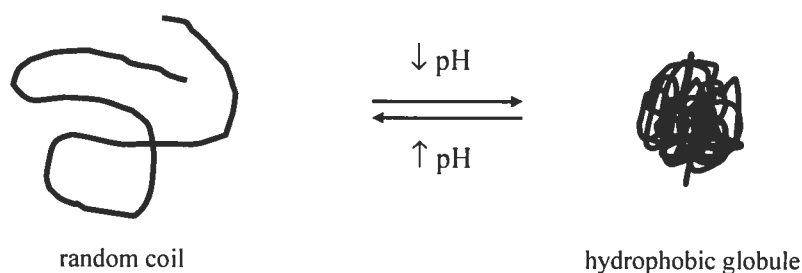


Figure 2. Schematic representation of the reversible conformational change underwent by anionic, carboxylated polymers such as PMAA upon variations in pH of surrounding environment.

In addition to potentiometric titration, viscometry and calorimetry, several spectroscopic techniques such as ultraviolet (UV) (Mandel, 1967; Davenport, 1980a), Raman (Koenig, 1969; Lando, 1973), Fourier transformed infrared (FTIR) (Mandel, 1967; Nakashima, 1999; Dong, 2001), small angle X-ray scattering (SAXS) (Plestil, 1986; Heitz, 1999; Muroga, 1999) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (Cutnell, 1976; Kay, 1976), have been used to characterize polymer transition. PMAA conformational change has also been monitored by spectrofluorimetry with fluorescent probes either dissolved in the medium or covalently attached to the polymer. Solubilized probes, such as auramine O (Anufrieva, 1968; Wang, 1986), pyrene (Chen, 1979; Chu, 1984; Olea, 1989), 1-pyrenemethanol (Nakashima, 1999), tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) (Chu, 1985) and 9-methylanthracene (Tan, 1980), have been commonly employed to report on modifications in the nature of their microenvironments, which are reflected by variations in their fluorescence spectra and/or lifetime (Kalyanasundaram, 1977). Thus, alterations in the fluorescence characteristics of a probe in solution in the presence of a polyanion reveal differences between the relatively hydrophobic environment in which the probe is solubilized at low pH, and the polar aqueous medium in which it is expelled upon neutralization. Covalently-linked labels

(e.g. 5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulfonate (Bednar, 1985; Bednar, 1991), pyrene (Chu, 1984; Stramel, 1988), 9,10-diphenylanthracene (Delaire, 1984), as well as acenaphthylene or 1-vinylnaphthalene (Soutar, 1993, 1994b, 1994a)) have provided further information on polyelectrolyte conformation as they remain associated with the polymer even in its extended form. They have served to directly examine polymer segmental dynamics by means of time-resolved anisotropy measurements. It has been demonstrated that the label's average excited lifetime decreases as the PMAA chain expands, and this is attributed to the greater fluidity and polarity of its surrounding environment (Bednar, 1991; Soutar, 1994a). However, as pointed out by Morawetz (Morawetz, 1996) and Soutar and Swanson (Soutar, 1994a), one should be careful about the extent to which the behaviour of the polymer is perturbed by the presence of a covalently-bound fluorophore.

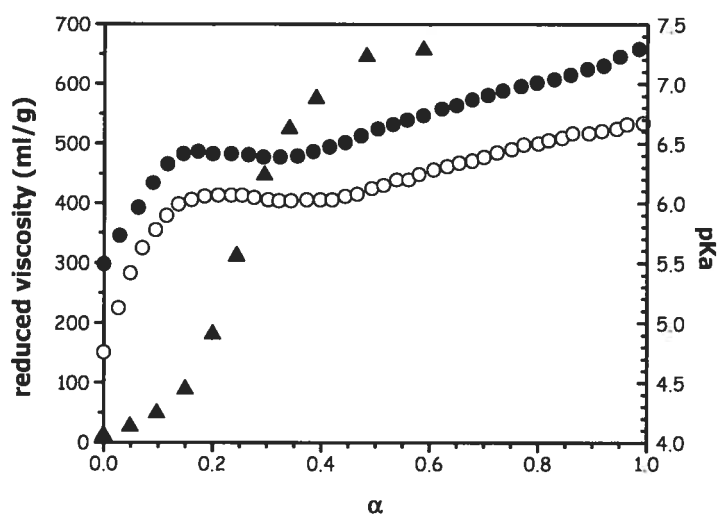


Figure 3. Plot of pK_a (circles) and η_{red} (triangles) versus α : $c_p = 6.88 \times 10^{-4}$ g/mL (full symbols), $c_p = 9.03 \times 10^{-3}$ g/mL (open symbols). Adapted from Heitz et al. (1999) with permission from Elsevier Science.

Luminescence studies of pH-induced conformational changes of polyelectrolytes have been considerably refined by the use of extrinsic mobile quenchers. The extent to which a given quencher will access a fluorophore depends on several factors, such as polymer chain mobility, intracoil microviscosity and hydrophobicity, and the nature of the quencher itself (charge, hydrophobicity). Various quenchers have been tested, including neutral molecules like nitromethane, and ionic species such as Ti^+ and I^- (Chen, 1979; Chu, 1984; Olea, 1989; Delaire, 1984; Soutar, 1993). Quenching studies conducted with PMAA

and PAA have revealed that polymers unfolding with increasing pH enhance the accessibility of quencher molecules to the fluorophore, although the effect is less pronounced for PAA than for PMAA (*Chu, 1984*). These results confirm that PAA adopts a loosely coiled form at low pH.

Although its behaviour in solution has been less scrutinized than PMAA, poly(ethylacrylic acid) (PEAA) (Fig. 1, C) is known to present a conformational transition that is even more pronounced. Evidence for this pH-induced globule-to-coil transition has been provided by potentiometric (*Fitchner, 1977; Joyce, 1981*), spectroscopic (*Sugai, 1983; Borden, 1987*) and light scattering (*Eum, 1989*) techniques. The compact form of PEAA is stabilized by hydrophobic interactions between ethyl groups and is more stable than that of PMAA (*Sugai, 1983*). As observed for PMAA (*Olea, 1999*), the pH of conformational transition depends on polymer chain length (*Schroeder, 1989; Linhardt, 1999*).

2.1.2 Short-range versus long-range interactions

Nagasawa and coworkers (*Kitano, 1980; Nagasawa, 1980; Muroga, 1985*) studied PAA conformation in aqueous solution assuming that it was determined by two independent factors: local chain stiffness caused by steric hindrance between adjacent segments (short-range interactions), and the excluded volume effect occurring between segments far apart along the chain (long-range interactions). The excluded volume effect becomes negligible in θ conditions, where any type of interaction (*e.g.* polymer-polymer, polymer-solvent) can be neglected. Accordingly, polymer conformation is Gaussian (*i.e.* the polymer coil moves in a random manner) and its distribution of segments follows the Debye theory. θ conditions occur at a very specific temperature for a given polymer/solvent pair. As solvent power is increased, the flexible polymer chains expand and their conformation deviates from Gaussian on account of the excluded volume effect. Alternatively, the conformation of a semi-flexible chain ("locally stiff" polymer) deviates from the Gaussian chain due to intrinsic stiffness of the backbone, a behaviour described by the wormlike chain model (*Skolnick, 1977*). At high ionic strength or under acidic conditions, PAA conformation is close to a Gaussian coil. Upon neutralization (*i.e.* as the solvent quality increases), PAA expands and its conformation deviates from the Gaussian chain.

Dynamic light scattering experiments have been carried out to determine whether this deviation could be attributed to local chain stiffness or to long-range, excluded volume effect interactions (Nagasawa, 1980; Kitano, 1980). The particle scattering factor $P(\theta)$, which reflects the distribution of PAA segments, was measured and compared to theoretical values calculated according to the Debye theory, the wormlike chain model, and the excluded volume effect theory (Fig. 4). The distribution of PAA segments agreed well with the excluded volume effect theory, but differed importantly from that of an extended wormlike polymer and a random coil in θ solvent. From this study, it was concluded that the excluded volume effect was predominant in the expansion of flexible polyelectrolyte chains like PAA. Thus, it was proposed that PAA expands without a significant change in its local flexibility. Variations in polymer local flexibility can be directly evaluated by determining the persistence length of the chain. The theory of excluded volume effect assumes that persistence length remains constant regardless of polymer charge density and ionic strength of the solution. Conversely, in the wormlike chain model, this parameter increases with chain expansion. Persistence lengths of PAA samples in semi-dilute aqueous salt solutions were measured by Muroga *et al.* using SAXS and were shown to be essentially independent of charge density or salt concentration (Muroga, 1985). A similar investigation performed with PMAA samples gave comparable results, in spite of the overall globule-to-coil conformational change experienced by this polymer (Muroga, 1999). The constant local conformation and importance of long-range interactions in neutralized PAA were also evidenced by NMR spectroscopy (Muroga, 1969).

Walczak *et al.* investigated the local conformation of PAA by polarized Raman spectroscopy (Walczak, 1992). Although their first study (Walczak, 1992) was in excellent agreement with the work of Muroga *et al.* (1985), a second investigation carried out with an improved spectroscopic method gave conflicting results, since the persistence length was found to increase with charge density (Walczak, 1996). These discrepancies were explained by differences in PAA concentrations, molecular weight, tacticity, as well as varying salt concentrations, which render data comparison problematic.

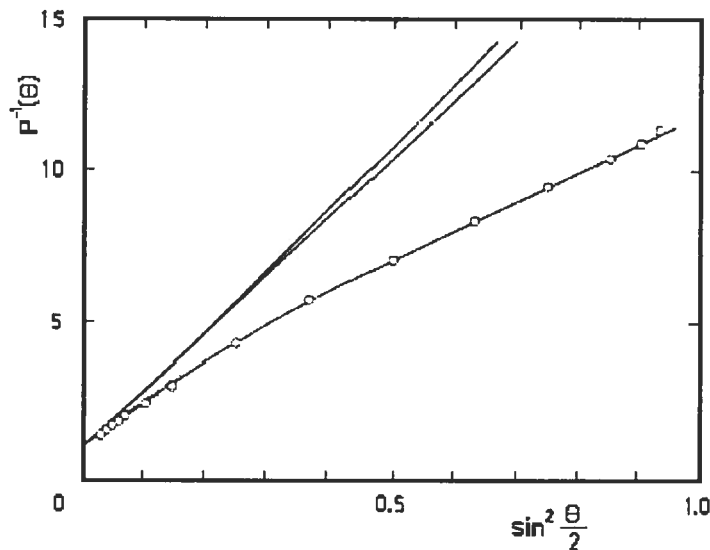


Figure 4. Comparison of experimental and calculated $P(\theta)$ values for various PAA conformations at $\alpha = 0.6$ and salt concentration of 0.025 N. The solid lines represent $P(\theta)$ values calculated for Gaussian chains (G), wormlike chains (W) and for non-Gaussian chains with the excluded volume effect (E). Adapted from Kitano et al. (1980) with permission from the American Chemical Society.

2.1.3 *Controversial issues*

Despite the considerable amount of information on PMAA, some controversial issues remain. First, there is some disagreement about the forces stabilizing the compact structure of the polymer at low α values. Hydrophobic interactions and short-range van der Waals forces associated with methyl side chains as well as hydrogen bonding between carboxyl groups are possibly involved (Table 1). Hydrophobic interactions are most often postulated to explain the stabilization of the compact PMAA form. If the compact form is stabilized by such interactions, aqueous-organic solvent mixtures should affect the nonpolar group-water interaction. Viscometry experiments conducted in water-methanol mixtures have indeed shown that when present at concentrations greater than 20%, alcohol lowers the stability of the compact structure and leads to smooth unfolding of the macromolecule (Anufrieva, 1968; Brand, 1974). However, contradictory results have been obtained by UV spectrophotometric titration, which still revealed PMAA abrupt conformational transition in water containing 40% methanol (Mandel, 1967). It was concluded from the latter work

that the stability of the compacted chain was primarily due to van der Waals interactions between neighbouring methyl groups rather than by restructuring of water molecules around the methyl groups (hydrophobic interactions). Alternatively, UV and FTIR spectroscopy data have demonstrated that hydrogen bonding between adjacent ionized and unionized carboxyl groups played an important role in stabilizing the compact conformation of PMAA (Davenport, 1980a; Dong, 2001). It has been shown that PMAA becomes more compact in the initial stages of ionization (Bednar, 1985; Bednar, 1991), a behaviour that can be rationalized by such strong attractive forces only. It is indeed probable that all three kinds of interactions contribute to stabilization of the PMAA contracted state, although the relative importance of each of them remains to be determined.

Table 1. Forces attributed to stabilization of the compact state of PMAA

Research groups	Reference(s)	Technique(s) used to study PMAA conformational change	Force(s) invoked for the stabilization of the compact form
Katchalsky	(Katchalsky, 1951)	Viscometry	Hydrogen bonding
Anufrieva	(Anufrieva, 1968)	Potentiometry	van der Waals interactions
		Potentiometry	Hydrophobic interactions
		Viscometry	
		Luminescence	
Mandel <i>et al.</i>	(Leyte, 1964), (Mandel, 1967)	Potentiometry	van der Waals interactions
Delben <i>et al.</i>	(Delben, 1972)	UV spectroscopy	
Braud <i>et al.</i>	(Brand, 1974)	Calorimetry	Hydrophobic interactions
		Potentiometry	Hydrophobic interactions
		Viscometry	
Davenport and Wright	(Davenport, 1980a), (Davenport, 1980b)	UV spectroscopy	Hydrogen bonding
Yamashita and Kwak	(Yamashita, 1987)	Direct flow microcalorimetry	No contribution of hydrophobic interactions
Bednar <i>et al.</i>	(Bednar, 1985), (Bednar, 1991)	Fluorescence	Hydrogen bonding
			Hydrophobic interactions
Sakurai <i>et al.</i>	(Sakurai, 1993)	Viscometry	Hydrogen bonding
		Potentiometry	
Dong <i>et al.</i>	(Dong, 2001)	FTIR	Hydrogen bonding
			Hydrophobic interactions

The nature of the polymer structure in the compact and extended form is also a matter of debate. Some authors have claimed that in what is called the contracted form of PMAA, there is considerable water penetration and that uncharged PMAA has in fact overall dimensions that are intermediate between those of a compact dehydrated sphere and

a Gaussian coil (*Yamashita, 1987; Leyte, 1972; Heitz, 1999*). A number of reports support the hypothesis that the transition is cooperative in nature [*Anufrieva, 1968 #247; Leyte, 1964 #252; [Mandel, 1967 #253; Nakashima, 1999 #264]*]. This conformational transition has been found to be more complex than a simple one-step process. Rather, it has been suggested to take place through multiple intermediate steps, with different stages of unfolding as α increased (*Koenig, 1969; Chu, 1984; Olea, 1989; Chu, 1985; Dong, 2001*). An “interconnected globular structure” has been also proposed, in which the PMAA chains, at low pH, form compact clusters joined by flexible, short interconnecting segments. During the neutralization process, the size of the clusters decreased up to a certain limit, beyond which they disintegrated completely to an expanded polymer chain (*Bednar, 1991; Soutar, 1994a*). Tan and Treolar (*Tan, 1980*) established that these clusters were present for PMAA molecular weights (MWs) above 10,000.

2.2 Carboxylated copolymers

2.2.1 Acrylic and methacrylic acid copolymers

Hydrophobic modifications affect both the segmental mobility of polyelectrolytes and the pH range over which the transition is apparent. This is especially striking for acrylic acid (AA)-based systems, since PAA is a flexible polymer that shows no conformational transition in aqueous media. Incorporation of hydrophobic molecules into PAA (*e.g.* fluorescent probes (*Turro, 1986; Turro, 1991; Morishima, 1987*), *n*-alkyl chains (*Philippova, 1997, 1996; Gaspar, 2001*), ethyl acrylate (EA) (*Tan, 1973, 1974; Tan, 1975*) or ethyl methacrylate (*de Oliveira, 1996*) results in conformational behaviours similar to those observed with PMAA.

The pH of phase transition and polarity of the hydrophobic domains depend on the proportion and nature of hydrophobes. For example, copolymers of methacrylic acid (MAA) (Fig. 1, F) have shown conformational transition that shifted progressively towards higher pH values with increasing hydrophobicity and/or content of hydrophobic comonomers (*e.g.* styrene or alkyl(meth)acrylate derivatives) (Fig. 5) (*Ebdon, 1995; Yessine,*

2003). Copolymers of AA and methyl methacrylate generated hydrophobic domains capable of solubilizing pyrene, although these domains were more polar than those formed by the analog copolymers of AA and styrene (Conio, 1976; Ebdon, 1994).

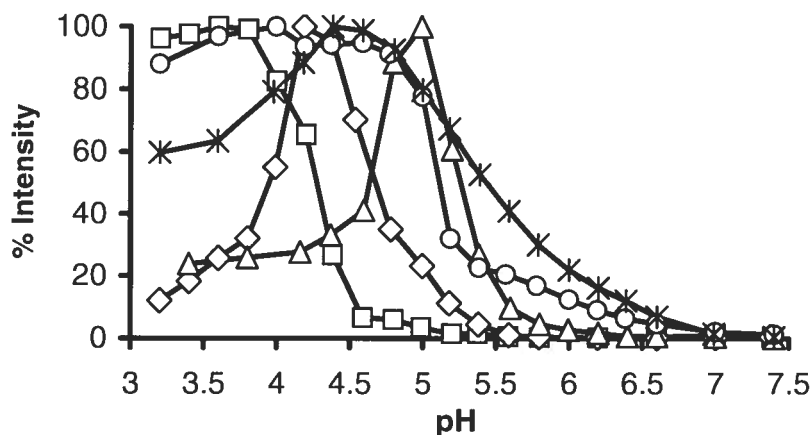


Figure 5. Precipitation pH of MAA/alkyl(meth)acrylate copolymers MMA₅₀-co-MAA₅₀ (squares), EA₅₀-co-MAA₅₀ (diamonds), MA₃₅-co-EA₃₅-co-MAA₃₀ (triangles), MMA₇₀-co-MAA₃₀ (circles), and MA₄₅-co-MMA₄₅-co-MAA₁₀ (stars) as measured by turbidimetry at 37°C in phosphate buffer. Polymers' precipitation pH was measured as an increase in light scattering intensity at 480 nm. MMA=methyl methacrylate, EA=ethyl acrylate, MA=methyl acrylate, MAA=methacrylic acid. Reprinted from Yessine et al. (2003) with permission from Elsevier Science.

2.2.2 *Maleic acid copolymers*

Reversible conformational transitions have been demonstrated in a hydrolyzed, alternating copolymer of maleic anhydride and butyl vinyl ether (Dubin, 1967) (Fig. 1, G). This polymer expanded from a “hypercoiled” state to a polyelectrolyte configuration upon progressive neutralization of the primary carboxyl groups. However, in contrast to PMAA, this conformational transition presented a “two-state” character, which implies that the polymer did not show different stages of unfolding, but jumped abruptly from one state to the other (Strauss, 1979). Maleic acid copolymers of methyl and ethyl vinyl ether did not exhibit conformational transition (Dubin, 1967; Strauss, 1975a, 1975b). Since these polymers differ from the butyl species only in the number of methylene groups in their alkyl side chains, hydrophobic forces were unanimously invoked for stabilization of the compact form. An increase in alkyl chain length (e.g. pentyl, hexyl and octyl side groups) was shown

to enhance the stability of the compact state and shifted transition to higher α values (Dubin, 1970; Strauss, 1978a, 1978b). However, copolymers of decyl vinyl ether or longer alkyl chains retained compact conformation over the entire range of α (Binana-Limbele, 1987). The effect of alkyl chain length on conformational transition is illustrated in Figure 6. A similar trend was observed for copolymers of maleic acid and α -olefins (Bianchi, 1970; Fenyo, 1977; Chu, 1987). High MW copolymers with long alkyl chains ($\geq C_{12}$) formed small intramolecular micelles in aqueous solution (Strauss, 1982; Barbieri, 1985; Zdanowicz, 1993). The fraction of alkyl side chains under the form of microdomains was shown to increase with decreasing α and with rising carbon number (Binana-Limbele, 1990; Anthony, 1994).

An alternating hypercoiling copolymer of maleic acid and styrene was studied extensively by Sugai and coworkers (Fig. 1, H). This copolymer exhibited conformational transition upon ionization (Ohno, 1973; Okada, 1977) similar to that of PMAA and maleic acid-butyl vinyl ether copolymers (Fig. 6). Resistance to chain expansion was attributed to intramolecular hydrophobic interactions between the phenyl groups. Derivative spectroscopy established the “two-state” character of pH-induced conformational transition, and kinetics studies demonstrated that it occurred in about 500 ms (Sugai, 1974; Ohno, 1978). This is similar to PMAA, but considerably slower than the helix-coil transition of poly(α -aminoacids) (about 20 μ s) (Lumry, 1964).

2.2.3 *N-isopropylacrylamide (NIPAM) copolymers*

NIPAM homopolymers (PNIPAM) are physically characterized by their lower critical solution temperature (LCST), which is around 32°C in aqueous solution (Heskins, 1968). They are soluble below their LCST, and undergo phase transition when heated above it. By randomly introducing a small proportion of a titratable comonomer in the structure of PNIPAM, its LCST can be increased above 37°C, making the polymer pH-responsive (Taylor, 1975; Hirotsu, 1987; Chen, 1995; Kim, 1994; Dong, 1991). A randomly-alkylated copolymer of NIPAM and MAA (Fig. 1, I) was synthesized by our group and was shown to undergo pH- and temperature-triggered conformational change (Roux, 2003). At neutral pH, light scattering and differential scanning calorimetry (DSC) experiments revealed that the polymer underwent coil-to-globule phase transition over a wide range of

temperatures. At acidic pH, the decreased LCST was accompanied by a reduction in the cooperativity degree of phase transition.

Thus, it appears that the conformational properties of pH-sensitive, water-soluble polymers can be easily modulated by carefully adjusting their composition. As explained below, this in turn will influence interaction with the cell membrane and the efficacy of the drug formulation.

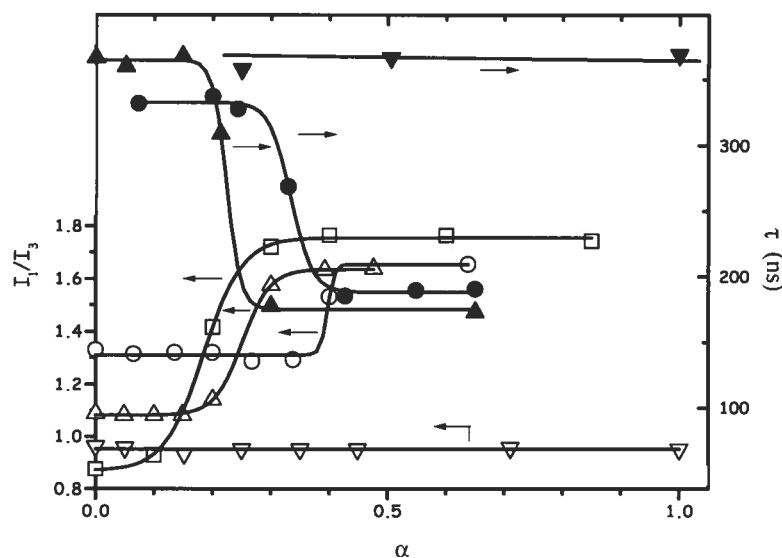


Figure 6. Variations in the ratio of the first (372 nm) and third (383 nm) peaks of pyrene emission spectrum (I_1/I_3 ratio) (open symbols) and fluorescence lifetime (full symbols) with neutralization degree α for PMAA (squares), alternating copolymer of maleic acid and styrene (circles) and alternating copolymers of maleic acid and butyl (triangles) or decyl (reversed triangles) vinyl ether at 25°C. Concentrations: 0.05 M for PMAA and maleic acid/alkyl vinyl ether copolymers; 0.025 M for maleic acid/styrene copolymer. Reprinted from Binana-Limbele and Zana (1987) with permission from the American Chemical Society.

3. Interaction of anionic polyelectrolytes with membrane bilayers

Surface-active polymers can sensitize phospholipid bilayer membranes to a variety of external stimuli. This feature has been exploited to create vesicles that rapidly release their contents in response to changes in temperature (Seki, 1984a), glucose concentration (Devlin, 1986), light intensity (Ferrito, 1988; Yon, 1991) and pH (Tirrell, 1985). In the preparation of a pH-sensitive delivery system designed to exhibit maximal activity under acidic conditions, minimal membrane perturbation is generally expected to occur at neutral pH. Thus, it is of prime importance to study the interactions of polyelectrolytes with

membrane bilayers at acidic as well as at neutral pH. In addition, when used as protein models, polyelectrolytes can provide valuable information on physiological processes such as domain formation in biological membranes.

3.1 Polymer-lipid interaction at neutral pH

It is well-established that water-soluble polyelectrolytes bearing a sufficient proportion of hydrophobic groups aggregate in aqueous solution despite the presence of repulsive charges on the backbone. These polymers present thickening properties in solution at increasing concentrations, which are attributed to associations of their hydrophobic moieties and the formation of a reversible, cross-linked polymer network. Conversely, in dilute solutions, lower viscosity values compared to their unmodified analog suggest that intramolecular associations take place (*Wang, 1988; Magny, 1991; Senan, 1994; Petit, 1996; Dai, 2000; Ng, 2001*). When lipid membranes are mixed with such polymers, incorporation of hydrophobic groups into the bilayer often prevails over self-association. This was demonstrated for a NIPAM copolymer bearing pH-sensitive glycine carboxyl groups, and hydrophobically-modified with 1 mol% pyrenyl-octadecyl moieties (PNIPAM-Py-Gly) (Fig. 1, J). In aqueous solutions, PNIPAM-Py-Gly adopted a micellar structure with a hydrophobic core composed of pyrene and octadecyl groups (*Spafford, 1998*). Addition of the copolymer to a suspension of cationic liposomes induced micelle disruption, as the hydrophobic groups penetrate into the bilayer (*Položova, 1999*). In this particular case, binding of the polymer to the phospholipid membrane was shown to be primarily driven by electrostatic interactions between cationic lipids and glycine residues, as well as by hydrophobic forces (*Položova, 1999; Franzin, 1998*). The interaction of PNIPAM-Py-Gly with neutral phospholipid liposomes was weak because of the absence of electrostatic interactions and the low proportion of alkyl chains (*Položova, 1999*). When hydrophobic forces are sufficiently important, binding of anionic polymers to neutral and even to negatively-charged lipid bilayers becomes possible (*Ladavière, 2002; Ladavière, 2001*). Conversely, if interactions between hydrophobic groups are too strong, intramolecular association may prevail over insertion into the bilayers (*Yessine, 2003*).

Depending on the proportion of hydrophobic side groups within the polymer backbone, the charge density and polymer concentration, the association can either stabilize the vesicles by adsorption or induce structural changes (leakage, membrane disruption). For example, high binding levels of PNIPAM-Py-Gly to liposomes created areas of high local curvature leading to local defects, but did not induce liposome destruction. Similarly, hydration of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) multilamellar vesicles (MLVs) at pH 7.4 in the presence of PEEA homopolymer elicited an increase in the gel-liquid crystalline transition half-width of DPPC, whereas the enthalpy of transition was unaffected by the polymer (*Seki, 1984a*). This suggested that PEEA was essentially adsorbed to the external leaflet of the lipid membrane and did not access the inner layer. PEEA adsorption was maximal at the lipid phase transition temperature (T_m) (*Thomas, 1996*), and the phenomenon was concentration-dependent until saturation of the vesicle surface was achieved (*Thomas, 1994a*). Studies involving hydrophobically-modified PAAs of varying hydrophobicity and charge density further showed that, at pH 7.0, polymers bearing a few pendant octadecyl chains along the backbone adsorbed to vesicles and induced their stabilization (*Ladavière, 2001; Ladavière, 2002; Nagy, 2001*). However, more hydrophobic polymers bearing >25 mol% octyl groups completely destabilized small unilamellar vesicles (SUVs) by forming smaller, mixed structures (*Ladavière, 2001*), and triggered dextran leakage from giant unilamellar vesicles (*Ladavière, 2002*).

Binding of polyelectrolytes to bilayer membranes can induce the formation of heterogeneous environments. Upon polymer binding, domain formation with selective lipid enrichment has been investigated extensively by Macdonald and coworkers (*Mitrakos, 1997, 2000; Macdonald, 2000*) using deuterium (^2H) NMR spectroscopy of choline-deuterolabeled palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC- α - d_2 and POPC- β - d_2) (Fig. 7A). They studied the electrostatic interactions of poly(styrenesulfonate) (PSS), PAA and PGA with cationic lipid bilayers consisting of mixtures of POPC and dioleoyldimethylammonium propane (DODAP). Binding of all three polyanions modified the POPC NMR pattern and was consistent with the presence of polyelectrolyte-free and polyelectrolyte-bound domains. As shown in Figure 7B-2 and 7B-3, one POPC- β - d_2 sub-spectrum displayed quadrupolar splitting greater than that of the control (Fig. 7B-1), which grew in intensity with added

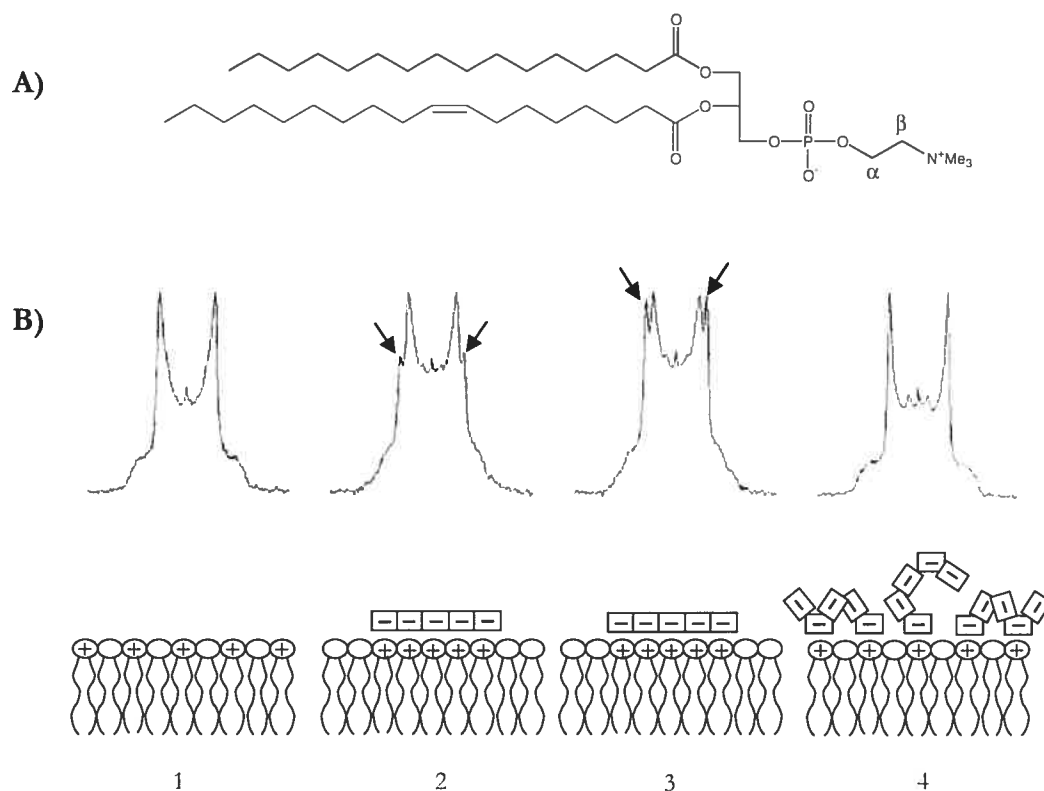


Figure 7. (A) Chemical structure of POPC. The position of the deuterons in POPC- α - d_2 and POPC- β - d_2 are indicated in the figure. (B) ^2H NMR spectra of mixed DODAP + POPC- β - d_2 (20/80) cationic lipid bilayers as a function of added PSS in amounts corresponding to, from left to right, 0, 0.75, 1.0 and 2.0 equivalents of PSS anionic charge to DODAP cationic charge. Arrows indicate the emergence of the polyelectrolyte-bound population with a quadrupolar splitting greater than the control. A schematic picture of anionic polyelectrolyte bound to the outer leaflet of a mixed cationic + zwitterionic lipid bilayer at different anion/cation charge ratios is shown at the bottom of each spectrum. Adapted from Mitrakos and Macdonald (1997) with permission from the American Chemical Society.

PSS. The polyelectrolyte-bound population was enriched with DODAP, while the polyelectrolyte-free population was correspondingly depleted. At concentrations below the anion/cation equivalence point, it was suggested that the polyelectrolyte lies flat on the membrane surface. When the amount of added polyelectrolyte exceeded charge equivalence, the quadrupolar splittings tended toward values characteristic of the control cationic bilayer in the absence of polyelectrolyte. According to these authors, the enriched DODAP domains were then dissipated due to a more brush-like configuration adopted by the polyelectrolyte (each of its charge is no longer bound with a lipid surface charge) (Fig. 7B-4). Cationic amphiphile segregation was correlated with the potential of the

polyelectrolyte to penetrate into the bilayer. More hydrophobic PSS formed the most compact domains, while hydrophilic PGA produced larger domains containing more POPC (Mitrakos, 1997). The extent of polymer binding was also related to its hydrophobicity and followed the order PSS > PAA > PGA (Porcar, 1997). Domain size on a per chain basis was linearly proportional to the MW of the polyelectrolyte (Mitrakos, 2000). Overall, studies of anionic polymer-lipid interactions at neutral pH showed that anionic polyelectrolytes are capable of inducing domain formation in oppositely-charged lipid bilayers by means of electrostatic attractions. In the absence of such attractive forces, interactions between polyelectrolytes and phospholipid bilayers are driven by hydrophobic substituents.

3.2 pH-dependent polymer-lipid complexation

As discussed above, acid titration of a weak polyacid generally induces modification of its conformation. The state of ionization determines the ability of the polymer to interact/destabilize lipid membranes. To date, four major systems have been investigated as membrane-lytic polymers, *i.e.* poly(alkylacrylic acid)s, NIPAM copolymers, succinylated poly(glycidol)s, and poly(β -malic acid) (Fig. 1).

3.2.1 Poly(alkylacrylic acid) derivatives

In 1984, Seki and Tirrell (Seki, 1984a) demonstrated that some poly(alkylacrylic acid)s could associate to phosphatidylcholine membranes and modify their phase-transition behaviour in a pH-dependent manner. Upon acidification, PAA and PMAA induced vesicle aggregation (Fujivara, 1997) and increased the bilayer permeability to small molecules (Kitano, 1991; Kitano, 1994). In contrast to PAA and PMAA, which showed no ability to solubilize phospholipid membranes at any pH, PEAA was found to cause complete membrane reorganization under acidic conditions (Seki, 1984a; Thomas, 1995). PEAA alone underwent pH-dependent conformational transition at pH 6.1-6.2 (Borden, 1987), whereas the pH of transition was shifted to 6.5 in the presence of DPPC vesicles (Borden, 1987; Schroeder, 1989; Thomas, 1992). This shift was attributed to hydrogen bonding between the unionized carboxyl groups of PEAA and the phosphodiester functions of the

lipid surface. Hydrogen bonding was considered as the main driving force for polymer complexation, the latter being dependent on external pH, the polymer's pK_a , and tacticity (Seki, 1984a).

At low pH and above the T_m , low concentrations of PEAA (< 3% w/w PEAA/lipid) strongly adsorbed to a variety of MLVs, including negatively-charged liposomes (Seki, 1984a). Moreover, membrane permeabilization to small molecules (Tirrell, 1985) or ions (Thomas, 2000) and pore formation (Chung, 1996) were demonstrated. Selective recognition of labeled membranes resulting in dye release was observed between PEAA-bound adenine and lipid surface-bound thymine functional groups (Pinilla, 1994). At sufficiently high concentrations (> 50% w/w PEAA/lipid), the polymer induced the formation of mixed micellar aggregates (Borden, 1988). Thomas and Tirrell (Thomas, 1992) hypothesized that a change in polymer conformation may not be required for membrane solubilization. As carboxylic groups are protonated, PEAA becomes more hydrophobic and adsorbs to the outer leaflet of the bilayer. This may cause membrane expansion, which increases lateral compression of the bilayer and leads to membrane disruption. The rate of micellization seems to be kinetically controlled by polymer adsorption, which is maximal near T_m (Thomas, 1996). Electron microscopy, X-ray diffraction and Raman spectroscopy have revealed that the resulting mixed micelles had a disk shape (Borden, 1988; Thomas, 1994b).

When the polymer is covalently coupled to the vesicle surface, permeabilization of liposomes may occur without membrane micellization. Maeda et al. have demonstrated that PEAA conjugated to SUVs induced rapid calcein release upon acidification to pH 6.5 (Maeda, 1988, 1991). Furthermore, covalently-linked PEAA permeabilized large unilamellar vesicles (LUVs) composed of egg yolk phosphatidylcholine (EPC) and cholesterol (55/45 mol/mol), promoting their fusion at low pH (Chen, 1999). It was suggested that the hydrophobic segments of PEAA inserted into the membrane of neighbouring liposomes, leading to close vesicle-vesicle contact and local dehydration. This caused defects in membrane packing and eventually fusion. Intermembrane mixing between EPC LUVs was also recently reported with non-covalently bound PEAA (Linhardt, 2000). In this system, fusion was preceded by essentially complete leakage of an encapsulated dye.

Polyelectrolyte-induced reorganization of membranes is sensitive to liposome composition. Cholesterol has been shown to decrease the pH at which entrapped vesicle content was released from lipid vesicles (Mills, 1999; Needham, 1998). Cholesterol is known to increase phospholipid packing in the bilayer (Senior, 1982). Accordingly, a greater amount of work is required to perturb membrane structure, which is compensated by increasing polymer protonation. It was also shown that incorporation of 5 mol% poly(ethylene glycol) (PEG) (MW=2000) did not inhibit the interaction between PEAA (MW=30,000) and liposomes under acidic conditions (Mills, 1999; Needham, 1998). It has been suggested that PEAA has a cross sectional area sufficiently small to penetrate the PEG layer. The pH at which membrane reorganization occurs could also be modulated by varying the polymer's MW (Schroeder, 1989) or copolymerizing ethylacrylic acid (EAA) with a more hydrophilic or hydrophobic monomer (Thomas, 1995). Polymers with a greater MW collapse at higher pH values and form mixed micelles that exclude water more effectively. The addition of increasing amounts of hydrophilic MAA units in the polymeric structure leads to a progressive reduction in the pH at which vesicle solubilization occurs, and to an apparent broadening of transition (Fig. 8).

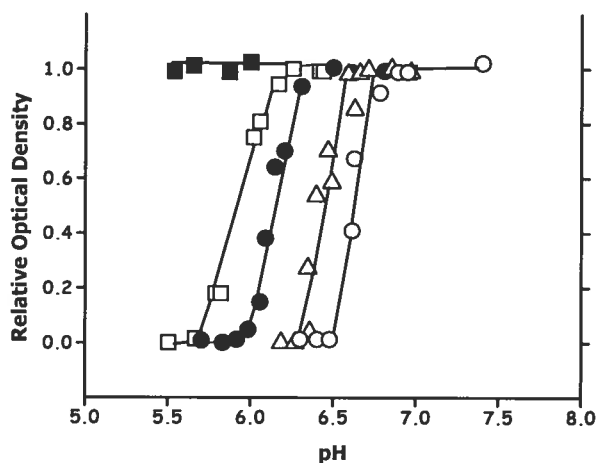


Figure 8. Optical densities (relative to optical densities at pH 7.0) of 1:1.5 (*w/w*) DPPC/EAA-MAA copolymer mixtures in 50 mM phosphate buffer. Empty circles, triangles, full circles, empty squares and full squares refer to 100, 73, 58, 49, and 0 mol% EAA, respectively. Reprinted from Thomas et al. (1995) with permission from the American Chemical Society.

3.2.2 NIPAM copolymers

Our group has taken advantage of the increased LCST of pH-responsive NIPAM copolymers and proposed a new pH-sensitive liposome system. We demonstrated that NIPAM copolymerized with MAA and octadecyl acrylate (ODA) (hydrophobic anchor) (Fig. 1, I) triggered the release of a fluorescent dye (Meyer, 1998; Zignani, 2000) and doxorubicin (Leroux, 2001) from EPC, EPC/cholesterol or EPC/cholesterol/PEG-phosphatidylethanolamine LUVs under mildly acidic conditions (pH 4.9-5.5). The pH at which the polymer collapsed was correlated with liposomal content release. Accordingly, it was hypothesized that pH-triggered release at 37°C resulted from transient destabilization of liposomal membrane structural integrity due to conformational change of the polymer upon acidification. Although the exact mechanism involved in the acidic destabilization of vesicles remains to be determined, the formation of local defects of high curvature was detected by ^2H NMR (Roux, 2003).

The presence of ODA chains in the structure of the copolymer was found to be essential for pH-dependent triggered release (Zignani, 2000). However, Félix *et al.* observed that NIPAM/MAA copolymers, even without ODA, were capable of binding to POPC liposomes in a pH-dependent manner (Félix, 2002b, 2002a). In these studies, content release was not assessed, but membrane fusion was found to occur, although to a limited extent and at very acidic pH (20% at pH 2.6, 15% at pH 4.1, less than 10% at pH 5.6). Other investigations demonstrated that fusion was probably not involved in LUV destabilization by NIPAM copolymers (Zignani, 2000; Koga, 2001). An interesting advantage of these polymers over poly(alkylacrylic acid)s is their ability to destabilize vesicles prepared with high temperature phase transition phospholipids such as distearoylphosphatidylcholine ($T_m = 55^\circ\text{C}$) at 37°C (Roux, 2000).

3.2.3 Succinylated poly(glycidol)s (SucPG)

SucPG are PEG derivatives with carboxylic acid groups on the side chain (Kono, 1994). SucPG bearing *n*-decyl alkyl chains (Fig. 1, K) were incorporated in the structure of EPC vesicles to generate pH-sensitive liposomes. Content leakage was negligible at pH 7.4,

but increased rapidly below pH 5.5 and was accompanied by concomitant membrane fusion. Intermembrane mixing was enhanced with decreasing pH and with rising polymer concentration. Although the mechanisms by which SucPG liposomes are destabilized were not investigated in this study, protonation of the carboxylic acid groups was postulated to enhance interactions with the lipid membrane, causing local dehydration and, eventually, fusion. Recently, it was further demonstrated that SucPG liposomes fused with positively-charged lipoplexes under weakly acidic conditions (*Kono, 2001*), and that fusion was not hindered by the coupling of an anti-BCG monoclonal antibody to the liposome (*Mizoue, 2002*).

3.2.4 *Poly(β -malic acid)*

The non-biodegradability of poly(alkylacrylic acid)s and NIPAM copolymers may be a serious limitation to their widespread use in the biomedical field, especially when injectable formulations are considered. Non-biodegradable polymers are not metabolized and can only be cleared by renal excretion. Thus, MW should not exceed the glomerular filtration threshold (*Seymour, 1987*). To circumvent this constraint, biodegradable poly(carboxylic acid)s such as poly(β -malic acid) (Fig. 1, L) could be used. The polymer was found to perturb the structural organization of DPPC vesicles in a pH-dependent manner (*Seiki, 1984b*). As mentioned earlier, poly(β -malic acid) is devoid of hydrophobic side groups. Therefore, its behaviour in solution resembles that of PAA, which means that it does not induce complete membrane reorganization (*Seiki, 1984b*). A recent study showed that the incorporation of octyl groups (≤ 5 mol%) within the polymer backbone was necessary to induce liposome content leakage, aggregation and fusion (*Osanai, 2000*). These events took place below pH 4.0, and increased with polymer/lipid ratio and decreasing pH. However, the fact that these structural changes occurred at such low pH limits the development of pH-sensitive vesicles for drug delivery applications. It is not yet known whether further modifications to the polymer's chemical composition could shift its pH-dependent transition profile to higher pH values

4. Drug delivery applications: enhanced endosomal escape of biomolecules

The efficient delivery of therapeutic macromolecules (e.g. DNA, proteins) to the cytoplasm is often limited by their intracellular trafficking pathway. Although colloidal complexes can be internalized into targeted cells via receptor-mediated endocytosis, they are most of the time rapidly trafficked from endosomes to lysosomes where degradation may occur (Mukherjee, 1997; Mellman, 1996). The efficient intracellular delivery of endocytosed active biomolecules generally requires a membrane-disrupting agent, which would facilitate release of the drug from the endosomes (e.g. pH-sensitive liposomes) and/or eventually destabilize the endosomal membrane to promote drug escape in the cytoplasm. Since endosomes have a slightly acidic pH, anionic carboxylated polymers are potentially useful for this purpose because they can destabilize membrane bilayers by a pH-triggered conformational change (Fig. 9).

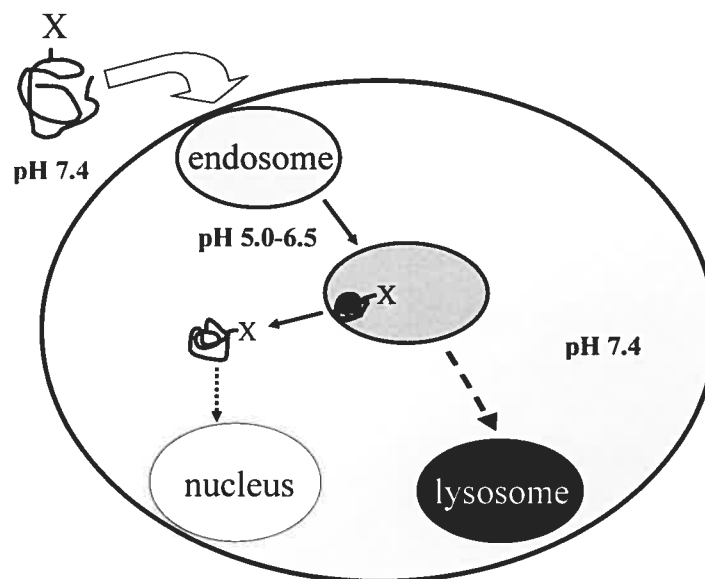


Figure 9. Intracellular trafficking pathway followed by polymer/biomolecule conjugates internalized through receptor-mediated endocytosis. pH-sensitive anionic polymers are potentially useful membrane-destabilizing agent, since they can promote endosomal escape of internalized biomolecules into the cytoplasm before they reach the lysosomes, where degradation occurs. Once in the endosome where pH is slightly acidic, the polymer undergoes a coil-to-globule transition resulting in membrane destabilization and cytoplasmic release of the complex/conjugate. In the figure, X represents a therapeutic biomacromolecule such as a drug, peptide, DNA, or antisense oligonucleotide, conjugated to the polymer.

4.1 Formation of complexes/conjugates

Anionic carboxylated polymers have been studied extensively as macromolecular drug carriers. To assess whether improved cytoplasmic delivery of drugs could be achieved with these polymers, their ability to disrupt eukaryotic cell membranes has been investigated using red blood cells (RBC) as endosomal membrane models (Murthy, 1999; Yessine, 2003; Heskins, 1968). The hemolysis assay was used in numerous studies to assess the potential of different anionic polymers to disrupt endosomes because it had been previously shown that there is a correlation between peptide hemolytic efficiency and endosomal disruption (Plank, 1994). The pertinence of this model was also confirmed with a study of the lytic properties of a series of MAA copolymers performed with artificial phospholipid vesicles prepared with EPC: cholesterol: dioleoylphosphatidylethanolamine: dimiristoylphosphatidylglycerol (61:17:16:6 molar ratio) (Yessine, 2003). These liposomes presented a phospholipid composition similar to lysosomal membranes, and the release profiles almost mimicked those obtained with RBC (Darnell, 1990). In this model, the extent of membrane disruption is determined by measuring hemoglobin leakage. PEAA as well as random copolymers of EA and AA or MAA (50/50 mol/mol) showed similar hemolytic activity at pH 5.5 and below (Murthy, 1999; Yessine, 2003). For all three polymers, the hydrophilic-hydrophobic balance was comparable in terms of the ethyl to carboxyl group ratio (1:1). Study of the structure-activity relationship of a set of different MAA copolymers demonstrated that the presence of EA greatly increased the polymer's ability to destabilize the membrane bilayers (Yessine, 2003). It was further shown that, for efficient destabilization at acidic pH, the copolymers should exhibit sharp conformational transition. Murthy *et al.* also found that increasing the alkyl chain length of monomer units enhanced membrane lytic activity (Murthy, 1999; Murthy, 1998). Compared to PEAA, the more hydrophobic polymers, poly(propylacrylic acid) (PPAA) (Fig. 1, D) and poly(butylacrylic acid) (PBAA) (Fig. 1, E), exhibited greater hemolytic activity and achieved complete RBC lysis at higher pH values (pH 6.1 and 7.4, respectively). A 3-fold increase in PPAA's molecular weight (from 10,000 to 30,000) was also shown to enhance hemolytic activity (Heskins, 1968). However, excessive polymer hydrophobicity was not associated with membrane destabilization and resulted in high macrophage cytotoxicity at neutral pH (Yessine, 2003). This is probably due to the globule configuration adopted by the polymer in

solution, which renders it more susceptible to phagocytosis. Thus, pH-sensitive synthetic polymers can be molecularly engineered to efficiently disrupt eukaryotic membranes within a defined pH range by adjusting their hydrophilic-hydrophobic balance. The membrane-destabilizing activity of the polymers could also be modulated by mechanical treatment, such as focused ultrasound. The concomitant administration of PEAA and ultrasound was found to synergistically increase PEAA lytic activity toward RBC, and to shift the pH at which hemolysis occurs to values similar to those of PPAA (Mourad, 2001). However, the applicability and efficiency of this method *in vitro* and *in vivo* remain to be assessed.

Since they induce RBC lysis at pH values typical of those found in endosomes, PEAA and especially PPAA were further studied as carriers for model biomolecules. Interestingly, linkage of PPAA to a protein (streptavidin) did not affect pH-dependent conformational change of the polymer, or its ability to disrupt RBC (Lackey, 1999a). A pH-sensitive polymer/streptavidin complex was further shown to induce pH-triggered release of the model drug biotin following polymer collapse (Bulmus, 2000). Increased endosomal escape of a biomolecule was first assessed *in vitro* with PPAA chemically conjugated to a toxin (ricin A chain), and resulted in enhanced cytotoxicity (Lackey, 1999b). Enhanced cytoplasmic delivery of PEG-fluorescein isothiocyanate grafted to the polymer backbone *via* a pH-sensitive hydrolysable acetal bond was also observed by punctuate staining of murine hepatocytes (Hoffman, 2000a). Further evidence was obtained in transfection experiments using dioleoyltrimethylammonium propane (DOTAP)/plasmid DNA complexes, which showed that the addition of PPAA led to significant enhancement (up to 20-fold) in the number of transfected cells (Stayton, 2000; Cheung, 2001). The mechanism of DNA release from these type of complexes is not understood precisely. It was suggested that internalization of cationic lipids/DNA lipoplexes by endocytosis brings on destabilization of the endosomal membrane through induction of flip-flop of anionic lipids from the cytoplasmic-facing monolayer (Xu, 1996). The lateral diffusion of these lipids into the complex would form a charge neutral ion pair with the cationic lipids, which would result in displacement of DNA and its release into the cytoplasm. It is not known at present whether incorporation of a polymer within the complex influences in any way the release of the conjugated active compound. The fact that DOTAP/DNA/PPAA particles exhibited high levels of transfection in media containing up to 50% serum indicated that the polymer

may confer both serum-stabilizing and endosomal-escaping properties to lipoplex carriers (Cheng, 2001). The first example of targeted drug delivery of a PPAA bioconjugate was given with a streptavidin complex, which was bound to a biotinylated antibody (Lackey, 2001). Complexation of PPAA with the targeted biomolecule did not inhibit its internalization, and enabled its transfer from the endosome to the cytoplasm (Lackey, 2002).

Although the cytoplasmic release of potentially therapeutic molecules has been studied extensively *in vitro*, *in vivo* studies performed with such systems are scarce. A recent investigation carried out with DOTAP/DNA/PPAA complexes showed that gene delivery could be achieved through the injection of ternary complexes into mice wounds (Kyriakides, 2002). PPAA incorporation in the complexes resulted in prolonged gene expression (6 days), an increased number of transfected cells, and localized modulation of the wound-healing response. However, topical application of the formulation failed to induce prolonged gene expression. At present, no study involving parenterally injectable formulations of anionic polyelectrolyte conjugates/complexes has been reported. Accordingly, much work remains to be done to assess the viability of such systems *in vivo*.

4.2 pH-sensitive liposomes

pH-sensitive liposomes bearing NIPAM copolymers are currently evaluated for the endosomal delivery of drugs that are degraded in lysosomes, such as β -cytosine arabinoside (ara-C). This anticancer drug was previously shown to be delivered to and degraded in lysosomes after delivery *via* conventional liposomes (Connor, 1986). Rapid release of ara-C in endosomes using pH-sensitive dioleoylphosphatidylethanolamine/oleic acid liposomes was demonstrated to increase its activity. Once released in the endosomes, ara-C was rapidly trafficked to the cytoplasm by nucleoside transporters located in the endosomal membrane (Brown, 1990)]. Ara-C encapsulated in pH-sensitive PNIPAM/liposomes complexes exhibited greater cytotoxicity than the control, pH-insensitive formulation toward J774 macrophage-like cells (Roux, 2002a). The ability of such vesicles to facilitate the transfer of a fluorescent dye in the cytoplasm of these cells was qualitatively assayed by fluorescence microscopy (Francis, 2001). It was found that cells treated with liposome/polymer complexes displayed diffused fluorescence, indicating rapid endosomal

escape and diffusion of the dye into the cytoplasm. In contrast, phagocytosis of plain liposomes led to a vesicular fluorescence pattern reflecting the presence of the probe in the endosomal/lysosomal compartment. Preliminary data indicate that polymer-coated liposomes are also relatively stable in serum. Pre-incubation of liposomes in 75% human serum did not result in a significant loss of pH-sensitivity (Roux, 2002b). *In vivo*, the polymer provided, at neutral pH, a steric barrier sufficient to significantly increase the liposome circulation times (36% increase in area under the curve) (Roux, 2002b). Force measurements between polymer-coated lipid bilayers showed that NIPAM copolymers provide a steric barrier that is pH-dependent (Roux, 2002b). At pH 7.0, long-range repulsive forces were present, while the range and magnitude of these forces were significantly reduced at pH 5.4. However, this modest “stealth” effect remained marginal in comparison to PEG, which is more hydrophilic and flexible. DSC and FTIR experiments further showed that at neutral pH, the NIPAM copolymer was not in its random coil configuration, and thus may not provide liposomes with optimal steric protection *in vivo* (Roux, 2003). The addition of PEG to NIPAM copolymer/liposome complexes efficiently prolonged circulation time, but significantly decreased liposome pH-sensitivity (Roux, 2003). Thus, to be clinically viable, pH-sensitive NIPAM copolymer/liposome complexes need further optimization. Both properties, *i.e.* long circulation time and ability to achieve efficient cytoplasmic delivery, should be found in the same formulation. Since NIPAM copolymers seem relatively well-tolerated *in vitro* (Taillefer, 2000; Francis, 2001) and *in vivo* (Molinaro, 1999), such systems represent a promising strategy for improving the liposomal delivery of drugs.

SucPG-modified liposomes are also currently being investigated for drug delivery applications. The cytoplasmic delivery of calcein in CV-1 kidney cells was successfully achieved *via* EPC SUVs (Kono, 1997). The efficiency of delivery was correlated with the ability of polymer-coated liposomes to fuse with the endosomal/lysosomal membrane. Recently, Kono *et al.* reported that negatively-charged SucPG complexes, prepared by mixing lipoplexes with SucPG liposomes bearing transferrin as ligand, exhibited high transfection efficiencies (Kono, 2001). It was further shown that cytotoxicity of the SucPG complexes was less than that of plain lipoplexes. As mentioned earlier, SucPG liposomes were also used in the preparation of immunoliposomes by conjugation of an anti-BCG antibody to the lipid membrane (Mizoue, 2002). This formulation retained specific antigen-

binding affinity to target cells. Following incubation of BCG-SucPG liposomes containing the fluorophore DiI with colon 26 cells at 37°C, diffuse fluorescence was observed in the cells. These results suggested that the dye was rapidly released from the immunoliposomes and diffused into cytoplasm following recognition and internalization of the complexes by tumour cells. Such targeted liposomal formulations are expected to be valuable for improving internalization of anticancer drugs and bioactive materials through receptor-mediated endocytosis. It is yet unknown whether the circulation time of SucPG liposomes is comparable to that of PEGylated liposomes.

5. Concluding remarks

Polyanions are nowadays employed in a multitude of industrial and biomedical applications. The most interesting feature of carboxylated polymers is undoubtedly their ability to change conformation upon pH variation of the surrounding environment. Over the years, scientists have gained better insights into the conformational behaviour of these polymers and of the factors influencing transition. Anionic polyelectrolytes were first used as synthetic models to better understand how natural polyelectrolytes behave in solution and in the presence of membrane bilayers. Later, pH-responsive delivery systems based on these polymers were proposed as a means of improving the endosomal escape of active biomolecules. Because of their great versatility, these formulations may represent an attractive strategy for achieving such a goal. To be efficient *in vivo*, pH-sensitive colloidal formulations should bear a number of essential properties, including biocompatibility, stability in serum, long circulation time, interaction with targeted cells and internalization, rapid release following application of the stimulus, and, finally, delivery of the active biomaterials into the cytoplasm of the targeted cells. To date, although promising results have been obtained, all these characteristics have not yet been combined into a single formulation with great success. Additional work and further optimization are required before anionic polyelectrolytes can be used universally as part of drug delivery systems that can efficiently deliver their content into the cytoplasm.

Acknowledgements

Scholarships to MA Yessine from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, and the Rx&D Health Research Foundation are acknowledged. The authors thank Röhm Pharma, the Canadian Institutes of Health Research, and the Canada Research Chair Program for financial support.

References

- Anthony O. and Zana R. (1994). Fluorescence investigation of the binding of pyrene to hydrophobic microdomains in aqueous solutions of polysoaps. *Macromolecules* 27: 3885-3891.
- Anufrieva E.V., Birshstein T.M., Nerkrasova T.N., Ptitsyn O.B. and Shevelea T.V. (1968). The models of the denaturation of globular proteins. II. Hydrophobic interactions and conformational transition in polymethacrylic acid. *J Polym Sci Part C* 16: 3519-3531.
- Barbieri B.W. and Strauss U.P. (1985). Effect of alkyl group size on the cooperativity in conformational transitions of hydrophobic polyacids. *Macromolecules* 18: 411-414.
- Barone G., Crescenzi V. and Quadrifoglio F. (1966). Conformational transition of poly(glutamic acid) in aqueous solution. *Biopolymers* 4: 529-538.
- Bednar B. and Morawetz H. (1985). Kinetics of the conformational transition of poly(methacrylic acid) after changes of its degree of ionization. *Macromolecules* 18: 1940-1944.
- Bednar B., Trnena J., Svoboda P., Vajda S., Fidler V. and Prochazka K. (1991). Time-resolved fluorescence study of chain dynamics. 1. Poly(methacrylic acid) in dilute water solutions. *Macromolecules* 24: 2054-2059.
- Bianchi E., Ciferri A., Parodi R., Pampone R. and Tealdi A. (1970). Ethylene-maleic anhydride copolymers and derivatives. Potentiometric titrations and interactions with polypeptides. *J Phys Chem* 74: 1050-1056.
- Binana-Limbele W. and Zana R. (1987). Fluorescence probing of microdomains in aqueous solutions of polysoaps. 1. Use of pyrene to study the conformational state of

- polysoaps and their comicellization with cationic surfactants. *Macromolecules* 20: 1331-1335.
- Binana-Limbele W. and Zana R. (1990). Fluorescence probing of microdomains in aqueous solutions of polysoaps. 2. Study of the size of the microdomains. *Macromolecules* 23: 2731-2739.
- Borden K.A., Eum K.M., Langley K.H., Tan J.S., Tirrell D.A. and Voycheck C.L. (1988). pH-dependent vesicle-to-micelle transition in an aqueous mixture of dipalmitoylphosphatidylcholine and a hydrophobic polyelectrolyte. *Macromolecules* 21: 2649-2651.
- Borden K.A., Eum K.M., Langley K.H. and Tirrell D.A. (1987). On the mechanism of polyelectrolyte-induced structural reorganization in thin molecular films. *Macromolecules* 20: 454-456.
- Braud C., Muller G., Fenyo J.C. and Selegny E. (1974). Conformational transition of poly(methacrylic acid) in methanol-water mixtures. *J Polym Sci, Polym Chem Ed* 12: 2767-2778.
- Brown P.M. and Silvius J.R. (1990). Mechanisms of delivery of liposome-encapsulated cytosine arabinoside to CV-1 cells in vitro. Fluorescence-microscopic and cytotoxicity studies. *Biochim Biophys Acta* 1023: 341-351.
- Bulmus V., Ding Z., Long C.J., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (2000). Site-specific polymer-streptavidine bioconjugate for pH-controlled binding and triggered release of biotin. *Bioconjugate Chem.* 11: 78-83.
- Chen G. and Hoffman A.S. (1995). Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transitions over a wide range of pH. *Nature* 373: 49-52.
- Chen T., Choi L.S., Einstein S., Klippenstein M.A., Scherrer P. and Cullis P.R. (1999). Proton-induced permeability and fusion of large unilamellar vesicles by covalently conjugated poly(2-ethylacrylic acid). *J Liposome Res* 9: 387-405.
- Chen T.S. and Thomas J.K. (1979). Influence of the conformational states of polymethacrylic acid on the photophysical properties of pyrene in aqueous solution: a fluorescent probe and laser photolysis study. *J Polym Sci, Polym Chem Ed* 17: 1103-1116.
- Cheung C.Y., Murthy N., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (2001). A pH-sensitive polymer that enhances cationic lipid-mediated gene transfer. *Bioconjugate Chem* 12: 906-910.

- Chu D.Y. and Thomas J.K. (1984). Photophysical studies of a water-soluble copolymer of methacrylic acid and 1-pyreneacrylic acid. *Macromolecules* 17: 2142-2147.
- Chu D.Y. and Thomas J.K. (1985). Effect of conformation of poly(methacrylic acid) on the photophysical and photochemical processes of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II). *J Phys Chem* 89: 4065-4070.
- Chu D.-Y. and Thomas J.K. (1987). Photophysical and photochemical studies on a polymeric intramolecular micellar system, PA-18K₂. *Macromolecules* 20: 2133-2138.
- Chung J.C., Gross D.J., Thomas J.L., Tirrell D.A. and Opsahl-Ong L.R. (1996). pH-sensitive, cation-selective channels formed by a simple synthetic polyelectrolyte in artificial bilayer membranes. *Macromolecules* 29: 4636-4641.
- Conio G., Patrone E., Russo S. and Trefiletti V. (1976). Hydrophobic polyelectrolytes: preparation and conformational properties of poly(styrene-co-methacrylic acid). *Makromol Chem* 177: 49-63.
- Connor J. and Huang L. (1986). pH-sensitive immunoliposomes as an efficient and target-specific carrier for antitumor drugs. *Cancer Res* 46: 3431-3435.
- Crescenzi V., Quadrioglio F. and Delben F. (1972). Calorimetric investigation of poly(methacrylic acid) and poly(acrylic acid) in aqueous solution. *J Polym Sci Part A2* 10: 357-368.
- Cutnell J.D. and Glasel J. (1976). ¹³C Nuclear spin-lattice relaxation and nuclear overhauser enhancement in aqueous solutions of poly(methacrylic acid). *J Phys Chem* 9: 71-76.
- Dai S., Tam K.C. and Jenkins R.D. (2000). Aggregation behavior of methacrylic acid/ethyl acrylate copolymer in dilute solutions. *Eur Polym J* 36: 2671-2677.
- Darnell J., Lodish H. and Baltimore D. (1990). Molecular cell biology. *Scientific American Books, New York* Second edition: 493.
- Davenport J.N. and Wright P.V. (1980a). Conformations in partly ionized poly(methacrylic acid): 1. Ionic hydrogen bonds in syndiotactic chains. *Polymer* 21: 287-290.
- Davenport J.N. and Wright P.V. (1980b). Conformations in partly ionized poly(methacrylic acid): 2. Unperturbed dimensions of syndiotactic chains. *Polymer* 21: 293-302.
- de Oliveira V.A., Tiera M.J., Gehlen M.H. and Neumann M.G. (1996). Pyrene fluorescence in the presence of acrylic acid-ethyl methacrylate copolymers: effects of the copolymer composition in the formation of microdomains. *Photochem & Photobiol* 63: 779-783.

- Delaire J.A., Rodgers M.A. and Webber S.E. (1984). Quenching of fluorescence in water-soluble copolymers of methacrylic acid and vinylidiphenylanthracene. *J Phys Chem* 88: 6219-6227.
- Delben F., Crescenzi V. and Quadrifoglio F. (1972). On the enthalpy of dissociation of poly(methacrylic acid) in aqueous solution. *Ent Polym J* 8: 933-935.
- Devlin B.P. and Tirrell D.A. (1986). Glucose-dependent disruption of phospholipid vesicle membranes. *Macromolecules* 19: 2465-2466.
- Dong J., Tsubahara N., Fujimoto Y., Ozaki Y. and Nakashima K. (2001). Fourier transform infrared studies of pH- and temperature-dependent conformational changes of solid poly(methacrylic acid). *Appl Spectrosc* 55: 1603-1609.
- Dong L.-C. and Hoffman A.S. (1991). A novel approach for preparation of pH-sensitive hydrogels for enteric drug delivery. *J Control Release* 15: 141-152.
- Drummond D.C., Zignani M. and Leroux J.C. (2000). Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog Lipid Res* 39: 409-460.
- Dubin P. and Strauss U.P. (1967). Hydrophobic hypercoiling in copolymers of maleic acid and alkyl vinyl ethers. *J Phys Chem* 71: 2757-2759.
- Dubin P. and Strauss U.P. (1970). Hydrophobic bonding in alternating copolymers of maleic acid and alkyl vinyl ethers. *J Phys Chem* 74: 2842-2847.
- Ebdon J.R., Hunt B.J., Lucas D.M., Soutar I., Swanson L. and Lane A.R. (1995). Luminescence studies of hydrophobically modified, water-soluble polymers. I. Fluorescence anisotropy and spectroscopic investigations of the conformational behavior of copolymers of acrylic acid and styrene or methyl methacrylate. *Can J Chem* 73: 1982-1994.
- Ebdon J.R., Lucas D.M., Soutar I. and Swanson L. (1994). Luminescence studies of the conformational behaviour of hydrophobically-modified, water-soluble polymers. *Macromol Symp* 79: 167-177.
- Eum K.M., Langley K.H. and Tirrell D.A. (1989). Quasi-elastic and electrophoretic light scattering studies of the reorganization of dioleoylphosphatidylcholine vesicle membranes by poly(2-ethylacrylic acid). *Macromolecules* 22: 2755-2760.
- Félix M.M., Umakoshi H., Shimanouchi T., Yoshimoto M. and Kuboi R. (2002a). Characterization and control of stimuli-induced membrane fusion of liposomes in the presence of proteins and stimuli responsive polymers. *Biochem Eng J* 12: 7-19.

- Félix M.M., Umakoshi H., Shimanouchi T., Yoshimoto M. and Kuboi R. (2002b). Evaluation of interaction between liposome membranes induced by stimuli responsive polymer and protein. *J Biosci Bioeng* 5: 498-501.
- Fenyo J.C., Delben F., Paoletti S. and Crescenzi V. (1977). Thermodynamics of polycarboxylate aqueous solutions. 4. Special features of hydrophobic maleic acid-olefin copolymers. *J Phys Chem* 81: 1900-1905.
- Ferrito M.S. and Tirrell D.A. (1988). Photoregulation of the binding of a synthetic polyelectrolyte to phosphatidylcholine bilayer membranes. *Macromolecules* 21: 3117-3119.
- Fitchner F. and Schonert H. (1977). Kooperative Zustandsänderung von Polyethylacrylsäure in wässriger Lösung. *Colloid Polym Sci* 255: 230-232.
- Francis M.F., Dhara G., Winnik F.M. and Leroux J.C. (2001). In vitro evaluation of pH-sensitive polymer/niosome complexes. *Biomacromolecules* 2: 741-749.
- Franzin C.M., Macdonald P.M., Polozova A. and Winnik F.M. (1998). Destabilization of cationic lipid vesicles by an anionic hydrophobically modified poly(N-isopropylacrylamide) copolymer: a solid-state ^{31}P NMR and ^2H NMR study. *Biochim Biophys Acta* 1415: 219-234.
- Fujiwara M., Baldeschwieler J.D. and Grubbs R.H. (1996). Receptor-mediated endocytosis of poly(acrylic acid)-conjugated liposomes by macrophages. *Biophys Biochim Acta* 1278: 59-67.
- Fujiwara M., Grubbs R.H. and Baldeschwieler J.D. (1997). Characterization of pH-dependent poly(acrylic acid) complexation with phospholipid vesicles. *J Colloid Interface Sci* 185: 210-216.
- Gaspar L.J.M., Baskar G. and Mandal A.B. (2001). Solution structure of a modified comb-like polymer from octadecyl methacrylate and acrylic acid. *Chem Phys Lett* 348: 395-402.
- Heitz C., Rawiso M. and Francois J. (1999). X-ray scattering study of a poly(methacrylic acid) sample as a function of its neutralization degree. *Polymer* 40: 1637-1650.
- Heskins M. and Guillet J.E. (1968). Solution properties of poly(N-isopropylacrylamide). *J Macromol Sci, Chem* A2: 1441-1445.
- Hirotsu S., Hirokawa Y. and Tanaka T. (1987). Volume-phase transitions of ionized N-isopropylacrylamide gels. *J Chem Phys* 87: 1392-1394.

- Hoffman A.S., Murthy N., Cheung C., Fausto N., Campbell J. and Stayton P.S. (2000a). Design and synthesis of a new pH-sensitive polymer for enhancing the endosomal escape of "fragile" drugs such as DNA and proteins. *Proceed Int Symp Control Rel Bioact Mater* 27: 115.
- Hoffman A.S., Stayton P.S., Bulmus V., Chen G., Chen J., Cheung C., Chilkoti A., Ding Z., Dong L., Fong R., Lackey C.A., Long C.J., Miura M., Morris J.E., Murthy N., Nabeshima Y., Park T.G., Press O.W., Shimoboji T., Shoemaker S., Yang H.J., Monji N., Nowinski R.C., Cole C.A., Priest J.H., Harris J.M., Nakamae K., Nishino T. and Miyata T. (2000b). Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. *J Biomed Mater Res* 52: 577-586.
- Joyce D.E. and Kurucsev T. (1981). Hydrogen bonding in poly(methacrylic acid) and poly(ethacrylic acid) solutions. *Polymer* 22: 415-417.
- Kalyanasundaram K. and Thomas J.K. (1977). Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *J Am Chem Soc* 99: 2039-2044.
- Katchalsky A. (1951). Solutions of polyelectrolytes and mechanochemical systems. *J Polym Sci* 7: 393-412.
- Kay P.J., Kelly D.P., Milgate G.I. and Treolar F.E. (1976). The conformational transition in poly(methacrylic acid) and butyl vinyl ether/maleic anhydride copolymers studied by ¹H NMR linewidth measurements. *Makromol Chem* 177: 885-893.
- Kim Y.-H., Bae Y.H. and Kim S.W. (1994). pH/temperature-sensitive polymers for macromolecular drug loading and release. *J Control Release* 28: 143-152.
- Kitano H., Akatsuka Y. and Ise N. (1991). pH-responsive liposomes which contain amphiphiles prepared by using lipophilic radical initiator. *Macromolecules* 24: 42-46.
- Kitano H., Maeda M., Takeuchi S., Ieda K. and Aizu Y. (1994). Liposomes containing amphiphiles prepared by using a lipophilic chain transfer reagent: responsiveness to external stimuli. *Langmuir* 10: 403-406.
- Kitano T., Tagushi A., Noda I. and Nagasawa M. (1980). Conformation of polyelectrolyte in aqueous solution. *Macromolecules* 13: 57-63.
- Koenig J.L., Angood A.C., Semen J. and Lando J.B. (1969). Laser-excited raman studies of the conformational transition of syndiotactic polymethacrylic acid in water. *J Am Chem Soc* 91: 7250-7254.

- Koga S., Kondo Y., Komata T. and Kondo S. (2001). Treatment of bladder cancer cells in vitro and in vivo with 2-5A antisense telomerase RNA. *Gene Ther* 8: 654-658.
- Kono K., Igawa T. and Takagishi T. (1997). Cytoplasmic delivery of calcein mediated by liposomes modified with a pH-sensitive poly(ethylene glycol) derivative. *Biochim Biophys Acta* 1325: 143-154.
- Kono K., Torikoshi Y., Mitsutomi M., Itoh T., Emi N., Yanagie H. and Takagishi T. (2001). Novel gene delivery systems: complexes of fusogenic polymer-modified liposomes and lipoplexes. *Gene Ther* 8: 5-12.
- Kono K., Zenitani K. and Takagishi T. (1994). Novel pH-sensitive liposomes: liposomes bearing a poly(ethylene glycol) derivative with carboxyl groups. *Biochim Biophys Acta* 1193: 1-9.
- Kyriakides T.R., Cheung C.Y., Murthy N., Bornstein P., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (2002). pH-sensitive polymers that enhance intracellular drug delivery in vivo. *J Control Release* 78: 295-303.
- Lackey C.A., Murthy N., Press O.W., Tirell D.A., Hoffman A.S. and Stayton P.S. (1999a). Hemolytic activity of pH-responsive polymer-streptavidin bioconjugates. *Bioconjugate Chem* 10: 401-405.
- Lackey C.A., Murthy N., Stayton P.S., Press O.W., Hoffman A.S. and Tirrell D.A. (1999b). Enhancement of endosomal release and toxic activity of ricin A chain by a pH-sensitive polymer. *Proceed Int Symp Control Rel Bioact Mater* 26: 815-816.
- Lackey C.A., Press O.W., Hoffman A.S. and Stayton P.S. (2001). pH-sensitive polymer-protein complexes for control of intracellular trafficking of biomolecular therapeutics. *Polym Mater Sci Eng* 84: 807-808.
- Lackey C.A., Press O.W., Hoffman A.S. and Stayton P.S. (2002). A biomimetic pH-responsive polymer directs endosomal release and intracellular delivery of an endocytosed antibody complex. *Bioconjugate Chem* 13: 996-1001.
- Ladavière C., Toustou M., Gulik-Krzywicki T. and Tribet C. (2001). Slow reorganization of small phosphatidylcholine vesicles upon adsorption of amphiphilic polymers. *J Colloid Interface Sci* 241: 178-187.
- Ladavière C., Tribet C. and Cribier S. (2002). Lateral organization of lipid membranes induced by amphiphilic polymer inclusions. *Langmuir* 18: 7320-7327.

- Lando J.B., Koenig J.L. and Semen J. (1973). Conformation studies of poly(methacrylic acid). II. Laser-excited raman studies of the conformational transition in aqueous solution. *J Macromol Sci Phys B*7: 319-343.
- Leroux J.C., Roux E., Le Garrec D., Hong K. and Drummond D.C. (2001). *N*-isopropylacrylamide copolymers for the preparation of pH-sensitive liposomes and polymeric micelles. *J Control Release* 72: 71-84.
- Leyte J.C., Arbour-van der Veen H.M.R. and Zuiderweg L.H. (1972). Irreversible potentiometric behavior of isotactic poly(methacrylic acid). *J Phys Chem* 76: 2559-2561.
- Leyte J.C. and Mandel M. (1964). Potentiometric behavior of polymethacrylic acid. *J Polym Sci Part A* 2: 1879-1891.
- Linhardt J.G., Thomas J.L. and Tirrell D.A. (1999). Free-radical synthesis of poly(2-ethylacrylic acid) fractions of low polydispersity: effects of molecular weight and polydispersity on the pH-dependent conformational transition in aqueous solutions. *Macromolecules* 32: 4457-4459.
- Linhardt J.G. and Tirrell D.A. (2000). pH-induced fusion and lysis of phosphatidylcholine vesicles by the hydrophobic polyelectrolyte poly(2-ethylacrylic acid). *Langmuir* 16: 122-127.
- Lumry R., Legare R. and Miller W.G. (1964). The dynamics of the helix-coil transition on poly- α ,L-glutamic acid. *Biopolymers* 2: 489-500.
- Macdonald P.M., Crowell K.J., Franzin C.M., Mitrakos P. and Semchyschyn D. (2000). ^2H NMR and polyelectrolyte-induced domains in lipid bilayers. *Solid State Nucl Magn Reson* 16: 21-36.
- Maeda M., Kumano A. and Tirrell D.A. (1988). H^+ -induced release of contents of phosphatidylcholine vesicles bearing surface-bound polyelectrolyte chains. *J Am Chem Soc* 110: 7455-7459.
- Maeda M., Kumano A. and Tirrell D.A. (1991). Signal-sensitive release of contents from liposomes bearing surface-grafted polyelectrolyte chains. *Ann NY Acad Sci* 618: 362-366.
- Magny B., Illiopoulos I. and Audebert R. (1991). Intrinsic viscosity of hydrophobically modified polyelectrolytes. *Polym Commun* 32: 456-458.

- Mandel M., Leyte J.C. and Stadhouders M.G. (1967). The conformational transition of poly(methacrylic acid) in solution. *J Phys Chem* 71: 603-612.
- Mellman I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 575-625.
- Meyer O., Papahadjopoulos D. and Leroux J.C. (1998). Copolymers of *N*-isopropylacrylamide can trigger pH-sensitivity to stable liposomes. *FEBS Lett* 421: 61-64.
- Mills J.K., Eichenbaum G. and Needham D. (1999). Effect of bilayer cholesterol and surface grafted poly(ethylene glycol) on pH-induced release of contents from liposomes by poly(2-ethylacrylic acid). *J Liposome Res* 9: 275-290.
- Mitrakos P. and Macdonald P.M. (1997). Domains in cationic lipid plus polyelectrolyte bilayer membranes: detection and characterization via ^2H nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 36: 13646-13656.
- Mitrakos P. and Macdonald P.M. (2000). Polyelectrolyte molecular weight and electrostatically-induced domains in lipid bilayer membranes. *Biomacromolecules* 1: 365-376.
- Mizoue T., Horibe T., Maruyama K., Takizawa T., Iwatsuru M., Kono K., Yanagie H. and Moriyasu F. (2002). Targetability and intracellular delivery of anti-BCG antibody-modified, pH-sensitive fusogenic immunoliposomes to tumor cells. *Int J Pharm* 237: 129-137.
- Molinaro G., Adam A., Zignani M., Taillefer J., Schwach-Abdellaoui K., Gurny R. and Leroux J.C. (1999). Evaluation of the local and systemic inflammatory responses induced by the subcutaneous injection of different biopolymers. *Proceed Int Control Rel Bioact Mater* 26: 607-608.
- Morawetz H. (1996). Nature of the hypercoiled form of poly(methacrylic acid) in water at low pH. *Macromolecules* 29: 2689-2690.
- Morishima Y., Kobayashi T., Nozakura S.-I. and Webber S.E. (1987). Preferential excimer emission from amphiphilic alternating copolymers of 2-vinylnaphthalene and maleic acid in aqueous solution. *Macromolecules* 20: 807-813.
- Mourad P.D., Murthy N., Porter T.M., Poliachik S.L., Crum L.A., Hoffman A.S. and Stayton P.S. (2001). Focused ultrasound and poly(2-ethylacrylic acid) act synergistically to disrupt lipid bilayers in vitro. *Macromolecules* 34: 2400-2401.
- Mukherjee S., Ghosh R.N. and Maxfield F.R. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev* 77: 759-803.

- Muroga Y., Noda I. and Nagasawa M. (1969). Nuclear magnetic resonance investigation of conformations of isotactic polyelectrolytes in aqueous solution. *J Phys Chem* 73: 667-672.
- Muroga Y., Noda I. and Nagasawa M. (1985). Investigation of local conformation of polyelectrolytes in aqueous solution by small-angle X-ray scattering. 1. Local conformations of poly(sodium acrylates). *Macromolecules* 18: 1576-1579.
- Muroga Y., Yoshida T. and Kawaguchi S. (1999). Conformation of poly(methacrylic acid) in acidic aqueous solution studied by small angle X-ray scattering. *Biophys Chem* 81: 45-57.
- Murthy N., Robichaud J., Stayton P.S., Press O.W., Hoffman A.S. and Tirrell D.A. (1998). Design of polymers to increase the efficiency of endosomal release of drugs. *Proceed Int Symp Control Rel Bioact Mater* 25: 224-225.
- Murthy N., Robichaud J.R., Tirrell D.A., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (1999). The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J Control Release* 61: 137-143.
- Nagasawa M. and Holtzer A. (1964). The helix-coil transition in solutions of polyglutamic acid. *J Am Chem Soc* 86: 538-543.
- Nagasawa M., Murase T. and Kondo K. (1965). Potentiometric titration of stereoregular polyelectrolytes. *J Phys Chem* 69: 4005-4012.
- Nagasawa M., Noda I. and Kitano T. (1980). Light scattering from solutions of a semi-flexible polymer and a polyelectrolyte both having sharp molecular weight distributions. *Biophys Chem* 11: 435-438.
- Nagy J.K., Kuhn Hoffmann A., Keyes M.H., Gray D.N., Oxenoid K. and Sanders C.R. (2001). Use of amphipathic polymers to deliver a membrane protein to lipid bilayers. *FEBS Lett* 501: 115-120.
- Nakashima K., Fujimoto Y., Anzai T., Dong J., Sato H. and Ozaki Y. (1999). Fluorescence and FTIR studies on the pH-dependent conformational change of poly(methacrylic acid) in aqueous solutions. *Bull Chem Soc Jpn* 72: 1233-1238.
- Needham D., Mills J. and Eichenbaum G. (1998). Interactions between poly(2-ethylacrylic acid) and lipid bilayer membranes: effects of cholesterol and grafted poly(ethylene glycol). *Faraday Discussions* 111: 103-110.

- Ng W.K., Tam K.C. and Jenkins R.D. (2001). Rheological properties of methacrylic acid/ethyl acrylate copolymer: comparison between an unmodified and hydrophobically modified system. *Polymer* 42: 249-259.
- Ohno N., Nitta K., Makino S. and Sugai S. (1973). Conformational transition of the copolymer of maleic acid and styrene in aqueous solution. *J Polym Sci, Pol Phys Ed* 11: 413-425.
- Ohno N., Okuda T., Nitta K. and Sugai S. (1978). Conformational transition of the copolymer of maleic acid and styrene in aqueous solution. III. *J Polym Sci, Polym Phys Ed* 16: 513-521.
- Okuda T., Ohno N., Nitta K. and Sugai S. (1977). Conformational transition of the copolymer of maleic acid and styrene in aqueous solution. II. *J Polym Sci, Polym Phys Ed* 15: 749-755.
- Olea A.F., Rosenbluth H. and Thomas J.K. (1999). Effect of the molecular weight on the dynamic of the conformational transition of poly(methacrylic acid). *Macromolecules* 32: 8077-8083.
- Olea A.F. and Thomas J.K. (1989). Fluorescence studies of the conformational change of poly(methacrylic acid) with pH. *Macromolecules* 22: 1165-1169.
- Osanai S. and Nakamura K. (2000). Effects of complexation between liposome and poly(malic acid) on aggregation and leakage behaviour. *Biomaterials* 21: 867-876.
- Petit F., Illiopoulos I. and Audebert R. (1996). Hydrophobically modified polyelectrolytes with perfluorinated or hydrogenated side alkyl chains - Comparison of the associating behavior. *J Chim Phys PCB* 93: 887-898.
- Philippova O.E., Hourdet D., Audebert R. and Khokhlov A.R. (1996). Interaction of hydrophobically modified poly(acrylic acid) hydrogels with ionic surfactants. *Macromolecules* 29: 2822-2830.
- Philippova O.E., Hourdet D., Audebert R. and Khokhlov A.R. (1997). pH-responsive gels of hydrophobically modified poly(acrylic acid). *Macromolecules* 30: 8278-8285.
- Pinilla I.M., Martinez M.B. and Tirrell D.A. (1994). Selective H⁺-dependent release of content from thymine-labeled phospholipid vesicles by an adenine-labeled polyelectrolyte. *Macromolecules* 27: 2671-2674.

- Plank C., Oberhauser B., Mechtler K., Koch C. and Wagner E. (1994). The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem* 269: 12918-12924.
- Plestil J., Ostanevich Y.M. and Bezzabotonov Y. (1986). Small-angle scattering from polyelectrolyte solutions: dimensions of poly(methacrylic acid) chains in salt-free solutions. *Polymer* 27: 839-842.
- Polozova A. and Winnik F.M. (1999). Contribution of hydrogen bonding to the association of liposomes and an anionic hydrophobically modified poly(*N*-isopropylacrylamide). *Langmuir* 15: 4222-4229.
- Porcar I., Catala I., Garcia R., Abad C. and Campos A. (1997). Macromolecules in ordered media VII. High-performance size-exclusion chromatography as a technique for characterizing the interaction between polyanions and cationic liposomes. *J Chrom A* 778: 53-65.
- Roux E., Francis M., Winnik F.M. and Leroux J.C. (2002a). Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drugs. *Int J Pharm* 242: 25-36.
- Roux E., Lafleur M., Lataste E., Moreau P. and Leroux J.C. (2003). On the characterization of pH-sensitive liposome/polymer complexes. *Biomacromolecules* 4: 240-248.
- Roux E., Stomp R., Giasson S., Pezolet M., Moreau P. and Leroux J.C. (2002b). Steric stabilization of liposomes by pH-responsive *N*-isopropylacrylamide copolymer. *J Pharm Sci* 91: 1795-1802.
- Roux E., Zignani M., Daigle C., Moreau P., Drummond D.C., Hong K. and Leroux J.C. (2000). pH-sensitive gel phase liposomes. *Proceed Int Control Rel Bioact Mater* 27: 215.
- Sakurai M., Imai T., Yamashita F., Nakamura K., Komatsu T. and Nakagawa T. (1993). Temperature dependence of viscosities and potentiometric titration behavior of aqueous poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid) solutions. *Polymer J* 25: 1247-1255.
- Schroeder U.K.O. and Tirrell D.A. (1989). Structural reorganization of phosphatidylcholine vesicle membranes by poly(2-ethylacrylic acid). Influence of the molecular weight of the polymer. *Macromolecules* 22: 765-769.
- Seki K. and Tirrell D.A. (1984a). pH-dependent complexation of poly(acrylic acid) derivatives with phospholipid vesicle membranes. *Macromolecules* 17: 1692-1698.

- Seki K., Tirrell D.A., Braud C. and Vert M. (1984b). pH-dependent structural modification of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicle membranes by a degradable poly(carboxylic acid) of pharmacological importance. *Makromol Chem Rapid Commun* 5: 187-190.
- Senan C., Meadows J., Shone P.T. and Williams P.A. (1994). Solution behavior of hydrophobically modified sodium polyacrylate. *Langmuir* 10: 2471-2479.
- Senior J. and Gregoriadis G. (1982). Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life Sci* 30: 2123-2136.
- Seymour L.W., Duncan R., Strohal J. and Kopecek J. (1987). Effect of molecular weight (Mw) 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.
- Skolnick J. and Fixman M. (1977). Electrostatic persistence length of a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules* 10: 944-948.
- Soutar I. and Swanson L. (1993). Luminescence studies of polyelectrolyte behaviour in solution. 1. Accessibility of naphthalene-based labels of poly(methacrylic acid) to mobile low molar mass species in aqueous media. *Eur Polym J* 29: 371-378.
- Soutar I. and Swanson L. (1994a). Luminescence studies of polyelectrolyte behavior in solution. 3. Time-resolved fluorescence anisotropy measurements of the conformational behavior of poly(methacrylic acid) in dilute aqueous solutions. *Macromolecules* 27: 4304-4311.
- Soutar I. and Swanson L. (1994b). Luminescence studies of polyelectrolyte behaviour in solution. 2. The application of steady-state fluorescence anisotropy measurements to the study of the conformational behaviour of poly(methacrylic acid) in dilute aqueous solution. *Polymer* 35: 1942-1947.
- Spafford M., Polozova A. and Winnik F.M. (1998). Synthesis and characterization of a hydrophobically modified copolymer of N-isopropylacrylamide and glycinyll acrylamide. *Macromolecules* 31: 7099-7102.
- Stayton P.S., Hoffman A.S., Murthy N., Lackey C., Cheung C., Tan P., Klumb L.A., Chilkoti A., Wilbur F.S. and Press O.W. (2000). Molecular engineering of proteins

- and polymers for targeting and intracellular delivery of therapeutics. *J Control Release* 65: 203-220.
- Stramel R.D., Nguyen C., Webber S.E. and Rodgers M.A. (1988). Photophysical properties of pyrene covalently bound to polyelectrolytes. *J Phys Chem* 92: 2934-2938.
- Strauss U.P. and Barbieri B.W. (1982). Estimation of the cooperative unit size in conformational transitions of hydrophobic polyacids. *Macromolecules* 15: 1347-1349.
- Strauss U.P., Barbieri B.W. and Wong G. (1979). Analysis of ionization equilibria of polyacids in terms of species population distributions. Examination of a "two-state" conformational transition. *J Phys Chem* 83: 2840-2843.
- Strauss U.P. and Schlesinger M.S. (1978a). Effects of alkyl group size and counterion type on the behavior of copolymers of maleic anhydride and alkyl vinyl ethers. 1. Potentiometric titrations. *J Phys Chem* 82: 571-574.
- Strauss U.P. and Schlesinger M.S. (1978b). Effects of alkyl group size and counterion type on the behavior of copolymers of maleic anhydride and alkyl vinyl ethers. 2. Fluorescence of dansylated copolymers. *J Phys Chem* 82: 1627-1632.
- Strauss U.P. and Vesnaver G. (1975a). Optical probes in polyelectrolyte studies. I. Acid-base equilibria of dansylated copolymers of maleic anhydride and alkyl vinyl ethers. *J Phys Chem* 79: 1558-1561.
- Strauss U.P. and Vesnaver G. (1975b). Optical probes in polyelectrolyte studies. II. Fluorescence spectra of dansylated copolymers of maleic acid anhydride and alkyl vinyl ethers. *J Phys Chem* 79: 2426-2429.
- Sugai S., Nitta K. and Ohno N. (1982). Studies on conformational transition of the maleic acid copolymer with styrene in aqueous salt solution by derivative spectroscopy. *Polymer* 23: 238-242.
- Sugai S., Nitta K., Ohno N. and Nakano H. (1983). Conformational studies on poly(ethacrylic acid) in aqueous salts by potentiometric, viscometric, optical and ^1H -NMR measurements. *Colloid Polym Sci* 261: 159-165.
- Sugai S., Ohno N. and Nitta K. (1974). Kinetic studies on the conformational transition of the copolymer of styrene and maleic acid in aqueous solution. *Macromolecules* 7: 961-963.

- Taillefer J., Jones M.C., Brasseur N., van Lier J.E. and Leroux J.C. (2000). Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs. *J Pharm Sci* 89: 52-62.
- Tan J.S. and Gasper S.P. (1973). Dilute solution behavior of polyelectrolytes. Potentiometric titration studies on chain conformation. *Macromolecules* 6: 741-746.
- Tan J.S. and Gasper S.P. (1974). Dilute solution behavior of polyelectrolytes. Intrinsic viscosity and light scattering studies. *J Polym Sci, Polym Phys Ed* 12: 1785-1804.
- Tan J.S. and Shneider R.L. (1975). Dye binding and its relation to polyelectrolyte conformation. *J Phys Chem* 79: 1380-1386.
- Tan K.L. and Treolar F.E. (1980). Solubilization of 9-methylanthracene by the hypercoiled form of poly(methacrylic acid) in water: fluorescence decay and rotational diffusion measurements. *Chem Phys Lett* 73: 234-239.
- Taylor L.D. and Cerankowski L.D. (1975). Preparation of films exhibiting a balanced temperature dependence to permeation by aqueous solutions - A study of lower cosolute behavior. *J Polym Sci, Polym Chem Ed* 13: 2551-2570.
- Thomas J.L., Barton S.W. and Tirrell D.A. (1994a). Membrane solubilization by a hydrophobic polyelectrolyte: surface activity and membrane binding. *Biophys J* 67: 1101-1106.
- Thomas J.L., Devlin B.P. and Tirrell D.A. (1996). Kinetics of membrane micellization by the hydrophobic polyelectrolyte poly(2-ethylacrylic acid). *Biochim Biophys Acta* 1278: 73-78.
- Thomas J.L., Hsu S.L. and Tirrell D.A. (1994b). Polyelectrolyte-phospholipid micelle structure. *New J Chem* 18: 407-410.
- Thomas J.L. and Tirell D.A. (2000). Polymer-induced leakage of cations from dioleoyl phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol liposomes. *J Control Release* 67: 203-209.
- Thomas J.L. and Tirrell D.A. (1992). Polyelectrolyte-sensitized phospholipid vesicles. *Acc Chem Res* 25: 336-342.
- Thomas J.L., You H. and Tirrell D.A. (1995). Tuning the response of a pH-sensitive membrane switch. *J Am Chem Soc* 117: 2949-2950.

- Tirrell D.A., Takigawa D.Y. and Seki K. (1985). pH sensitization of phospholipid vesicles via complexation with synthetic poly(carboxylic acid)s. *Ann NY Acad Sci* 446: 237-248.
- Turro N.J. and Arora K.S. (1986). Pyrene as a photophysical probe for intermolecular interactions of water-soluble polymers in dilute solutions. *Polymer* 27: 783-796.
- Turro N.J., Caminati G. and Kim J. (1991). Phosphorescence from a bromonaphthalene lumophore as a photophysical probe of polymer conformation and interpolymer interactions. *Macromolecules* 24: 4054-4060.
- Walczak W.J., Hoagland D.A. and Hsu S.L. (1992). Analysis of polyelectrolyte chain conformation by polarized raman spectroscopy. *Macromolecules* 25: 7317-7323.
- Walczak W.J., Hoagland D.A. and Hsu S.L. (1996). Spectroscopic evaluation of models of polyelectrolyte chain conformation in dilute solution. *Macromolecules* 29: 7514-7520.
- Wang K.T., Illiopoulos I. and Audebert R. (1988). Viscometric behaviour of hydrophobically modified poly(sodium acrylate). *Polym Bull* 20: 577-582.
- Wang Y. and Morawetz H. (1986). Study of the equilibrium and the kinetics of the fluorescence enhancement on mixing solutions of auramine O and poly(methacrylic acid). *Macromolecules* 19: 1925-1930.
- Xu Y. and Szoka F.C., Jr. (1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* 35: 5616-5623.
- Yamashita F. and Kwak J.C.T. (1987). Heat capacity measurements in carboxylic polyelectrolyte solutions. *J Polym Sci, Polym Phys* 25: 1395-1406.
- Yatvin M.B., Kreutz W., Horvitz B.A. and Shinitzky M. (1980). pH-sensitive liposomes: possible clinical implications. *Science* 210: 1253-1255.
- Yessine M.-A., Lafleur M., Petereit H.-U., Meier C. and Leroux J.-C. (2003). Characterization of the membrane destabilizing properties of different pH-sensitive methacrylic acid copolymers. *Biophys Biochim Acta* 1613: 28-38.
- You H. and Tirrell D.A. (1991). Photoinduced, polyelectrolyte-driven release of contents of phosphatidylcholine bilayer vesicles. *J Am Chem Soc* 113: 4022-4023.
- Zdanowicz V. and Strauss U.P. (1993). Intramolecular micelle size of polysoaps by luminescence quenching. Role of solubilization. *Macromolecules* 26: 4770-4773.

Zignani M., Drummond D.C., Meyer O., Hong K. and Leroux J.C. (2000). In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. *Biochim Biophys Acta* 1463: 383-394.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE

Hypothèse de recherche

Certains copolymères d'acide méthacrylique (MAA) sensibles au pH possèdent des propriétés déstabilisantes des membranes leur permettant de faciliter le transfert d'oligonucléotides antisens (ODNs) de l'endosome au cytoplasme suite à leur incorporation dans différents vecteurs synthétiques.

Objectifs généraux

En nous basant sur la littérature, nous constatons que certains poly(acides (méth)acryliques d'alkyle) peuvent interagir avec des membranes lipidiques en fonction du pH. Les résultats de plusieurs études démontrent que les propriétés déstabilisantes des membranes de ces polymères sont grandement influencées par leur composition et leur hydrophobie. D'autre part, ils suggèrent fortement que ce type de polymère pourrait être employé afin d'augmenter la libération de principes actifs dans le cytoplasme. Nous avons donc décidé d'étudier en détail les propriétés de ces polymères et d'évaluer leur potentiel thérapeutique en les intégrant dans des systèmes d'administration de médicaments. L'objectif principal de la présente thèse consiste à déterminer si des poly(acides (méth)acryliques d'alkyle) peuvent être utilisés afin d'améliorer le transport intracellulaire d'ODNs.

Objectifs spécifiques

Dans un premier temps, les propriétés physico-chimiques d'une série de copolymères de MAA ont été corrélées avec leur capacité à déstabiliser des vésicules lipidiques en fonction du pH. Pour ce faire, les copolymères ont été caractérisés dans le but d'identifier les propriétés qu'ils doivent posséder afin d'interagir efficacement avec les

membranes à pH acide tout en étant inertes et non toxiques à pH physiologique. Plus précisément, cette partie du travail consistait à :

- Étudier le changement de conformation des différents copolymères en fonction du pH.
- Évaluer les propriétés destabilisantes des membranes des différents copolymères en fonction du pH.
- Évaluer la toxicité des copolymères envers des cellules en culture.

Dans un deuxième temps, le copolymère le plus prometteur et un ODN modèle ont été incorporés dans des nanoparticules ternaires composés de dioléoyltriméthylammonium propane (DOTAP). De par sa nature cationique, ce vecteur a permis d'étudier en détail l'efficacité et le mécanisme d'action du système *in vitro*. Il était attendu que le copolymère de MAA potentialise l'activité de l'ODN en augmentant son transfert de l'endosome au cytoplasme des cellules. Afin de vérifier cette hypothèse, les travaux effectués visaient à :

- Déterminer si le copolymère de MAA augmente la capacité de l'ODN à inhiber l'expression de sa protéine cible.
- Étudier la capture cellulaire de complexes.
- Évaluer la distribution intracellulaire des complexes.

Étant donné la nature cationique des nanoparticules à base de DOTAP, elles sont instables en présence de sels et susceptibles de se dissocier ou de s'agréger en présence de sérum. Par conséquent, le copolymère et l'ODN ont dans un troisième temps été incorporés dans des micelles polyioniques possédant des caractéristiques plus prometteuses pour des applications *in vivo*. Les dernières expériences accomplies avaient donc pour objectifs de :

- Vérifier si le copolymère de MAA et l'ODN peuvent être incorporés dans des micelles neutres, de petite taille, de distribution de taille étroite et présentant une architecture cœur/couronne.

- Étudier les propriétés physico-chimiques des micelles en fonction du pH.
- Confirmer que le copolymère de MAA incorporé dans les micelles conserve sa capacité à déstabiliser les membranes lipidiques suivant une diminution du pH du milieu.
- Évaluer si les micelles protègent l'ODN de la dégradation enzymatique.
- Déterminer si les micelles peuvent faciliter le transfert de l'ODN de l'endosome au cytoplasme de cellules en culture.

CHAPITRE 2

Characterization of the membrane-destabilizing properties of different pH-sensitive methacrylic acid copolymers³

Marie-Andrée Yessine^a, Michel Lafleur^b, Christian Meier^c, Hans-Ulrich Peterleit^c, Jean-Christophe Leroux^a

^a Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, ^bDepartment of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

^c Röhm GmbH, Chemische Fabrick, Werk Darmstadt, Kirschenallee, D-64293 Darmstadt, Germany

Keywords: Methacrylic acid copolymers, pH-sensitivity, membrane bilayers, endosomal release

³ Paru dans *Biochim Biophys Acta* (2003) 1613 : 28-38. Reproduit avec la permission d'Elsevier Science.

Abstract

The intracellular delivery of active biomacromolecules from endosomes into the cytoplasm generally requires a membrane-disrupting agent. Since endosomes have a slightly acidic pH, anionic carboxylated polymers could be potentially useful for this purpose since they can destabilize membrane bilayers by a pH-triggered conformational change. In this study, 5 different pH-sensitive methacrylic acid copolymers were characterized with respect to their physicochemical and membrane lytic properties as a function of pH. pH-dependent conformational changes were studied in aqueous solution by turbidimetry and spectrofluorimetry. The hydrophobic domains that formed upon a decrease in pH were found to be dependent on the copolymer's composition. Hemolysis and cytotoxicity assays demonstrated that the presence of the hydrophobic ethyl acrylate monomer and/or sufficient protonation of the carboxylic acid groups were important parameters for efficient membrane destabilization. Excessive copolymer hydrophobicity was not associated with membrane destabilization, but resulted in high macrophage cytotoxicity. Overall, this study gave more insights into the structure-activity relationship of methacrylic acid copolymers towards membrane bilayers. Gaining knowledge of modulation of the physicochemical properties of copolymers and the optimization of copolymer-lipid interaction may lead to the elaboration of much more efficient drug delivery systems.

1. Introduction

The efficient delivery of therapeutic macromolecules (e.g. DNA, proteins) to the cytoplasm is often limited by their intracellular trafficking pathway. Although colloidal complexes can be internalized into targeted cells via receptor-mediated endocytosis, they are most of the time rapidly trafficked from endosomes to lysosomes where degradation may occur (*Mukherjee, 1997; Mellman, 1996*). The escape of biomolecules from endosomes generally requires a membrane-destabilizing agent, which can release the internalized compounds into the cytoplasm before they reach the lysosomes. Since endosomes exhibit a slightly acidic pH (5.0-6.5), a possible strategy to achieve such a goal consists of using a carrier that destabilizes the endosomal bilayer under mildly acidic conditions and is non-disruptive at pH 7.4.

Carriers based on attenuated viruses have been studied extensively in gene delivery (*Shimotobno, ; Wei, 1981; Gordon, 1994*). At low pH (4.8-6.5), viral fusion glycoproteins adopt an α -helix or a β -sheet conformation, which interacts with cell membranes and induces their destabilization (*Hernandez, 1996*). Although they provide high transfection efficiencies, these agents can elicit host immunogenic reactions (*Temin, 1990*). Safety issues have prompted the development of synthetic fusogenic peptides that mimic the process by which viruses destabilize endosomal membranes (*Subbarao, 1987; Plank, 1994*). However, like the parent viral vector, these peptides are likely to be immunogenic in vivo. To obtain safer agents, much attention has been focused on the development of nonviral delivery vectors such as synthetic polymers. Among these, synthetic pH-sensitive polyelectrolytes are of particular interest as they can, like viruses, interact with membranes in a pH-dependent manner. The mechanism of membrane destabilization varies, depending on whether the polyelectrolyte is a weak base (polycation) or a weak acid (polyanion).

The first class of polyelectrolytes is composed of cationic aminated polymers, such as poly(L-lysine) (PLL), poly(ethylenimine) (PEI), and poly(amidoamine) (PAA). These polymers promote membrane destabilization at acidic pH via electrostatic interactions between protonated amines and the negatively-charged membrane. PLL is a linear polymer, which efficiently binds DNA and protects it from degradation by nucleases (*Laemmli, 1975; Wu, 1987; Wagner, 1990*). However, its usefulness is limited as it is relatively cytotoxic and

poorly endosomolytic. Thus, PLL does not by itself induce the endosomal release of DNA unless another endosomolytic agent is added (*Zenke, 1990; Erbacher, 1996*), or unless the polymer is chemically modified to increase its lytic activity (*Midoux, 1999; Bennis, 2000*). Highly branched cationic polymers such as PEI and PAA dendrimers are efficient transfection agents that are thought to act by a proton-sponge effect. The high buffering capacity of these polymers prevents acidification of the endosomal compartment, and induces ion influx in endosomes, causing osmotic swelling and vesicle destabilization (*Boussif, 1995; Haensler, 1993*). Recent work on these polymers has demonstrated that chain flexibility would be a key feature for this effect, since polymer expansion appears to be an important parameter leading to endosomal swelling and subsequent disruption (*Tang, 1996*).

The second category of pH-sensitive synthetic polymers consists of anionic carboxylated polymers, such as acrylic and methacrylic acid copolymers. These polymers bear pendant carboxylic acid groups and destabilize membrane bilayers by a pH-triggered conformational change. They collapse from an expanded hydrophilic coil at physiological pH to a hydrophobic globule in an acidic environment (*Seki, 1984; Borden, 1987; de Oliveira, 1996; Olea, 1999*). So far, poly(ethylacrylic acid) (PEAA) is the anionic carboxylated polymer that has been studied most extensively for its membrane-destabilizing properties. PEAA is currently being investigated in liposomal delivery systems to induce pH-triggered release of liposome content (*Maeda, 1988; Thomas, 2000; Chen, 1999; Mills, 1999*). It is also being evaluated as an endosomolytic agent (*Murthy, 1999; Mourad, 2001*). At acidic pH and low concentrations, it can permeabilize cell membranes, whereas high polymer concentrations completely solubilize phospholipid bilayers (*Thomas, 1992*). PEAA interaction with membrane bilayers is well characterized in the literature. However, little information is available on the structure-activity relationship of methacrylic and acrylic acid copolymers. This manuscript is aimed at characterizing 5 different methacrylic acid (MAA) copolymers with respect to their membrane lytic properties as a function of pH. To gain more insights into their structure-dependent interaction with membrane bilayers, the physicochemical properties of the copolymers are correlated with their ability to destabilize vesicles (red blood cells or liposomes), and with cytotoxicity assays. Ultimately, these copolymers could be used as soluble macromolecular drug carriers. Drugs could be covalently attached to the polymer backbone via a cleavable linkage. Alternatively, MAA

copolymers could be complexed by means of electrostatic interactions to positively-charged DNA delivery systems such as polyplexes and lipoplexes.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Methacrylic acid copolymers were prepared by free radical polymerization and provided by Röhm GmbH (Darmstadt, Germany). The lactate dehydrogenase (LDH) assay kit and cytochalasin B were purchased from Sigma (St.-Louis, MO). Egg phosphatidylcholine (EPC), dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) and dimiristoylphosphatidylglycerol (DMPG) were obtained from Northern Lipids inc. (Vancouver, BC, Canada). Cholesterol (Chol) was obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS) and *p*-xylene-bis-pyridinium bromide (DPX) were procured from Molecular Probes (Eugene, OR). Unless otherwise stated, all other products, including pyrene, fluoresceinamine (isomer I) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), were obtained from Aldrich (Milwaukee, WI).

2.2 Purification and molecular weight determination

Prior to use, the copolymers were dissolved in ethanol and dialyzed against water for at least 72 h. Absolute number (M_n)- and weight (M_w)- average molecular weights (MWs) as well as the polydispersity index (PI) were determined by size exclusion chromatography (SEC), using a Waters 1525 pump (Waters, Milford, MA) equipped with a high-sensitivity differential refractive index detector (Waters 2410) and PD 2000 light scattering detector (Precision Detectors, Franklin, MA). The eluent was either a 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) buffer, pH 8, or N,N-dimethylformamide (DMF) containing 10 mM lithium bromide (LiBr). Four Waters Ultrahydrogel (120, 250, 1000 and

2000) or 3 Waters Styragel columns (HT2, HT3 and HT4) were placed in series. Flow rate and temperature were set at 1 mL/min and 35°C, respectively.

2.3 Evaluation of the precipitation pH of methacrylic acid copolymers

The copolymers were dissolved in phosphate buffered saline (PBS, 34 mM, NaCl 75 mM), pH 7.4, to a final concentration of 75 mg/L. Polymer solutions were progressively acidified with HCl to pH 3.2 and aliquots were withdrawn at different pH values. The precipitation pH was determined by 90° turbidimetry at 480 nm under stirring at 37°C, using a Series 2 Aminco Bowman spectrofluorimeter (Spectronic Instruments Inc., Rochester, NY) (Meyer, 1998). Light scattering intensities were plotted as a function of pH. Experiments were run in duplicate.

2.4 Study of the pH-dependent conformational transition of copolymers by pyrene fluorescence

The copolymers were dissolved in PBS, pH 7.4, to a final concentration of 200 mg/L. Polymer solutions were progressively acidified to pH 4.2 and aliquots were withdrawn at different pH values. Pyrene (2×10^{-7} M) was also dissolved in phosphate buffer and added to the copolymer solutions. The samples were stirred overnight in the dark at room temperature. Fluorescence emission spectra were recorded at 37°C ($\lambda_{ex} = 334$ nm), and intensities of emission peaks I (372 nm) and III (383 nm) served to monitor the formation of hydrophobic domains within the copolymers. Experiments were also performed without pyrene to eliminate excess light scattering caused by precipitated copolymers. Each experiment was performed in quadruplicate.

2.5 Hemolysis assays

This procedure was described previously by Murthy and coworkers (Murthy, 1999). Human red blood cells (RBC) were selected as the endosomal membrane model. The cells

were collected from a healthy donor in vacutainer tubes (Fisher Scientific, Montreal, QC, Canada) containing 5.5 mg of liquid K₃ EDTA. The tubes were centrifuged at 200 g for 5 min at 4°C, and the cells were washed 3 times (centrifugation followed by redispersion) with PBS, pH 7.4, or saline 0.9% (w/v). RBC were counted with a hemacytometer and diluted either in isotonic phosphate or 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES, 200 mM, NaCl 110 mM) buffer of the appropriate pH. The copolymers were dissolved in PBS or in mildly alkaline saline 0.9% (w/v). The hemolysis assay was performed by adding RBC suspended in the appropriate medium to the copolymer solution (final cell concentration = 10⁸ RBC/mL). The samples were incubated for 30 min under stirring at 37°C, cooled on ice, and centrifuged at 5,300 g for 5 min at 4°C. To determine the extent of membrane disruption, hemoglobin absorbance in the supernatant was measured at 541 nm, using a PowerWave microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT). To obtain 100% hemolysis, cells (10⁸ RBC/mL) were lysed by dispersion in water. Controls were prepared by mixing the RBC with buffer or saline. RBC were tested within 24 h after collection.

2.6 Assessment of copolymer-lipid interaction using liposomes as membrane models

Unilamellar liposomes (20 mM total lipid) composed either of EPC or EPC:Chol:DOPE:DMPG (61:17:16:6 molar ratio) were prepared by hydration of dried lipids, followed by repeated extrusion through a 0.2- μ m pore size membrane at room temperature. Liposomes containing the highly water-soluble fluorophore HPTS and the collisional quencher DPX were prepared by including these probes in the lipid hydration buffer (N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethane sulfonic acid) (HEPES) 20 mM, HPTS 35 mM, DPX 50 mM, pH 7.4). Untrapped dye was removed by gel filtration in Sephadex G-100 (Pharmacia, Baie d'Urfé, QC, Canada). Liposomes and the copolymers dissolved in mildly alkaline saline were added to either isotonic PBS or MES buffer of the appropriate pH. The release of liposome content was monitored for 20 min at 37°C by a fluorescence dequenching assay (Daleke, 1990). The extent of content release was calculated from HPTS fluorescence (λ_{ex} =413 nm, λ_{em} =512 nm) relative to measurement after liposome lysis in 0.5% (v/v) Triton X-100, which gave the complete release of encapsulated HPTS and DPX.

2.7 Measurement of liposome size by dynamic light scattering (DLS)

The hydrodynamic mean diameter and size distribution of liposomes were determined at an angle of 90° and a temperature of 37°C by DLS, using differential size distribution processor intensity analysis (N4Plus, Coulter Electronics, Miami, FL). The copolymers were dissolved in PBS at concentrations ranging from 0.25 to 4 mg/mL. The solutions were filtered through a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ pore size filter before liposome addition. Size measurements were conducted in triplicate.

2.8 Labeling of copolymer B with fluoresceinamine and study of adsorption

Fluoresceinamine (1.6×10^{-3} mmol) dissolved in distilled anhydrous tetrahydrofuran (THF) was added to a THF solution of copolymer B (250 mg, 2.2 mL). The mixture was degassed for 15-20 min under argon, and the carboxylic acid group activator N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (1.9×10^{-3} mmol, 20% excess) was added. The reaction was carried out for 72 h under inert atmosphere in the dark at room temperature. THF was then evaporated under vacuum, and the crude product was dissolved in phosphate buffer, pH 9. It was dialysed (MW cut-off 3,500) for 3 days against a water/methanol mixture (50:50 v/v). The methanol was subsequently replaced by pure water, and dialysis was continued for another 2 days. The purified product was finally freeze-dried, and the absence of free fluoresceinamine was confirmed by thin layer chromatography, using an ethyl acetate/hexane/acetic acid (78:10:2 v/v) mobile phase. The fluorescein content of the copolymers was assayed by spectrofluorimetry in PBS and found to be 0.04 mol% (yield: 66%). The precipitation pH of labeled copolymer was measured as described above (Section 2.3).

For the adsorption study, 10^8 RBC suspended in the appropriate isotonic buffer (phosphate or MES) at pH varying from 6.0 to 7.4 were incubated for 30 min under stirring at 37°C , with the labeled copolymer dissolved in mildly alkaline saline (final concentration = 75 or 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Controls were prepared by adding only saline to the RBC. The samples

were then centrifuged gently at 50 g, and the fluorescence of the supernatant (λ_{ex} =485 nm, λ_{em} =530 nm) was determined in a FL600 microplate reader (Biotek Instruments). To obtain 100% fluorescence, the copolymer was mixed with the appropriate buffer devoid of RBC. Each experiment was performed in quadruplicate.

2.9 Evaluation of the cellular toxicity of copolymers by MTT assay

Inhibition of cell proliferation was measured by tetrazolium salt MTT assay (Mosmann, 1983). J774 mouse macrophage-like cells (a gift from Professor Michel Desjardins, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada) were suspended in Dulbecco's modified Eagle cell culture medium (DMEM) containing 10% (v/v) heat-inactivated (56°C, 30 min) fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin G and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). The cells were plated in 96-well tissue culture plates (100 µL DMEM-FBS containing 5×10^3 viable cells) and allowed to adhere for 24 h at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂. Twenty µL of copolymer solutions in PBS and sterilized by filtration through a 0.2-µm pore size filter were then added to the wells in triplicate (final concentration ranging from 3 to 500 µg/mL). Controls (100% cell survival) were prepared by adding PBS to the cells. Incubations were conducted for 48 h, and MTT dissolved in PBS (10 µL of a 5 mg/mL solution) was added to each well. After a further 3-h incubation, sodium dodecyl sulfate (100 µL of a 10% w/v solution containing 0.01 N hydrochloric acid) was added to each well to dissolve reduced MTT. Absorbance was measured 24 h later at 570 nm. Each experiment was undertaken in quadruplicate. Experiments using the phagocytosis inhibitor cytochalasin B were performed in 24-well tissue culture plates (500 µL DMEM-FBS containing 5×10^4 viable cells). After 24 h of incubation, 50 µL of a solution of cytochalasin B (6 µM final concentration) were added to each well in triplicate. The plates were incubated for 20 min, and 108 µL of copolymer E solution prepared in PBS were added to the wells (final concentration ranging from 125 to 1,000 µg/mL). Inhibitor cell toxicity was assessed by adding PBS to the cells instead of the copolymer solution. The cells were incubated for another 4.5 h, rinsed twice with serum-

free culture medium, and fresh DMEM-FBS medium was added. The MTT assay was performed after 48 h as described above. Experiments were conducted in triplicate.

2.10 Evaluation of the cellular toxicity of copolymers by LDH assay

Cellular death due to necrosis is associated with the release of the cytoplasmic enzyme LDH (*Cabaud, 1958; Lobner, 2000; Phillips, 1996*). To determine the in vitro toxicity of the copolymers, J774 cells were plated in 96-well tissue culture plates as described above for the MTT assay. After 24 h of incubation, copolymer solutions were added to each well in triplicate (final concentration ranging from 3 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Controls were prepared by adding PBS to the cells. The cells were incubated for another 48 h, and LDH activity was assessed in 4 μL aliquots of the supernatant of each well with a modified commercial LDH assay kit (*Phillips, 1996*). Total LDH content was measured by incubating the cells with Triton X-100 (1% v/v final concentration) to induce cell lysis.

3. Results

3.1 MW determination

The chemical compositions and respective MWs of the MAA copolymers are shown in Fig. 1 and Table 1. Although most copolymers were analyzed in an aqueous mobile phase (e.g. Tris buffer), it was necessary to use DMF with 10 mM LiBr for the more hydrophobic copolymer E. This copolymer, which contains only 10 mol% MAA, was found to interact with Ultrahydrogel columns. The MWs obtained ranged from 20,000 to 30,000. For all copolymers, the PI lay between 1.2 and 1.4, which is acceptable for polymers synthesized by free radical polymerization.

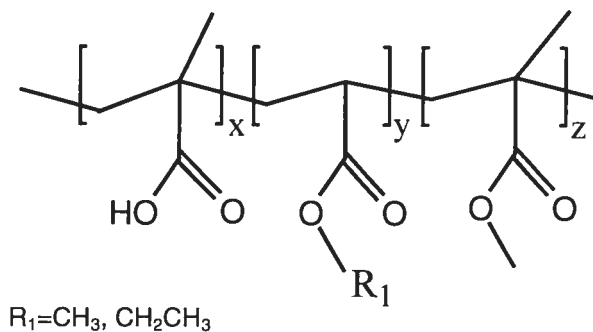


Figure 1. Chemical structure of the MAA copolymers tested.

Table 1. Molecular weight and precipitation pH of the different copolymers tested

Copolymer	Chemical composition (molar ratio)	Molecular weight			pH transition range
		M_n	M_w	PI	
Type A ¹	MMA/MAA (50:50)	20640	28390	1.38	3.8 – 4.5
Type B ¹	EA/MAA (50:50)	21630	26240	1.21	4.7 – 5.1
Type C ¹	MA/EA/MAA (35:35:30)	24270	31510	1.30	5.0 – 5.6
Type D ¹	MMA/MAA (70:30)	19130	23030	1.20	4.8 – 5.3
Type E ²	MA/MMA/MAA (45:45:10)	26940	32680	1.21	Broad (4.5 – 7.0)

¹ MW evaluated in TRIS buffer, pH 8.

² MW evaluated in DMF containing 10 mM LiBr.

MMA = methyl methacrylate, MA = methyl acrylate, EA = ethyl acrylate, MAA = methyl acrylic acid

3.2 *Evaluation of the pH-dependent conformational transition of MAA copolymers*

Fig. 2 shows the precipitation pH for the 5 MAA copolymers, while the pH transition ranges are presented in Table 1. Since turbidimetry is a method sensitive to the formation of particles with size neighboring the light wavelength, the reported values do not correspond to the true onset of phase transition but rather to the stage where the polymer starts to aggregate substantially. Most of the copolymers exhibited relatively sharp transitions which encompassed 0.4-0.7 pH units, and started to precipitate at least 1.8 pH units below 7.4. Copolymer E presented a much broader transition that covered about 2 pH units and started to phase separate at pH 7.0. The fact that this copolymer contains only 10 mol% carboxylic acid groups may explain the more gradual precipitation profile.

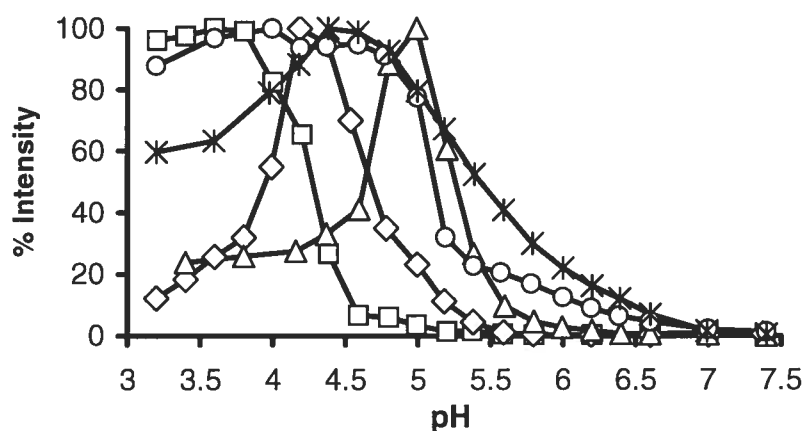


Figure 2. Precipitation pH of MAA copolymers A (squares), B (diamonds), C (triangles), D (circles), and E (stars) at 37°C. The copolymers were dissolved in PBS, pH 7.4. Polymer solutions were progressively acidified to pH 3.2 and aliquots were withdrawn at different pH values. Polymers precipitation pH was measured as an increase in light scattering intensity at 480 nm.

To gain more information on the hydrophobicity of the aggregates that are formed at acidic pH and to determine whether hydrophobic microdomains can be detected prior to a turbidity increase, pH-dependent conformational transition of the different copolymers was monitored by spectrofluorimetry, using pyrene as a probe. Pyrene is commonly used to assess the degree of hydrophobicity of its surrounding environment because its emission intensity and vibronic band structure are sensitive to solvation (*Kalyanasundaram, 1977*). For pH-sensitive polymers, the formation of hydrophobic microdomains under mildly acidic conditions can be monitored by an increase in total fluorescence intensity and a decrease in the ratio of the first (372 nm) and third (383 nm) peaks of the emission spectrum (I_1/I_3 ratio). Fig. 3A shows the emission spectrum of pyrene in solution with copolymer B at 2 different pHs, whereas Fig. 3B depicts the I_1/I_3 ratio plotted as a function of pH for the different copolymers. Both an increase in the total fluorescence intensity of pyrene and a decrease in the I_1/I_3 ratio were observed as the pH was decreased from 7.4 to 4.8. These results reflect the progressive conformational change of the copolymer, and are typical of the presence of hydrophobic domains in which pyrene is preferentially solubilized. Copolymers A and B underwent the sharpest transitions, followed by copolymers C and D. Interestingly, copolymer E presented no transition at all. It is noteworthy that the sharpness of the transition is related to the amount of MAA present in the copolymers, namely 50 mol% for copolymers A and B, 30 mol% for copolymers C and D, and only 10

mol% for copolymer E (Table 1). Also, as observed by turbidimetry, the transitions of copolymers A and B occurred at the lowest pH values, followed by copolymers C and D. However, these experiments suggest that hydrophobic microdomains already exist before polymer self-association is detected by turbidimetry. By comparing Figures 2 and 3B, one can observe that at the onset of turbidity increase, pyrene has already partitioned into a highly hydrophobic environment (i.e. I_1/I_3 ratios ≤ 1.3).

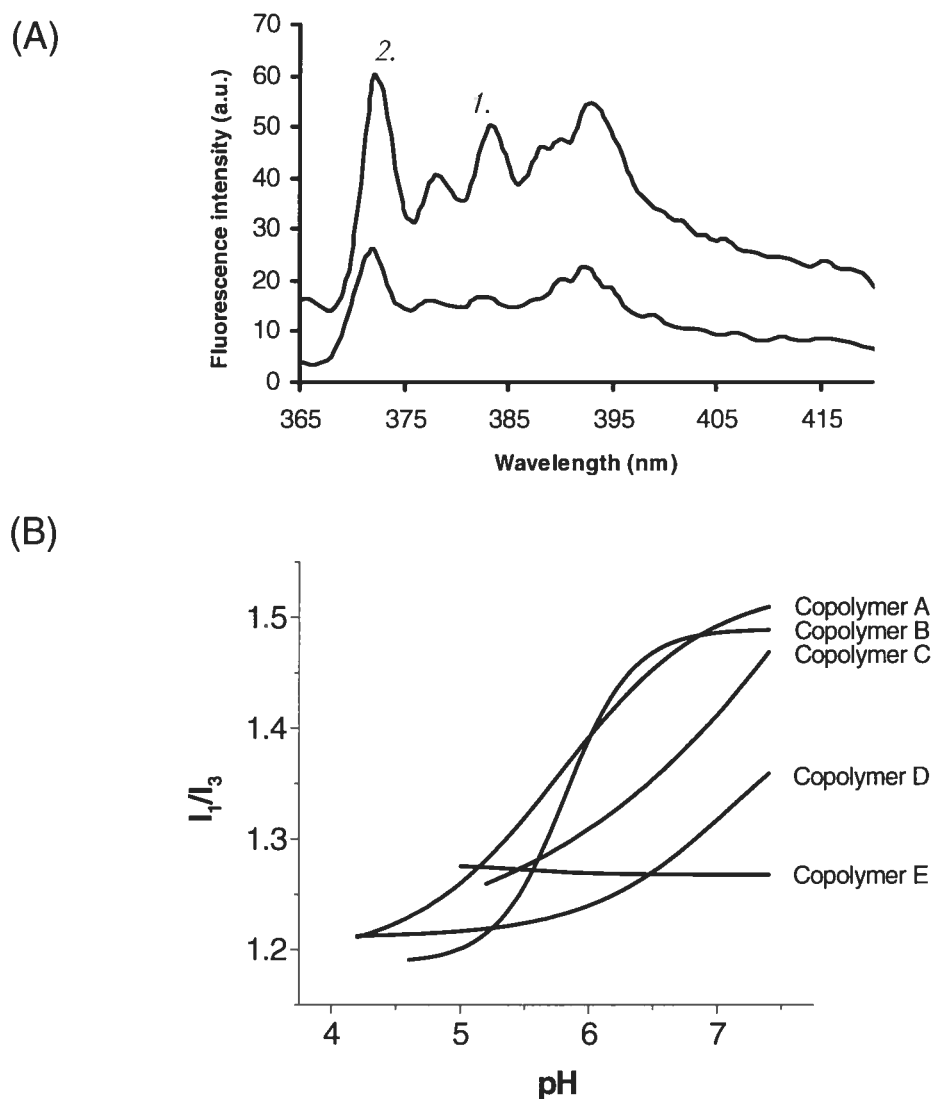


Figure 3. (A) Pyrene emission spectra in the presence of copolymer B at 37°C and pH 7.4 (lower curve) and 4.8 (upper curve) (B) Variation, with pH, of the I_1/I_3 ratio of pyrene codissolved at 37°C with the different MAA copolymers tested (data points have been removed for clarity).

3.3 Evaluation of the membrane-destabilizing properties of copolymers at neutral and acidic pH

Destabilization of membrane bilayers by the copolymers was first studied at neutral pH, using RBC as the endosomal membrane model. Fig. 4 shows the copolymers' hemolytic activity at physiological pH. Copolymers B, C and D were the most hemolytic at pH 7.4, whereas copolymer E presented limited hemolytic activity, reaching a maximal value of 20% hemolysis at 10 mg/mL. Copolymers B, C and D became significantly hemolytic (5%) at a concentration of approximately 0.5 mg/mL. Between 0.5 and 5.0 mg/mL, copolymer B was less hemolytic than copolymers C and D, which demonstrated similar activities. These results are in agreement with the transitions detected by turbidimetry and pyrene fluorescence spectroscopy. The closer the transition was to pH 7.4, the more hemolytic the copolymer was at that pH.

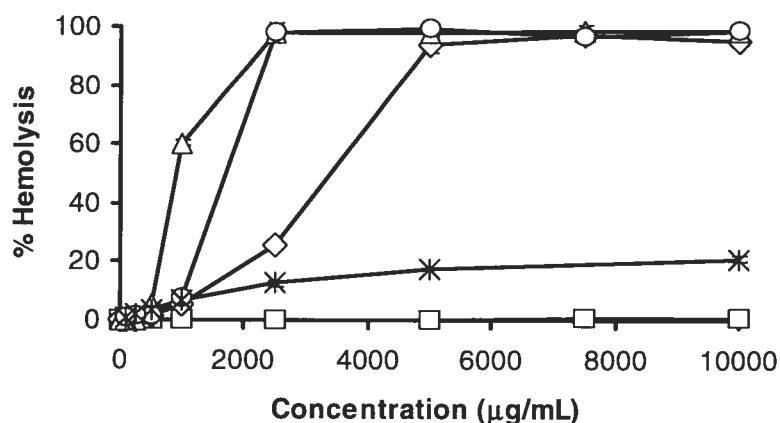


Figure 4. RBC hemolysis at physiological pH induced by MAA copolymers A (squares), B (diamonds), C (triangles), D (circles), and E (stars) at 37°C and physiological pH, as determined after a 30-min incubation by the absorbance of released hemoglobin at 541 nm. RBC suspended in PBS, pH 7.4, were added to copolymers dissolved in the same buffer at varying concentrations (10–10,000 µg/mL). Mean ± SD (n=3).

A useful endosomolytic agent should have membrane-destabilizing properties at the mildly acidic pH (5.0–6.5) found in endosomes. Assessment of copolymer pH-dependent hemolytic activity was first carried out with RBC (Fig. 5A). Only copolymers B and C caused hemolysis at 150 µg/mL in the pH range tested. Hemolytic activity was maximal at pH 5.0–5.5 for both copolymers. To determine the lowest hemolytic concentration at acidic pH,

hemolysis caused by copolymers B and C (pH 5.0 and 5.5) was evaluated at concentrations ranging from 5 to 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 5B). Copolymer B was more hemolytic at pH 5.5 than 5.0, especially at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (58% vs 10% hemolysis, respectively). Copolymer C was also less hemolytic at pH 5.0 than at 5.5, but at all concentrations tested, and was globally less hemolytic than copolymer B. Thus, maximal hemolysis is not necessarily achieved at the most acidic pH. At low pH values, extensive phase separation (Fig. 2) could limit polymer interaction with cell membranes.

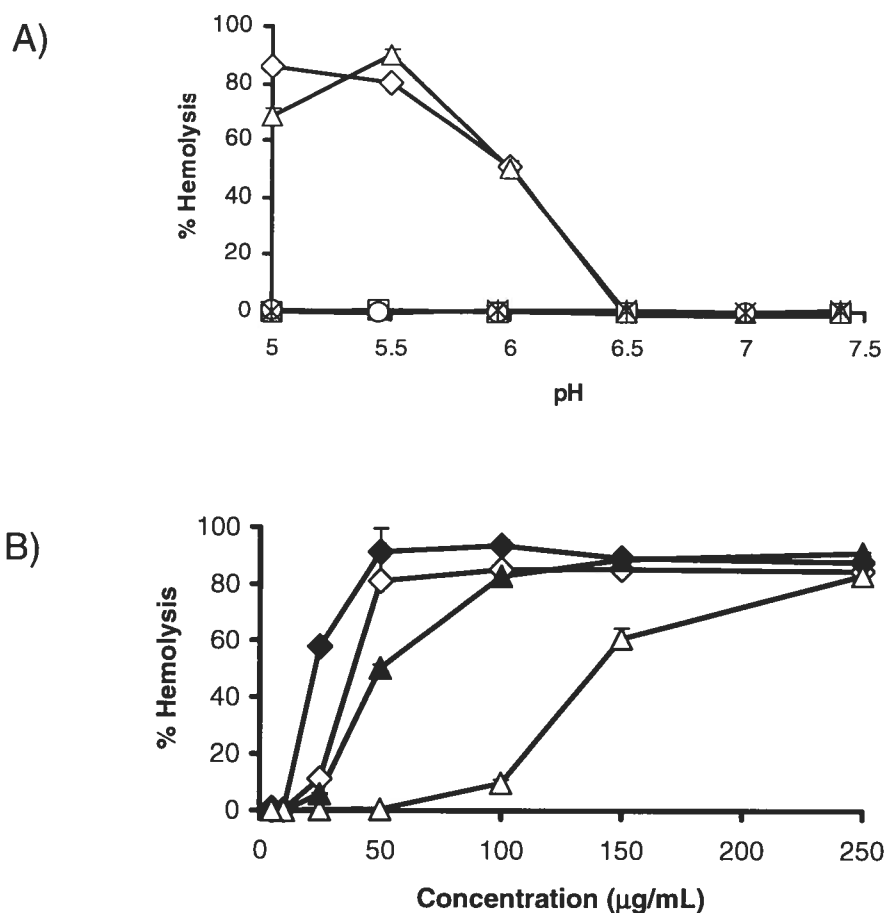


Figure 5. pH-dependent RBC hemolysis induced by the copolymers tested at 37°C after a 30-min incubation. (A) RBC suspended in isotonic phosphate or MES buffers of the appropriate pH were added to copolymers A (squares), B (diamonds), C (triangles), D (circles), and E (stars) dissolved in mildly alkaline saline at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final concentration). Mean \pm SD (n=3). (B) RBC hemolysis caused by copolymers B (diamonds) and C (triangles) at pH 5.0 (open) or 5.5 (closed) at various concentrations (5-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Mean \pm SD (n=3).

To assess the effect of membrane composition on their lytic properties, the copolymers were incubated 20 min at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and different pH, with artificial phospholipid vesicles prepared with EPC or EPC:Chol:DOPE:DMPG (61:17:16:6 molar ratio). The latter liposomes present a phospholipid composition similar to lysosomal membranes (Darnell, 1990). The vesicles were loaded with fluorescent probe HPTS and a collisional quencher. Fig. 6A shows the results obtained with EPC liposomes.

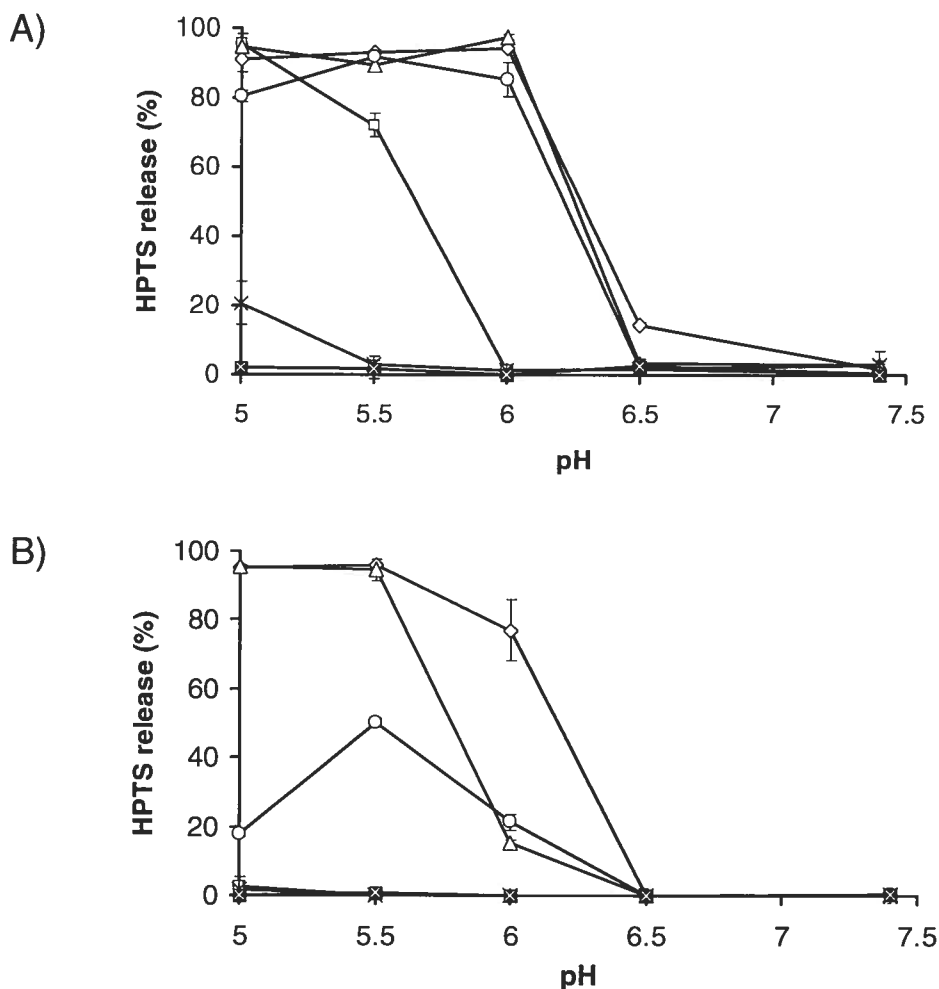


Figure 6. Release of HPTS encapsulated in (A) EPC or (B) EPC:Chol:DOPE:DMPG (61:17:16:6 molar ratio) liposomes at 37°C. The vesicles were incubated for 20 min without (cross) or with copolymers A (squares), B (diamonds), C (triangles), D (circles), E (stars) at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. HPTS release from liposomes was measured by an increase in HPTS fluorescence ($\lambda_{\text{ex}}=413$ nm, $\lambda_{\text{em}}=512$ nm). One hundred percent content release was obtained by adding Triton X-100 to the liposomes, and the data are expressed as a percentage of total HPTS release. Mean \pm SD (n=3).

Compared to RBC, these vesicles are more readily destabilized. With the exception of copolymer E, the copolymers triggered complete probe release at pH 5.0. Copolymers B, C and D also demonstrated high activity at pH 5.5 and 6.0. Copolymer A, which undergoes phase transition at lower pH values, required a more acidic pH for maximal activity. Incorporation of Chol and the negatively-charged phospholipid DMPG to EPC liposomes decreased polymer-triggered content leakage (Fig. 6B). Release profiles from these liposomes almost mimicked those obtained with RBC (Fig. 5A), with copolymers A and E showing no HPTS release at any pH, and copolymers B and C being maximally lytic at pH 5.0 and 5.5.

3.4 Adsorption study to RBC

To determine whether the copolymers adsorbed to RBC, copolymer B was labeled with fluorescein. Labeling did not significantly modify the pH at which the polymer phase separates (data not shown). Although sharper, transition began at the same pH (5.5) as the unmodified copolymer and followed the same trend up to pH 5.0. The adsorption study was carried out at a maximal concentration of 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to avoid complete membrane solubilization at pH values ranging from 7.4 to 6.0. At all pH values, the proportion of total copolymer bound to RBC at 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was almost twice that observed at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 7). Saturation of adsorption sites at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ may explain these results, since adsorption on membrane bilayers has been shown to be a saturable process for PEAA (Thomas, 1994). Between pH 6.5 and 7.4, there was about 20% adsorption to RBC at 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. At pH 6.0, adsorption increased to 60%. Since partial hemolysis was observed at that pH, this proportion is probably underestimated. After solubilization of RBC lipids, some copolymer may end up in the supernatant and may be included with the unbound fraction. The extent of polymer adsorption to RBC was estimated by dividing the number of adsorbed polymer molecules by the number of RBC. At 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, between pH 6.5 and 7.4, approximately 3×10^6 polymer molecules adsorbed to RBC, and this number increased to 1×10^7 at pH 6.0.

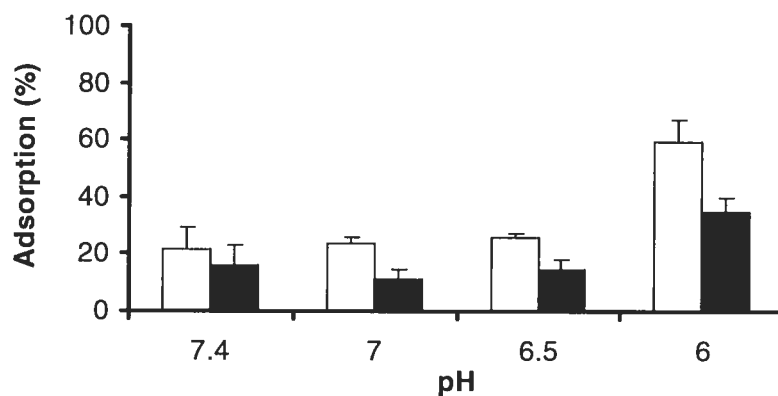


Figure 7. Adsorption of labeled copolymer B to RBC. The labeled copolymer was incubated with RBC for 30 min at 37°C at 75 (open bars) and 150 (closed bars) µg/mL. Samples were centrifuged at 50 g, and fluorescence of the supernatant was measured ($\lambda_{ex}=485$ nm, $\lambda_{em}=530$ nm). Measurements are expressed relative to 0% adsorption obtained by incubating the labeled copolymer with the appropriate buffer devoid of RBC. Mean \pm SD (n=4).

3.5 Cytotoxicity assays

The cellular toxicity of the copolymers was evaluated on macrophage-like cells by MTT (cell proliferation, Fig. 8A) and LDH (cell necrosis, Fig. 8B) assays. The 2 assays gave comparable results. While copolymers A and D did not show any cytotoxicity, copolymer B was associated with less than 20% cell survival and LDH release of about 35% at concentrations exceeding 12.5 µg/mL. Copolymer C induced mild cytotoxicity (80% cell survival, 15% LDH release) above 250 µg/mL. It is noteworthy that, at neutral pH, copolymers B and C were hemolytic towards RBC at higher concentrations (≥ 0.5 mg/mL). This greater sensitivity of J774 vs RBC may reflect differences in membrane intrinsic structural properties (Gunn, 1988). Surprisingly, copolymer E, which demonstrated weak hemolytic activity at pH 7.4, showed extensive cytotoxicity towards J774 cells at the highest concentration tested (0.5 mg/mL). To determine whether phagocytosis of copolymer E was involved in the significant toxicity observed on macrophage-like cells, a cell proliferation assay was undertaken with this copolymer and cells pretreated with cytochalasin B. Cytochalasin B is a fungal metabolite frequently used to inhibit actin-dependent functions, such as phagocytosis in living eukaryotic cells (Davies, 1978; Legrand, 1996). In the presence of cytochalasin B, there was a 5-fold increase in cell survival at 0.5

and 1 mg/mL, the most toxic copolymer concentrations (Fig. 9). Reduction of cell death was less important at lower copolymer concentrations, probably because of cytochalasin B's intrinsic toxicity (about 20% cell death, data not shown).

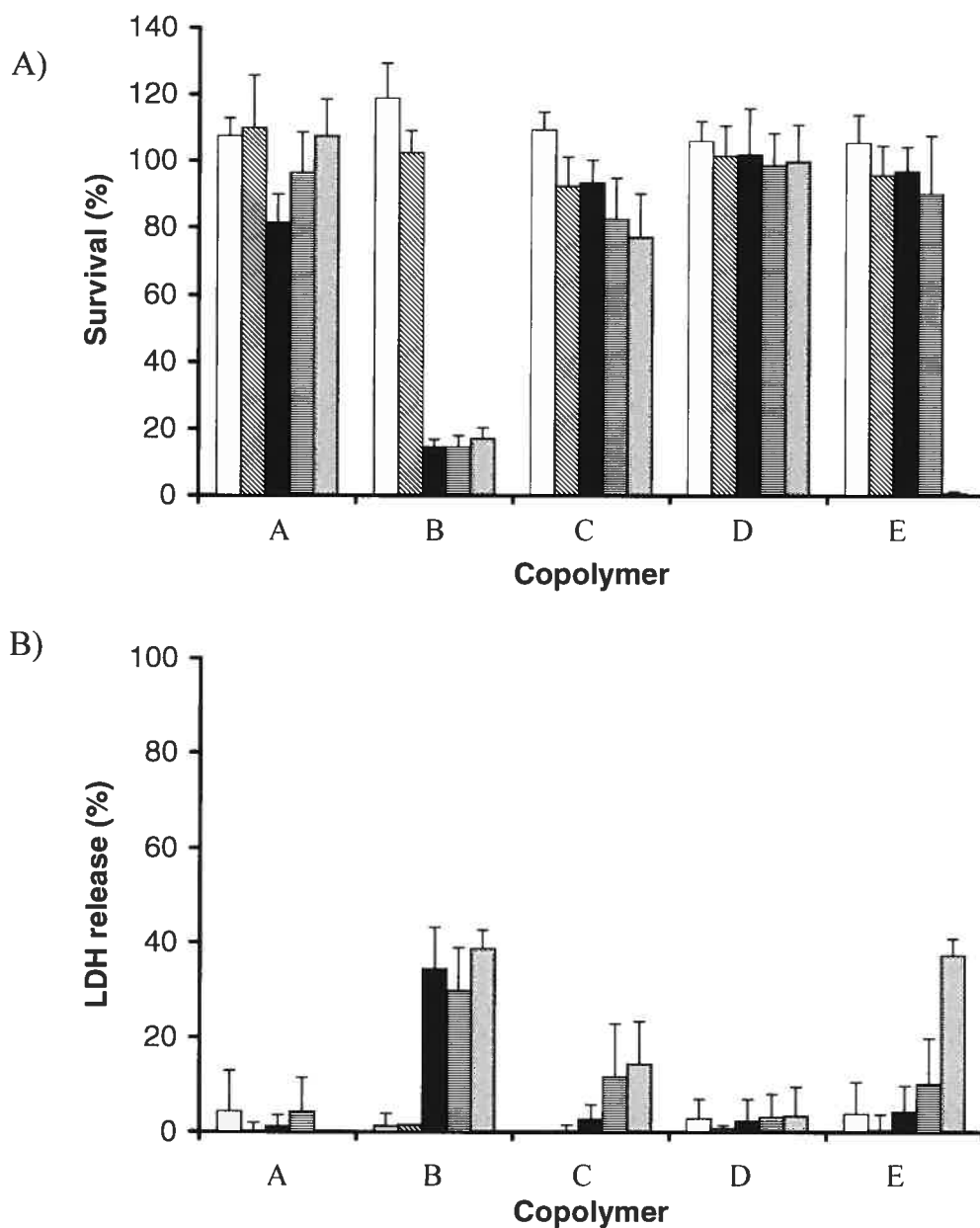


Figure 8. Copolymer cytotoxicity on J774 cells as a function of concentration as determined by (A) MTT and (B) LDH colorimetric assays at (from left to right) 3.125 (white), 12.5 (striped), 62.5 (black), 250 (squared) and 500 (dotted) µg/mL. Mean \pm SEM (n=4).

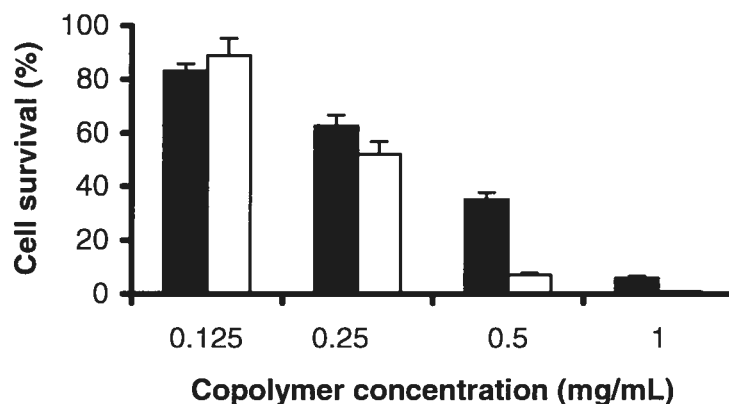


Figure 9. J774 cell survival, as determined by MTT assay, as a function of copolymer E concentration. The cells were incubated with (closed bars) and without (open bars) 6 μ M cytochalasin B. Mean \pm SEM (n=4).

4. Discussion

4.1 Molecular weight determination

Five different MAA copolymers were characterized with respect to their physicochemical properties, membrane lytic activity and cytotoxicity. The synthetic copolymers used in this work are a priori not biodegradable. Thus, their elimination from the body would be strictly dependent on renal glomerular filtration. Seymour *et al.* reported that a MW of 40,000 is the limiting threshold allowing renal elimination of non-biodegradable N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (PHPMA) copolymers (Seymour, 1987). It is known that uncharged polymers behaving as flexible coils (e.g. PHPMA, dextran, poly(N-vinylpyrrolidone)) can be filtered through glomerular pores even when their MW is higher than the threshold limiting glomerular filtration of globular, more rigid proteins (Maddox, 1992). The MAA copolymers examined in this study are polyanions in physiological solution. Accordingly, they have a relatively rigid, more extended conformation than corresponding uncharged polymers because of intramolecular electrostatic repulsion. This restricted deformability may decrease their filtration rate compared to flexible polymers with similar MW. Given that these polymers may eventually be administered parenterally, we decided to study copolymers with MWs well below the

threshold value established for flexible polymers (Table 1). The MWs found by aqueous SEC at pH 8 may, however, be overestimated owing to aggregation. In water at pH 9, it was previously demonstrated that a random ethyl acrylate (EA):MAA copolymer (50:50 molar ratio) forms aggregates of a few polymer chains. Aggregate formation would be driven by the EA segment, which is sufficiently blocky to induce hydrophobic associations in the backbone according to an open association mechanism (Dai, 2000; Ng, 2001). Aggregation at high pH is also supported by a study showing that the addition of β -cyclodextrin to random EA:MAA copolymers reduces the MWs obtained by SEC (Islam, 2000). Since β -cyclodextrin is known for its ability to shield hydrophobic associations, the resultant MWs probably correspond to those of single polymer chains. Aggregation at neutral pH has also been demonstrated for a random copolymer of acrylic acid containing 29% ethyl methacrylate (de Oliveira, 1996). Since the copolymers used in this work bear hydrophobic monomers (EA, methyl acrylate and methyl methacrylate) in proportions equal to or greater than 50 mol%, aggregation at neutral pH cannot be excluded.

4.2 Evaluation of copolymer-lipid interaction at neutral pH

The membrane-destabilizing activity of copolymers B and C on both RBC (Fig. 4) and J774 macrophages (Fig. 8) at neutral pH could be explained by the presence of hydrophobic EA units in the backbone. It has been suggested that ethyl chains facilitate interaction with hydrophobic components of the membrane (Chen, 1999; Thomas, 1992). Destabilization of membrane bilayers can still occur with a shorter alkyl chain (i.e. methyl) provided that the polymer is sufficiently hydrophobic (low I_1/I_3 ratio) and its concentration is high (e.g. copolymer D). However, the ability of such a copolymer to interact with the cell membrane at low concentrations is limited, as demonstrated by the weak toxicity of copolymer D towards J774 cells. Interestingly, copolymer E, which contains 10 mol% MAA and no EA, was poorly hemolytic towards RBC, even at 10 mg/mL. A control experiment also showed that copolymer E was unable to trigger HPTS release from EPC liposomes at pH 7.4 (data not shown). Nevertheless, this copolymer was very cytotoxic towards J774 cells at only 0.5 mg/mL.

Why was copolymer E more toxic than copolymer D towards macrophages? The answer to this question probably lies in the conformation adopted by the copolymer in solution. The I_1/I_3 ratio of copolymer E at neutral pH is very low (Fig. 3B). Therefore, at pH 7.4, the copolymer is probably in a globule configuration and exhibits a relatively hydrophobic surface owing to the low concentration of MAA units. Such a conformation would make copolymer E more susceptible to phagocytosis by macrophages (Müller, 1990). This hypothesis was verified by using a phagocytosis inhibitor. An increase in cell survival was observed at concentrations where the copolymer was the most cytotoxic. These results indicate that, following phagocytosis, the non-biodegradable polymer may persist within macrophages as an indigestible residue. Intracellular residue accumulation may ultimately lead to cell damage or death (Müller, 1990; Saad, 1996; Catelas, 1998). In contrast to J774 cells, RBC cannot internalize foreign particles. Thus, the limited RBC hemolysis observed at pH 7.4 may be explained by strong intramolecular interactions and poor insertion into the phospholipid membrane. The other copolymers were significantly less hydrophobic than copolymer E at pH 7.4 (higher I_1/I_3 ratio), and thus less prone to phagocytosis by J774 macrophages. A hydrophilic copolymer (high I_1/I_3 ratio) bearing no EA, such as copolymer A, is, in turn, inactive toward both RBC and J774 cells at neutral pH.

PEAA adsorption to lipid bilayers at neutral pH has been demonstrated in previous studies (Seki, 1984; Chen, 1999). Accordingly, to follow polymer adsorption to RBC, copolymer B, which is highly hemolytic, was labeled with fluorescein. At neutral pH, the copolymer was sufficiently hydrophobic to physically bind to RBC (Fig. 7). With increasing concentrations, polymer adsorption can lead to complete membrane solubilization (Thomas, 1992; Thomas, 1994). At copolymer B concentrations inducing 100% hemolysis (≥ 5 mg/mL), membrane solubilization was demonstrated by the absence of a pellet after RBC centrifugation. However, interaction with membrane bilayers with increasing polymer concentrations does not necessarily lead to complete membrane solubilization. We demonstrated by DLS that MAA copolymers (e.g. copolymers D and E) can destabilize EPC liposomes and trigger the release of their contents without solubilizing the vesicles (data not shown).

4.3 Evaluation of copolymer-lipid interaction upon decrease in pH

Polymers bearing pendant carboxylic acid groups undergo conformational transition after a decrease in pH (Seki, 1984; Borden, 1987; de Oliveira, 1996; Olea, 1999). As the acid/ester ratio is decreased, the transition from an extended chain to a compact globule occurs at higher values of ionization, since the charged groups are less numerous, and the charge effects more rapidly overcome by hydrophobic forces (Tonge, 2001). This finding was made by both aggregation probed by turbidimetry and the creation of hydrophobic domains detected from pyrene fluorescence (Fig. 2 and 3). It is interesting that aggregation of the polymer and the formation of hydrophobic domains (large enough to accommodate pyrene molecules) do not occur in a concomitant manner. Systematically, hydrophobic domains start to form before the extent of the aggregation is sufficient to be detected by turbidimetry. Copolymer E, for example, appeared to lead to hydrophobic domains over the investigated pH range, while the onset of light intensity variation was observed at pH 7. Neither of these assays is, by itself, predictive of the copolymers' ability to destabilize membrane bilayers. Increase in pyrene I_1/I_3 ratio allows to monitor subtle changes in the conformational change (e.g. formation of hydrophobic pockets within or between polymer chains) when the polymer is still in solution whereas turbidimetry detects the onset of extensive polymer aggregation. As explained below, the data obtained from both assays should be interpreted by taking into consideration other properties associated to the polymer structure.

Since membrane destabilization was expected to increase under acidic conditions, hemolysis assays as a function of pH were carried out at a low polymer concentration (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Between pH 5 and 6.5, only the 2 copolymers bearing EA units (i.e. B and C) were found to be hemolytic (Fig. 5A). Interestingly, the hemolytic activity of both copolymers at pH 5.5 (Fig. 5) was similar to or more pronounced than that reported previously for PEAA and a random copolymer of acrylic acid and EA (1:1 molar ratio) (Murthy, 1999). For all copolymers, the hydrophilic-hydrophobic balance is comparable in terms of the ethyl to carboxyl group ratio (1:1). Hoffman and coworkers demonstrated that the membrane lytic activity could be enhanced by increasing the alkyl chain length of monomer units (Murthy, 1999). Poly(propylacrylic acid) exhibited a higher hemolytic

activity than PEAA, and achieved complete RBC lysis at 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ below pH 6.1 (Murthy, 1999; Lackey, 1999).

The membrane composition was shown to influence the extent of pH-triggered content release. The susceptibility to destabilization by MAA copolymers was in increasing order RBC < EPC:Chol:DOPE:DMPG liposomes < EPC liposomes. RBC contain about 25% Chol (Darnell, 1990) and are structurally rigid (Gunn, 1988) making this model fairly resistant to destabilization. Addition of Chol to EPC liposomes promotes packing of the bilayer and increases its stability (Senior, 1982). In the case of PEAA, increasing Chol concentrations were shown to inhibit the binding of the protonated polymer to the membrane (Mills, 1999). In addition, the presence of a negatively-charged lipid such as DMPG can generate electrostatic repulsion between the bilayer and the copolymer, thus reducing its adsorption. The experiments carried out with liposomes were helpful in that they allowed to discriminate between the membrane lytic activity of polymers that seemed relatively inactive towards RBC (Fig 5A). For example, at pH 5.5, copolymer D was more active than copolymer A towards liposomes (Fig. 6), whereas both copolymers were unable to destabilize RBC. This can be explained by the greater hydrophobicity of copolymer D at pH 5.5, as demonstrated by pyrene fluorescence experiments ($I_1/I_3=1.22$ and 1.33 for copolymers D and A, respectively, Fig. 3B). However, despite a high hydrophobicity at acidic pH, copolymer D was less efficient than B and C. Copolymer D is devoid of EA, which decreases its ability to insert into lipid bilayers.

Interestingly, GALA, an endosomolytic synthetic peptide, was shown to be at least 12 times more potent than copolymers B and C at destabilizing EPC vesicles at pH 5.0 (data not shown) (Parente, 1990). However, its hemolytic activity towards RBC was weak, with 50% hemolysis at 10 mg/mL (Plank, 1994). At pH 5.0, GALA forms a stable amphiphatic α -helix secondary structure, which is thought to partition in the phospholipid membrane and form small pores or channels (Parente, 1990). Change in helical content as pH is decreased was correlated with GALA's lytic activity (Subbarao, 1987). GALA's weak hemolytic activity may result from the size of hemoglobin which would be a too large molecule to escape the pores (Plank, 1994). Additionally to helix formation, increase in GALA's hydrophobicity upon a decrease in pH was associated to liposome lysis (Subbarao, 1987). Adsorption of partially-ionized (meth)acrylic acid copolymers to phospholipid

bilayers may involve several types of interaction, including hydrophobic interactions and hydrogen bonding. It has been suggested by Seki and Tirrell (*Seki, 1984*) that hydrogen bonding involving the lipid phosphodiester head group and protonated carboxyl groups of the polymer would be the major driving force for poly(carboxylic acids) binding on the lipid-bilayer surface. Overall, it seems that strong lytic activity is achieved by an optimal combination of sufficiently long alkyl chains and protonation of carboxylic acid groups. Membrane destabilization at acidic pH probably comes from increased copolymer binding and pH-dependent change in polymer conformation. At this point, it appears difficult to determine the individual contribution of these 2 mechanisms since both phenomena are interdependent. Protonation of carboxylic acid groups under acidic conditions triggers coil-to-globule phase transition but also increases polymer hydrophobicity, and may further contribute to augment binding to the membrane via hydrogen bonding. Interestingly, it was previously shown that acrylic acid copolymers permeabilize membranes by creating defects such as pores or channels. Chung and coworkers (*Chung, 1996*) have reported the formation of cation-selective channels through artificial membranes induced by PEAA in a pH-dependent manner. In their study, no ion channels were present at pH 7.6 but they formed rapidly when the pH was reduced to 6.0. Two hypothetical models were suggested to illustrate pore formation by PEAA. In the first model, one or multiple polymer molecules could align their segments across the bilayer, the inner surface of the pore being stabilized by the polymer. Another possibility would be the induction of a change in local curvature of the bilayer, with the PEAA chains localized on the outer surface of the pore. Since the copolymers studied in this work are structurally related to PEAA, similar mechanisms of membrane destabilization can be hypothesized, although the exact nature of the defects remains to be determined.

This study revealed that multiple parameters influence MAA copolymer-lipid interaction at neutral as well as at acidic pH. First, the presence of EA was found to greatly increase the polymer ability to destabilize membrane bilayers. Second, for efficient destabilization at acidic pH, the copolymers should exhibit a sharp phase transition as measured by turbidimetry or pyrene spectrofluorimetry. Third, the copolymer should not be too hydrophobic at neutral pH to avoid excessive uptake by macrophages. This can be

readily assessed by pyrene fluorescence spectroscopy. Among the different copolymers studied in this work, copolymer C is of particular interest. The concentration at which it was highly hemolytic at pH 5.5 (approximately 50% hemolysis) was 10 times lower (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Fig. 5B) than the concentration at which hemolysis appears at neutral pH (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Fig. 4). Moreover, copolymer C did not show any cytotoxicity on macrophage-like cells at concentrations where it is highly hemolytic at acidic pH. Thus, given its good lytic activity and safety profile, copolymer C would be a good candidate for complexation with a drug delivery system. However, in order to reduce the administered dose, promote cell uptake and achieve sufficiently high copolymer concentration in the endosomal compartment, the complex should be further decorated with a targeting ligand.

Acknowledgements

This project was funded in part by the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (scholarship to M.-A. Yessine) and the Canada Research Chair Program. Didier Hoarau is acknowledged for his technical help with the hemolysis assays.

References

- Benns J.M., Choi J.S., Mahato R.I., Park J.S. and Kim S.W. (2000). pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. *Bioconjugate Chem* 11: 637-645.
- Borden K.A., Eum K.M., Langley K.H. and Tirrell D.A. (1987). On the mechanism of polyelectrolyte-induced structural reorganization in thin molecular films. *Macromolecules* 20: 454-456.
- Boussif O., Lezoualch 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: 7297-7301.
- Cabaud P.G. and Wroblewski F. (1958). Colorimetric measurement of lactic dehydrogenase activity of body fluids. *Am J Clin Pathol* 30: 234-236.

- Catelas I., Huk O.L., Petit A., Zukor D.J., Marchand R. and Yahia L. (1998). Flow cytometric analysis of macrophage response to ceramic and polyethylene particles: effects of size, concentration, and composition. *J Biomed Mater Res* 41: 600-607.
- Chen T., Choi L.S., Einstein S., Klippenstein M.A., Scherrer P. and Cullis P.R. (1999). Proton-induced permeability and fusion of large unilamellar vesicles by covalently conjugated poly(2-ethylacrylic acid). *J Liposome Res* 9: 387-405.
- Chung J.C., Gross D.J., Thomas J.L., Tirrell D.A. and Opsahl-Ong L.R. (1996). pH-sensitive, cation-selective channels formed by a simple synthetic polyelectrolyte in artificial bilayer membranes. *Macromolecules* 29: 4636-4641.
- Dai S., Tam K.C. and Jenkins R.D. (2000). Aggregation behavior of methacrylic acid/ethyl acrylate copolymer in dilute solutions. *Eur Polym J* 36: 2671-2677.
- Daleke D.L., Hong K. and Papahadjopoulos D. (1990). Endocytosis of liposomes by macrophages: binding, acidification and leakage of liposomes monitored by a new fluorescence assay. *Biochim Biophys Acta* 1024: 352-366.
- Darnell J., Lodish H. and Baltimore D. (1990). Molecular cell biology, Second ed., *Scientific American Books, New York*: 493.
- Davies P. and Allison A. (1978). Effects of cytochalasin B on endocytosis and exocytosis. In: Tanenbaum S.W. (ed.), *Frontiers of Biology, Cytochalasins: Biochemical and cell biological aspects*, vol.46, North Holland Publishing Cp., Amsterdam 7: 143-160.
- de Oliveira V.A., Tiera M.J., Gehlen M.H. and Neumann M.G. (1996). Pyrene fluorescence in the presence of acrylic acid-ethyl methacrylate copolymers: effects of the copolymer composition in the formation of microdomains. *Photochem & Photobiol* 63: 779-783.
- Erbacher P., Roche A.C., Monsigny M. and Midoux P. (1996). Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp Cell Res* 225: 186-194.
- Gordon E.M. and Anderson W.F. (1994). Gene therapy using retroviral vectors. *Curr Opin Biotechnol* 5: 611-616.
- Gunn R.B. and Parker J.C. (1988). *Cell Physiology of Blood*, Society of General Physiologists, vol. 43, Rockefeller University Press, NY.
- Haensler J. and Szoka F.C., Jr. (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjugate Chem* 4: 372-379.

- Hernandez L.D., Hoffman L.R., Wolfsberg T.G. and White J.M. (1996). Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 627-661.
- Islam M.F., Jenkins R.D., Bassett D.R., Lau W. and Ou-Yang H.D. (2000). Single chain characterization of hydrophobically modified polyelectrolytes using cyclodextrins/hydrophobes complexes. *Macromolecules* 33: 2480-2485.
- Kalyanasundaram K. and Thomas J.K. (1977). Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *J Am Chem Soc* 99: 2039-2044.
- Lackey C.A., Murthy N., Press O.W., Tirell D.A., Hoffman A.S. and Stayton P.S. (1999). Hemolytic activity of pH-responsive polymer-streptavidin bioconjugates. *Bioconjugate Chem* 10: 401-405.
- Laemmli U.K. (1975). Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 4288-4292.
- Legrand P., Vertut-Doi A. and Bolard J. (1996). Comparative internalization and recycling of different amphotericin B formulations by a macrophage-like cell line. *J Antimicrobial Chem* 37: 519-533.
- Lobner D. (2000). Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J Neurosci Methods* 96: 147-152.
- Maddox D.A., Deen W.M. and Brenner B.M. (1992). Glomerular filtration. In: Windhager, E. (ed.) *Handbook of physiology. Section 8, Renal physiology*, vol. I, Oxford Univ. Press, NY.
- Maeda M., Kumano A. and Tirrell D.A. (1988). H⁺-induced release of contents of phosphatidylcholine vesicles bearing surface-bound polyelectrolyte chains. *J Am Chem Soc* 110: 7455-7459.
- Mellman I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 575-625.
- Meyer O., Papahadjopoulos D. and Leroux J.C. (1998). Copolymers of N-isopropylacrylamide can trigger pH-sensitivity to stable liposomes. *FEBS Lett* 421: 61-64.
- Midoux P. and Monsigny M. (1999). Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjugate Chem* 10: 406-411.

- Mills J.K., Eichenbaum G. and Needham D. (1999). Effect of bilayer cholesterol and surface grafted poly(ethylene glycol) on pH-induced release of contents from liposomes by poly(2-ethylacrylic acid). *J Liposome Res* 9: 275-290.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Mourad P.D., Murthy N., Porter T.M., Poliachik S.L., Crum L.A., Hoffman A.S. and Stayton P.S. (2001). Focused ultrasound and poly(2-ethylacrylic acid) act synergistically to disrupt lipid bilayers in vitro. *Macromolecules* 34: 2400-2401.
- Mukherjee S., Ghosh R.N. and Maxfield F.R. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev* 77: 759-803.
- Müller R.H., Lherm C., Herbort J. and Couvreur P. (1990). In vitro model for the degradation of alkylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 11: 590-595.
- Murthy N., Robichaud J.R., Tirell D.A., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (1999). The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J Control Release* 61: 137-143.
- Ng W.K., Tam K.C. and Jenkins R.D. (2001). Rheological properties of methacrylic acid/ethyl acrylate copolymer: comparison between an unmodified and hydrophobically modified system. *Polymer* 42: 249-259.
- Olea A.F., Rosenbluth H. and Thomas J.K. (1999). Effect of the molecular weight on the dynamic of the conformational transition of poly(methacrylic acid). *Macromolecules* 32: 8077-8083.
- Parente R.A., Nir S. and Szoka F.C., Jr. (1990). Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. *Biochemistry* 29: 8720-8728.
- Phillips N.C., Gagne L., Ivanoff N. and Riveau G. (1996). Influence of phospholipid composition on antibody responses to liposome encapsulated protein and peptide antigens. *Vaccine* 14: 898-904.
- Plank C., Oberhauser B., Mechtler K., Koch C. and Wagner E. (1994). The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem* 269: 12918-12924.
- Saad B., Ciardelli G., Matter S., Welti M., Uhlschmid G.K., Neuenschwander P. and Suter U.W. (1996). Characterization of the cell response of cultured macrophages and fibroblasts to particles of short-chain poly[(R)-3-hydroxybutyric acid]. *J Biomed Mater Res* 30: 429-429.

- Seki K. and Tirrell D.A. (1984). pH-dependent complexation of poly(acrylic acid) derivatives with phospholipid vesicle membranes. *Macromolecules* 17: 1692-1698.
- Senior J. and Gregoriadis G. (1982). Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life Sci* 30: 2123-2136.
- Seymour L.W., Duncan R., Strohal J. and Kopecek J. (1987). Effect of molecular weight (Mw) 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.
- Shimotohno K. and Temin H.M. (1981). Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell* 26: 67-77.
- Subbarao N.K., Parente R.A., Szoka F.C.J., Nadasdi L. and Pongracz K. (1987). pH-dependent bilayer destabilization by an amphipathic peptide. *Biochemistry* 26: 2964-2972.
- Tang M.X., Redemann C.T. and Szoka F.C., Jr. (1996). In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjugate Chem* 7: 703-714.
- Temin H.M. (1990). Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors. *Hum Gene Ther* 1: 111-123.
- Thomas J.L., Barton S.W. and Tirrell D.A. (1994). Membrane solubilization by a hydrophobic polyelectrolyte: surface activity and membrane binding. *Biophys J* 67: 1101-1106.
- Thomas J.L. and Tirell D.A. (2000). Polymer-induced leakage of cations from dioleoyl phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol liposomes. *J Control Release* 67: 203-209.
- Thomas J.L. and Tirrell D.A. (1992). Polyelectrolyte-sensitized phospholipid vesicles. *Acc Chem Res* 25: 336-342.
- Tonge S.R. and Tighe B.J. (2001). Responsive hydrophobically associating polymers: a review of structure and properties. *Adv Drug Deliv Rev* 53: 109-122.
- Wagner E., Zenke M., Cotten M., Beug H. and Birnstiel M.L. (1990). Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3410-3414.

- Wei C.M., Gibson M., Spear P.G. and Scolnick E.M. (1981). Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 39: 935-944.
- Wu G.Y. and Wu C.H. (1987). Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 262: 4429-4432.
- Zenke M., Steinlein P., Wagner E., Cotten M., Beug H. and Birnstiel M.L. (1990). Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3655-3659.

CHAPITRE 3

On the role of methacrylic acid copolymers in the intracellular delivery of antisense oligonucleotides[†]

Marie-Andrée Yessine^a, Christian Meier^b, Hans-Ulrich Peterleit^b and Jean-Christophe Leroux^a

^a Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

^b Degussa, Pharma Polymers, Röhm GmbH & Co. KG, Kirschenallee, D-64293 Darmstadt, Germany.

Keywords: Methacrylic acid copolymers, oligonucleotides, intracellular delivery, endosomal release, drug delivery

[†] Paru dans Eur J Pharm Biopharm (2006) 63 : 1-10. Reproduit avec la Permission d'Elsevier Science.

Abstract

The delivery of active biomacromolecules to the cytoplasm is a major challenge as it is generally hindered by the endosomal/lysosomal barrier. Synthetic titratable polyanions can overcome this barrier by destabilizing membrane bilayers at pH values typically found in endosomes. This study investigates how anionic polyelectrolytes can enhance the cytoplasmic delivery of an antisense oligonucleotide (ODN). Novel methacrylic acid (MAA) copolymers were examined for their pH-sensitive properties and ability to destabilize cell membranes in a pH-dependent manner. Ternary complex formulations prepared with the ODN, a cationic lipid and a MAA copolymer were systematically characterized with respect to their size, zeta potential, antisense activity, cytotoxicity and cellular uptake using the A549 human lung carcinoma cell line. The MAA copolymer substantially increased the activity of the antisense ODN in inhibiting the expression of protein kinase C- α . Uptake, cytotoxicity and antisense activity were strongly dependent on copolymer concentration. Metabolic inhibitors demonstrated that endocytosis was the major internalization pathway of the complexes, and that endosomal acidification was essential for ODN activity. Confocal microscopy analysis of cells incubated with fluorescently-labeled complexes revealed selective delivery of the ODN, but not of the copolymer, to the cytoplasm/nucleus. This study provides new insight into the mechanisms of intracellular delivery of macromolecular drugs, using synthetic anionic polyelectrolytes.

1. Introduction

Antisense oligodeoxyribonucleotides (ODNs) are being investigated for the treatment of various diseases arising from genetic abnormalities, including cancer, viral infections and inflammatory disorders. These molecules can inhibit gene expression by several putative mechanisms, such as translational arrest and cleavage of target mRNA (Cooper, 1999). However, rapid degradation of ODNs by nucleases, poor cellular uptake and inability to reach their intracellular site of action (e.g. the cytoplasm and/or nucleus) in sufficient amount often compromise their biological activity. Naked ODNs are internalized by endocytosis and end up in acidic endosomal/lysosomal compartments (Yakubov, 1989; Loke, 1989). These organelles represent a dead end for ODNs since from this location, they may either be released from the cell *via* exocytosis or be partially digested (Tonkinson, 1994).

To circumvent problems related to ODN internalization, intracellular trafficking and premature degradation, a variety of positively-charged lipidic (lipoplexes) and polymeric (polyplexes) vehicles have been investigated (for recent reviews, see (Lysik, 2003; Garcia-Chaumont, 2000; Shoji, 2004)). Cationic lipids, generally in combination with a fusogenic agent, can condense ODNs by electrostatic interactions and enhance their stability (Capaccioli, 1993), cellular uptake (Zelphati, 1996a) and antisense activity *in vitro* (Bennett, 1992). After internalization by endocytosis, ODN release is thought to be initiated by cationic lipids which induce the flip-flop of anionic lipids from the cytoplasmic facing monolayer (Zelphati, 1996b). Charge neutralization then leads to dissociation of the complex and ODN transfer into the cytosol, where it is rapidly transported into the nucleus (Zelphati, 1996b; Marvanson, 1998; Leonetti, 1991; Lysik, 2003). Protection and facilitated transit of the ODN from the endosomes to the cytoplasm can also be achieved through the use of specific titratable polyamines (e.g. polyethylenimine), which have been shown to destabilize the endosomal membrane *via* a mechanism that is still a matter of debate. Indeed, the hypothesis initially put forward to explain the enhanced efficacy of some polyamines, the so-called “proton sponge” effect (Boussif, 1995), is now being seriously questioned (Dubrueil, 2004; Funhoff, 2004).

In 1999, Hoffman and co-workers demonstrated that synthetic polyanions, such as poly(propylacrylic acid) (PPAA), exhibited membrane-lytic properties at pH values typically

found in the endosomal compartment (Lackey, 1999). Upon protonation and charge neutralization in the acidic environment of endosomes, PPAA was shown to interact with the endosomal membrane and selectively disrupt it [Jones, 2003 #467], thereby enhancing the cytoplasmic delivery of internalized macromolecules, such as plasmid DNA and polymer-antibody complex (Lackey, 2002; Cheung, 2001). Moreover, it was demonstrated that PPAA enhanced the *in vitro* transfection of lipoplex formulations in the presence of 50% serum, and provided significant improvements in the efficacy of a plasmid DNA in an *in vivo* murine wound healing model (Kyriakides, 2002). Recently, our group reported that low molecular weight (MW ~ 20 000), pH-sensitive methacrylic acid (MAA) copolymers could also destabilize membrane bilayers at slightly acidic pH values (Yessine, 2003). As these copolymers are structurally related to PPAA, it was hypothesized that they could improve the intracellular delivery and biological activity of ODNs. This study investigates how MAA copolymers can enhance the cytoplasmic delivery of a 20-mer phosphorothioate anti-protein kinase C-alpha (PKC- α) ODN, which has been tested in phase III clinical trials (Tortora, 2003). The activity of the ODN incorporated into complexes composed of a cationic lipid and a MAA copolymer, is assessed *in vitro* for the first time. These results are put in perspective relative to cytotoxicity data and the activity of a conventional control lipoplex formulation. More importantly, the cellular internalization and trafficking of the ODN as well as of the copolymer are investigated by flow cytometry and confocal microscopy. Preliminary data reveal a drastic effect of the MAA copolymer on the uptake, intracellular distribution and antisense activity. Moreover, selective delivery of the ODN, but not of the copolymer, to the cytoplasm/nucleus is demonstrated.

2. Materials and methods

2.1 Purification and characterization of the copolymers

MAA copolymers were provided by Röhm GmbH (Darmstadt, Germany). They were prepared by free radical polymerization involving different chain transfer agents (Table 1). Prior to use, they were dissolved in ethanol and dialyzed against water for at least 5 days.

Absolute number (M_n)- and weight (M_w)-average MWs were determined by size exclusion chromatography, with a Waters 1525 pump (Waters, Milford, MA) equipped with 4 Waters Ultrahydrogel (120, 250, 1000 and 2000) columns placed in series, a high-sensitivity differential refractive index detector (Waters 2410) and a PD 2000 light scattering detector (Precision Detectors, Franklin, MA). Samples were analyzed in 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) buffer, pH 8, at 1 mL/min and 35°C. Phase transition range of the different copolymers was evaluated by turbidimetry as previously reported (Yessine, 2003).

Table 1. Chemical composition and molecular weight of the different copolymers tested

Copolymer	Composition (molar ratio)	Chain transfer agent	Molecular weights			pH transition range
			M_n	M_w	PI	
1	EA/MAA (50:50)	2-ethylhexylthioglycolate	9200	12 400	1.35	4.2-5.2
2	EA/DMA/MAA (49:1:50)	2-ethylhexylthioglycolate	11 700	14 800	1.26	4.4-5.2
3	EA/DMA/MAA (49:1:50)	dodecyl mercaptane	18 400	24 900	1.35	4.2-5.2
4	EA/BMA/MAA (40:10:50)	dodecyl mercaptane	19 800	26 000	1.31	4.2-5.2

EA = ethyl acrylate, DMA = dodecyl methacrylate, BMA = butyl methacrylate, MAA = methacrylic acid

2.2 *Cell culture*

A549 human lung carcinoma cells, obtained from the American Type Tissue Collection, were grown in Dulbecco's modified Eagle cell culture medium (DMEM) containing 10% (*v/v*) heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin G and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). The cells were routinely passed when they were 90-95% confluent.

2.3 Hemolysis assays

This procedure was described previously by Murthy and coworkers (Murthy, 1999). Human red blood cells were collected from a healthy donor, centrifuged at 200 *g* (5 min, 4°C), and washed 3 times (centrifugation followed by redispersion) with saline 0.9% (*w/v*). The cells were counted with a hemacytometer and diluted in either isotonic phosphate (66 mM) or 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (200 mM) buffer of the appropriate pH. Hemolysis assay was performed by adding the erythrocytes suspended in the appropriate medium (final cell concentration = 10⁸ cells/mL) to a copolymer solution. To ensure that buffer pH did not influence the data, hemolysis was measured at each pH value in the absence of copolymer. Samples were incubated for 30 min under stirring at 37°C, cooled on ice, and centrifuged at 5300 *g* for 5 min at 4°C. The extent of membrane disruption was established by measuring hemoglobin absorbance in the supernatant at 541 nm, with a PowerWave microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT). To obtain 100% hemolysis, the cells (10⁸/mL) were lysed by dispersion in water. Controls were prepared by mixing red blood cells with saline. The cells were used within 24 h after collection.

2.4 Preparation of cationic liposomes and cationic lipid/ODN complexes

Dioleoyltrimethylammonium propane (DOTAP) and dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). DOTAP particles and DOTAP/DOPE liposomes were prepared by extrusion through 0.05- μ m pore size membranes under sterile conditions (Olson, 1979). Twenty-mer antisense phosphorothioate ODN (5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA-3'), designed to hybridize to the 3' untranslated region of human PKC- α mRNA, its fluorescein-labeled derivative and a scrambled version (5'-GGTTTTACCATCGGTCTTGG-3') were provided by Medicorp Inc. (Montreal, QC, Canada). Lipoplexes were prepared by incubating the ODN in HEPES (20 mM) - dextrose (5% *w/v*) (H/D, pH 7.4) with the cationic lipids for 30 min at room temperature under mild agitation. Formulations containing the endosomolytic polymer (*i.e.* ternary complexes) were obtained by further incubating the lipoplexes with copolymer 4 (Table 1) in H/D for 30 min. Complexes were formed at theoretical [+/-] ratios ranging from 2 to 8. Charge ratios were quantified as total positive-to-negative charges, and were

calculated by assuming 40% copolymer ionization at pH 7.4, as determined from titration experiments (data not shown). Unless otherwise stated, the ODN concentration was fixed at 200 nM. Size and zeta potentials of the complexes were evaluated with a Malvern Autosizer 4800 and a Malvern ZetaSizer Nanoseries ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), respectively.

2.5 *Gel electrophoresis*

To ensure that ODN was not released from the complexes upon addition of the MAA copolymer, ternary complexes containing the fluorescent ODN were prepared as described above and loaded onto a 20% poly(acrylamide) gel. Following migration, ODN was visualized directly on the gel after exposition to UV light using a ChemiImager 5500 imaging system (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA).

2.6 *Assessment of ODN antisense activity*

A549 cells were plated in 6-well tissue culture plates (1 mL medium containing 1×10^5 viable cells), and allowed to adhere at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂. After 24 h, the cells were treated with 500 nM phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) (Sigma, St.-Louis, MO) for 18 h to remove most of the immunoreactive PKC- α (Dean, 1994). They were washed 3 times with DMEM, and 0.5 mL of Opti-Mem I reduced serum medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) premixed with 0.5 mL of complexes in H/D was added to each well. One hundred percent PKC- α expression was obtained by adding Opti-Mem mixed with H/D to the cells. The cells were incubated for 4 h at 37°C, washed once with complete DMEM and allowed to recover for 20 h. Then, they were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, 66 mM, NaCl 75 mM, pH 7.4), and extracted in 200 μ L lysis buffer consisting of Tris.HCl, pH 8.0 (0.01 M), NaCl (0.14 M), sodium azide (0.0256 M), Triton X-100 (1% *v/v*), aprotinin (0.1 U/mL) and phenylmethylsulfonyl fluoride (0.5 mM). The cell lysates were incubated for 1 h at 4°C, and centrifuged at 5000 *g* for 5 min at 4°C. Sample protein content was determined with the BCA protein assay kit using bovine

serum albumin standards (Pierce, Rockford, IL). The remaining samples were electrophoresed through a 12% (*w/v*) poly(acrylamide) gel, and the resolved proteins were transferred to a poly(vinylidene fluoride) membrane by electrotransfer. PKC- α expression (MW 82 000 g/mol) was quantified by use of an anti-PKC- α monoclonal antibody (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). To confirm equal loading, the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (MW 36 000 g/mol) was measured simultaneously, using an anti-GAPDH monoclonal antibody (Advanced Immunochemicals, Long Beach, CA). All formulations were tested at least in triplicate.

2.7 *Evaluation of the cellular toxicity of complexes by MTT assay*

Inhibition of cell proliferation was assessed by tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (*Mosmann, 1983*). A549 cells were plated in 6-well tissue culture plates and treated with formulations prepared with scrambled ODN, as described above. After a 4-h incubation period, the medium was removed and replaced with 0.5 mL of complete DMEM. Twenty hours later, MTT dissolved in PBS (50 μ L of a 5 mg/mL solution) was added to each well. After a further 3-h incubation, sodium dodecyl sulfate (500 μ L of a 10% *w/v* solution containing 0.01 N HCl) was added to dissolve the reduced MTT. Absorbance was measured 24 h later at 570 nm. Each experiment was performed in quadruplicate.

2.8 *Effect of metabolic inhibitors on ODN delivery*

Prior to incubation with the complexes, A549 cells were treated for 15 min with cytochalasin B (25 μ g/mL) or for 30 min with bafilomycin A (200 or 500 nM) in Opti-Mem I medium. Inhibitors were present concomitantly with the complexes during the 4-h incubation period.

2.9 Labeling of copolymer with rhodamine

The carboxylic acid group activator 1,3-diisopropylcarbodiimide (0.543 mmol) was added to a solution of copolymer 4 in anhydrous dimethylformamide (DMF) (50 mg, 1.0 mL). After 30 min, Lissamine[®] rhodamine B ethylenediamine (Molecular Probes, Eugene, OR) (2.05×10^{-3} mmol) dissolved in DMF and catalytic amounts of triethylamine and 4-(dimethylamino)pyridine were added. The reaction was carried out for 3 days in an inert atmosphere, in the dark at room temperature. The crude product was dialyzed against methanol (MW cut-off 3500) for 3 days to remove unreacted rhodamine. The methanol was then replaced progressively by water, and the purified product was freeze-dried. The absence of free rhodamine was confirmed by thin layer chromatography, using a chloroform/methanol (80/20 *v/v*) mobile phase. Rhodamine content of the copolymer was assayed by spectrofluorimetry in methanol ($\lambda_{\text{ex}} = 560$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 581$ nm) and found to be 0.28 mol% (yield: 70%).

2.10 Flow cytometry

Complexes containing fluorescein-labeled ODN (20% of total ODN) \pm rhodamine-labeled copolymer 4 (15% of total polymer) were prepared as described above, and incubated with cells for 4 h. The cells were then washed twice with cold PBS and resuspended in 0.5 mL PBS. Mean green and red fluorescence intensities for 10 000 cells were recorded at 530/30 (FL1-height) and 585/42 (FL2-height) nm, respectively with a FacsCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) at a laser excitation wavelength of 488 nm.

2.11 Intracellular distribution of ODN and copolymer

A549 cells were grown on coverslips and incubated for varying lengths of time with complexes containing fluorescein-labeled ODN and rhodamine-labeled copolymer 4. The cells were then washed twice in cold PBS and fixed for 15 min in PBS containing 3% (*w/v*) paraformaldehyde. The fixed cells were mounted in Mowiol[®] (EMD Biosciences Inc.,

Darmstadt, Germany) and examined by LSCM under a Leica DMIRBE inverted microscope coupled with a Leica TCS SP confocal system (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). The cells were excited at 488 or 568 nm, and fluorescence was collected by emission windows set at 505-555 and 585-635 nm, respectively. Images collected by LCS Lite software (Leica Microsystems) were exported as TIFF files and prepared for publication by Adobe Photoshop v7.0 software (Adobe Systems, San Jose, CA).

2.12 *Statistical analysis*

Significant differences between two groups were evaluated by Student's *t*-test. Multiple comparisons for more than two groups were evaluated by one-way analysis of variance followed by Scheffé's post hoc test to determine the significance of paired combinations. P values lower than 0.05 were considered to be significant.

3. *Results*

3.1 *Characterization of the different MAA copolymers*

In a previous study, we showed that among a series of novel MAA copolymers, those containing ethyl acrylate (copolymer 1, Table 1) demonstrated the best membrane-destabilizing properties at acidic pH (Yessine, 2003). To further improve membrane-lytic activity, hydrophobized derivatives of copolymer 1 were synthesized. These derivatives bear a small proportion of alkyl chains (butyl or dodecyl) that was incorporated either randomly and/or at one extremity of the polyanion. The chemical composition and respective MWs of the MAA copolymers are presented in Table 1. As these copolymers are *a priori* not biodegradable, their MW was kept below 40 000 to ensure elimination by renal glomerular filtration (Seymour, 1987). Number-average (M_n) MWs ranged from 9200 to 19 800 with polydispersity indices (PI) between 1.2 and 1.4. Table 1 also shows the pH transition ranges of the different copolymers. Despite differences in their chemical composition, all copolymers precipitated at similar pH values (4.2-5.2), and exhibited sharp transitions

encompassing 0.8-1.0 pH units. It is noteworthy that the turbidimetry method used to monitor phase transition generally underestimates the pH value at which the onset of coil-to-globule transition takes place (Roux, 2003).

A useful endosomolytic agent should have membrane-destabilizing properties at the mildly acidic pH (5.0-6.5) found in endosomes and should be inert at physiological pH. The pH-dependent membrane lytic activity of MAA copolymers was assessed at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with red blood cells serving as an endosomal membrane model (Fig. 1a). At pH 7.4, slight hemolytic activity was noticed for copolymers 3 and 4 only. However, this destabilizing effect disappeared at concentrations below 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (data not shown). All copolymers showed enhanced membrane-disruptive activity at decreased pH values and were highly hemolytic at pH 5.0-5.5. Copolymer 4 was the most hemolytic, as it caused 50 and 100% hemolysis at pH 6.5 and 6.0, respectively. It was followed by copolymers 3, 2, and 1. To determine the lowest concentration at which hemolysis occurred under acidic conditions, red blood cells were incubated with the copolymers at pH 5.5 at concentrations ranging from 0.1 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 1b). Again, copolymer 4 was the most hemolytic agent, with 60% lysis at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As this copolymer demonstrated high membrane-lytic properties under mildly acidic conditions, it was selected for incorporation into the lipoplexes. Ternary complexes prepared at 3 different [+/-] charge ratios were characterized with respect to their size and zeta potential. As shown in Table 2, the addition of ODN only had a moderate effect on the zeta potential of DOTAP particles, which remained highly positive. Further charge neutralization was achieved upon complexing the copolymer, resulting in a net drop of zeta potential values. The ternary complexes also exhibited larger sizes compared to DOTAP aggregates and DOTAP/ODN complexes. In H/D, the 4/1, 3/1 and 2/1 ternary complexes consisted of monodisperse populations with mean hydrodynamic diameters of about 200, 250 and 350 nm, respectively (Table 2). As more copolymer was incorporated into the complexes, zeta potential values decreased and slight particle aggregation occurred. The size of the ternary complexes increased further in cell culture medium, whereas zeta potential values decreased. Both phenomena can be attributed to charge screening and complex aggregation induced by the presence of salts in cell culture medium (Jääskeläinen, 1998; Ross, 1999). Gel electrophoresis of the 4/1, 3/1 and

2/1 complexes revealed that ODN was not released from the complexes upon the addition of the MAA copolymer (data not shown).

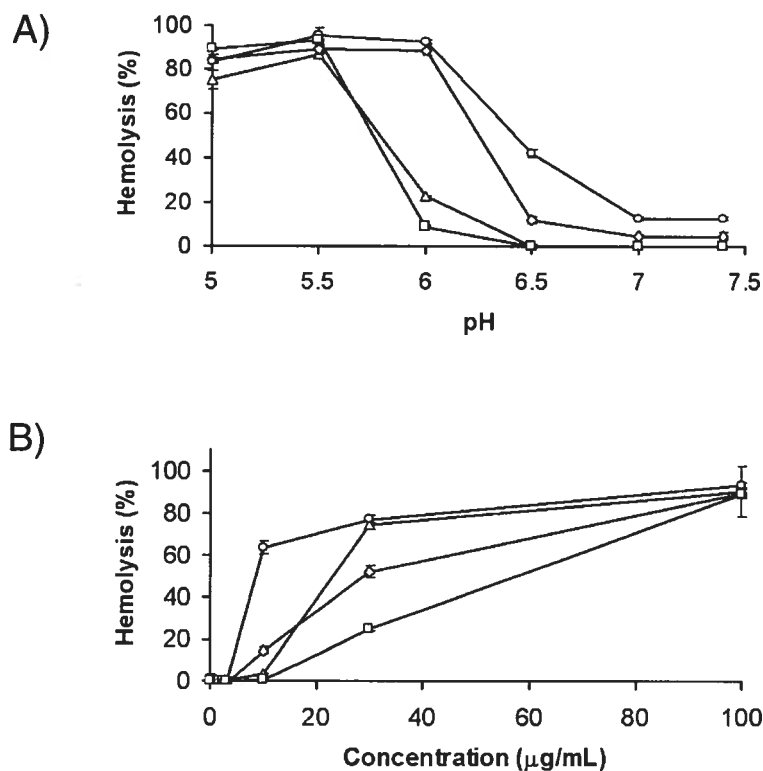


Figure 1. pH-dependent red blood cell hemolysis induced by MAA copolymers. The copolymers were incubated with human erythrocytes for 30 min at 37°C. The samples were centrifuged, and the extent of hemolysis was measured by reading the absorbance of the supernatant at 541 nm. (A) Red blood cells suspended in isotonic phosphate or MES buffers of the appropriate pH were added to copolymers 1 (squares), 2 (triangles), 3 (diamonds), or 4 (circles) dissolved in mildly alkaline saline at 100 $\mu\text{g/mL}$ (final concentration). (B) Red blood cell hemolysis caused by the copolymers at pH 5.5 at various concentrations (0.1-100 $\mu\text{g/mL}$). Symbols are the same as in (a). Values are mean \pm S.D., $n=3$. No hemolysis was observed in the absence of copolymer.

3.2 *Inhibition of PKC- α expression and cytotoxicity experiments*

Figure 2a shows the effect of treating A549 cells with ternary complexes (DOTAP/ODN/copolymer 4) at different [+/-] ratios on the expression level of PKC- α and cell survival. These complexes were compared to a positive control composed of DOTAP/DOPE/ODN (Fig. 2b). In both formulations, the charge ratio was adjusted by

Table 2. Size and zeta potential of the lipid particles

	H/D buffer		H/D:Opti-Mem media (50:50 v/v)	
	Size (PI) (nm)	Zeta potential ± SD (mV)	Size (PI) (nm)	Zeta potential ± SD (mV)
DOTAP	118 (0.131)	48.3 ± 3.0	111 (0.073)	49.9 ± 1.7
DOTAP/ODN (21/1) ^a	117 (0.101)	44.9 ± 3.5	125 (0.122)	47.2 ± 0.6
DOTAP/ODN/copolymer 4 (4/1) ^a	195 (0.200)	32.0 ± 1.9	329 (0.259)	31.4 ± 2.1
DOTAP/ODN/copolymer 4 (3/1) ^a	255 (0.280)	31.1 ± 1.5	440 (0.332)	23.7 ± 2.7
DOTAP/ODN/copolymer 4 (2/1) ^a	345 (0.289)	26.8 ± 1.2	599 (0.324)	6.7 ± 2.7

^aThe [+/-] ratio is indicated in parentheses.

varying the amount of cationic lipids. For the ternary complexes, maximal antisense effect (60% PKC- α inhibition) was achieved at [+/-] = 4/1. A further increase in cationic charge density did not result in enhanced antisense activity as the cytotoxic level of the complexes was reached. On the other hand, when the ODN was complexed to DOTAP/DOPE, a slight rise in antisense activity was observed at increasing [+/-] ratios, with 50% PKC- α inhibition achieved at [+/-] = 8/1. No cytotoxicity was apparent since the amount of cationic lipids was inferior to that of ternary complexes at an equivalent charge ratio (*e.g.* 15.2 *vs.* 80 μ M at 4/1 [+/-], respectively).

To assess whether ODN activity was influenced by polymer concentration, A549 cells were treated with complexes containing increasing amounts of copolymer 4 (Fig. 3a). The 4/1 formulation was titrated with the copolymer to reach [+/-] ratios of 3 and 2. As shown in Fig. 3a-I, complexes with the lowest amount of polymer (*i.e.* 4/1) were as effective as those with the highest polymer content (*i.e.* 2/1). Surprisingly, a lower antisense effect was noted with complexes prepared with intermediate amounts of polymer (*i.e.* 3/1) ($p < 0.05$). These results suggest that for ternary complexes, antisense activity is not directly correlated to polymer concentration. As discussed in the next section, other factors such as cationic charge density influence cellular internalization of the complexes and, consequently, delivery of the ODN to its site of action. In addition to cellular uptake, the surface charge

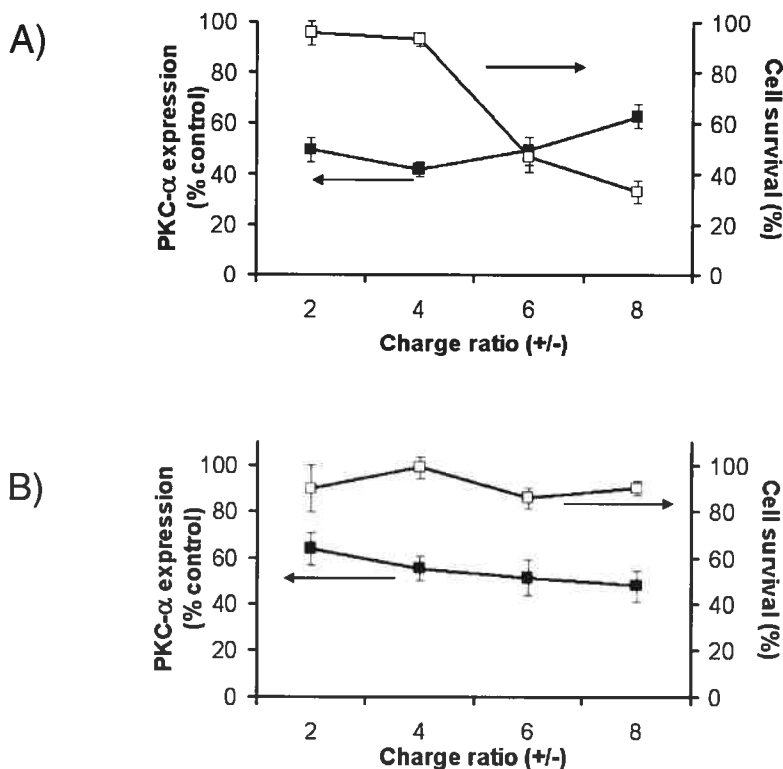


Figure 2. Effect of charge ratio on the expression of PKC- α (closed squares) and cytotoxicity (open squares). A549 cells in serum-free medium were treated with 500 nM PDBu for 18 h and washed to remove it. Then, the cells were incubated for 4 h with either DOTAP/ODN/copolymer 4 (A) or DOTAP/DOPE/ODN (B) complexes. The ODN and copolymer concentrations were 200 nM and 40.8 μ M, respectively. The [+/-] ratio was adjusted by varying the amount of cationic lipids. After the washing step, the cells were allowed to recover for an additional 20 h. Proteins were extracted, and immunoreactive PKC- α was determined by immunoblotting. Protein level is expressed as PKC- α % control (buffer treatment). Cell survival was determined using colorimetric MTT assay. Data are expressed relative to 100% cell survival (buffer treatment). Values are mean \pm S.D., n=3-6 experiments.

also modifies the cytotoxicity of the complexes; increasing complex concentration by 2.5-fold relative to that used in Figure 3 did not affect A549 cell survival in the case of 2/1 complexes, whereas it induced cytotoxicity in the case of 4/1 complexes (data not shown). It is worth mentioning that control formulations that lacked polymer did not inhibit PKC- α expression at any charge ratio (Fig. 3a-III and b). Similarly, no antisense activity was detected with complexes formulated with scrambled ODN (Fig. 3a-II and b), and with complexes containing no ODN (data not shown). Indeed, this particular antisense ODN was previously shown to be sequence-specific (Dean, 1994; Dean, 1996).

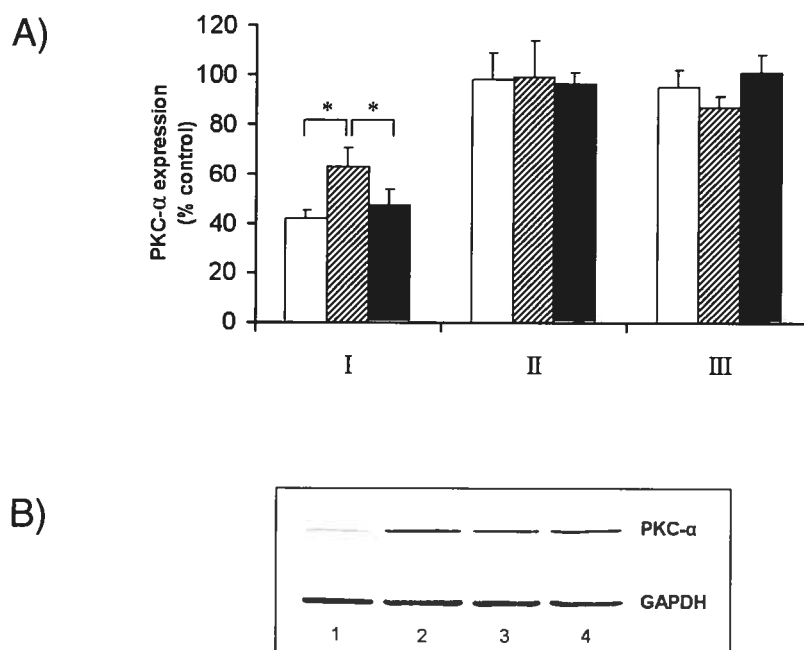


Figure 3. Effect of copolymer concentration on PKC- α expression. (A) A549 cells in serum-free medium were treated with 500 nM PDBu for 18 h and washed to remove it. Then, the cells were incubated for 4 h with either ternary complexes prepared with antisense ODN (I), ternary complexes prepared with scrambled ODN (II) or complexes without copolymer (III). In all complexes, the ODN concentration was 200 nM. The [+/-] ratio was adjusted to 4/1 (open bars), 3/1 (grey bars) or 2/1 (solid bars) by varying the concentration of copolymer 4 in the ternary complexes, and the amount of cationic lipids in the DOTAP/ODN complexes. After the washing step, the cells were allowed to recover for an additional 20 h. Proteins were extracted, and immunoreactive PKC- α was determined by immunoblotting. Protein level is expressed as PKC- α % control (buffer treatment). Values are mean \pm S.D., $n=3-4$ experiments. * $p < 0.05$. (B) Representative blot of cells treated with different complexes at a 4/1 charge ratio. *Top band*, immunoreactive PKC- α isozyme. *Bottom band*, immunoreactive GAPDH, demonstrating equal loading in each lane. Cells were incubated with: lane 1, ternary complexes prepared with the antisense ODN; lane 2, ternary complexes prepared with the scrambled ODN; lane 3, complexes without copolymer prepared with the antisense ODN; lane 4, H/D buffer.

3.3 *Interaction of ternary complexes with cancer cells*

Lipoplex uptake by A549 cells was first examined by flow cytometry. The complexes were prepared using fluorescein-labeled ODN and rhodamine-labeled copolymer 4. Control cells incubated with free ODN showed practically no uptake as the cell-associated fluorescence approximated that of untreated cells (Fig. 4b). In the absence of the copolymer, DOTAP/ODN lipoplexes interacted avidly with the cell membrane, as

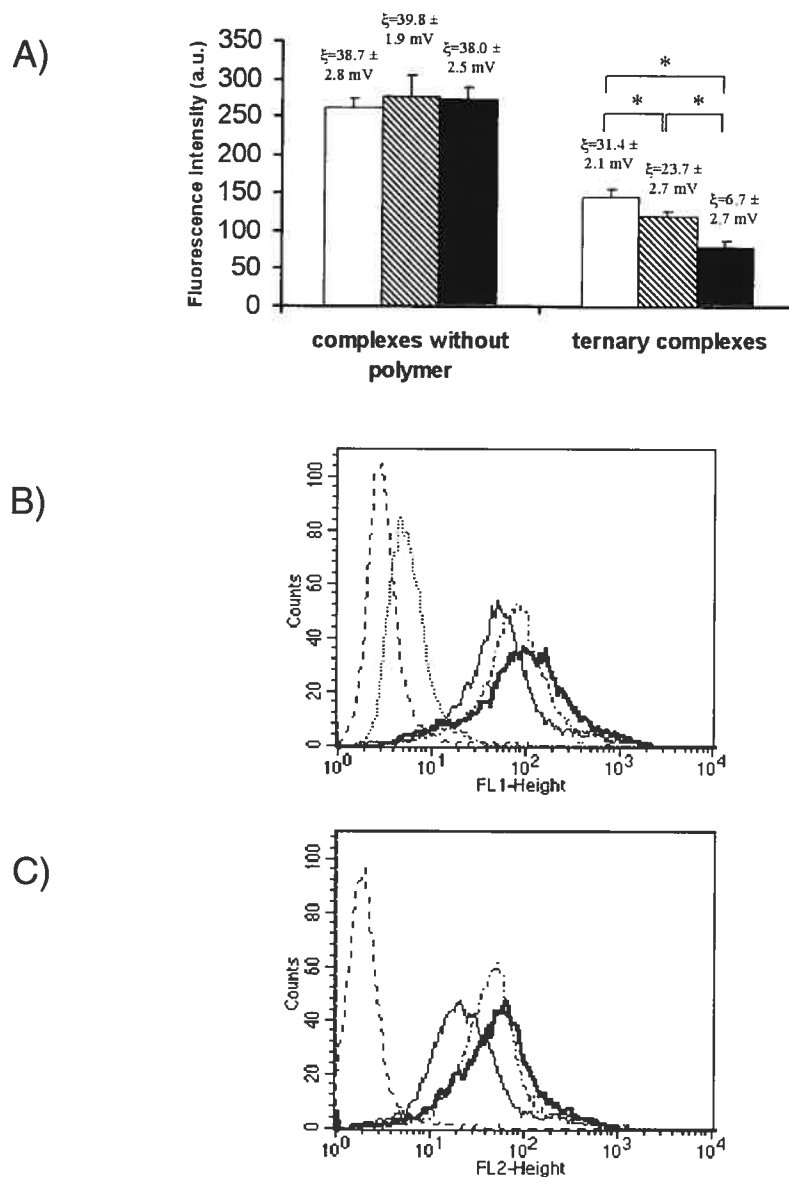


Figure 4. Cellular uptake of lipoplexes. A549 cells were incubated with DOTAP/ODN complexes \pm copolymer 4 using a fluorescein-labeled ODN and rhodamine-labeled copolymer. After a 4-h incubation period, the cells were rinsed and resuspended in PBS. The mean fluorescence intensity of 10 000 cells was measured by flow cytometry (see “Materials and Methods”). Values are mean \pm S.D. (n=3 experiments). (A) Green fluorescence intensity of cells incubated with DOTAP/ODN complexes or ternary complexes. The ternary complexes were composed of DOTAP (80 μ M), antisense ODN (200 nM), and copolymer 4 at 40.8 μ M, 4/1 [+/-] (open bars), 57.0 μ M, 3/1 [+/-] (grey bars) or 90.5 μ M, 2/1 [+/-] (solid bars). For DOTAP/ODN complexes, the DOTAP concentration was kept constant (80 μ M), and the charge ratio was adjusted by varying ODN concentration. Zeta potentials (\pm S.D.) measured in cell culture medium are indicated for each formulation. * $p < 0.05$. Green (B) and red (C) fluorescence of cells incubated with free ODN (dotted line), 4/1 (thick line), 3/1 (dashed-dotted line) or 2/1 (thin line) ternary complexes. Dashed lines represent unstained control cells. The results shown in (B) and (C) are representative of several independent experiments.

demonstrated by the strong cell-associated fluorescence (Fig. 4a). Interestingly, the addition of copolymer 4 to the lipoplexes produced a drastic drop in cellular uptake, despite the fact that the [+/-] ratios were identical to those of control lipoplexes (Fig. 4a). Cells incubated with 4/1 ternary complexes presented higher levels of both green (ODN) and red (polymer) fluorescence than those exposed to the 3/1 and 2/1 formulations (Fig. 4b and c) ($p < 0.05$). In contrast, there were no marked differences between binding of the 4/1, 3/1 and 2/1 complexes with no polymer (Fig. 4a). These results may be explained by the surface charge of the complexes. As shown in Figure 4a, the zeta potential values of the three DOTAP/ODN complexes were not noticeably distinct, as reported previously (Pires, 1999). In contrast, for ternary complexes, they were markedly different between the 3 charge ratios.

To confirm that ternary complexes were internalized *via* an endocytic pathway, A549 cells were incubated with 4/1 or 2/1 complexes in the presence of cytochalasin B. This fungal metabolite depolymerizes the microfilaments of actin and blocks uncoated pit-mediated endocytosis (Davies, 1978). Figure 5 shows that treatment with cytochalasin B completely blocked the antisense activity of the lipoplex formulations ($p < 0.05$). These data confirm that endocytosis is the major internalization pathway for ternary complexes. The mechanism of ODN delivery was examined further in the presence of bafilomycin A, an inhibitor of endosomal/lysosomal acidification that blocks the H^+ -ATPase pump located in the vesicle membrane (Umata, 1990). In principle, a higher endosomal pH should decrease the extent of protonation of MAA, which would, in turn, prevent polymer-triggered endosomal membrane disruption and cytoplasmic release of ODN. At a concentration of 200 nM, bafilomycin A strongly inhibited the antisense activity of the 2/1 complexes ($p < 0.05$), whereas no effect was observed for the 4/1 system (Fig. 5). However, when the bafilomycin concentration was increased further to 500 nM, the 4/1 complexes exhibited a significant decrease in antisense activity. Thus, the acidification of endosomes is required for polymer-mediated ODN activity.

To gain insight into the intracellular trafficking of the ternary complexes, the cellular distribution of the ODN and copolymer was examined by laser scanning confocal microscopy (LSCM). After a 3-h incubation period, cells treated with free ODN showed

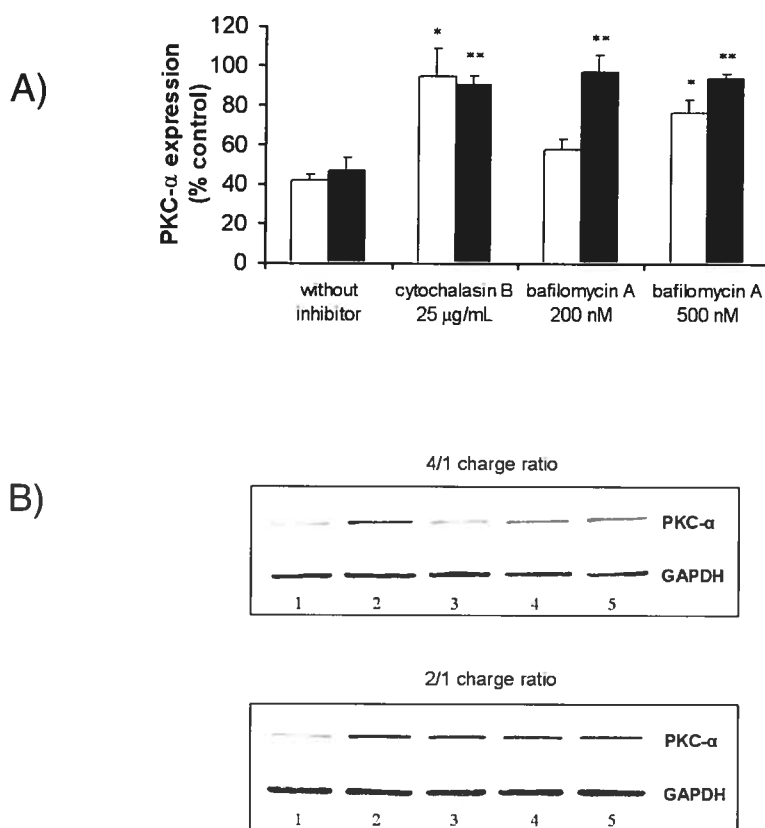


Figure 5. Effect of metabolic inhibitors on PKC- α expression. (A) A549 cells in serum-free medium were treated with 500 nM PDBu for 18 h and washed to remove it. Before complex addition, the cells were preincubated for 15 min with cytochalasin B (25 μ g/mL), or for 30 min with bafilomycin A (200 or 500 nM). Ternary complexes prepared with DOTAP (80 μ M), antisense ODN (200 nM) and copolymer 4 at 40.8 μ M, 4/1 [+/-] (open bars) or 90.5 μ M, 2/1 [+/-] (solid bars) were then added. The inhibitors were present during the 4-h incubation period. After the washing step, the cells were allowed to recover for an additional 20 h. Proteins were extracted, and immunoreactive PKC- α was determined by immunoblotting. Protein level is expressed as PKC- α % control (buffer treatment). Values are mean \pm S.D. (n=3). $p < 0.05$ relative to cells incubated in the absence of inhibitor with 4/1 (*) or 2/1 (**) complexes, respectively. (B) Representative blots of cells treated with ternary complexes at a 4/1 or 2/1 [+/-] ratio in the presence or absence of metabolic inhibitors. *Top band*, immunoreactive PKC- α isozyme. *Bottom band*, immunoreactive GAPDH, demonstrating equal loading in each lane. Lane 1, no inhibitor; lane 2, cytochalasin B 25 μ g/mL; lane 3, bafilomycin A 200 nM; lane 4, bafilomycin A 500 nM; lane 5, H/D buffer.

multiple fluorescent intracellular vesicles, probably corresponding to endocytic compartments (Fig. 6a). Similar subcellular distribution was observed at an earlier time point (0.5 h), although the fluorescence intensity was lower (data not shown). In all cases, fluorescence remained weak and was never detected in the nucleus of the cells. The hydrophilicity and negative charge of ODN molecules are responsible for their limited

internalization and poor ability to cross intracellular barriers. Association of the ODN with DOTAP (2/1 [+/-]) resulted in increased cellular fluorescence (Fig. 6b). Although the punctuate fluorescent pattern was still present, the vesicles were less abundant and larger in size. Some cells showed more diffuse fluorescence, indicating partial release of the ODN

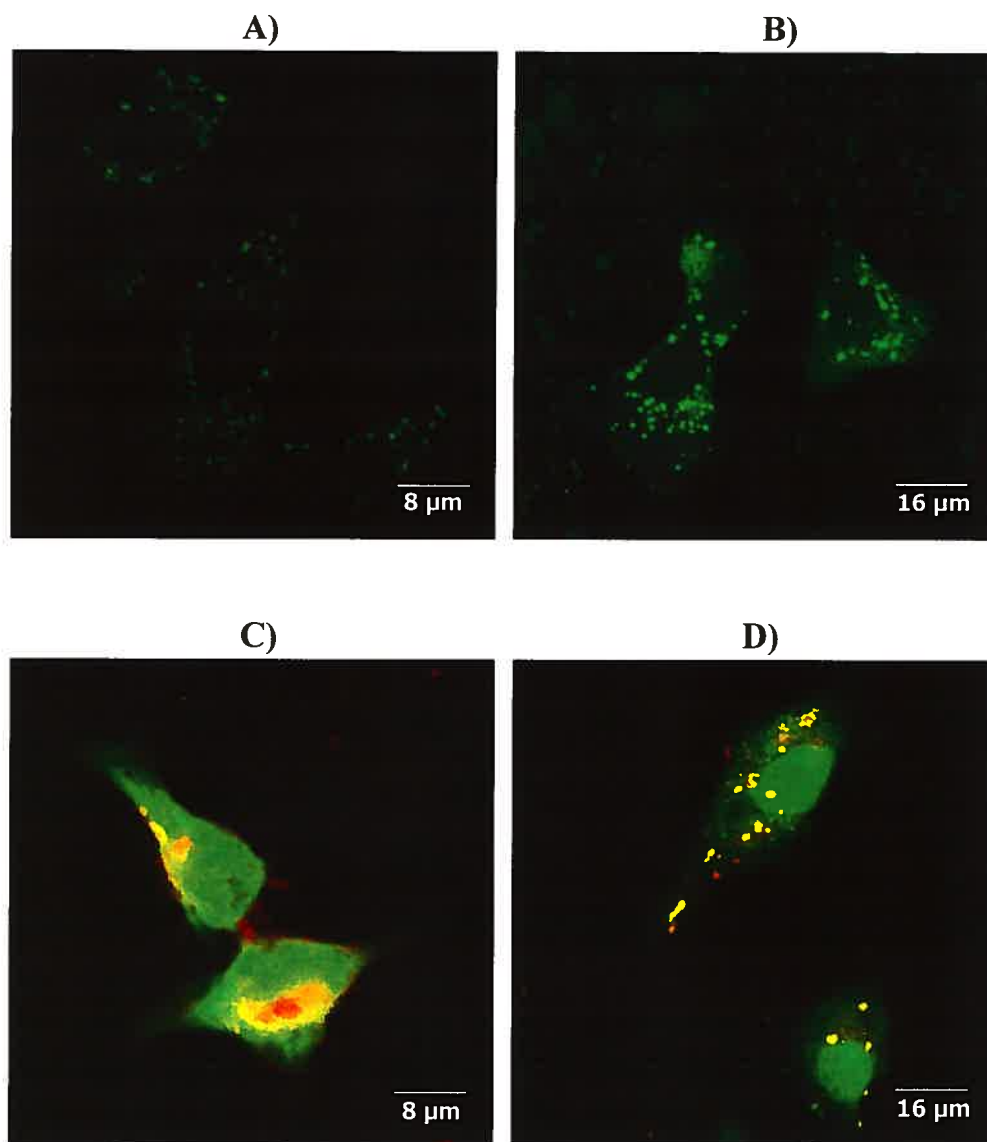


Figure 6. Intracellular distribution of the ODN and copolymer. A549 cells grown on coverslips were incubated with free ODN for 3 h (a), DOTAP/ODN complexes for 3 h (7.6 μM/200 nM, 2/1 [+/-]) (b), or DOTAP/ODN/copolymer + complexes (80 μM/200 nM/90.5 μM, 2/1 [+/-]) for 0.5 h (c) or 3 h (d). Complexes were prepared using a fluorescein-labeled ODN and rhodamine-labeled copolymer. After the incubation period, the cells were rinsed with PBS and fixed in a 3% (*w/v*) paraformaldehyde solution. Coverslips were mounted on slides and examined by LSCM (see “Materials and Methods”).

into the cytosol. Staining of nuclei was weak and, most of the time, undetectable. As for ODN/DOTAP/copolymer 4 (2/1 [+/-]) complexes, intense green fluorescence was detected in the cytoplasm after 0.5 h, suggesting rapid escape of ODN from endocytic organelles (Fig. 6c). At that stage, some ODN was already present in the nucleus. Conversely, the copolymer (red color) remained mainly localized in the globular compartments. Colocalization of ODN and the copolymer was also detected in most cells (yellow color), corresponding to complexes retained in intracellular organelles. After 3 h of incubation, cytoplasmic fluorescence was less pronounced, while bright green nuclear fluorescence could be seen, indicating almost complete diffusion of the ODN into the nucleus (Fig. 6d). In a few cells, weak and diffuse red fluorescence was detected in the cytoplasm (data not shown), which may correspond to low MW copolymer chains released from the endosomes (*vide infra*). Collectively, these findings demonstrate that cytoplasmic delivery of the ODN was facilitated by the copolymer, the latter being mostly retained in the endosomal/lysosomal compartments.

4. Discussion

Polyelectrolytes bearing pendant carboxylic acid group units undergo coil-to-globule conformational transition upon a decrease in pH (Yessine, 2004). Previous work showed that the sharpness of phase transition was related to carboxylate content (Yessine, 2003). Polymers with a high proportion of MAA units (typically more than 30%) exhibited abrupt phase transition and increased membrane destabilizing properties at acidic pH. Moreover, it was demonstrated that copolymerization of MAA with a non-ionizable hydrophobic monomer, such as ethyl acrylate, potentiated the membrane-lytic activity of the copolymers. The hemolysis data presented in this work revealed that further enhancing copolymer hydrophobicity by incorporating monomers bearing long alkyl chains had a dramatic impact on the destabilization of cell membranes. It was previously demonstrated by Murthy *et al.* that increasing the alkyl chain length of monomeric units from 2 to 4 carbons enhanced the membrane-lytic activity of poly(alkylacrylic acid) homopolymers (Murthy, 1999; Murthy, 1998). Longer alkyl chains facilitate polymer insertion into the phospholipid bilayers, and destabilize them more readily. As shown in Figure 1, the presence of a docetyl (C₁₂) group

at the extremity of the polymeric chain (compare copolymers 3 and 4 *vs* 1 and 2) improved its lytic properties substantially. By comparing copolymers 3 and 4, it can be seen that the addition of 10 mol% butyl methacrylate had a greater effect on hemolytic activity than 1 mol% dodecyl methacrylate, reflecting the higher overall hydrophobicity of copolymer 4.

The ability of copolymer 4 to efficiently destabilize cell membranes at pH values corresponding to those found in endosomes (Fig. 1) led us to hypothesize that it might represent an ideal candidate for enhancing the cytosolic delivery of fragile biomacromolecules, such as ODNs. Thus, copolymer 4 was complexed to an antisense ODN by means of electrostatic interactions with a positively-charged lipidic carrier (DOTAP). Ternary complexes prepared with either endosomolytic polymers or peptides have indeed been investigated as transfection aids for cationic lipoplexes loaded with plasmid DNA (*Cheung, 2001; Jääskeläinen, 1994; Simoes, 1998*). In the present work, a synthetic pH-sensitive polyanion was shown to increase the activity of an antisense ODN directed against PKC- α in A549 human lung carcinoma cells. PKC- α is an isozyme that functions as an intracellular receptor in the phosphoinositide signal transduction pathway. This pathway is often constitutively activated in tumor cells, and altered PKC- α regulation has been implicated in tumor promotion and carcinogenesis (*Tortora, 2003*). Therefore, inhibiting PKC- α expression might help to halt or slow tumor cell proliferation. A549 cells are known to strongly express PKC- α (*Dean, 1996*) and were thus an interesting model for the present study. DOTAP/ODN/copolymer 4 complexes having a 4/1 or 2/1 [+/-] ratio were highly active toward target protein (Figs 2a and 3). Their efficiency was, in fact, comparable to that of a reference system in which the ODN was complexed to DOTAP/DOPE liposomes (Fig. 2b). DOPE is an inverted cone-shaped lipid with non-bilayer-forming properties that is thought to trigger cytosolic release by fusing to and/or disrupting the endosomal membrane (*Farhood, 1995*). Complexes lacking an endosomolytic agent (*i.e.* composed solely of DOTAP and ODN) were unable to inhibit protein expression under the conditions tested (Fig. 3a-III), reflecting their poor efficiency in mediating ODN escape from the endosome.

Although the use of pH-sensitive endosomolytic polymers for enhancing ODN delivery has been previously proposed by the group of Murthy *et al.*, studies investigating the actual mechanisms by which these agents act are lacking (*Murthy, 1999*). In a recent

work, Jones *et al.* examined the pathway by which poly(alkylacrylic acid)s, such as poly(ethylacrylic acid) (PEAA) and PPAA, enhanced gene transfection (Jones, 2003). They suggested that the copolymers were mainly destabilizing late endosomes, and that sufficient polymer hydrophobicity was essential to mediate the intracellular delivery of DNA. However, the ternary complexes used in this study were not fully characterized. Besides, although the ability of the polymers to disrupt endosomes was examined in cultured cells, interaction of the polymeric lipoplexes with cells was not investigated.

In the present work, three ternary complex formulations that differed only in their respective copolymer content were systematically compared in terms of size, zeta potential, activity and cellular uptake. The MAA copolymer was shown to neutralize DOTAP particles, and substantially decrease the surface charge of the complexes (Table 2). It is fairly well-established that a residual positive charge is required for effective delivery, since lipoplexes bind to the cell surface by means of electrostatic interactions (Allen, 1991; Zelphati, 1996a). Flow cytometry experiments demonstrated that a more positive surface charge does increase the cellular uptake of complexes (Fig. 4). Indeed, the cellular association of the 3/1 and especially the 2/1 ternary complexes was decreased *vs.* their 4/1 counterparts. Although 2/1 ternary complexes were less charged than their 4/1 analogs, they were equally effective in inhibiting PKC- α expression (Fig. 3a-I). These results were surprising and imply that zeta potentials and, thus, extent of uptake are not directly predictive of complex efficiency. The equipotency of the 2/1 and 4/1 formulations may be ascribed to the greater efficiency of 2/1 ternary complexes in triggering ODN escape from the endosomes. Although these complexes are less taken up than the 4/1 lipoplexes, their higher polymer content may destabilize the endosomal membrane more efficiently. This hypothesis may also account for the lower efficiency of the intermediately-charged 3/1 complexes (Fig. 3a-I). Indeed, the combined effects of decreased uptake (*vs.* 4/1 complexes, see Fig. 4) and insufficient copolymer concentration (*vs.* 2/1 complexes) may reduce the antisense activity of the 3/1 lipoplexes.

The activity of the ternary complexes was substantially decreased when the endosomal/lysosomal compartments were alkalized by inhibiting the H⁺ATPase pump (Fig. 5). Accordingly, acidification of endosomes is necessary for the efficient release of ODN into the cytoplasm. The lack of effect of bafilomycin toward 4/1 ternary complexes

at low concentration (200 nM) *vs.* the 2/1 system indirectly corroborates the fact that the 4/1 complexes were taken up to a greater extent. Indeed, at 200 nM, there might not be enough bafilomycin to inhibit acidification of a larger number of endocytic vesicles. This hypothesis is supported by the almost complete inhibition of complex activity obtained when bafilomycin concentration was increased.

The mechanism by which titratable polyanions destabilize membranes at acidic pH is not fully elucidated. Confocal microscopy experiments have revealed that after only 30 min of incubation with ternary lipoplexes, the ODN largely diffuses in the cytoplasm. Since the endocytosed material generally reaches the lysosomes after $T_{1/2} \approx 35$ min (Collins, 1989), it can be speculated that ODN was mostly released from the endosomes. A previous study (Jones, 2003), demonstrated that poly(alkylacrylic acid)s allowed the cytoplasmic delivery of both a small molecule (*i.e.* calcein, 622 g/mol) and a macromolecule (*i.e.* cathepsin B-GFP fusion protein, MW 64 000 g/mol) through the specific destabilization of late endosomes. In addition, it was hypothesized that these polyanions could sufficiently disrupt endosomes to effect the indiscriminant release of their content into the cytosol. However, since the copolymers were not directly tracked, it was not known whether they also escaped the endosomes. In the present work, copolymer 4 was probed in the cell after labeling with rhodamine. Although low amounts of polymer were detected in the cytoplasm of a few cells, the polyanion remained mostly sequestered in vesicular structures, probably corresponding to endosomal/lysosomal compartments (Fig. 6). Thus, it appears that polymer pH-dependent conformational change induces transient and small membrane defects to the endosomal membrane, allowing escape of the ODN (MW = 6988 g/mol). Chung *et al.* have reported the formation of cation-selective channels through artificial membranes induced by PEAA in a pH-dependent manner (Chung, 1996). Since MAA copolymers are structurally related to PEAA, a similar mechanism of membrane destabilization may be hypothesized, although the exact nature of the defects remains to be determined. One could be tempted to attribute the weak and sporadic red cytoplasmic fluorescence seen in some cells (data not shown) to the complete rupture of the endosomal membrane. However, since the polymers used had a PI >1.2, this phenomenon could also be ascribed to the partial endosomal escape of copolymer chains with low MW *via* pores formed in the endosomes. Obviously, more work is required to answer this question.

Experiments conducted with fractionated copolymer samples with narrower PI could help clarify this issue.

This study revealed, for the first time, that the incorporation of a MAA copolymer into cationic lipid particles markedly increased the activity of an antisense ODN. Following internalization *via* endocytosis, endosomal acidification triggers coil-to-globule conformational change of the copolymer, endosomal membrane destabilization and release of the ODN into the cytosol. Important insights into the mode of interaction of polymeric lipoplexes were highlighted in this work. First, the polymer concentration of the complexes greatly modifies the surface charge which, in turn, was found to influence the extent of uptake by A549 cells. Second, decreased cellular uptake does not necessarily lead to a decline in complex activity, as long as a sufficient polymer concentration can be achieved in the endosomes. Third, within cells, the MAA copolymer remains mostly sequestered in endosomal/lysosomal compartments, which suggests that ODN release was mediated through the induction of transient membrane defects in the endosomal membrane. Future work will aim to determine the effect of the presence of serum in the cell culture medium on complex activity, cellular uptake and intracellular trafficking. Previously, it was found by Cheung *et al.* that the incorporation of the anionic polyanion PPAA into complexes made of plasmid DNA and DOTAP markedly enhanced the serum stability of the formulations *in vitro* [Cheung, 2001 #92] and *in vivo* (Kyriakides, 2002). In contrast, cationic liposomes containing DOPE failed to deliver efficiently ODN into cells in the presence of 10% serum (Lewis, 1996; Zelphati, 1998) and their application to animals has been disappointing (Litzinger, 1997). Mechanistic studies under physiological conditions are thus essential in order to contribute to the successful implementation of these copolymers *in vivo*.

Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. M.-A. Yessine acknowledges scholarships from the Rx&D Health Research Foundation and Fonds de la Recherche en Santé du Québec. The authors thank Dr. O. Meyer for helpful input.

References

- Allen T.M., Austin G.A., Chonn A., Lin L. and Lee K.C. (1991). Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Biochim Biophys Acta* 1061: 56-94.
- Bennett C.F., Chiang M.Y., Chan H., Shoemaker J.E. and Mirabelli C.K. (1992). Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol* 41: 1023-1033.
- Boussif O., Lezoualch 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: 7297-7301.
- Capaccioli S., Di Pasquale G., Mini E., Mazzei T. and Quattrone A. (1993). Cationic lipids improve antisense oligonucleotide uptake and prevent degradation in cultured cells and in human serum. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 818-825.
- Cheung C.Y., Murthy N., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (2001). A pH-sensitive polymer that enhances cationic lipid-mediated gene transfer. *Bioconjugate Chem* 12: 906-910.
- Chung J.C., Gross D.J., Thomas J.L., Tirrell D.A. and Opsahl-Ong L.R. (1996). pH-sensitive, cation-selective channels formed by a simple synthetic polyelectrolyte in artificial bilayer membranes. *Macromolecules* 29: 4636-4641.
- Collins D., Maxfield F. and Huang L. (1989). Immunoliposomes with different acid sensitivities as probes for the cellular endocytic pathway. *Biochim Biophys Acta* 987: 47-55.
- Cooper S.R., Taylor J.K., Miraglia L.J. and Dean N.M. (1999). Pharmacology of antisense oligonucleotide inhibitors of protein expression. *Pharmacol Ther* 82: 427-435.
- Davies P. and Allison A. (1978). Effects of cytochalasin B on endocytosis and exocytosis. In: Tanenbaum S.W. (ed.), *Frontiers of Biology (vol.46): Cytochalasins: Biochemical and cell biological aspects*, North Holland Publishing Co., Amsterdam 7: 143-160.
- Dean N., McKay R., Miraglia L., Howard R., Cooper S., Giddings J., Nicklin P., Meister L., Ziel R., Geiger T., Muller M. and Fabbro D. (1996). Inhibition of growth of human tumor cell lines in nude mice by an antisense oligonucleotide inhibitor of protein kinase C-alpha expression. *Cancer Res* 56: 3499-3507.

- Dean N.M., McKay R., Condon T.P. and Bennett C.F. (1994). Inhibition of protein kinase C-alpha expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters. *J Biol Chem* 269: 16416-16424.
- 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: 379-388.
- Farhood H., Serbina N. and Huang L. (1995). The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* 1235: 289-295.
- Funhoff A.M., van Nostrum C.F., Koning G.A., Schuurmans-Nieuwenbroek N.M., Crommelin D.J. and Hennink W.E. (2004). Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH. *Biomacromolecules* 5: 32-39.
- Garcia-Chaumont C., Seksek O., Grzybowska J., Borowski E. and Bolard J. (2000). Delivery systems for antisense oligonucleotides. *Pharmacol Ther* 87: 255-277.
- Jääskeläinen I., Monkkinen J. and Urtti A. (1994). Oligonucleotide-cationic liposome interactions. A physicochemical study. *Biochim Biophys Acta* 1195: 115-123.
- Jääskeläinen I., Sternberg B., Mönkkönen J. and Urtti A. (1998). Physicochemical and morphological properties of complexes made of cationic liposomes and oligonucleotides. *Int J Pharm* 167: 191-203.
- Jones R.A., Cheung C.Y., Black F.E., Zia J.K., Stayton P.S., Hoffman A.S. and Wilson M.R. (2003). Poly(2-alkylacrylic acid) polymers deliver molecules to the cytosol by pH-sensitive disruption of endosomal vesicles. *Biochem J* 372: 65-75.
- Kyriakides T.R., Cheung C.Y., Murthy N., Bornstein P., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (2002). pH-sensitive polymers that enhance intracellular drug delivery in vivo. *J Control Release* 78: 295-303.
- Lackey C.A., Murthy N., Press O.W., Tirell D.A., Hoffman A.S. and Stayton P.S. (1999). Hemolytic activity of pH-responsive polymer-streptavidin bioconjugates. *Bioconjugate Chem* 10: 401-405.

- Lackey C.A., Press O.W., Hoffman A.S. and Stayton P.S. (2002). A biomimetic pH-responsive polymer directs endosomal release and intracellular delivery of an endocytosed antibody complex. *Bioconjugate Chem* 13: 996-1001.
- Leonetti J.P., Mechti N., Degols G., Gagnor C. and Lebleu B. (1991). Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2702-2706.
- Lewis J.G., Lin K.-Y., Kothavale A., Flanagan W.M., Maytteuci M.D., DePrince R.B., Mook Jr R.A., Hendren R.W. and Wagner R.W. (1996). A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3176-3181.
- Litzinger D.C. (1997). Limitations of cationic liposomes for antisense oligonucleotides delivery in vivo. *J Liposome Res* 7: 51-61.
- Loke S.L., Stein C.A., Zhang X.H., Mori K., Nakanishi M., Subasinghe C., Cohen J.S. and Neckers L.M. (1989). Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3474-3478.
- Lysik M.A. and Wu-Pong S. (2003). Innovations in oligonucleotide drug delivery. *J Pharm Sci* 92: 1559-1573.
- 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: 2016-2023.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Murthy N., Robichaud J., Stayton P.S., Press O.W., Hoffman A.S. and Tirrell D.A. (1998). Design of polymers to increase the efficiency of endosomal release of drugs. *Proceed Int Symp Control Rel Bioact Mater* 25: 224-225.
- Murthy N., Robichaud J.R., Tirell D.A., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (1999). The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J Control Release* 61: 137-143.
- Olson F., Hunt C.A., Szoka F.C., Vail W.J. and Papahadjopoulos D. (1979). Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* 557: 9-23.

- Pires P., Simoes S., Nir S., Gaspar R., Duzgunes N. and Pedroso de Lima M.C. (1999). Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1418: 71-84.
- Ross P.C. and Hui S.W. (1999). Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency. *Gene Ther* 6: 651-659.
- Roux E., Lafleur M., Lataste E., Moreau P. and Leroux J.C. (2003). On the characterization of pH-sensitive liposome/polymer complexes. *Biomacromolecules* 4: 240-248.
- Seymour L.W., Duncan R., Strohm J. and Kopecek J. (1987). Effect of molecular weight (Mw) 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.
- Shoji Y. and Nakashima H. (2004). Current status of delivery systems to improve target efficacy of oligonucleotides. *Curr Pharm Des* 10: 785-796.
- Simoes S., Slepushkin V., Gaspar R., de Lima M.C. and Duzgunes N. (1998). Gene delivery by negatively charged ternary complexes of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusigenic peptides. *Gene Ther* 5: 955-964.
- Tonkinson J.L. and Stein C.A. (1994). Patterns of intracellular compartmentalization, trafficking and acidification of 5'-fluorescein labeled phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides in HL60 cells. *Nucleic Acids Res* 22: 4268-4275.
- Tortora G. and Ciardiello F. (2003). Antisense strategies targeting protein kinase C: preclinical and clinical development. *Semin Oncol* 30: 26-31.
- Umata T., Moriyama Y., Futai M. and Mekada E. (1990). The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact Vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase. *J Biol Chem* 265: 21940-21945.
- Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Rytte A.S., Yurchenko L.V. and Vlassov V.V. (1989). Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6454-6458.
- Yessine M.-A., Lafleur M., Petereit H.-U., Meier C. and Leroux J.-C. (2003). Characterization of the membrane destabilizing properties of different pH-sensitive methacrylic acid copolymers. *Biophys Biochim Acta* 1613: 28-38.

- Yessine M.A. and Leroux J.C. (2004). Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and endosomal escape of biomacromolecules. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 999-1021.
- Zelphati O. and Szoka F.C., Jr. (1996a). Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm Res* 13: 1367-1372.
- Zelphati O. and Szoka F.C., Jr. (1996b). Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11493-11498.
- Zelphati O., Uyechi L.S., Barron L.G. and Szoka F.C., Jr. (1998). Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim Biophys Acta* 1390: 119-133.

CHAPITRE 4

Proton-actuated membrane-destabilizing polyion complex micelles⁵

Marie-Andrée Yessine^a, Marie-Hélène Dufresne^a, Christian Meier^b, Hans-Ulrich Petereit^b, and Jean-Christophe Leroux^a

^a Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada.

^b Degussa, Pharma Polymers, Röhm GmbH & Co. KG, Kirschenallee, D-64293 Darmstadt, Germany.

⁵ Soumis pour publication dans *Bioconjugate Chem* (2006). Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society.

Abstract

The efficiency of nucleic acid-based drugs is usually hampered by the fact that following their uptake by the cell, these drugs end up in acidic organelles (i.e. endosomes/lysosomes) from which they barely escape. This work relates to the preparation and characterization of polyion complex micelles (PICM) formed by the self-assembly of three polyelectrolytes: a diblock cationic copolymer, a membrano-lytic, methacrylic acid copolymer, and an oligonucleotide. It is demonstrated that a synthetic membrane-active polyanion can be successfully integrated within the structure of PICM to yield well-defined, narrowly distributed micelles (30 nm) with a core/shell architecture. Besides their ability to protect the oligonucleotide against nuclease degradation, PICM partly dissociate under mildly acidic conditions, releasing chain clusters that destabilize bilayer membranes. This unprecedented association/dissociation behavior illustrates the potential of these pH-sensitive PICM for the transport and efficient delivery of polyionic drugs.

1. Introduction

Recent advances in the field of nanotechnology have led to the design of highly sophisticated nanoscale constructs and supramolecular assemblies prepared from well-defined synthetic macromolecules (Hawker, 2005). Of such assemblies, micelles formed by the self-association of block copolymers in aqueous medium have received much attention due to their potential applications in the biomedical and pharmaceutical fields (Kataoka, 2001; Gillies, 2005). In particular, colloidal carrier systems prepared from the complexation of a polynucleotide and a diblock copolymer composed of polycation and poly(ethylene oxide) (PEO) segments are being developed for the delivery of nucleic acids (Rungsardthong, 2003; Kataoka, 1996; Kabanov, 1995; Rungsardthong, 2001). Neutralization of the charged segments through electrostatic interactions yields hydrophobic complexes that self-assemble into polyion complex micelles (PICM) presenting a core/shell architecture. These micelles present numerous advantages including their straightforward preparation, high colloidal stability, solubility in aqueous media, small size, and narrow size distribution. Furthermore, they represent a promising approach to improve the *in vivo* efficiency of nucleic acid-based drugs, since protection against nuclease degradation and prolonged circulation times in the blood compartment would allow for enhanced drug deposition at the target site (Kakizawa, 2002).

However, despite these attractive properties, the intracellular bioavailability of polynucleotides remains limited due to their sequestration in the endosomal/lysosomal compartment following the uptake of PICM by the cell. The escape of biomolecules from endosomes generally requires a membrane-destabilizing agent, which will provoke the release of the internalized compounds into the cytoplasm before they reach the lysosomes. Synthetic titratable polyanions can achieve such a goal by destabilizing membrane bilayers at pH values typically found in endosomes. Indeed, polymers such as poly(ethylacrylic acid) (PEAA) and poly(propylacrylic acid) (PPAA) undergo a pH-triggered conformational change at slightly acidic pH values (Murthy, 1999; Lackey, 1999). Upon protonation and charge neutralization in the acidic environment of endosomes, PPAA was shown to disrupt selectively the endosomal membrane (Jones, 2003), thereby enhancing the cytoplasmic delivery of macromolecules such as plasmid DNA and polymer-antibody complex (Cheung, 2001; Lackey, 2002).

Recently, our group demonstrated that pH-sensitive methacrylic acid (MAA) copolymers can also be used to improve the cellular delivery of nucleic acid-based drugs (Yessine, 2006). In that study, nanoparticles in suspension were obtained following the electrostatic complexation of an MAA copolymer, a model ODN, and a cationic lipid. The particles bore a positive surface charge which facilitated their internalization into cultured cells. However, given their cationic nature, the complexes were unstable in physiological conditions (Yessine *et al.*, unpublished observations) thus compromising their applicability for systemic administration. The present work describes the incorporation of an MAA copolymer into a system that could be more suitable for *in vivo* applications. We demonstrate that the copolymer can be intimately integrated within the structure of neutral, water soluble, and well-defined PICM. More importantly, we show that upon a decrease in pH, the resulting PICM partially dissociate to release membrane-active fragments that efficiently destabilize lipid bilayers.

2. Experimental procedures

2.1 Materials

Poly(ethylene oxide)-*b*-poly(aminoethyl methacrylate) (PEO-*b*-PAEMA, 75/25 mol%, M_n 4700) was synthesized by atom transfer radical polymerization as described previously (Dufresne, 2004). Poly(methacrylic acid-*co*-ethyl acrylate-*co*-butyl methacrylate) (P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA), 50/40/10 mol%, M_n 19,800) was provided by Röhm GmbH (Darmstadt, Germany). It was prepared by free radical polymerization involving dodecyl mercaptane as chain transfer agent. The polymer was dissolved in ethanol and dialyzed against water for at least 5 days prior to use. P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) was labeled with Lissamine® rhodamine B ethylenediamine (Molecular Probes, Eugene, OR) as described previously (Yessine, 2006). Twenty-mer phosphorothioate ODN (5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA-3') and its fluorescein-labeled derivative were provided by Medicorp Inc. (Montreal, QC, Canada).

2.2 Preparation of the ternary polyion complex micelles (PICM)

PEO-*b*-PAEMA (500 μg) was incubated with P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) (216 μg) in tris(hydroxymethyl)aminoethane (Tris) buffer (10 mM, pH 7.4) for 5 min at room temperature under mild agitation. The ODN (20 μg) was then added and the formulation was incubated further for 5 min. The charge ratio was calculated from the degree of ionization of the polymers, as determined from titration experiments (supportive information). Micelles containing PMAA were prepared using a similar procedure using the same amounts of each component. Salt-containing samples were prepared by adding 0.5 mL of micelles to 0.5 mL of Tris 0.1 M, pH 7.4, containing 300 mM sodium chloride (NaCl) to yield a final salt concentration of 150 mM (isotonic conditions).

2.3 Determination of the critical association concentration

The critical association concentration (CAC) was measured by the steady-state pyrene fluorescence method (*Astafieva, 1993*) based on the I_{336}/I_{333} intensity ratio of the excitation spectra of pyrene following its translocation from water to the PICM hydrophobic core. Serial dilutions of a stock solution of ternary PICM in Tris buffer, pH 7.4, were prepared to contain 2×10^{-7} M of pyrene (Sigma, St-Louis, MO) and were stirred overnight in the dark. Fluorescence intensity was measured ($\lambda_{\text{ex1}} = 333$ nm, $\lambda_{\text{ex2}} = 336$, $\lambda_{\text{em}} = 390$ nm) at room temperature or at 37°C using a Series 2 Aminco Bowman fluorimeter (Spectronic Instruments Inc., Rochester, NY). Experiments were performed in triplicate.

2.4 Dynamic light scattering, multiangle static light scattering and zeta potential measurements

Size, M_w and zeta potential of the ternary PICM were all determined in triplicate in Tris buffer of the appropriate pH following filtration of the micelles through a 0.45- μm GHP filter. The mean hydrodynamic diameter, PI, and scattering intensity of PICM were determined using a Malvern Autosizer 4800 or a Malvern ZetaSizer Nanoseries ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Measurements were performed at a scattering

angle of 90° and a temperature of 25 and 37°C. The CONTIN program was used to extract size distributions from the autocorrelation functions. Alternatively, MASLS measurements were conducted using a Malvern Autosizer 4800 at 25°C at seven angles ranging from 70° to 130° for four micelle concentrations. The M_w s of the complexes were derived from Equation 1, which describes the intensity of light scattered from a dilute solution of macromolecules:

$$\frac{Kc}{R_0} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2c + 3A_3c^2 \quad [1]$$

In this equation, c stands for the solution concentration in PICM, R_0 is the Rayleigh ratio, and 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 increment ($dn/dc = 0.174$) was determined using a differential Rudolph J157 automatic refractometer (Rudolph Research Analytical, Flanders, NJ), at a wavelength of 589.3 nm. Zeta potential was evaluated with a Malvern ZetaSizer Nanoseries ZS.

2.5 *Transmission electron microscopy imaging*

Copper grids (200 mesh) were coated with pioloforme resin. Prior to sample deposition, a drop of an aqueous solution of poly(lysine) (17 % w/v, Sigma) was placed onto the grid for 5 min. The excess solution was wicked off, the grid was allowed to dry and a drop of ternary PICM (5 μ L) in Tris buffer (pH 7.4 or 5.0) was placed onto the grid for 2 min. After removal of the excess solution, the sample was stained using uranyl acetate (3.5% w/v in water) for 5 min. The grid was then gently washed with water and allowed to dry. Prepared samples were imaged using a Philips CM100 transmission electron

microscope (FEI Company, Japan) operating at 60 kV. Micrographs were taken at a 46,000 magnification.

2.6 Nuclear magnetic resonance analysis

Polymer and micelle samples were prepared in deuterated Tris buffer (10 mM) adjusted to pH 7.4 using DCl and NaOD solutions (CDN Isotopes, Pointe-Claire, Qc, Canada). Prior to analysis, the PICM were eluted on a Sephacryl[®] 200 HR column (Sigma) to completely remove any free polymer in solution, and concentrated at room temperature using a vacuum concentrator (Savant SpeedVac SC210A, Thermo Electron Corp., Waltham, MA). The NMR spectrum of the micelles was first acquired at pH 7.4 using a Bruker spectrometer operating at 400 MHz (Bruker, Milton, On, Canada). The pH of the sample was then adjusted to 5.0 using DCl and the NMR acquisition repeated.

2.7 Enzymatic degradation of ODN incorporated into the ternary PICM

Naked fluorescent ODN or fluorescent ternary PICM were incubated with DNase I (50 U/ μ g ODN) (Sigma) in the presence of MgCl₂ (5 mM) at 37°C. At pre-determined time points, aliquots were withdrawn and degradation was stopped by adding EDTA (10 mM). Before being loaded onto a 20% poly(acrylamide) gel, heparin (280 μ M) was added to the samples to induce ODN release from the PICM. Following migration, ODN was visualized directly on the gel after exposition to UV light using a ChemiImager 5500 imaging system (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA). The amount of intact ODN was quantified relatively to the fluorescent signal obtained with a sample containing 100% intact ODN (non-exposed to DNase).

2.8 Assessment of membrane-destabilizing properties of micelles using liposomes as an endosomal membrane model

Unilamellar liposomes (40 mM total lipid) mimicking the composition of the endosomal membrane (egg phosphatidylcholine: cholesterol: dioleoylphosphatidylethanolamine: dimiristoylphosphatidylglycerol, 61:17:16:6 molar ratio) (Darnell, 1990) were prepared by hydration of a dried lipid film, followed by repeated extrusion through a 0.2- μm pore size membrane at room temperature. The highly water-soluble fluorophore trisodium 8-hydroxypyrene trisulfonate (HPTS) and the collisional quencher p-xylene-bis-pyrimidium (DPX) were included in the lipid hydration buffer (Tris 10 mM, NaCl 48 mM, HPTS 35 mM, DPX 50 mM, pH 7.4). Untrapped dye was removed by gel filtration on Sepharose 2B (Sigma). The membrane-destabilizing properties of the micelles were evaluated at 37°C at different pH values by adding liposomes (10 μL) to the ternary PICM (previously purified on Sephacryl[®] 200HR to remove free P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) or PMAA) in isotonic buffer of the appropriate pH. In all cases, the final MAA copolymer concentration was adjusted to 85 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The release of liposome content was monitored for 20 min at 37°C by a fluorescence dequenching assay (Daleke, 1990). The extent of release was calculated from HPTS fluorescence ($\lambda_{\text{ex}}=412$ nm, $\lambda_{\text{em}}=513$ nm) relative to the fluorescence intensity measured following liposome lysis in 0.5% (*v/v*) Triton X-100, which accounted for the complete release of encapsulated HPTS and DPX.

2.9 Intracellular distribution of the ODN

U937 cells were plated in 6-well tissue culture plates (1 mL medium containing 1 X 10⁶ viable cells) containing coverslips, and differentiated into macrophages using 80 nM phorbol myristate (Sigma). After 72 h, the phorbol was rinsed and ternary micelles (2 mg PEO-*b*-PAEMA, 0.862 mg P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) or PMAA, 80 μg ODN) containing fluorescein-labeled ODN (50% of total ODN) were prepared as described above, and incubated with cells for 4 h at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂. Two hours before the end of the incubation period, LysoTracker red (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) was added to each well at a final concentration of 80 nM. After 4 h, the cells were

corresponding to P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) was observed at acidic pH because the relatively high concentrations required for the NMR analysis exceeded the copolymer solubility.

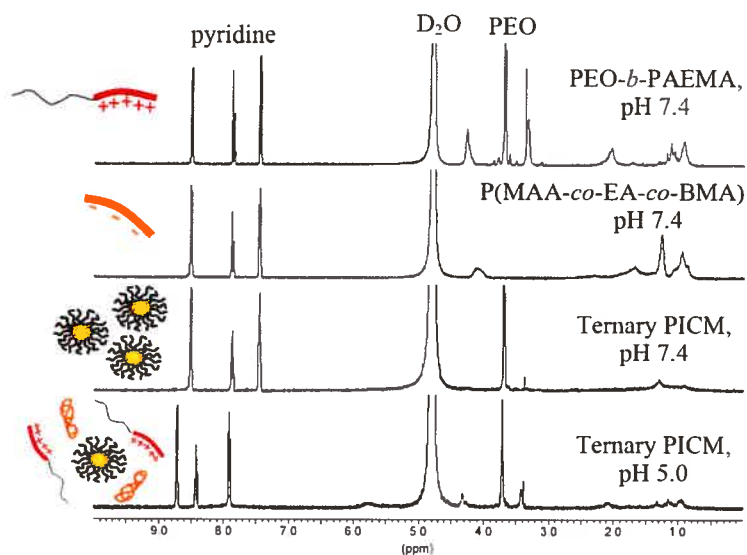


Figure 2. $^1\text{H-NMR}$ spectra of the polymers alone and ternary PICM in deuterated Tris buffer. Pyridine was used as an internal standard.

ODN stability towards nucleases was assessed by incubating free fluorescent ODN or ternary micelles containing the fluorescent ODN with DNase I (50 U/ μg ODN, 37°C). Gel electrophoresis of aliquots withdrawn at pre-determined time points showed that only 30% of the naked ODN remained intact after a 6-h incubation period. In contrast, no degraded ODN could be detected in the micellar samples at the end of the study (Fig. 3). Thus, it is possible to protect the ODN upon incorporation in the ternary PICM structure.

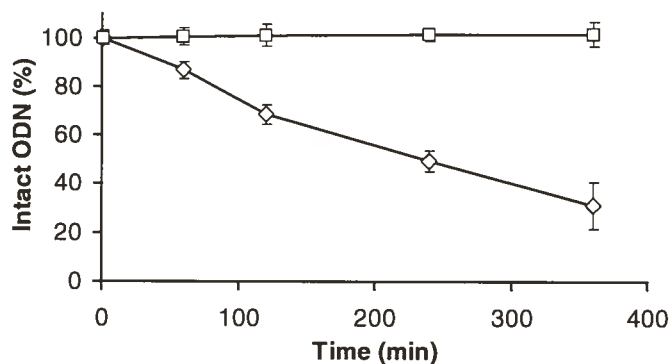


Figure 3. Stability towards nuclease degradation of naked ODN (\diamond) and ODN incorporated into ternary PICM (\square) over a 6-h period.

The membrane-destabilizing properties of the micelles were evaluated at different pH values following removal of uncomplexed polymer. To do so, artificial phospholipid vesicles were used to mimick the endosomal membrane. The vesicles were loaded with the water-soluble fluorophore HPTS and the collisional quencher DPX and were added to the micelles in isotonic buffer of the appropriate pH. Figure 4 illustrates the release profiles of the encapsulated probe. At pH 7.4, the ternary PICM did not destabilize the phospholipid bilayer as shown by the absence of released dye. As the pH was reduced, the extent of leakage progressively increased, reaching up to 60% at pH 5.0. When comparing the release kinetics obtained in the presence of free P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) to that associated with PICM at pH 5.0, one can note that the latter caused a lowered and delayed HPTS release. This suggests that the protonation of P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) led to its progressive removal from the micelles and to the subsequent destabilization of the vesicle membranes. Chung *et al.* have reported that PEAA induces the formation of cation-selective channels through artificial membranes in a pH-dependent manner (Chung, 1996). Since P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) is structurally related to PEAA, a similar mechanism of vesicle destabilization may be hypothesized, although the exact nature of the membrane defects remains to be determined. Interestingly, control ternary PICM (35 nm) prepared using a well-known non membrano-lytic polymer (PMAA) (Thomas, 1995) instead of P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) were unable to trigger HPTS release at pH 5.0 (Fig. 4), confirming that PEO-*b*-PAEMA does not destabilize the vesicles.

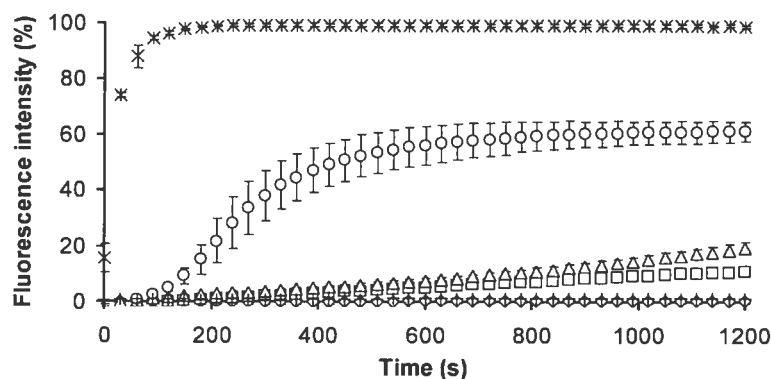


Figure 4. HPTS release induced by the ternary micelles at 37°C and pH 7.4 (◇), 6.2 (□), 5.5 (△) and 5.0 (○). Star symbols represent the release induced by free P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) at pH 5.0 at equivalent concentration. Release induced by ternary micelles prepared with PMAA, pH 5.0, is represented by (+). Mean \pm S.D. (n=3).

To verify whether the ternary micelles could facilitate the transfer of the ODN from the endosome to the cytoplasm, the intracellular distribution of the ODN in macrophages was examined by LSCM. In these *in vitro* experiments, macrophages were used since the uptake of the PICM in non phagocytic cells is inefficient due to the steric barrier created by the PEG corona (unpublished observations). Live cells were analysed since it was previously demonstrated that cell fixation could affect membrane permeability and cause artefacts (Richard, 2003). Forty-five minutes after the incubation period, macrophages treated with ternary endosomolytic micelles showed multiple fluorescent intracellular vesicles, probably corresponding to phagocytic/endocytic compartments (Fig. 5A). Colocalization of ODN and LysoTracker red was detected in most cells (yellow color),

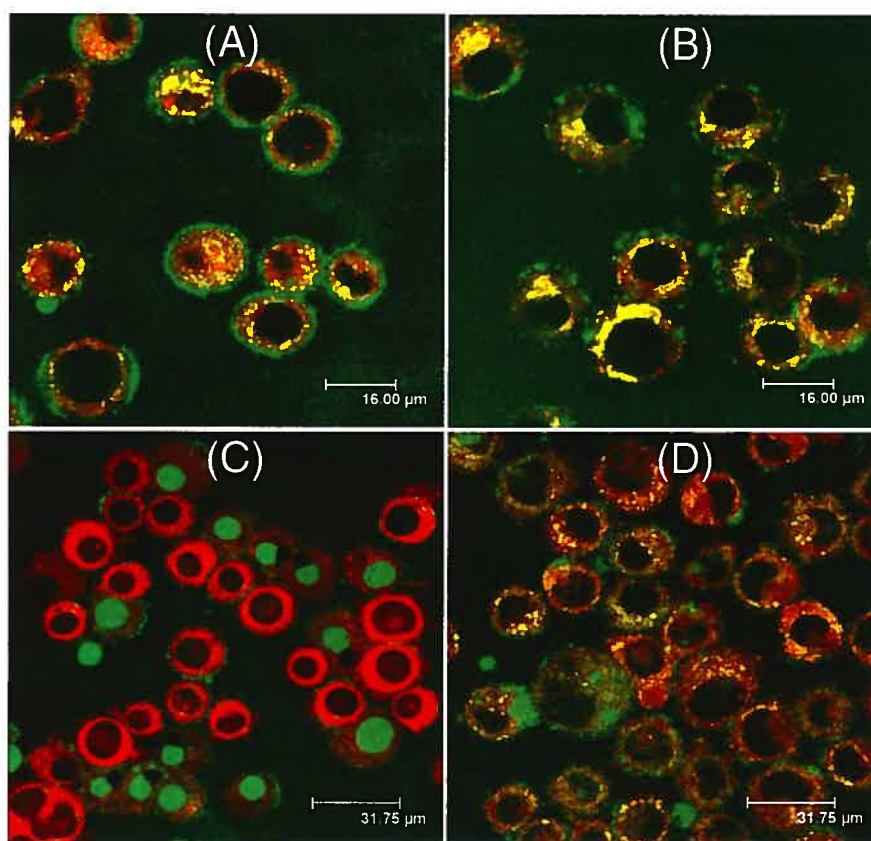


Figure 5. U937 macrophages on coverslips were incubated with ternary micelles prepared with P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) (A, C) or the non endosomolytic polymer PMAA (B, D) for 4 h at 37°C. Micelles were prepared using a fluorescein-labeled ODN and acidic organelles were stained with LysoTracker red. After a 4-h incubation period at 37°C, the cells were rinsed with cold PBS, mounted on slides, and kept on ice. Live cells were examined by LSCM 45 min (A, B) and 2 h (C, D) following the incubation period.

indicating that some micelles were localized in acidic organelles. Similar subcellular distribution was observed with the control micelles prepared with PMAA (Fig. 5B). Two hours after the incubation period, bright green nuclear fluorescence could be seen in several cells incubated with endosomolytic micelles, indicating that the ODN was released from the endosomal/lysosomal compartments (Fig. 5C) (Loke, 1989; Chin, 1990). These cells also exhibited a decreased red fluorescence indicating disruption of most of the acidic organelles. At that stage, the control, non endosomolytic micelles were still mainly localized in intracellular globular compartments (Fig. 5D), and staining of the nucleus of the cells was weak and, most of the time, undetectable. Collectively, these preliminary findings clearly demonstrate that cytoplasmic delivery of the ODN was facilitated by the incorporation of an endosomolytic polymer into PICM.

In conclusion, ternary PICM with a core/shell architecture, small size, and narrow size distribution were successfully obtained at physiological pH following the sequential addition of a cationic diblock copolymer, an MAA copolymer, and an ODN. Besides their ability to protect the ODN against nuclease degradation, the ternary micelles were shown to release chain clusters capable of inducing membrane destabilization at slightly acidic pH and improving substantially the ODN subcellular distribution. This unprecedented association/dissociation behavior is represented in Figure 6 and highlights the potential of

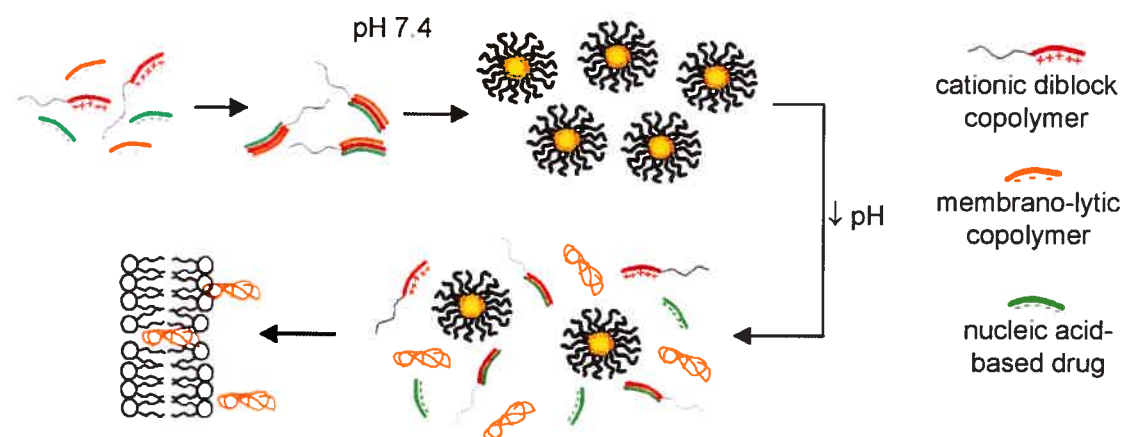


Figure 6. Schematic representation of the association/dissociation behavior of the ternary PICM as a function of pH.

these pH-sensitive PICM for the efficient transport and delivery of polyionic drugs. Future work will aim at evaluating the ability of the system to increase the efficacy of ODNs into human tumoral cells. To promote cellular internalization, the micelles will have to be decorated with a targeting ligand.

Acknowledgements

This work was financially supported by the NSERC and the Canada Research Chair Program. M.-A. Yessine acknowledges a scholarship from the FRSQ.

Supporting Information Available: Molecular weight determination, potentiometric titration, and $^1\text{H-NMR}$ spectra of the copolymers in deuterated Tris. Experimental details on the determination of the critical association concentration of the ternary PICM and the quantification of complexed ODN and P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA). This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Astafieva I., Zhong X.F. and Eisenberg A. (1993). Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions]. *Macromolecules* 26: 7339-7352.
- Cheung C.Y., Murthy N., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (2001). A pH-sensitive polymer that enhances cationic lipid-mediated gene transfer. *Bioconjugate Chem* 12: 906-910.
- Chin D.J., Green G.A., Zon G., Szoka F.C., Jr. and Straubinger R.M. (1990). Rapid nuclear accumulation of injected oligodeoxyribonucleotides. *New Biol* 2: 1091-1100.
- Chung J.C., Gross D.J., Thomas J.L., Tirrell D.A. and Opsahl-Ong L.R. (1996). pH-sensitive, cation-selective channels formed by a simple synthetic polyelectrolyte in artificial bilayer membranes. *Macromolecules* 29: 4636-4641.
- Daleke D.L., Hong K. and Papahadjopoulos D. (1990). Endocytosis of liposomes by macrophages: binding, acidification and leakage of liposomes monitored by a new fluorescence assay. *Biochim Biophys Acta* 1024: 352-366.

- Darnell J., Lodish H. and Baltimore D. (1990). *Molecular cell biology*. Scientific American Books, New York Second edition: 493.
- Dufresne M.H. and Leroux J.C. (2004). Study of the micellization behavior of different order amino block copolymers with heparin. *Pharm Res* 21: 160-169.
- Gillies E.R. and Frechet J.M.J. (2005). pH-responsive copolymer assemblies for controlled release of doxorubicin. *Bioconjugate Chem* 16: 361-368.
- Hawker C.J. and Wooley K.L. (2005). The convergence of synthetic organic and polymer chemistries. *Science* 309: 1200-1205.
- Jones R.A., Cheung C.Y., Black F.E., Zia J.K., Stayton P.S., Hoffman A.S. and Wilson M.R. (2003). Poly(2-alkylacrylic acid) polymers deliver molecules to the cytosol by pH-sensitive disruption of endosomal vesicles. *Biochem J* 372: 65-75.
- 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: 639-643.
- 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 copolymers micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Del 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.
- Lackey C.A., Murthy N., Press O.W., Tirell D.A., Hoffman A.S. and Stayton P.S. (1999). Hemolytic activity of pH-responsive polymer-streptavidin bioconjugates. *Bioconjugate Chem* 10: 401-405.
- Lackey C.A., Press O.W., Hoffman A.S. and Stayton P.S. (2002). A biomimetic pH-responsive polymer directs endosomal release and intracellular delivery of an endocytosed antibody complex. *Bioconjugate Chem* 13: 996-1001.
- Loke S.L., Stein C.A., Zhang X.H., Mori K., Nakanishi M., Subasinghe C., Cohen J.S. and Neckers L.M. (1989). Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3474-3478.

- Murthy N., Robichaud J.R., Tirell D.A., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (1999). The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J Control Release* 61: 137-143.
- 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: 585-590.
- 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 Control 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: 683-690.
- Thomas J.L., You H. and Tirrell D.A. (1995). Tuning the response of a pH-sensitive membrane switch. *J Am Chem Soc* 117: 2949-2950.
- Weaver J.V.M., Armes S.P. and Liu S.Y. (2003). A "Holy Trinity" of micellar aggregates in aqueous solution at ambient temperature: Unprecedented self-assembly behavior from a binary mixture of a neutral-cationic diblock copolymer and an anionic polyelectrolyte. *Macromolecules* 36: 9994-9998.
- Yessine M.A., Meier C., Peterit 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: 1-10.

Supporting information

Molecular weight determination of the copolymers - $^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded on a Bruker NMR spectrometer operating at 400 MHz (Bruker, Milton, On, Canada). The number-average (M_n) molecular weight (MW) of PEG-*b*-PAEMA was evaluated in CDCl_3 , 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 (*Dufresne, 2004*). M_n - and weight-average (M_w) MWs, as well as the polydispersity index (PI) of PEO-*b*-PAEMA were determined by gel permeation chromatography (GPC) using an Alliance GPVC system (Waters, Milford, MA) equipped with a high-sensitivity differential refractive index detector. GPC analysis was performed in THF using three Waters Styragel columns (HR1, HR3, and HR4) in series at a flow rate of 1 mL/min and a temperature of 40°C. A calibration curve was obtained with near-monodisperse PEO standards. P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) absolute M_n and M_w were determined using combined refractive index (Waters) and PD 2000 light scattering (Precision Detectors, Franklin, MA) detectors, and 4 Waters Ultrahydrogel (120, 250, 1000 and 2000) columns placed in series. Samples were analyzed in 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) buffer, pH 8, at 1 mL/min and 35°C.

PEO-*b*-PAEMA: NMR: M_n 4700; GPC: M_n 5080, M_w 6320, PI 1.25;

P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA): GPC: M_n 19,800, M_w 26,000, PI 1.31.

Potentiometric titration of the copolymers - Titration curves for PEO-*b*-PAEMA were generated by first titrating the polymer solution (1 mg/mL) to low pH using 0.05 N HCl, so as to ensure complete dissolution of the polymer. 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 0.05 N NaOH solution. The degree of ionization (α) at a given pH was calculated from Equation 1:

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

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 et al. (1999) Macromolecules 32:4302*).

The procedure for the potentiometric titration of P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) was essentially the same as that of PEG-*b*-PAEMA, except that the polymer was first dissolved using a 0.05N NaOH solution, and then titrated with incremental additions of a 0.05 N HCl solution. The value of α was isolated from Equation 2:

$$\text{pK}_a = \text{pH} - \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) \quad [2]$$

In this equation, α is defined as the ratio C_{COO^-}/C_m , where C_{COO^-} stands for the effective concentration of ionized carboxylic acid groups and C_m is the monomeric concentration in (meth)acrylates. Assuming that all added protons are able to neutralize the acid groups, a fair approximation of C_{COO^-} is calculated using the effective concentration of HCl added.

Representative titration curves for both polymers are presented in Figure S1.

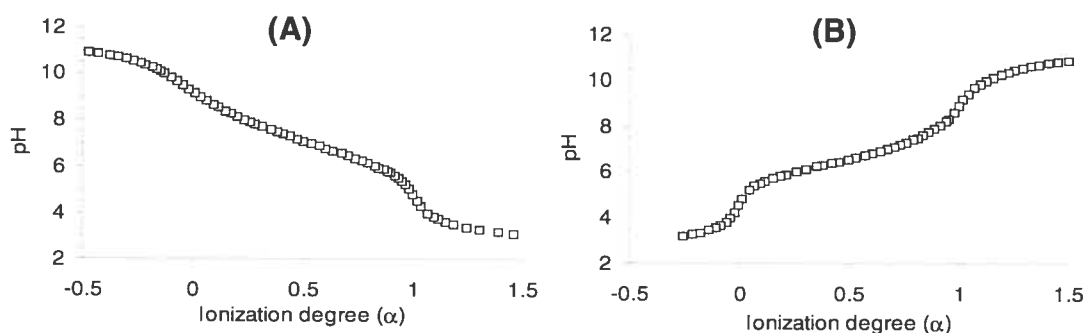


Figure S1. pH of a solution of PEO-*b*-PAEMA (A) and p(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) (B) as a function of α .

Quantification of complexed ODN and P(MAA-co-EA-co-BMA) in ternary PICM – Micelles containing the fluorescent ODN were prepared as described above. To confirm that electrostatic interactions were responsible for ODN complexation, a sample was prepared with heparin (400 μM), a polyanion that induces ODN displacement through

competition for the cationic binding sites. Samples were loaded onto a 20% poly(acrylamide) gel. Following migration, the ODN was visualized directly on the gel after exposition to UV light using a ChemiImager 5500 imaging system (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA) (Fig. S2). To assess the extent of complexation of the MAA copolymer, ternary PICM containing rhodamine-labeled P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) were loaded into Microcon[®] centrifugal filter devices (MW cut-off 100,000, Millipore, Bedford, MA). The tubes were centrifuged 5 min (4200 *g*, room temperature) and the fluorescence of the filtrate ($\lambda_{exc}=550$ nm, $\lambda_{em}=588$ nm) was read using a Safire microplate reader (Tecan, Durham, NC). The amount of uncomplexed polymer was calculated as being the ratio of $(F/F_0) \times 100$, where *F* stands for the fluorescence of the filtrate of PICM samples, and *F*₀ is the fluorescence of the filtrate of control samples prepared with the fluorescent polymer only.



Figure S2. Gel electrophoresis of ternary PICM containing the fluorescent ODN. Lane 1: ternary PICM without heparin; lane 2: ternary PICM in the presence of excess heparin; lane 3: naked ODN.

Nuclear magnetic resonance analysis of the copolymers in deuterated Tris buffer- The assigned spectra for PEO-*b*-PAEMA and P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) are represented in Figure S3.

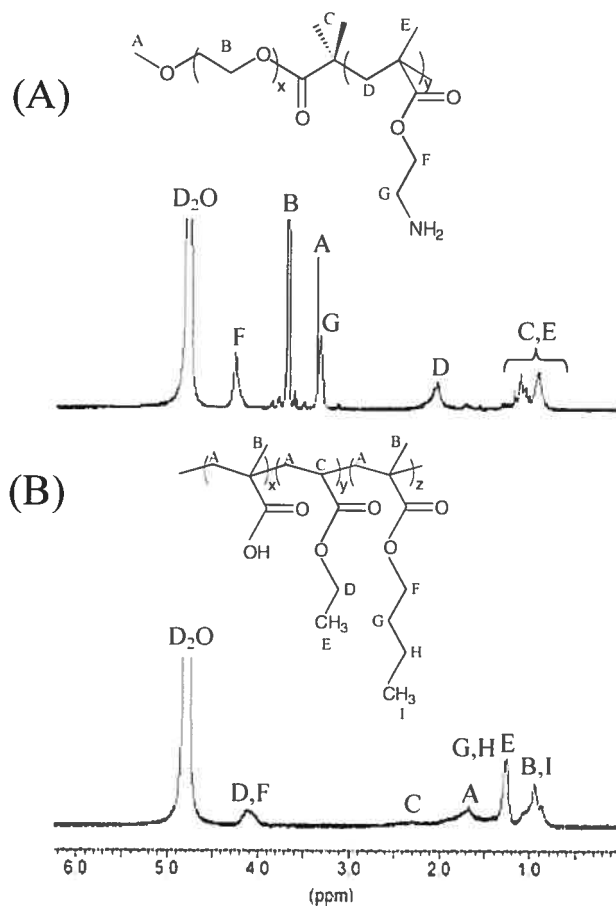


Figure S3. ¹H-NMR analysis of PEO-*b*-PAEMA (A) and P(MAA-*co*-EA-*co*-BMA) (B) in deuterated Tris buffer, pH 7.4.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

Suite à une administration locale ou systémique, les oligonucléotides antisens (ODNs) natifs et non formulés sont rapidement dégradés par les nucléases, faiblement capturés par les cellules cibles et incapables d'atteindre leur site d'action intracellulaire (*i.e.* le cytoplasme ou le noyau) en quantité suffisante. Afin de remédier à tous ces problèmes, une variété de vecteurs lipidiques, polymères et peptidiques a été développée (voir Chapitre 1, partie 1). Cependant, qu'ils soient administrés seuls ou à l'aide de vecteurs synthétiques, les ODNs pénètrent dans les cellules par endocytose. Par conséquent, le vecteur employé doit assurer leur passage dans le cytoplasme afin d'éviter que les ODNs ne se retrouvent séquestrés dans les endosomes/lysosomes où ils sont généralement dégradés. Afin d'améliorer la biodisponibilité intracellulaire des ODNs, une approche intéressante consiste à employer un agent capable de déstabiliser la membrane endosomale.

Étant donné que les endosomes ont un pH légèrement acide (5,0-6,5), des polymères anioniques sensibles au pH peuvent être employés pour favoriser le transfert des ODNs de l'endosome au cytoplasme. En effet, suite à une diminution du pH du milieu, certains polymères possédant des unités acide acrylique (AA) ou acide méthacrylique (MAA) subissent un changement de conformation leur permettant de déstabiliser les membranes lipidiques. À pH physiologique, les groupements acide carboxylique sont ionisés et la chaîne polymère adopte une conformation étirée en solution. Cependant, une diminution du pH du milieu entraîne la protonation des résidus COO et le polymère se contracte alors en globule hydrophobe (Fig. 2, Chapitre 1, partie 2). Les forces responsables de la stabilisation de la forme compacte du polymère font l'objet de controverse dans la littérature. Des interactions hydrophobes, des ponts hydrogène et des liaisons de van der Waals seraient probablement impliqués (Tableau 1, Chapitre 1, partie 2), mais l'importance relative de chaque type d'interaction reste à déterminer. Mentionnons finalement que le changement de conformation chaîne étirée-globule est réversible lorsque le pH du milieu est augmenté à nouveau.

En 1984, Seki et Tirrell démontraient que certains poly(acides acryliques d'alkyle) sensibles au pH pouvaient interagir avec des vésicules liposomales composées de

phosphatidylcholine (PC) en fonction du pH (Seki, 1984). En effet, à pH acide et à une concentration de 1 mg/mL, le poly(acide éthacrylique) (PEAA) solubilise les membranes lipidiques, alors que le poly(acide acrylique) (PAA) et le poly(acide méthacrylique), plus hydrophiles, sont incapables de déstabiliser les vésicules. Par la suite, le même groupe démontrait que le PEAA augmentait la perméabilité de liposomes composés de PC aux petites molécules (Tirrell, 1985) et aux ions (Thomas, 2000). La sensibilité au pH du PEAA peut être modifiée par l'addition de comonomères. En effet, lorsque que des quantités croissantes de MAA (*i.e.* jusqu'à 50 mol %) sont incorporées de manière aléatoire dans un homopolymère de PEAA, le copolymère résultant est toujours membrano-lytique, mais une diminution de la valeur du pH à laquelle les membranes sont solubilisées est observée (Fig. 8, Chapitre 1, partie 2) (Thomas, 1995). Ce phénomène peut être expliqué par le fait que le MAA augmente l'hydrophilie du polymère et, par conséquent, un plus grand nombre de résidus acide carboxylique doit être neutralisé avant qu'il ne devienne suffisamment hydrophobe pour déstabiliser les liposomes. Dans l'ensemble, les résultats de ces études démontrent que les propriétés déstabilisantes des membranes des poly(acides (méth)acryliques d'alkyle) sont grandement influencées par leur composition et leur hydrophobie. D'autre part, ils suggèrent fortement que ce type de polymère pourrait être employé afin d'augmenter la libération de principes actifs dans le cytoplasme des cellules. Nous avons donc décidé d'étudier en détail les propriétés de ces polymères et d'évaluer leur potentiel thérapeutique en les intégrant dans différents systèmes d'administration de médicaments.

L'objectif principal de la présente thèse était de déterminer si des poly(acides (méth)acryliques d'alkyle) pouvaient être utilisés afin d'améliorer le transport intracellulaire d'ODNs. Dans un premier temps, les propriétés physico-chimiques d'une série de copolymères de MAA ont été corrélées avec leur capacité à déstabiliser des vésicules lipidiques en fonction du pH (Chapitres 2 et 3). Par la suite, le copolymère le plus prometteur et un ODN modèle ont été incorporés dans deux différents types de vecteurs : l'un permettant l'étude détaillée de l'efficacité et du mécanisme d'action du système *in vitro* (Chapitre 3), et l'autre possédant des caractéristiques plus prometteuses pour des applications *in vivo* (Chapitre 4).

La première partie du travail consistait à comprendre la relation structure-activité des copolymères de MAA dans le but d'identifier les caractéristiques physico-chimiques qu'ils doivent posséder afin d'interagir efficacement avec les membranes à pH acide tout en étant inertes et non toxiques à pH physiologique. La masse molaire et le pH de précipitation des copolymères de MAA qui ont été investigués sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Masse molaire et pH de précipitation des différents copolymères étudiés

Copolymère ^a	Composition ^b (ratio molaire)	Agent de transfert de chaîne ^c	Masse molaire ^d			pH de précipitation ^e
			M _n	M _w	PI	
1	MAM/MAA (50:50)	2-éthylhexylthioglycolate	20 600	28 400	1,38	3,8-4,5
2	AE/MAA (50:50)	2-éthylhexylthioglycolate	9200	12 400	1,35	4,2-5,2
3	MA/EA/MAA (35:35:50)	2-éthylhexylthioglycolate	24 300	31 500	1,30	5,0-5,6
4	MAM/MAA (70:30)	2-éthylhexylthioglycolate	19 100	23 000	1,20	4,8-5,3
5	AM/MAM/MAA (45:45:10)	2-éthylhexylthioglycolate	26 900	32 700	1,21	4,5-7,0
6	AE/MAD/MAA (49:1:50)	2-éthylhexylthioglycolate	11 700	14 800	1,26	4,4-5,2
7	AE/MAD/MAA (49:1:50)	mercaptane de dodécyle	18 400	24 900	1,35	4,2-5,2
8	AE/MAB/MAA (40:10:50)	mercaptane de dodécyle	19 800	26 000	1,31	4,2-5,2

^a Synthétisés par polymérisation radicalaire.

^b MAA = acide méthacrylique; MAM = méthacrylate de méthyle; AM = acrylate de méthyle; AE = acrylate d'éthyle; MAD = méthacrylate de dodécyle; MAB = méthacrylate de butyle.

^c Se retrouve en bout de chaîne.

^d Évaluée par GPC dans le Tris pH 8,0 (copol. 1-4 et 6-8) ou dans le N,N-diméthylformamide (copol. 5).

^e Évalué par turbidimétrie.

Ces polymères ne sont pas biodégradables. Étant donné qu'ils sont éventuellement destinés à être administrés par voie parentérale, il était important que leur masse molaire soit inférieure à 40 000 afin de permettre leur élimination par filtration glomérulaire et ainsi éviter leur accumulation dans l'organisme (Seymour, 1987). En comparant les pH de précipitation des différents polymères, on remarque premièrement que lorsque le ratio acide/ester diminue et/ou lorsque des monomères plus hydrophobes tel l'acrylate d'éthyle

(AE) sont présents, le changement de conformation survient à des valeurs de pH plus élevées (comparer les copol. 1 avec les copol. 2, 3 et 4). Dans les deux cas, l'hydrophobie plus importante des copolymères peut expliquer ces résultats. Également, il peut être constaté que la modification du copolymère 2 par l'incorporation de monomères possédant de longues chaînes alkyle (*i.e.* 4-12 carbones) en faibles proportions (*i.e.* 1 à 10 mol%) ne modifie pratiquement pas la transition de phase (copol. 6-8).

La capacité des copolymères de MAA à déstabiliser les membranes des cellules eucaryotes à différents pH a été évaluée en utilisant des globules rouges comme modèles d'endosome. En observant la Figure 5 du Chapitre 2 et la Figure 1 du Chapitre 3, on constate que les copolymères 2-3 et 6-8 démontrent une bonne activité hémolytique à des valeurs de pH comprises entre 5,0 et 6,5. Lorsque les résultats des tests d'hémolyse et de turbidimétrie sont analysés en parallèle, on remarque que la présence d'une transition de phase à pH acide est requise pour déstabiliser sélectivement les membranes au pH de l'endosome. Cependant, elle n'est pas garante qu'un tel phénomène se produise et ne permet pas de prédire l'importance de la déstabilisation. Par exemple, les copolymères 4 et 5, qui précipitent respectivement entre les pHs 4,8-5,3 et 4,5-7,0, ne possèdent aucune activité hémolytique à pH 5,0 à une concentration de 150 µg/mL. Dans le même ordre d'idée, les copolymères 2, 6, 7 et 8 précipitent sur un même intervalle de pH (4,2-5,2), mais leur activité hémolytique à pH 5,5 et à 100 µg/mL suit la séquence suivante : 2<6<7<8 (Fig. 1B, Chapitre 3).

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que plusieurs paramètres influencent la relation structure-activité des copolymères de MAA envers les membranes lipidiques. Pour être membrano-lytiques à pH acide et inertes à pH neutre, les polymères doivent premièrement contenir une forte proportion d'unités MAA (*i.e.* ≥ 30 mol%) afin de présenter une transition de phase abrupte. Deuxièmement, ils doivent être constitués de monomères possédant une chaîne alkyle d'au moins 2 carbones (*i.e.* éthyle, butyle ou dodécyle) de manière à être suffisamment hydrophobes pour déstabiliser les membranes à pH acide. Troisièmement, lorsque des polymères possèdent une hydrophobie similaire (*i.e.* copol. 2, 6, 7 et 8), leur capacité à interagir avec les membranes est influencée de manière substantielle par leur composition chimique respective (*i.e.* le nombre et la nature des chaînes alkyle). En effet, des chaînes alkyle plus longues et/ou plus nombreuses facilitent

l'insertion du polymère dans les membranes de phospholipides, ce qui déstabilise ces dernières plus efficacement. Il a été démontré par Murthy *et al.* que l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle des unités monomères des poly(acides acryliques d'alkyle) potentialise leur activité hémolytique (Murthy, 1998; Murthy, 1999; Murthy, 2001). Ce phénomène est également mis en évidence dans notre étude lorsque l'activité hémolytique des différents copolymères est comparée. Par exemple, le remplacement des unités méthacrylate de méthyle par des résidus AE (copol. 1 *vs.* copol. 2), ou encore l'ajout d'un groupement dodécyle (C12) à l'extrémité de la chaîne polymère (copol. 6 *vs.* copol. 7) augmente substantiellement l'activité hémolytique. Par ailleurs, en comparant les copolymères 7 et 8, on constate que l'addition de 10 mol% de méthacrylate de butyle a eu un effet plus grand sur l'activité hémolytique que l'incorporation de 1 mol% de méthacrylate de dodécyle. Finalement, bien qu'une certaine hydrophobie soit souhaitable, le polymère ne doit pas être trop hydrophobe car il risque alors d'être membrano-lytique à pH physiologique (Murthy, 2001). Un polymère trop hydrophobe peut également adopter une conformation en globule à pH neutre qui est susceptible d'être davantage phagocytée par les macrophages. Nous avons démontré que dans ce cas, l'accumulation du polymère à l'intérieur de ces cellules sous forme de particules non digestibles conduit ultimement à la mort cellulaire (Chapitre 2, section 4,2).

Étant donné ses bonnes propriétés déstabilisante des membranes à pH acide, le copolymère 8 fut sélectionné pour être incorporé dans différents types de vecteurs. Dans un premier temps, des nanoparticules ont été préparées en complexant le copolymère et un ODN modèle avec un lipide cationique, le dioléoyltriméthylammonium propane (DOTAP) (Chapitre 3). Dans un deuxième temps, des micelles polyioniques (MPIs) ont été obtenues en remplaçant le DOTAP par du poly(éthylène glycol)-*bloc*-poly(méthacrylate d'aminoéthyle) (PEG-*b*-PAEMA, 75/25 mol%, M_n 4700) (Chapitre 4). Les caractéristiques de chacun des deux systèmes ternaires sont présentées dans le Tableau 2.

En observant le Tableau 2, on constate qu'il y a des différences marquées entre les deux systèmes. En effet, dans le milieu sans sel, les nanoparticules ont une taille environ 10 fois plus élevée que les micelles et ont une charge résiduelle positive. Lorsque la quantité de copolymère incorporée dans les nanoparticules augmente (*i.e.* lorsqu'on passe du ratio de

Tableau 2. Taille et potentiel zêta des nanoparticules et des micelles ternaires à pH 7,4.

Type de complexe (ratio de charges +/-)	Diamètre ^a (nm) [PI]	Potentiel zêta ± ET (mV)
Nanoparticules^b		
Milieu sans sel ^c		
4/1	195 [0,20]	32,0 ± 1,9
3/1	255 [0,28]	31,1 ± 1,5
2/1	345 [0,29]	26,8 ± 1,2
Milieu avec sels ^d		
4/1	329 [0,259]	31,4 ± 2,1
3/1	440 [0,332]	23,7 ± 2,7
2/1	599 [0,324]	6,7 ± 2,7
Micelles		
Milieu sans sel ^c		
0,7/1	29,5 [0,13]	0,0 ± 3,6
Milieu avec sels ^d		
0,7/1	31,5 [0,16]	-0,9 ± 2,6

^a Évaluée par diffusion de la lumière en mode dynamique.

^b Les différents ratio de charges sont obtenus en variant uniquement la quantité de copolymère.

^c HEPES (20 mM)-dextrose (5% *p/v*), pH 7,4 pour les nanoparticules ; Tris (10 mM, pH 7,4) pour les micelles.

^d 50/50 (*v/v*) HEPES-dextrose/milieu Opti-Mem pour les nanoparticules ; Tris salin (10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) pour les micelles.

charges 4/1 à 2/1 [+/-]), leur charge de surface diminue. Par conséquent, la répulsion électrostatique entre les particules est moindre ce qui peut expliquer la légère agrégation qui est observée. En présence de sels, la taille des nanoparticules augmente alors que les valeurs de potentiel zêta diminuent davantage. Ces deux phénomènes peuvent être attribués à l'écrantage des charges causé par les ions présents en solution et à l'agglomération subséquente des complexes. Étant donné la nature cationique des nanoparticules à base de DOTAP, elles sont non seulement instables en présence de sels mais également susceptibles de se dissocier ou de s'agréger en présence de sérum (*Zelphati, 1998*). Cette propriété peut expliquer pourquoi les complexes ternaires présentés dans le Tableau 2 ne possèdent aucune activité antisens *in vitro* lorsque du sérum est ajouté au milieu de culture (observations non publiées). Curieusement, Cheung *et al.* ont démontré que l'incorporation de poly(acide propacrylique) (PPAA) dans des lipoplexes constitués de DOTAP/ADN augmente la stabilité de ces derniers dans le sérum (*Cheung, 2005; Cheung, 2001*). Ce phénomène a été attribué à la création par le PPAA d'une barrière stérique similaire à celle que peuvent former d'autres polymères hydrophiles tel le PEG. Les particules

DOTAP/ADN/PPAA ont une bonne efficacité de transfection *in vitro* et ce, même lorsque 50% de sérum est ajouté au milieu de culture (Cheung, 2001). Étant donné la nature similaire de ces complexes et de ceux présentés au Tableau 2, les résultats contradictoires obtenus quant à l'efficacité des deux systèmes en présence de sérum sont difficilement explicables. Des variations dans la composition des polymères et/ou dans la nature du principe actif (plasmide *vs.* ODN) peuvent être à l'origine de ces différences.

Contrairement aux nanoparticules, les MPIs sont neutres, stables dans des conditions physiologiques (*i.e.* 150 mM NaCl) (Tableau 2) et solubles en milieu aqueux. Par conséquent, elles possèdent une structure complètement différente de ces dernières. En effet, suite à la neutralisation du segment cationique de PAEMA par le copolymère 8 et l'ODN, des complexes hydrophobes sont formés. Ces derniers s'auto-assemblent pour former le cœur micellaire autour duquel les chaînes flexibles de PEG s'organisent en couronne hydrophile (Fig. 1). En plus de solubiliser les micelles, le PEG les stabilise en créant une barrière stérique qui minimise leur agrégation en présence de sels (Deshpande, 2002) et leur interaction avec les protéines sériques (Vinogradov, 1998; Oishi, 2003). Dans le présent travail, l'architecture coeur-couronne des MPIs a été confirmée par résonance magnétique nucléaire du proton (^1H -RMN) (Fig. 2, Chapitre 4). Étant donné que le copolymère de MAA est confiné dans le cœur des MPIs et que ce dernier est masqué par une couronne de PEG, il était important de vérifier que le polymère était toujours apte à déstabiliser les membranes suite à une diminution du pH environnant. Les données obtenues à l'aide de techniques telles la diffusion de la lumière en mode statique, la microscopie électronique à transmission, la RMN et la spectroscopie en fluorescence tendent à démontrer que lorsque le pH du milieu passe de 7,4 à 5,0, les MPIs se dissocient partiellement en libérant des fragments micellaires capables de déstabiliser des membranes lipidiques mimant l'endosome. La protonation du copolymère de MAA conduirait donc à son détachement progressif des micelles ce qui lui permettrait d'interagir efficacement avec les membranes lipidiques. Les propriétés endosomolytiques des micelles ont également été confirmées *in vitro*. En effet, il a été démontré à l'aide de la microscopie confocale que lorsque des cellules U937 différenciées en macrophages sont incubées en présence de micelles préparées avec le copolymère 8, une quantité substantielle d'ODN s'accumule dans le noyau de ces cellules. À l'opposé, la quantité d'ODN détectée dans le noyau de

macrophages incubés avec des micelles contrôles préparées avec un polymère non endosomolytique, le PMAA, est demeurée faible ou inexistante (Fig. 5, chapitre 4). Dans l'ensemble, les résultats obtenus au Chapitre 4 démontrent qu'un ODN et un polymère endosomolytique de type poly(acide (méth)acrylique d'alkyle) peuvent être incorporés avec succès dans un système micellaire simple à préparer, de structure bien définie, présentant un comportement unique d'association/dissociation en fonction du pH (Fig. 6, Chapitre 4) et capable d'améliorer le transfert d'un ODN de l'endosome au cytoplasme de cellules en culture.

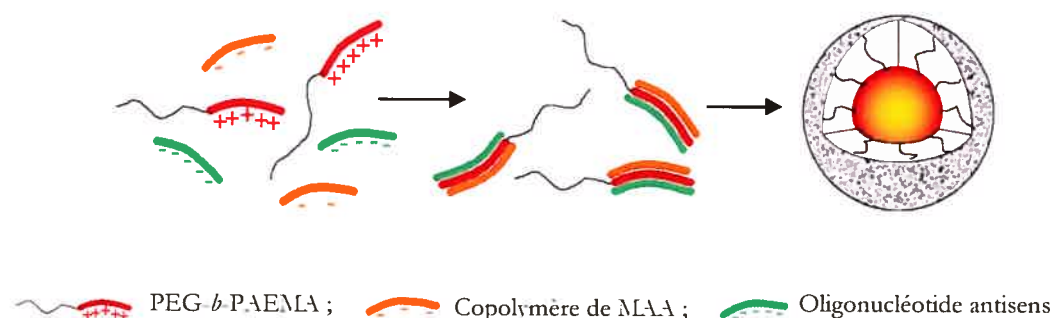


Figure 1. Formation des micelles polyioniques

Bien qu'elles soient peu nombreuses, d'autres études rapportent l'incorporation d'ADN, d'un polymère dérivé de l'acide (méth)acrylique et de PEG au sein d'un même système. Par exemple, le mélange d'ADN plasmidique, de poly(éthylèneimine) et de PEG-PAA résulte en la formation de complexes solubles en milieu aqueux (*Slinkin, 2001*). Cependant, les caractéristiques physico-chimiques de ces derniers (taille, potentiel zêta, stabilité) ne sont pas disponibles et, par conséquent, leur structure en solution est inconnue. Dans une autre approche, un monomère de styrène contenant des liens acétal clivables en milieu acide a été incorporé dans un copolymère endosomolytique constitué de DMAEMA et de méthacrylate de butyle (47/48 mol/mol). Des chaînes de PEG ont été conjuguées au copolymère *via* les liens acétal alors que le principe actif (un ODN ou un peptide) a été par la suite complexé ou conjugué à l'autre extrémité du PEG (Fig. 2). Il a été démontré que les liens acétal de ces conjugués appelés « polymères encryptés » se dégradent progressivement sur une période de 1 h à pH 5,4, ce qui libère le polymère endosomolytique. Le système s'est avéré capable d'augmenter le transfert d'un ODN dans le cytoplasme de cellules en culture (*Murthy, 2003a, 2003b*). Cependant, bien que le concept soit intéressant, le vecteur

est complexe à préparer et, encore une fois, l'arrangement adopté par les molécules du conjugué en solution n'a pas été étudié.

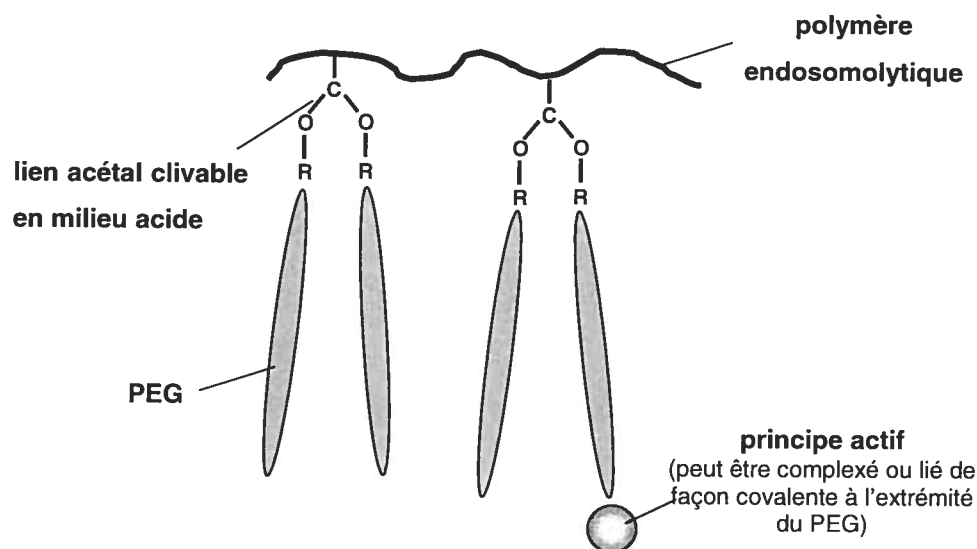


Figure 2. Représentation schématique d'un polymère encrytpé. Adapté de Murthy *et al.* (2003) avec la permission d'Elsevier Science.

En comparant les caractéristiques respectives des deux types de vecteurs décrits dans le Tableau 2, il est évident que les MPIs sont beaucoup plus prometteuses que les nanoparticules pour des applications *in vivo*. Cependant, en l'absence d'un ligand pouvant interagir avec des récepteurs membranaires, les micelles sont faiblement capturées par des cellules en culture étant donné la barrière stérique créée par la couronne de PEG (observations non publiées). En l'occurrence, afin de réaliser l'expérience *in vitro* présentée à la Figure 5 du chapitre 4, une forte concentration en micelles a dû être administrée et des macrophages ont été utilisés afin de favoriser la capture cellulaire du plus grand nombre de micelles possible. Par conséquent, les MPIs administrées telles quelles permettent difficilement l'étude du rôle joué par le copolymère de MAA dans le transport intracellulaire de l'ODN. À l'opposé, les nanoparticules peuvent être utilisées à cette fin puisque leur charge positive résiduelle favorise leur capture par endocytose en leur permettant d'interagir efficacement avec les membranes cellulaires chargées négativement. Les travaux décrits au Chapitre 3 montrent que l'incorporation du copolymère 8 dans des particules à base de DOTAP augmente substantiellement l'activité antisens d'un ODN dirigé contre la protéine kinase C-alpha (ISIS 3521) dans des cellules humaines de carcinome pulmonaire (lignée

A549) (Fig. 3, Chapitre 3). De plus, l'utilisation de la microscopie confocale a permis de démontrer clairement que l'inhibition de la synthèse protéique peut être attribuée au fait que le copolymère facilite le transfert de l'ODN de l'endosome au cytoplasme des cellules (Fig. 6, Chapitre 3).

Le mécanisme au moyen duquel les polyanions sensibles au pH déstabilisent les membranes à pH acide n'est pas complètement élucidé. Chung *et al.* ont rapporté que le PEAA pouvait induire la formation de canaux sélectifs aux cations dans des membranes de phospholipides artificiels (Chung, 1996). Ces canaux sont absents à pH 7,6, mais ils se forment rapidement lorsque le pH est abaissé à 6,0. Deux modèles ont été proposés pour illustrer la formation de pores par le PEAA. Dans le premier modèle, une ou plusieurs chaînes de polymère pourraient traverser transversalement la membrane de phospholipides. Dans ce cas, la surface interne du pore serait stabilisée par le polymère (Fig. 3A). Alternativement, le PEAA pourrait induire un changement local dans la courbure de la membrane. Les chaînes polymères seraient alors localisées sur la surface externe du pore (Fig. 3B).

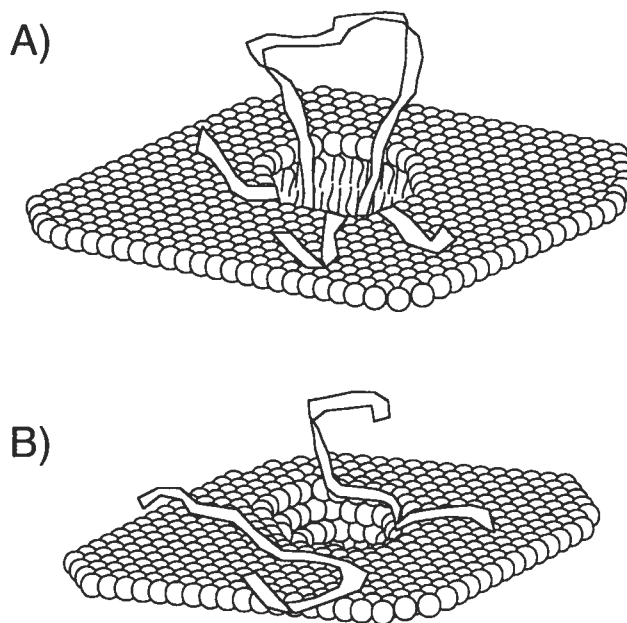


Figure 3. Modèles proposés afin d'illustrer la formation de pores dans les membranes de phospholipides par le PEAA (voir texte pour explications). Reproduit de Chung *et al.* (1996) avec la permission de l'*American Chemical Society*.

Étant donné que les copolymères de MAA sont structurellement apparentés au PEAA, il est possible qu'ils déstabilisent la membrane endosomale en y formant des pores. Les travaux réalisés au Chapitre 3 supportent cette hypothèse. En effet, à l'intérieur des cellules, le copolymère de MAA demeure majoritairement séquestré dans les endosomes/lysosomes (Fig. 6, Chapitre 3). La libération de l'ODN dans le cytoplasme pourrait donc être causée par l'induction de défauts transitoires dans la membrane endosomale. Par ailleurs, une faible proportion de polymère a été détectée dans le cytoplasme des cellules. Étant donné que le copolymère 8 utilisé dans les expériences possède un indice de polymolécularité supérieur à 1,3 (Tableau 1), ce phénomène pourrait être attribué à la libération dans le cytoplasme des chaînes de plus faible masse molaire suite à leur passage au travers des pores. Toutefois, il a été démontré récemment par Jones *et al.* que des poly(acides acryliques d'alkyle) favorisent le transfert d'une petite molécule, la calcéine (masse molaire 622 g/mol), mais aussi d'un peptide, la cathepsine (masse molaire = 64 000 g/mol) de l'endosome au cytoplasme de cellules HEK-293 (Jones, 2003). Ces résultats suggèrent que la membrane endosomale est suffisamment endommagée par les polymères pour permettre le passage de macromolécules. Par conséquent, l'hypothèse voulant que des pores soient formés transitoirement dans l'endosome est remise en question par cette étude, à moins que ces derniers ne soient d'une taille considérable. Manifestement, des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de clarifier cette question.

En plus des travaux effectués au Chapitre 3, d'autres études décrivent la vectorisation d'ADN à l'aide d'un système ternaire endosomolytique. Par exemple, des lipoplexes contenant du PPAA ont démontré une efficacité de transfection supérieure à celle de particules sans PPAA *in vitro* dans des cellules de fibroblastes murines (NIH3T3) (Cheung, 2001), mais aussi *in vivo* après avoir été administrés localement chez la souris (Kyriakides, 2002). L'activité de complexes lipides cationiques/ADN plasmidique a également été potentialisée dans des cellules en culture suite à l'incorporation d'un peptide endosomolytique tel que le GALA ou l'hémagglutinine du virus de l'influenza (Kichler, 1997; Simoes, 1998; de Lima, 1999; Schoen, 1999). Dans une autre étude, un ODN et un peptide anionique fusogène appelé JTS-1 ont été associés au DOTAP (Jaaskelainen, 2000). Les complexes résultant ont démontré une bonne activité antisens en inhibant spécifiquement la

synthèse de la luciférase dans des cellules épithéliales de rétine humaines (lignée D 407) et dans des fibroblastes rénaux provenant du singe (lignée CV-1) et ce, de manière plus efficace que les particules dépourvues de peptide.

En somme, toutes ces études concluent que l'activité des lipoplexes augmente dans des cellules en culture en présence d'un agent capable d'interagir efficacement avec les membranes lipidiques à pH acide. Cependant, il est important de souligner que les applications systémiques de ces systèmes sont grandement limitées par leurs caractéristiques physico-chimiques. Par conséquent, ils sont surtout utiles pour établir une preuve de concept ou pour mieux comprendre de quelle manière une molécule endosomolytique affecte le transport intracellulaire d'un principe actif. Pour être administrés de manière sécuritaire et efficace chez l'animal, la molécule endosomolytique et le principe actif doivent être incorporés dans un vecteur capable de résister aux conditions prévalant dans l'organisme. L'incorporation du copolymère de MAA et de l'ODN dans des micelles neutres, solubles et stables dans des conditions physiologiques constitue un excellent exemple du type de modification qui peut être apporté afin d'obtenir un système potentiellement viable en clinique.

Références

- Cheung C.Y., Murthy N., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (2001). A pH-sensitive polymer that enhances cationic lipid-mediated gene transfer. *Bioconjugate Chem* 12: 906-910.
- Cheung C.Y., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (2005). Poly(propylacrylic acid)-mediated serum stabilization of cationic lipoplexes. *J Biomater Sci, Polymer Edn* 16: 163-179.
- Chung J.C., Gross D.J., Thomas J.L., Tirrell D.A. and Opsahl-Ong L.R. (1996). pH-sensitive, cation-selective channels formed by a simple synthetic polyelectrolyte in artificial bilayer membranes. *Macromolecules* 29: 4636-4641.
- de Lima M.C., Simoes S., Pires P., Gaspar R., Slepishkin V. and Duzgunes N. (1999). Gene delivery mediated by cationic liposomes: from biophysical aspects to enhancement of transfection. *Mol Membr Biol* 16: 103-109.
- 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.
- Jaaskelainen I., Peltola S., Honkakoski P., Monkkonen J. and Urtili A. (2000). A lipid carrier with a membrane active component and a small complex size are required for efficient cellular delivery of anti-sense phosphorothioate oligonucleotides. *Eur J Pharm Sci* 10: 187-193.
- Jones R.A., Cheung C.Y., Black F.E., Zia J.K., Stayton P.S., Hoffman A.S. and Wilson M.R. (2003). Poly(2-alkylacrylic acid) polymers deliver molecules to the cytosol by pH-sensitive disruption of endosomal vesicles. *Biochem J* 372: 65-75.
- Kichler A., Mechtler K., Behr J.P. and Wagner E. (1997). Influence of membrane-active peptides on lipospermine/DNA complex mediated gene transfer. *Bioconjugate Chem* 8: 213-221.
- Kyriakides T.R., Cheung C.Y., Murthy N., Bornstein P., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (2002). pH-sensitive polymers that enhance intracellular drug delivery in vivo. *J Control Release* 78: 295-303.
- Murthy N., Campbell J., Fausto N., Hoffman A.S. and Stayton P.S. (2003a). Bioinspired pH-responsive polymers for the intracellular delivery of biomolecular drugs. *Bioconjugate Chem* 14: 412-419.
- Murthy N., Campbell J., Fausto N., Hoffman A.S. and Stayton P.S. (2003b). Design and synthesis of pH-responsive polymeric carriers that target uptake and enhance the intracellular delivery of oligonucleotides. *J Control Release* 89: 365-374.
- Murthy N., Chang I., Stayton P. and Hoffman A. (2001). pH-sensitive hemolysis by random copolymers of alkyl acrylates and acrylic acid. *Macromol Symp* 172: 49-55.
- Murthy N., Robichaud J., Stayton P.S., Press O.W., Hoffman A.S. and Tirrell D.A. (1998). Design of polymers to increase the efficiency of endosomal release of drugs. *Proceed Int Symp Control Rel Bioact Mater* 25: 224-225.
- Murthy N., Robichaud J.R., Tirrell D.A., Stayton P.S. and Hoffman A.S. (1999). The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J Control Release* 61: 137-143.
- Oishi M., Sasaki S., Nagasaki Y. and Kataoka K. (2003). pH-responsive oligodeoxynucleotide (ODN)-poly(ethylene glycol) conjugate through acid-labile

- beta-thiopropionate linkage: preparation and polyion complex micelle formation. *Biomacromolecules* 4: 1426-1432.
- Schoen P., Chonn A., Cullis P.R., Wilschut J. and Scherrer P. (1999). Gene transfer mediated by fusion protein hemagglutinin reconstituted in cationic lipid vesicles. *Gene Ther* 6: 823-832.
- Seki K. and Tirrell D.A. (1984). pH-dependent complexation of poly(acrylic acid) derivatives with phospholipid vesicle membranes. *Macromolecules* 17: 1692-1698.
- Seymour L.W., Duncan R., Strohm J. and Kopecek J. (1987). Effect of molecular weight (Mw) 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.
- Simoes S., Slepishkin V., Gaspar R., de Lima M.C. and Duzgunes N. (1998). Gene delivery by negatively charged ternary complexes of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusigenic peptides. *Gene Ther* 5: 955-964.
- Slinkin M.A. and Shevelev A.Y. (2001). Ternary interpolyelectrolyte complexes DNA-polycation-polyanion: A new approach to optimization of mixtures for transfection of eukaryotic cells. *Russian J Bioorg Chem* 27: 256-263.
- Thomas J.L. and Tirrell D.A. (2000). Polymer-induced leakage of cations from dioleoyl phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol liposomes. *J Control Release* 67: 203-209.
- Thomas J.L., You H. and Tirrell D.A. (1995). Tuning the response of a pH-sensitive membrane switch. *J Am Chem Soc* 117: 2949-2950.
- Tirrell D.A., Takigawa D.Y. and Seki K. (1985). pH sensitization of phospholipid vesicles via complexation with synthetic poly(carboxylic acid)s. *Ann NY Acad Sci* 446: 237-248.
- 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.
- Zelphati O., Uyechi L.S., Barron L.G. and Szoka F.C., Jr. (1998). Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim Biophys Acta* 1390: 119-133.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans un premier temps, les travaux réalisés dans la présente thèse ont démontré que plusieurs paramètres influencent l'interaction des copolymères d'acide méthacrylique (MAA) avec les membranes lipidiques. En effet, ils doivent d'une part être constitués d'une proportion d'unités MAA supérieure à 30 mol% afin de présenter une transition de phase abrupte leur permettant de déstabiliser efficacement les membranes à pH acide. D'autre part, la copolymérisation du MAA avec des monomères hydrophobes tel que l'acrylate d'éthyle potentialise l'activité membrano-lytique des copolymères. Finalement, les polymères ne doivent pas être trop hydrophobes afin de ne pas être toxiques à pH physiologique. Dans l'ensemble, cette étude a permis d'identifier plus clairement les propriétés physico-chimiques que doivent posséder les polymères de type poly(acide (méth)acrylique d'alkyle) afin d'interagir de manière optimale avec les membranes en fonction du pH. L'acquisition de connaissances sur la relation structure-activité des polymères est un premier pas important vers l'élaboration de systèmes d'administration de matériel génétique plus sécuritaires et efficaces dans des conditions physiologiques.

Dans un deuxième temps, l'application de ces notions a permis de sélectionner le copolymère de MAA présentant les caractéristiques les plus prometteuses pour la vectorisation d'oligonucléotides antisens (ODNs). Ce copolymère et un ODN modèle ont été incorporés avec succès dans deux différents types de vecteurs : un système nanoparticulaire et un système micellaire. Les nanoparticules ont une charge résiduelle positive et, par conséquent, sont capturées efficacement par des cellules en culture. Puisque la pénétration cellulaire n'est plus un obstacle, ce système est idéal afin d'évaluer le rôle joué par le copolymère de MAA dans le transport intracellulaire des ODNs. L'utilisation des nanoparticules dans une série d'expériences réalisées *in vitro* a effectivement permis de confirmer que les copolymères de MAA potentialisent l'activité des ODNs en augmentant leur transfert de l'endosome au cytoplasme des cellules.

Les micelles polyioniques (MPIs) quant à elles sont neutres, solubles en milieu aqueux et stables dans des conditions physiologiques. Par conséquent, elles présentent des caractéristiques plus optimales pour des applications systémiques. Si elles circulent

suffisamment longtemps, les MPIs pourraient gagner la matrice extracellulaire de certains tissus en exploitant, par exemple, la perméabilité accrue du lit vasculaire des tumeurs solides. Cependant, une fois dans l'interstitium, les micelles ne peuvent reconnaître les cellules cibles et s'y lier de manière à favoriser leur capture par endocytose étant donné la barrière stérique formée par les chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG). Pour pallier à ce problème, il est nécessaire de fixer un ligand à l'extrémité des chaînes de PEG. En effet, la présence d'une molécule de reconnaissance permet au vecteur d'être capturé uniquement par les cellules exprimant un récepteur spécifique. Le potentiel de cette approche a été démontré très récemment *in vitro* dans deux études où des polyplexes ont été incorporés dans des systèmes endosomolytiques ciblés présentant une charge de surface pratiquement neutre (Oishi, 2006; Boeckle, 2006). Évidemment, avant d'être administrées *in vivo*, les micelles ciblées devront être d'abord optimisées *in vitro* afin de déterminer, par exemple, la proportion de ligand à incorporer et la dose optimale d'ODN. De plus, elles devront être non toxiques, stables et efficaces en présence de sérum. Un tel système s'avère extrêmement prometteur car, en théorie, il permettrait de relever la plupart des défis inhérents à l'administration des ODNs. En effet, en étant confiné dans le cœur des micelles, l'ODN serait protégé de la dégradation enzymatique, des temps de circulation prolongés seraient conférés par la couronne de PEG, une capture cellulaire efficace et spécifique par les cellules cibles serait promue par la présence du ligand et finalement, le copolymère de MAA faciliterait la libération endosomale de l'ODN, augmentant ainsi sa biodisponibilité cytoplasmique et potentialisant son activité. Ainsi, les expériences ultérieures ont pour objectif le développement d'un vecteur multifonctionnel hautement adapté aux conditions prévalant dans l'organisme.

Références

- Boeckle S., Fahrmeir J., Roedl W., Ogris M. and Wagner E. (2006). Melittin analogs with high lytic activity at endosomal pH enhance transfection with purified targeted PEI polyplexes. *J Control Release* 112: 240-248.

Oishi M., Kataoka K. and Nagasaki Y. (2006). pH-responsive three-layered PEGylated polyplex micelle based on a lactosylated ABC triblock copolymer as a targetable and endosome-disruptive nonviral gene vector. *Bioconjugate Chem* 17: 677-688.

