



HAL
open science

Nouveaux vecteurs synthétiques fonctionnels pour le transfert de gènes

Bertrand Le Bon

► **To cite this version:**

Bertrand Le Bon. Nouveaux vecteurs synthétiques fonctionnels pour le transfert de gènes. Autre. Université Nice Sophia Antipolis, 2003. Français. NNT: . tel-00007070

HAL Id: tel-00007070

<https://theses.hal.science/tel-00007070>

Submitted on 8 Oct 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS – UFR SCIENCES

Laboratoire de Chimie Bioorganique, UMR-CNRS/UNSA 6001

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur en SCIENCES

Spécialité : Chimie (section 32)

par

Bertrand Le Bon

NOUVEAUX VECTEURS SYNTHETIQUES FONCTIONNELS POUR LE TRANSFERT DE GENES

Soutenue le 15 décembre 2003 devant le jury composé de :

Dr J.P. BEHR	Directeur de Recherche UMR-CNRS 7514 Laboratoire de Chimie Génétique Faculté de Pharmacie, Illkirch	Rapporteur
Dr J. HERSCOVICI	Directeur de Recherche CNRS Laboratoire de Pharmacologie Chimique et Génétique U266 INSERM-FRE-2463 CNRS ENSCP, Paris	Rapporteur
Dr S. BRAUN	Directeur de la Recherche Transgène SA, Strasbourg	Examineur
Pr R. CONDOM	Professeur UMR-CNRS 6001 Université Nice-Sophia Antipolis	Examineur
Dr P. VIERLING	Directeur de Recherche CNRS UMR-CNRS 6001 Université de Nice-Sophia Antipolis	Examineur

SOMMAIRE

Introduction Générale	p 1
Références bibliographiques.....	p 7

Partie I

Généralités sur la Thérapie Génique

I Introduction : le gène comme médicament.....	p 8
II Objectifs de la thérapie génique.....	p 11
II-1 Les pathologies visées.....	p 11
II-2 Les obstacles du transfert de gènes.....	p 12
II-3 Les approches envisagées.....	p 14
III Les outils du transfert de gènes.....	p 15
III-1 Les vecteurs de transfert de gènes.....	p 16
III-1-1 Les vecteurs Viraux.....	p 16
III-1-1-1 Les virus adéno associés (AAV).....	p 17
III-1-1-2 Les rétrovirus.....	p 17
III-1-1-3 Les adénovirus.....	p 18
III-1-1-4 Les virus herpétiques.....	p 18
III-1-1-5 Conclusions.....	p 18
III-1-2 Les vecteurs synthétiques.....	p 19
III-1-2-1 Les systèmes lipidiques.....	p 20
a) Les lipides (poly)cationiques et les lipoplexes.....	p 20
b) Les liposomes.....	p 24
III-1-2-2 Les systèmes polymériques et les polyplexes.....	p 24
III-2 Les méthodes physiques.....	p 27
III-2-1 L'injection d'ADN nu.....	p 27
III-2-2 La biolistique ou « gene gun ».....	p 27
III-2-3 L'électroporation.....	p 28
III-2-4 Les techniques parallèles.....	p 28
IV Etapes et mécanismes de la transfection par les lipoplexes et polyplexes.....	p 29
IV-1 Le trafic extracellulaire.....	p 30

IV-1-1 Les lipoplexes et polyplexes « conventionnels »	p 32
IV-1-2 Les lipoplexes et polyplexes « furtifs ».....	p 34
IV-2 L'entrée dans la cellule.....	p 36
IV-2-1 Les interactions non spécifiques.....	p 36
IV-2-2 Les interactions spécifiques : le ciblage cellulaire.....	p 37
IV-3 Le trafic intracellulaire.....	p 45
IV-3-1 Sortie des endosomes.....	p 46
IV-3-2 Le trafic intracytoplasmique et l'entrée dans le noyau.....	p 48
IV-3-3 De la transcription du plasmide à la protéine.....	p 51
IV-3-4 Expression cytoplasmique du transgène.....	p 52
V Conclusions.....	p 54
Références bibliographiques.....	p 55

Partie II

Nouveaux cotélomères pour la formulation de polyplexes « furtifs »

I Introduction.....	p 70
II Synthèse.....	p 73
II-1 Généralités sur la télomérisation.....	p 73
II-2 Les PEG-télomères « di-block » PEG-[NH ₂] _n et PEG-[CH ₂ NMe ₂] _m	p 75
II-3 Les cotélomères « random » iBu-[TEG] _m -[NH ₂] _n et iBu-[THM] _m -[NH ₂] _n	p 76
II-4 Les télomères témoins iBu-[NH ₂] _n	p 77
III Formulation et caractérisation.....	p 77
IV Transfection <i>in vitro</i>	p 79
V Conclusions.....	p 81
Références bibliographiques.....	p 82
VI Publication :	
“Polycationic Diblock and Random Polyethylene Glycol- or Tris(hydroxymethyl)methyl –Grafted (Co))telomers for Gene transfer: Synthesis and Evaluation of Their in Vitro Transfection Efficiency”.....	p 83

Partie III

Conjugués d'AMD3100 en tant que composants pour la formulation de systèmes spécifiques de transfert de gènes

I Introduction.....	p 93
II Synthèse	p 97
III Formulation et caractérisation.....	p 98
IV Transfection <i>in vitro</i>	p 100
IV-1 Transfection non spécifique : cas des cellules CXCR4(-).....	p 101
IV-2 Transfection spécifique : cas des cellules CXCR4(+)......	p 102
V Conclusion.....	p 104
Références bibliographiques.....	p 105
VI Publication :	
“ AMD3100 conjugates as components of targeted non-viral gene delivery systems: synthesis and in vitro transfection efficiency of CXCR4-expressing cells ” par B. Le Bon, N. Van Craynest, J.-M. Daoudi, C. Di Giorgio, A. J. Domb, et P. Vierling soumise à Bioconjugate Chemistry	p 106
Caption for schemes and figures	p 133
Conclusion générale.....	p 140

Abréviations

A

AAV : Adeno-Associated Virus (virus adéno-associés)

ADA : adénosine déaminase

ADN : acide désoxyribonucléique

AIBN : α,α' -azoisobutyronitrile

ARN : acide ribonucléique

B

Boc : tert-butyloxycarbonyle

BSA : Bovine Serum Albumin (albumine de sérum bovin)

C

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembranar Receptor (récepteur transmembranaire de la fibrose kystique)

CH₃CN : acétonitrile

D

DCC : dicyclohexyl-carbodiimide

DMEM : Dulbecco's Medium Eagle Modified (milieu de Eagle modifié par Dulbecco)

DMSO : diméthylsulfoxyde

DTNB : acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)

DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffered Solutions (solutions de Dulbecco tamponnées au phosphate)

E

EGF: Epidermal Growth Factor (facteur de croissance épidermale)

ETBr. : Ethidium Bromide (bromure d'éthidium)

F

FCS: voir SVF

FGF: Fibroblast Growth Factor (facteur de croissance des fibroblastes)

G

GBM : Glioblastome Multiforme

H

HOBt : 1-hydroxybenzotriazole

HSPGs :Heparan Sulfate Proteoglycan's (protéoglycanes du type sulfate d'héparine)

L

LDL : Low Density Lipoprotein (lipoprotéine faible densité)

M

MPS : Mononuclear Phagocyte System (système phagocytaire mononucléé)

N

NEt₃ : triéthylamine

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

NLS : Nuclear Localisation Signal (signal de localisation nucléaire)

NMR : Nuclear Magnetic Resonance (Résonance Magnétique Nucléaire RMN)

P

p(DMAEMA) : poly[2-(diméthylamino) méthacrylate d'éthyle]

PAMAM : polyamidoamine

PEG : polyéthylène glycol

PEI : polyéthylèneimine

pHPMA : polyhydroxy-méthacrylamide

PLL : poly-(L)lysine

PMA : Phorbol Myristate Acétate

R

RES : Reticulo-Endothelial System (système réticulo-endothélial)

RF : récepteur folate

RGD : arginine-glycine-acide aspartique

S

SCID : Severe Combined Immunodeficiency Diseases (déficits combinés immunitaires sévères)

SVF :Sérum de Veau Fœtal (fetal calf serum FCS)

T

TEG : tétraéthylène glycol

Tf : transferrine

TFA : acide trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

THM : trishydroxyméthyle

TsCl : chlorure de tosyl

X

X-SCID : X-Severe Combined Immunodeficiency Diseases (déficits combinés immunitaires sévères liés au chromosome X)

U

US : Ultrasons

UV : Ultraviolet

V

VIH-1 : Virus de l'Immunodéficience Humaine 1

INTRODUCTION
GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le concept de thérapie génique, imaginé il y a une trentaine d'années, est une application à des fins médicales des connaissances de la biologie moléculaire et de la génétique. Son but est de soigner ou de prévenir les maladies par l'utilisation d'un gène comme médicament. En pratique, elle consiste à transférer un gène dans les cellules soit pour compenser le dysfonctionnement d'un gène altéré ou absent, soit pour ajouter une nouvelle fonction à la cellule dans un but thérapeutique ou préventif. Cette nouvelle approche du traitement des pathologies est un profond changement des stratégies thérapeutiques. Car au lieu de traiter les symptômes, ce concept s'attaque à la cause des maladies et ouvre ainsi de nouvelles perspectives dans le traitement d'affections jusqu'à maintenant incurables. Elle s'applique potentiellement non seulement aux maladies génétiques, mais aussi aux maladies acquises telles que les cancers, les maladies neurodégénératives ou les pathologies infectieuses (hépatites, SIDA).

Les premiers essais cliniques de thérapie génique chez l'homme dans le traitement de déficits immunitaires sévères (SCID) ont démontré les difficultés d'application de cette thérapie. Les succès incontestables obtenus chez des patients souffrant de pathologies ADA-SCID ou X-SCID¹ se sont suivis malheureusement de complications comme des leucémies chez certains patients atteints de X-SCID.² Ces constatations soulignent les difficultés d'obtenir une méthode de thérapie génique fiable pour la médecine de demain.

C'est pourquoi le développement d'une thérapie génique sûre et efficace passe par la connaissance et la mise au point de véhicules capables de délivrer le gène médicament. En effet, la nature polyanionique et hydrophile de l'ADN et sa nature macromoléculaire ne lui permettent pas d'être utilisé seul comme un principe actif pharmacologique. Son inaptitude à franchir les barrières cellulaires et sa biodégradabilité le rendent dépendant d'un vecteur qui l'acheminera à sa cible cellulaire. En outre, ce dernier doit être capable de le compacter, de masquer sa charge et de le protéger des dégradations qu'il peut subir dans les milieux biologiques.

A ce jour, les principaux vecteurs utilisés en essais cliniques sont les vecteurs viraux. Les virus sont capables d'insérer efficacement dans les cellules leur patrimoine génétique afin de pérenniser leur cycle d'infection. Ces prédispositions acquises durant leur longue évolution en ont fait des outils de choix pour la thérapie génique. Mais les nombreux problèmes posés par l'emploi de tels vecteurs (production, immunogénicité, sûreté, coût) ont poussé les chercheurs à imaginer des systèmes synthétiques capables d'assurer les mêmes fonctions que les virus, mais sans leurs inconvénients.

Ces vecteurs non viraux ou vecteurs synthétiques ont connu un essor considérable depuis une quinzaine d'années. Une multitude de vecteurs (poly)cationiques lipidiques ou polymériques ont été synthétisés et évalués *in vitro* et *in vivo*. Leur capacité à complexer l'ADN grâce aux interactions électrostatiques pour former des particules appelées lipoplexes ou polyplexes³ et l'aptitude de ces particules à transférer les cellules en culture ont permis d'explorer de nouvelles voies d'applications de la thérapie génique. Cependant, ces systèmes présentent eux aussi de nombreuses limitations en terme d'efficacité, de spécificité, de biodisponibilité. Ces limitations sont entre autres liées (i) à leur nature souvent cationique qui est à l'origine de nombreuses interactions non-spécifiques avec les composants des fluides biologiques et divers types cellulaires qui limitent l'accès de ces particules à la cible tissulaire et cellulaire, et (ii) aux obstacles que rencontre le gène pour pénétrer dans la cellule puis dans le noyau cellulaire pour être exprimé.

Le succès d'une thérapie génique avec les vecteurs non viraux est tributaire de l'élaboration de systèmes capables de s'affranchir de ces obstacles. Les virus constituent des modèles pour l'élaboration de tels systèmes ou "virus synthétiques" (figure 1) qui sont en effet les instruments ou outils nécessaires pour une application fiable et efficace de la thérapie génique.

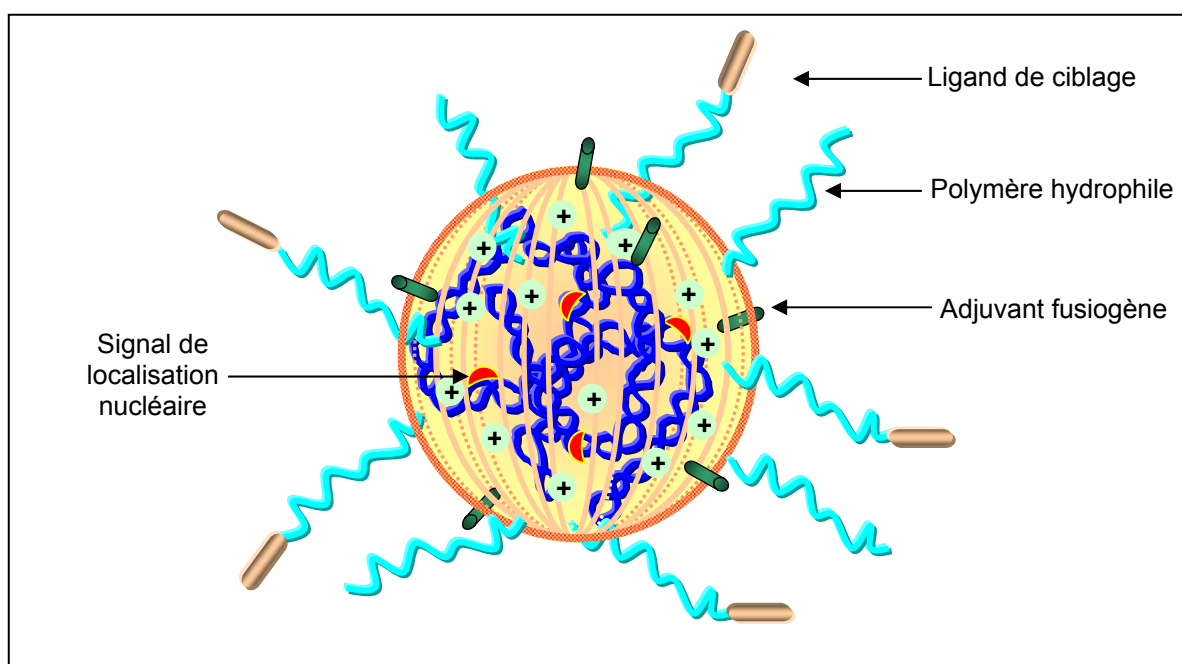


Figure 1 : « virus synthétique » = complexe polycation/ADN constitué d'éléments de furtivité et de ciblage

Le projet de thèse qui m'a été confié s'inscrit dans une optique d'amélioration des propriétés pharmacologiques des vecteurs synthétiques. Ce travail a concerné tout particulièrement la synthèse et l'évaluation de deux familles de vecteurs synthétiques, à savoir :

✧ **Les cotélomères “ di-block ” et “ random ” pour la formulation de particules d'ADN “ furtives ”**

Les connaissances acquises concernant le transport et la vectorisation de médicaments par des systèmes particuliers (liposomes, nanoparticules, nanosphères) et l'amélioration de leur biodisponibilité via l'utilisation de polymères hydrophiles (comme les polyéthylènes glycols) ont été mises à profit pour tenter d'améliorer la biodisponibilité des systèmes synthétiques. La formulation de particules d'ADN “ furtives ” à partir de vecteurs synthétiques greffés à des polymères hydrophiles devrait conférer à ces particules, des potentialités de transport et de persistance dans les milieux biologiques qui limitaient jusqu'à maintenant l'efficacité des particules d'ADN “ conventionnelles ”. Dans le cas d'une administration par la voie systémique, cette stratégie, en minimisant les interactions avec les constituants sanguins, devrait permettre d'éviter leur trop rapide élimination de la circulation

sanguine et donc d'augmenter leur probabilité d'atteindre leur cible cellulaire. Cette stratégie pourra aussi jouer un rôle additionnel en diminuant la toxicité des complexes.

Les vecteurs synthétiques élaborés au cours de ce travail font suite à des études réalisées au laboratoire avec des polymères particuliers (les télomères et cotélomères (lipo)polyaminés) qui se sont avérés être des agents de transfection très efficaces *in vitro*.⁴⁻⁶ Pour l'élaboration de particules d'ADN "furtives", nous avons élaboré deux séries de (co)télomères, l'une de type "di-block" qui est composée d'une partie polyaminée connectée à une partie polyéthylène glycol, l'autre de type "random" dont la structure repose sur une combinaison aléatoire d'unités aminés et de résidus tétraéthylène glycol (TEG) ou trishydroxyméthyle (THM) (Schéma 1).

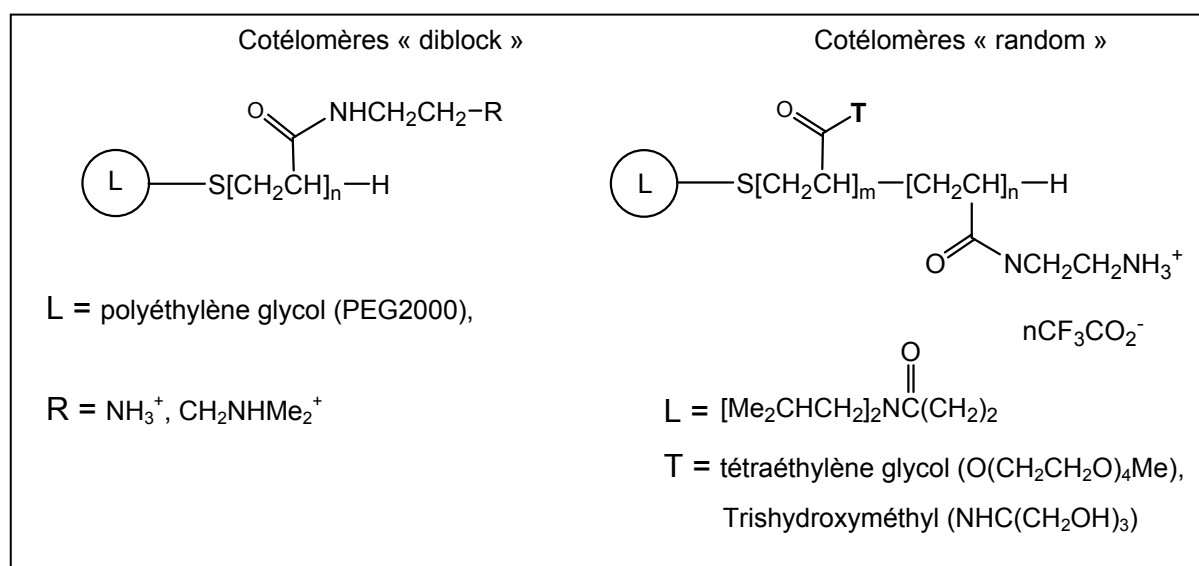


Schéma 1 : structures des cotélomères « diblock » et « random » synthétisés

⚙ Les conjugués AMD3100-lipides, -télomères et -polymères pour la formulation de particules ciblées et un transfert de gène spécifique

La nécessité de disposer d'un arsenal de vecteurs synthétiques permettant de réaliser un transfert de gène spécifique, nous a incité à élaborer divers conjugués de l'AMD3100 (Schéma 2) qui peuvent être utilisés pour la formulation de particules d'ADN ciblées. L'AMD3100 est une molécule de faible masse moléculaire et est un antagoniste puissant et

spécifique du récepteur de chimiokines CXCR-4. Ce récepteur est un des deux principaux corécepteurs utilisés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) pour infecter notamment les lymphocytes T4. Ce récepteur est aussi surexprimé par certaines tumeurs cérébrales et par des métastases du cancer du sein. La conjugaison de l'AMD3100 à des lipoplexes et polyplexes peut donc constituer un outil de choix pour réaliser la transfection spécifique de cellules tumorales et/ou infectés par le VIH qui expriment CXCR4.

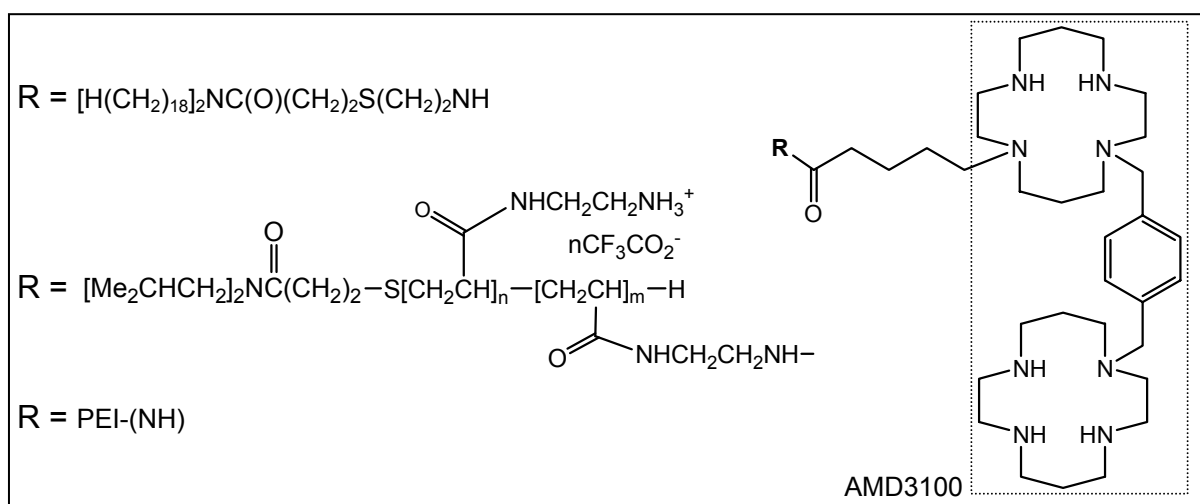


Schéma 2 : conjugués de l'AMD3100



La **première partie** de ce manuscrit est consacrée à une mise au point bibliographique concernant la thérapie génique et les vecteurs de transfert de gènes, et plus particulièrement les vecteurs synthétiques. Nous insisterons sur les divers problèmes posés par le transfert de gènes *in vitro* et *in vivo* et en particulier les étapes limitantes comme le trafic extracellulaire et l'entrée spécifique dans la cellule.

La **deuxième partie** est consacrée aux différents cotélomères “furtifs” développés au cours de ce travail de thèse. Nous aborderons sous forme d'une publication (Bioconjugate Chemistry 2002, 13(6), 1292-1301), leur synthèse et l'évaluation *in vitro* de leur potentiel en tant qu'agent de transfert de gènes.

La **troisième partie** est consacrée aux différents conjugués AMD3100 que nous avons élaborés. Nous aborderons également sous forme de publication qui a été soumise à Bioconjugate Chemistry, leur synthèse et leur aptitude à réaliser un transfert de gènes spécifique dans des cellules CXCR4 (+).

Une **conclusion** sur l'ensemble de ces travaux permettra de faire un bilan de nos résultats, d'énoncer les retombées de notre travail et les perspectives de recherche à venir.

Références bibliographiques

1. Fischer, A.; Hacein-Bey, S.; and Cavazzana-Calvo, M. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 615-621.
2. Hacein-Bey-Abina, S.; Von Kalle, C.; Schmidt, M.; Le Deist, F.; Wulffraat, N.; McIntyre, E.; Radford, I.; Villeval, J. L.; Fraser, C. C.; Cavazzana-Calvo, M.; and Fischer, A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 255-256.
3. Felgner, P. L.; Barenholz, Y.; Behr, J. P.; Cheng, S. H.; Cullis, P.; Huang, L.; Jessee, J. A.; Seymour, L.; Szoka, F.; Thierry, A. R.; Wagner, E.; and Wu, G. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum. Gene Ther.* **1997**, *8*, 511-512.
4. Nathalie Van Craynest. Nouveaux vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes. Thèse de Doctorat 19-7-2000. Université de Nice-Sophia Antipolis.
5. Van Craynest, N.; Santaella, C.; Boussif, O.; and Vierling, P. Polycationic telomers and cotelomers for gene transfer: synthesis and evaluation of their an vitro transfection efficiency. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 59-75.
6. Verderone, G.; Van Craynest, N.; Boussif, O.; Santaella, C.; Bischoff, R.; Kolbe, H. V.; and Vierling, P. Lipopolycationic telomers for gene transfer: synthesis and evaluation of their in vitro transfection efficiency. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1367-1379.

PARTIE I
GENERALITES SUR LA THERAPIE GENIQUE



I Introduction : le gène comme médicament

L'être humain est constitué de milliards de cellules d'aspects et de fonctionnements extrêmement différents. Toutes ces cellules sont issues de la même cellule initiale : la cellule œuf ou zygote. Le développement et la formation de l'être humain résultent de divisions multiples et successives de cette cellule initiale, suivies d'une différenciation progressive des cellules filles en plusieurs centaines de types cellulaires différents. Ce processus de différenciation et de morphogenèse est propre aux cellules eucaryotes. La particularité de ces cellules est la présence d'un compartiment interne spécifique et séparé du reste de la cellule, le noyau, qui renferme l'information génétique responsable de cette diversité. Cette information a pour support une macromolécule complexe : l'ADN (acide désoxyribonucléique). L'unité structurale de l'ADN est le nucléotide, lui-même composé d'un sucre (pentose), d'un groupement phosphate et d'une base azotée. L'enchaînement de deux chaînes de nucléotides appariés par leurs bases détermine une structure tridimensionnelle dite en "double hélice" proposée il y a maintenant 50 ans par Watson et Crick. Un fragment de cette double hélice composé de plusieurs nucléotides est l'unité de base de l'information génétique : le gène. L'ensemble des gènes, qui constitue le patrimoine génétique d'un être vivant (génome), code pour un ensemble de protéines (protéome) qui assure la majorité des fonctions et spécificités cellulaires et tissulaires.

La transformation de l'information génétique portée par les gènes en fonction, assurée par les protéines, se déroule lors d'un processus complexe qui regroupe plusieurs étapes. La transcription du gène en différents acides ribonucléiques (ARN), l'ARN messager (ARNm), l'ARN de transfert (ARNt) et l'ARN ribosomal (ARNr). Ces trois ARN interagissent au cours du processus de traduction qui aboutit à l'assemblage d'une chaîne polypeptidique d'ordre prédéterminé précurseur de la protéine fonctionnelle. Après maturation, ces protéines assurent de nombreuses fonctions vitales dans la cellule et dans l'organisme.

Au cours des multiples divisions cellulaires, le matériel génétique est théoriquement recopié à l'identique. Chaque cellule reçoit ainsi normalement la même information codant pour une protéine fonctionnelle. Mais, des erreurs peuvent subvenir durant ces phénomènes et persister par la suite, malgré les mécanismes de contrôles cellulaires. Ces mutations sur la molécule d'ADN, qui peuvent aussi être induites par des agents extérieurs (UV, produits chimiques, radiations) sont majoritairement muettes et n'ont aucune incidence sur l'intégrité des protéines produites. Cependant, il arrive que la mutation touche une partie codante du

gène entraînant la perte d'activité ou l'absence d'une protéine. Les conséquences sont la plupart du temps graves car elles entraînent des pathologies d'origine génétique, héréditaires ou acquises. Par exemple, la mucoviscidose encore appelée fibrose kystique, est la plus fréquente des maladies héréditaires mortelles des populations européennes, et touche en France 1/3000 naissances environ. La mutation du gène sur le chromosome 7, la plus fréquemment identifiée (75% des cas), correspond à la délétion sur la protéine CFTR d'un seul acide aminé, une phénylalanine. La pathologie chez l'Homme se manifeste essentiellement au niveau des poumons, dont les voies aériennes sont progressivement obstruées par un mucus trop visqueux. Parmi les pathologies acquises, les cancers issus de la division anarchique et incontrôlable des cellules tumorales, représentent les plus importantes causes de décès dans les pays développés. Les oncogènes seraient des gènes conférant à la cellule une activité de prolifération. Ils servent à coder des facteurs de croissance et leurs récepteurs ainsi que des protéines servant à la division cellulaire. Normalement, ils agiraient essentiellement lors de la période embryonnaire, et en dehors de cette période, leur activation, par exemple à la suite d'une mutation, serait susceptible d'entraîner une synthèse excessive de la protéine correspondante. Cette protéine permettrait à la cellule d'échapper aux systèmes habituels de régulation et contribuerait à la transformer en cellule maligne. Les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, peuvent entraîner une progression tumorale lorsqu'ils sont abolis. Ceux-ci interviennent normalement lorsque le matériel génétique est lésé : soit ils permettent une réparation du matériel, soit ils déclenchent la mort cellulaire ou apoptose. Ainsi, si la protéine codée par l'anti-oncogène est anormale ou manquante, le système de régulation ne fonctionnerait plus, et la cellule non réparée, se diviserait en cellules malignes.

Actuellement, on dénombre environ 4000 maladies d'origine génétique. La plupart de ces maladies sont rares et n'affectent que très peu de personnes. Ces maladies dites orphelines n'ont, dans la majorité des cas, aucun traitement curatif.

Parallèlement aux thérapies conventionnelles, qui traitent les symptômes des maladies génétiques, le concept de thérapie génique déjà imaginé il y a une trentaine d'années, consiste à traiter la base de l'anomalie génétique en utilisant le gène comme médicament. Cette thérapie représente un avantage certain par rapport à l'administration répétée de protéines recombinantes comme dans le cas de l'hémophilie ou du diabète. Le gène directement inséré dans la cellule permettrait la production continue de la protéine, afin d'obtenir des effets bénéfiques sur une période plus longue, tout en diminuant les effets secondaires d'une administration répétée de protéines recombinantes.

Actuellement, de nombreuses équipes de recherche dans le monde se mobilisent pour expérimenter et évaluer les applications de la thérapie génique dans des pathologies aussi diverses que les maladies génétiques, mais aussi les maladies acquises (cancer, SIDA, maladies neurodégénératives). Néanmoins le succès de cette thérapie repose en grande partie sur l'efficacité du transfert du gène médicament (transgène) vers son site d'action. L'idéal serait qu'il traverse efficacement et sans dégradation les nombreuses barrières biologiques jusqu'au noyau, et qu'il s'insère en lieu et place du gène défaillant.

Le but de la thérapie génique est donc d'insérer un gène médicament dans une cellule afin qu'il exprime une protéine. Selon le type de cibles cellulaires, on distingue la thérapie des cellules germinales (héréditaire) et la thérapie des cellules somatiques (non héréditaire).

La génothérapie germinale consiste à introduire un gène dans les cellules de la lignée germinale d'un individu afin de transmettre ce gène à sa descendance, ou bien encore de modifier précocement le génome d'un embryon. Cette thérapie est inapplicable à l'Homme en France pour des raisons éthiques comme le précise la loi de bioéthique du 29 juillet 1994 relative au respect du corps humain qui précise que "toute pratique eugénique tendant à l'organisation de la sélection des personnes est interdite" et que "sans préjudice des recherches tendant à la prévention et au traitement des maladies génétiques, aucune transformation ne peut être apportée aux caractères génétiques dans le but de modifier la descendance de la personne". Néanmoins il n'existe aucune réglementation limitant la thérapie génique germinale ou l'utilisation d'embryons humains aux Etats-Unis pour autant que ces techniques obtiennent l'autorisation de la FDA¹ (Food and Drug Administration).

La génothérapie somatique consiste à obtenir une correction phénotypique d'un groupe de cellules par l'expression d'un transgène, sans pour autant toucher au patrimoine génétique germinale. Cette thérapie évite donc, à priori, les risques de propagation verticale de transgènes artificiels dans l'espèce. La thérapie génique somatique est donc acceptée au niveau international, avec un encadrement et des procédures de contrôle variant d'un pays à l'autre. En France, tout protocole d'essai clinique doit passer devant la Commission Consultative pour la Protection des Personnes se prêtant à la Recherche Biomédicale (CCPPRB). L'avis de cette commission est ensuite transmis à l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire et des Produits de Santé) qui autorise le protocole et peut le suspendre avec avis des experts.

Les récents progrès de la génomique, science qui cherche à cartographier le génome humain, ont permis d'établir de nombreuses cartes de liaisons génétiques de caractères. Ce travail scientifique colossal qui a commencé en 1990 et qui cherche à identifier les quelques 30000 gènes du corps humain, est arrivé à son terme en avril 2003² (pour la dernière ébauche publiée correspondant à 99% du génome, voir référence³). Le potentiel représenté par cette accumulation de données pour la thérapie génique est énorme, à condition de transformer les gènes en médicaments, et de les insérer efficacement dans les cibles cellulaires. Cependant, de nombreux obstacles ralentissent le cheminement vers une thérapie génique fiable et efficace. Citons par exemple la grande diversité de pathologies, qui nécessite une application au cas par cas de la thérapie, ainsi que la fragilité et l'incapacité du gène à subsister dans les milieux biologiques ou à traverser les membranes cellulaires de part sa nature polyanionique, et enfin, le manque de spécificité vers un organe ou un type cellulaire. Malgré les nombreuses approches envisagées, la thérapie génique est ainsi tributaire d'un système gène/vecteur fiable qui va permettre au transgène de migrer vers sa cible cellulaire afin de s'exprimer efficacement et durablement.

II Objectifs de la thérapie génique

II-1 Les pathologies visées

La thérapie génique est une méthode ambitieuse de traitement qui peut s'appliquer à un grand nombre de maladies, la preuve en est l'importante série d'essais cliniques engagés dans le monde⁴ (figure 1). On recense environ 600 essais cliniques incluant quelques 3500 patients. Contrairement à l'idée que la thérapie génique était toute indiquée pour soigner les maladies héréditaires, la grande majorité des protocoles concerne des maladies acquises telles que les cancers (2/3 des protocoles). On retrouve loin en deuxième position les maladies monogéniques, qui sont caractérisées par une seule copie anormale du gène. Ces maladies dites Mendélienne sont rares mais très graves, comme par exemple l'anémie falciforme ou la mucoviscidose. La majorité des protocoles se déroule aux Etats-Unis et dans les pays développés. Cependant, malgré le grand nombre d'essais de thérapie génique engagés, les résultats significatifs sont peu nombreux. Le décès d'un patient aux Etats-Unis en 1999 au cours d'un protocole de thérapie génique⁵ a remis en cause la faisabilité de tels traitements. L'espoir est revenu, en 2000, grâce à l'équipe du Dr Fischer et à la guérison d'enfants atteints

d'un déficit immunitaire combiné sévère lié à X1 (X1-SCID).^{6,7} Néanmoins, les derniers essais ont montré les limites de cette thérapie, avec certains "enfants bulles" qui ont développé des leucémies à la suite de l'activation d'oncogènes provoquée par l'insertion du transgène.⁸

D'autres résultats récents, observés dans la pathologie ADA-SCID (absence de l'adénosine désaminase privant ainsi le sujet de système immunitaire), qui est une variante de la X1-SCID, sont encourageants⁹ car les enfants traités par le gène de l'enzyme ont vu peu à peu leur système immunitaire se régénérer.

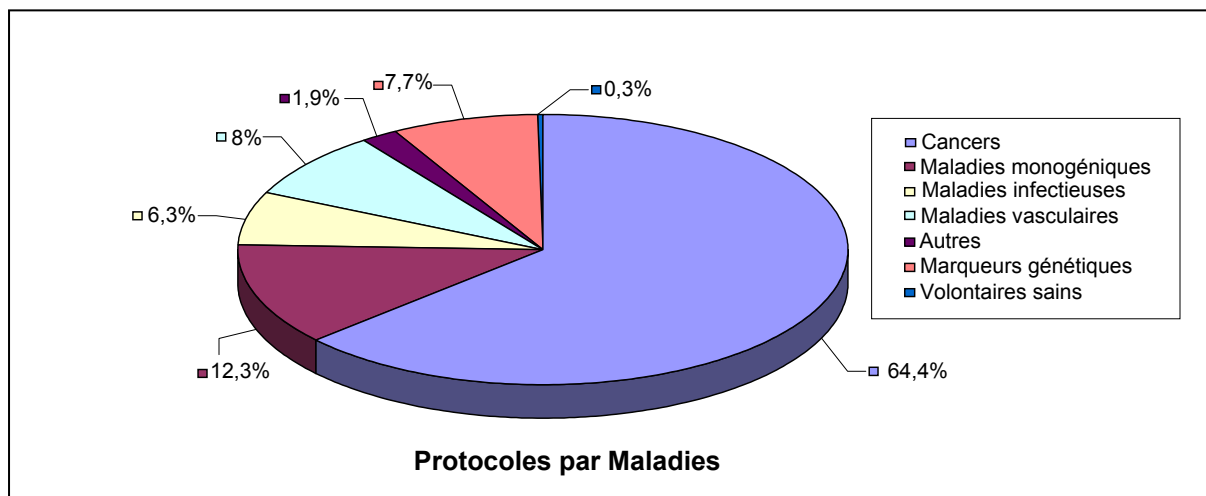


Figure 1 : répartition du pourcentage de protocoles par maladies

Par ailleurs, des progrès significatifs ont été réalisés dans le développement de systèmes de transfert de gènes pour le traitement de l'hémophilie A et B. Ainsi, des taux thérapeutiquement efficaces de facteurs de coagulation VIII et IX et sur une longue période ont été obtenus à l'aide des vecteurs AAV et lentiviraux.¹⁰

II-2 Les obstacles du transfert de gène

L'utilisation du gène comme médicament implique la connaissance des nombreux processus qui régissent la pharmacologie d'un principe actif (formulation, mode et site d'administration, site d'action) et, dans le cas particulier du gène médicament, son expression au sein de la cellule en protéines thérapeutiques.

Dans l'optique d'une utilisation thérapeutique *in vivo*, le gène médicament peut être amené vers sa cible de deux manières :

- par la voie systémique (injection intraveineuse ou intra-artérielle),
- par application locale (injection directe dans un tissu ou une tumeur cible, par aérosol).

Cependant, l'ADN est une molécule très fragile et facilement biodégradable. Par ailleurs, sa nature polyanionique et sa taille l'empêchent de pénétrer passivement dans les cellules. Par conséquent, ces deux voies d'administration vont présenter des obstacles physiologiques majeurs que le gène ne peut franchir seul pour atteindre sa cible. Afin de parvenir à celle-ci, le gène doit être associé à un système capable de le compacter, de le protéger des agressions du milieu biologique (en particulier des nucléases) et de le véhiculer au travers des différentes barrières physiologiques vers son site d'action. Enfin, le complexe vecteur/gène doit adhérer aux cellules, pénétrer dans celles-ci et délivrer le gène dans le noyau cellulaire. D'autre part, il doit si possible cibler les tissus ou les cellules en dysfonctionnement et non les cellules saines.

Ce système vecteur est l'outil indispensable au succès d'une thérapie génique. Nous présenterons dans les chapitres suivants les différents systèmes vecteurs et outils qui permettent de réaliser le transfert de gènes. Si l'utilisation de vecteurs de gènes a largement contribué au succès et au développement médical du transfert de gènes, le transfert optimal du gène reste encore tributaire de nombreux obstacles. Cette méthode ne sera fiable et efficace que si ces vecteurs s'affranchissent de ces nombreuses barrières.

Les différents obstacles, barrières et étapes majeurs qui jalonnent le transfert de gènes (depuis la formulation du système de transfert jusqu'au transfert du gène lui-même dans la cellule et son expression en protéines) ont été identifiés et peuvent être résumés de la façon suivante (figure 2).

1. Formulation du système vecteur/gène et acheminement du complexe vecteur/gène vers la cellule (par voie systémique ou injection locale),
2. Entrée du complexe dans la cellule
3. Migration du complexe vers le noyau
4. Libération du gène dans le noyau

5. Utilisation de la machinerie cellulaire hôte afin de transcrire le gène en ARN puis en protéines thérapeutiques.

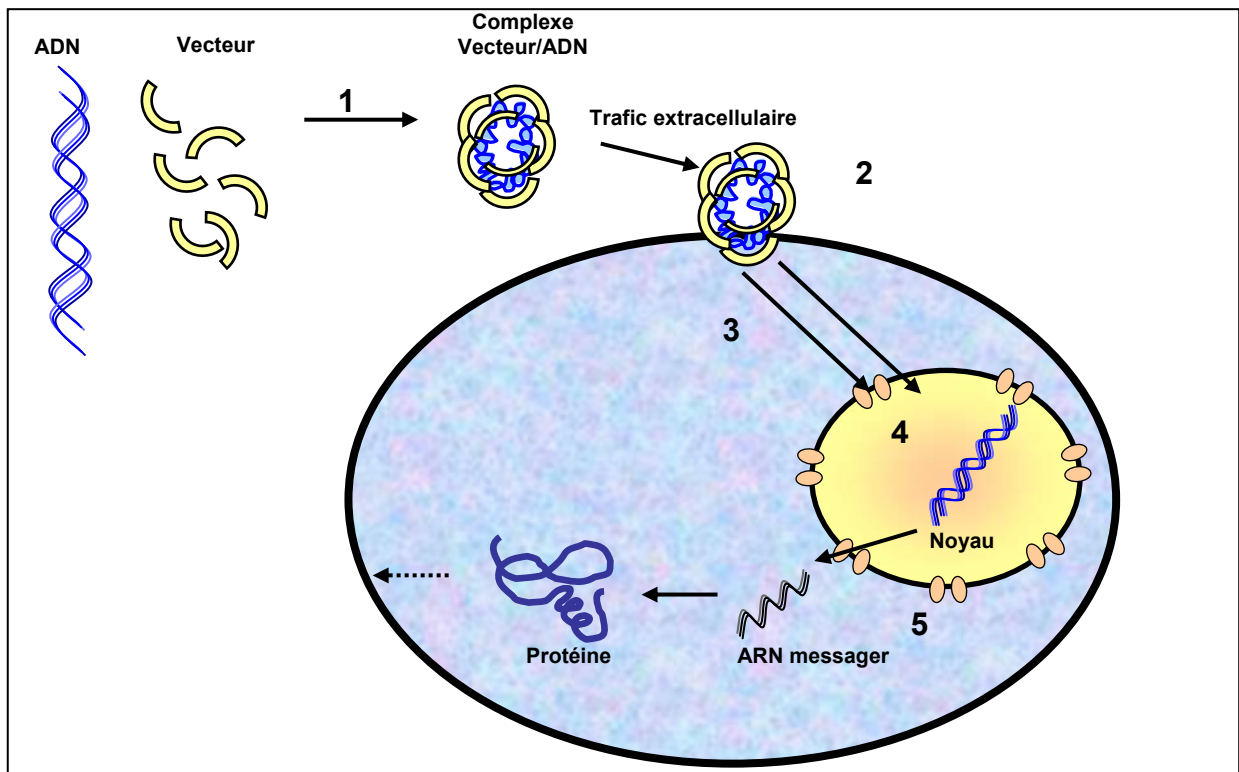


Figure 2: obstacles, barrières et étapes majeurs qui jalonnent le transfert de gènes

Parmi ces barrières, nous insisterons plus particulièrement dans cette partie bibliographique sur le trafic extracellulaire et l'entrée dans la cellule. En effet, les travaux de recherche réunis dans ce mémoire constituent des tentatives pour faciliter le trafic extracellulaire du système de transfert de gène de son site d'administration vers la cellule cible ou pour faciliter la reconnaissance spécifique du système de transfert de gènes par sa cellule cible.

Enfin, les différentes approches, outils et techniques, ainsi que les autres étapes limitantes du transfert de gènes seront décrites de manière non exhaustive dans les chapitres suivants.

II-3 Les approches envisagées

A côté des expérimentations *in vitro* de transfert de gènes dans les cellules en culture, de nombreuses approches existent pour introduire un transgène chez un patient. Les stratégies

les plus courantes sont les méthodes *ex vivo* et *in vivo*. La méthode *ex vivo* est basée sur la technique de transplantation cellulaire et celle-ci est applicable à tous types de tissus transplantables. Elle consiste à prélever des cellules cibles chez un patient, à les cultiver de manière appropriée et à les traiter dans les conditions de culture cellulaire avec la combinaison transgène / vecteur¹¹. Les cellules ainsi transfectées sont réimplantées chez le patient. Cette méthode s'est révélée efficace pour transfecter de nombreux types cellulaires (hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales¹², fibroblastes). C'est la technique la plus couramment utilisée dans les essais cliniques. Elle a notamment été utilisée pour le traitement des déficits immunitaires sévères chez les "enfants bulles". Par ailleurs, elle permet de s'affranchir de nombreux obstacles lors du trafic extracellulaire du vecteur lorsqu'il est administré *in vivo*. Néanmoins, cette approche reste compliquée et coûteuse, de part les différentes technologies employées (chirurgie, culture cellulaire).

L'approche *in vivo* consiste à administrer directement le gène médicament au patient. Cette technique permet d'injecter par les diverses voies d'administration (systémique, locale) et par différentes méthodes, le gène seul ou en association avec un vecteur. Mais, l'efficacité de cette méthode est fortement compromise par les multiples barrières physiologiques que doit franchir le transgène pour atteindre sa cible. De plus, l'expression du gène est souvent diffuse (cas d'une injection par voie systémique) ou, au contraire, localisée au niveau du site d'injection. Par ailleurs, elle est souvent transitoire et nécessite des injections répétées. La fiabilité de cette technique est donc tributaire d'un système qui pourra véhiculer le gène thérapeutique de manière efficace à son site d'action.

III Les outils du transfert de gènes

Actuellement, on distingue deux grandes familles de systèmes de vectorisation de gènes, d'un côté les vecteurs viraux et d'un autre, les vecteurs non viraux. La barrière entre ces deux familles tend à s'estomper, car on observe progressivement l'apparition de vecteurs hybrides possédant à la fois des structures virales et non virales.¹³ Parallèlement à ces deux familles, il existe des méthodes physiques originales qui seront décrites de manière succincte. Ces différents vecteurs ainsi que leurs modes d'administration et les différentes méthodes physiques, sont récapitulés dans le schéma suivant¹⁴ (figure 3):

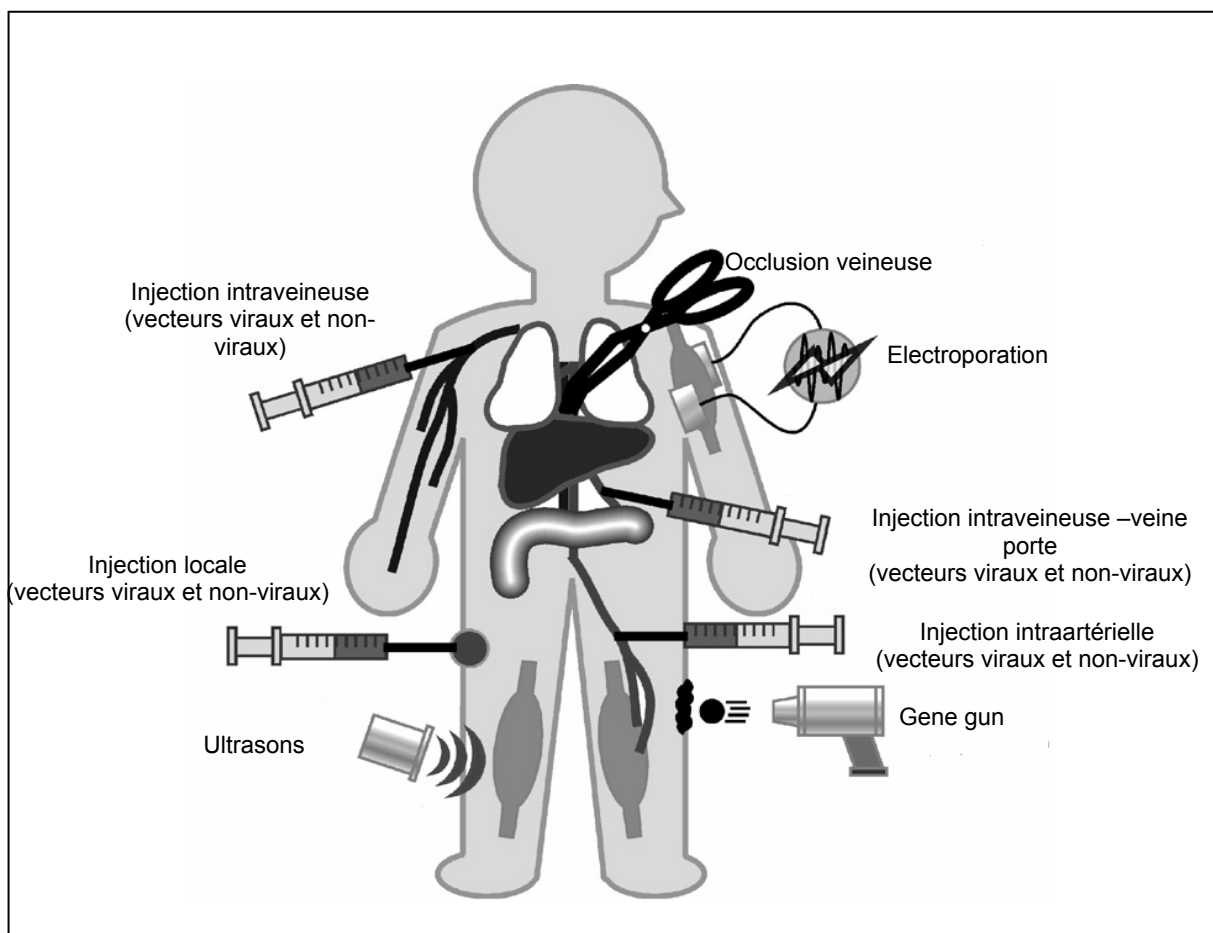


Figure 3 : voies d'administration et méthodes physiques du transfert de gènes

III-1 Les vecteurs de transfert de gènes

III-1-1 Les vecteurs viraux

Les virus, de part leur longue évolution et leur tropisme cellulaire, représentent des outils de choix pour la thérapie génique. Ils pénètrent spécifiquement et efficacement dans de multiples cellules en utilisant divers mécanismes.¹⁵ Ensuite, ils s'approprient admirablement la machinerie cellulaire pour exprimer leur patrimoine génétique et se multiplier afin d'infecter d'autres cellules. C'est pourquoi, ces dernières années, la plupart des protocoles de thérapie génique ont fait appel à ce genre de vecteur.³ Cependant les virus sauvages ne peuvent servir directement à des expériences de thérapie génique, car la plupart d'entre eux sont pathogènes et dangereux pour l'homme. Afin de devenir un vecteur, le virus est modifié

par génie génétique. La partie infectieuse de son patrimoine est retirée et remplacée par le gène thérapeutique. Toutefois, le virus conserve les nombreuses structures qui lui permettent d'infecter une cellule (protéines de l'enveloppe, protéine fusogène, etc.). Ces particules virales non-pathogènes ont été utilisées pour de nombreuses applications *in vivo*¹⁶ et suivant le type de tissus ou de cellules ciblés, différents vecteurs ont été utilisés. Les vecteurs viraux sont classés en deux grands groupes : ceux qui intègrent leur patrimoine génétique à l'ADN de la cellule hôte (virus adénoassociés et rétrovirus) et ceux qui ne l'intègrent pas (virus adénoviraux et herpétiques).

III-1-1-1 Les virus adénoassociés (AAV)

Les AAV sont des membres défectueux de la famille des parvovirus. Ils possèdent un simple brin d'ADN et sont non pathogènes pour l'homme. Pour cette dernière raison, leurs applications en thérapie génique n'ont cessé d'augmenter ces dernières années.^{17;18} L'avantage de ces virus est leur capacité à intégrer leur patrimoine dans la cellule hôte, permettant une expression prolongée du gène. Par ailleurs, ils sont capables d'infecter à la fois des cellules en division et quiescentes. Cependant, ces virus souffrent d'inconvénients majeurs, comme leur capacité de stockage d'un matériel génétique exogène limitée à 4,5 kb (kilobases) et leur difficulté de production.

III-1-1-2 Les rétrovirus

Les rétrovirus possèdent un patrimoine génétique particulier sous forme de double brin d'ARN, ainsi qu'une enzyme spécifique, la transcriptase reverse (TR), qui permet le passage de l'ARN à l'ADN proviral.¹⁹ Ces virus sont impliqués dans de graves pathologies humaines (leucémies, SIDA). C'est pourquoi les rétrovirus recombinants servant de vecteurs sont modifiés de manière à conserver leur capacité d'intégration du génome à la cellule hôte, tout en inhibant leur capacité de réplication. Cependant, de nombreux inconvénients sont liés à leurs utilisations. Citons la faible capacité d'incorporation d'un exogène (8 kb) et le manque de spécificité cellulaire. En effet, les protéines de l'enveloppe sont capables de se lier à de nombreux récepteurs portés par différents types de cellules. Ensuite, l'intégration aléatoire de leur génome peut engendrer une mutagenèse conduisant à une anomalie du cycle cellulaire, et

activer des oncogènes et, comme dans le cas des “ enfants bulles ”, aboutir à des leucémies. Enfin, la plupart de ces virus n’infectent que des cellules en division.

III-1-1-3 Les adénovirus

Les adénovirus sont particulièrement adaptés aux protocoles de thérapie génique. Ils sont responsables chez l’homme d’infections bénignes (conjonctivites, gastroentérites...) et sont peu pathogènes. Actuellement, ces virus sont les outils les plus prometteurs et aussi les plus utilisés en thérapie génique, malgré le décès d’un jeune patient en 1999.^{5;20} Ce sont des virus non enveloppés de forme icosaédrique possédant un double brin d’ADN de 36 kb. Après fixation et pénétration par endocytose dans la cellule, le génome viral migre vers le noyau mais ne s’intègre pas au patrimoine génétique de l’hôte, ne provoquant qu’une expression transitoire du gène thérapeutique, mais évitant les risques de mutagenèse. Par ailleurs, ces virus sont capables d’infecter à la fois des cellules en division et quiescentes. Leurs limitations résident dans la faible capacité d’incorporation d’un exogène (7,5 kb), mais récemment, une nouvelle génération d’adénovirus a vu le jour, et celle-ci possède une capacité d’incorporation allant jusqu’à 35 kb. L’inconvénient majeur à l’utilisation de ces vecteurs est lié à la forte réaction immunogène de l’hôte, qui développe des anticorps anti-adénovirus empêchant ainsi une administration répétée de ces vecteurs.

III-1-1-4 Les virus herpétiques

Le virus herpétique (HSV) est un virus à ADN neurotrophique peu pathogène pour l’homme. Les vecteurs utilisant ce virus sont capables d’infecter de nombreuses cellules, grâce aux multiples récepteurs reconnaissant les protéines de l’enveloppe. De plus, le virus modifié perd sa capacité répliquative et peut accepter des cassettes allant jusqu’à 25 kb. Son neurotropisme est particulièrement attractif pour le traitement des cancers cérébraux.²¹

III-1-1-5 Conclusion

Les vecteurs viraux possèdent de nombreux avantages pour le transfert de gène. Leur succès dans les protocoles de thérapie génique³ repose sur leur important potentiel de transfection *in vivo*. Cependant, ils souffrent de sévères inconvénients. En effet, l’intégration

d'un exogène de grande taille est difficile. Certains engendrent des réactions immunitaires, d'autres peuvent redevenir pathogènes après mutagenèse. Enfin, leur production et leur manipulation sont compliquées et coûteuses.

III-1-2 Les vecteurs synthétiques

Les vecteurs synthétiques représentent une alternative prometteuse aux vecteurs viraux. Ils sont simples à élaborer, à utiliser et sont peu immunogènes. Cependant, leur grand handicap réside dans leur plus faible efficacité. Par ailleurs, il est souvent très difficile, voire impossible, d'extrapoler les résultats obtenus sur des cellules en culture aux expériences *in vivo* de transfert de gènes. Cette absence de corrélation est souvent liée aux obstacles rencontrés par les vecteurs de transfert de gènes lors de leur trafic extracellulaire dans les milieux biologiques.

Actuellement, il existe une multitude de vecteurs synthétiques. Ce sont des dérivés (poly)cationiques, de nature lipidique ou polymérique. Ces vecteurs sont capables d'interagir par effet électrostatique avec les phosphates anioniques de l'ADN, et de le compacter pour engendrer des particules appelées lipoplexes ou polyplexes.²² En fonction de la quantité de vecteurs utilisée, celles-ci sont de charge globale négative, positive ou neutre. Ces complexes sont pour la plupart d'entre eux très efficaces *in vitro*, mais ces niveaux de transfection ne sont pas représentatifs de l'aptitude de ces complexes à transférer *in vivo*. Par ailleurs, il est très difficile de comparer les différents vecteurs synthétiques entre eux. En effet, leur efficacité et leur toxicité dépendent de nombreux paramètres tels que la structure chimique du vecteur, la formulation des systèmes vecteur/ADN et la nature des cellules utilisées. S'y rajoutent les nombreux facteurs liés au passage *in vitro in vivo* qui ont aussi une forte et difficilement prévisible incidence sur l'efficacité des vecteurs.

Le challenge des vecteurs synthétiques est donc d'acquérir les propriétés structurales qui leur permettront de résister aux milieux extracellulaires, de cibler les cellules et d'y libérer efficacement le gène thérapeutique.

Les vecteurs synthétiques peuvent être classés en deux grandes familles : les systèmes lipidiques et les systèmes polymériques. Les paragraphes suivants vont s'attacher à décrire de manière non exhaustive, ces deux familles.

III-1-2-1 Les systèmes lipidiques

a) Les lipides (poly)cationiques et les lipoplexes

Depuis 1987, date à laquelle la première expérience de lipofection sur des cellules de mammifères a été mise en évidence avec le composé DOTMA²³ (cf. structure Schéma 1a), de nombreux lipides cationiques et polycationiques ont été synthétisés et commercialisés.²⁴⁻²⁶ La structure chimique de ces lipides (poly)cationiques s'articule autour d'un squelette commun composé d'une partie apolaire (longue chaîne hydrocarbonée saturée ou non, chaîne perfluoroalkylée, dérivé du cholestérol, ou encore de la vitamine D²⁷), d'un connecteur (acide aminé, ou plus généralement un dérivé du glycérol), et d'une tête polaire comportant une ou plusieurs fonctions amines substituées ou non (lipides monocationiques ou polycationiques linéaires, ou ramifiés, Schéma 1a et 1b).

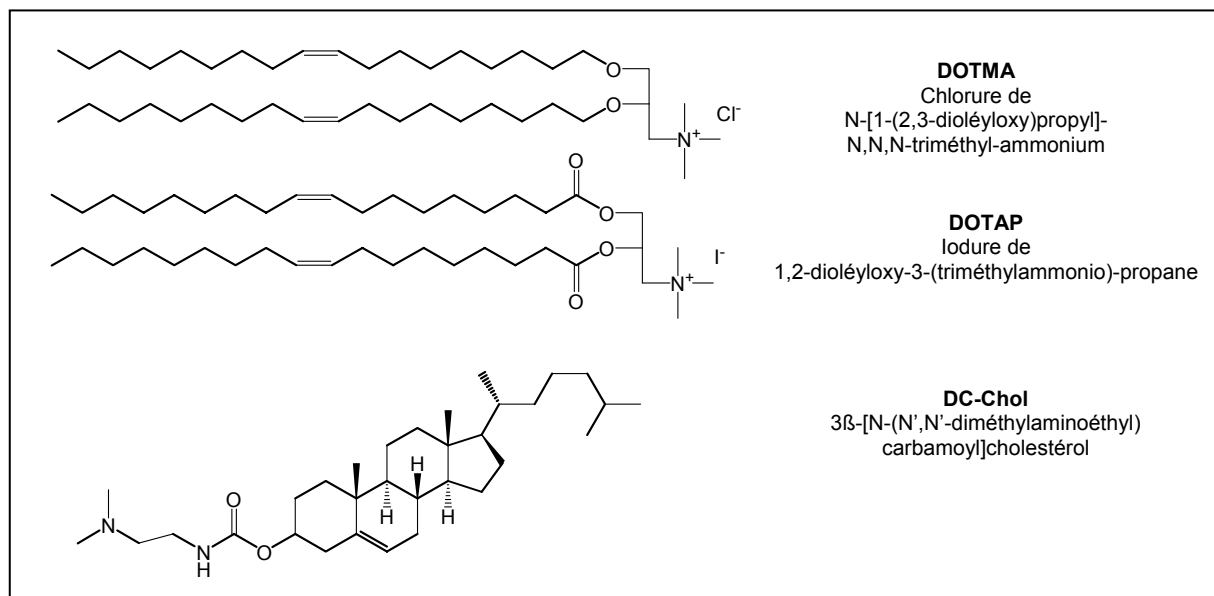


Schéma 1a : lipides monocationiques

Les lipoplexes qu'ils forment avec l'ADN²⁸ sont des agrégats complexes dont la morphologie et la taille dépendent de nombreux paramètres. Citons par exemple la cinétique, l'ordre du mélange, ou encore le rapport molaire entre le nombre de fonctions amines (N) du lipide et le nombre de phosphates (P) de l'ADN. Ce rapport N/P a également une forte incidence sur l'efficacité du transfert de gènes *in vitro* par les lipoplexes^{29;30} et sur leur devenir *in vivo*. On observe généralement pour des rapports N/P négatifs ou proches de la neutralité, la formation de larges agrégats dont la taille est ≥ 500 nm. De telles tailles sont difficilement compatibles pour des applications *in vivo*.³¹ Pour les lipoplexes présentant une charge globale positive, cette densité de charge positive favorise l'adsorption de protéines circulantes et l'adhésion non-spécifique des lipoplexes à la surface des cellules qui présentent une multitude de protéines anioniques.³²

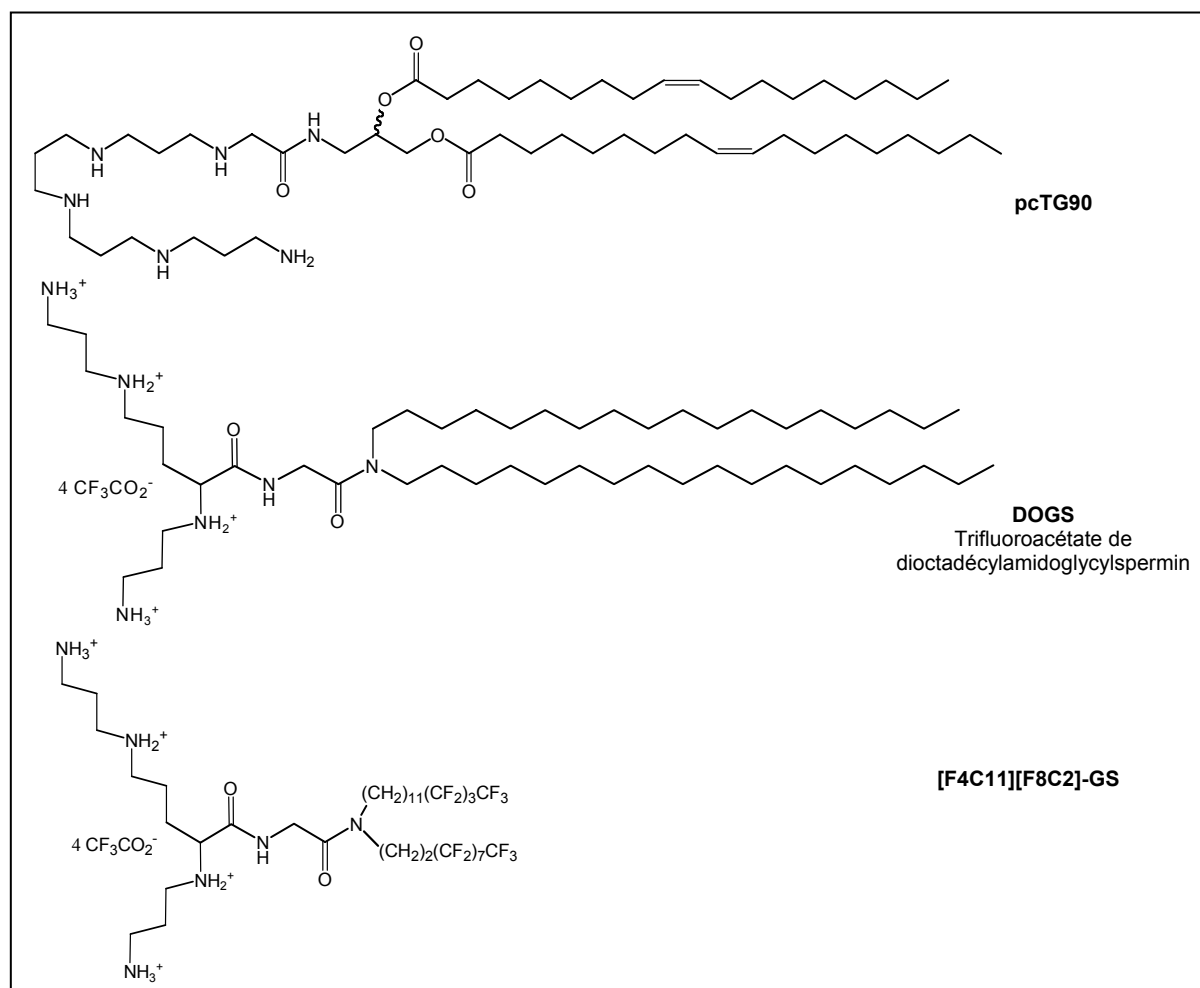


Schéma 1b : lipides polycationiques linéaires ou ramifiés et perfluoroalkylés

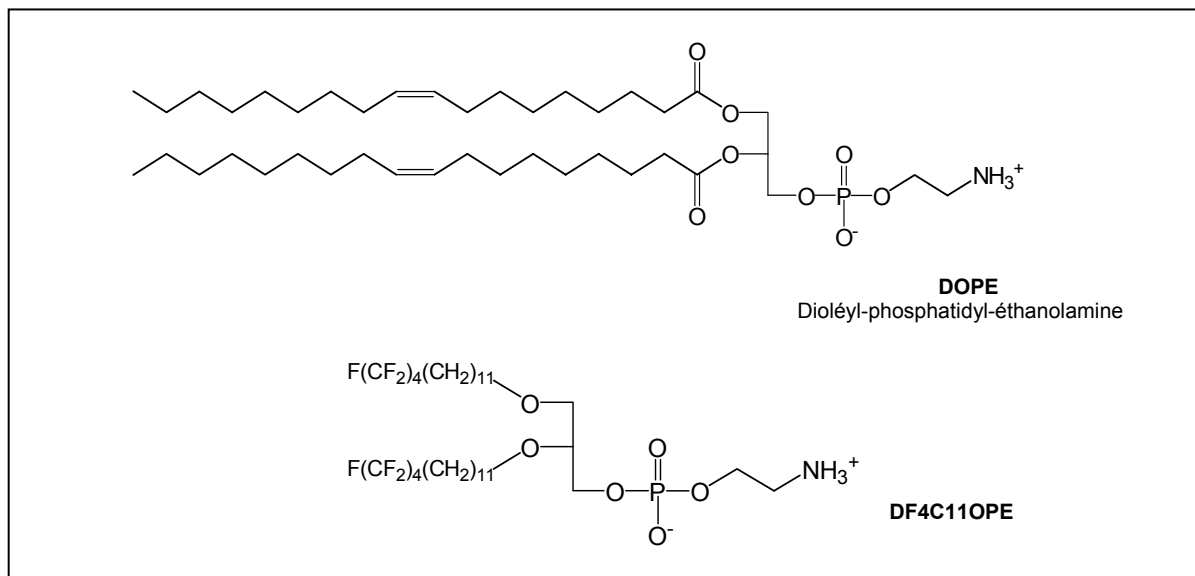


Schéma 1c : co-lipides ou lipides “ helper ” hydrocarbonés ou fluorés

Ces lipides (poly)cationiques sont très souvent utilisés avec des co-lipides ou lipides “ helper ” comme DOPE (Schéma 1c)³³ ou le cholestérol³⁴, et le plus souvent dispersés sous forme de liposomes. L'utilisation conjointe de ces co-lipides amplifie leurs propriétés transfectantes car ils favorisent la formation de bicouches lamellaires³⁵ et améliorent la stabilité des complexes. Par ailleurs, DOPE est capable d'induire une déstabilisation de la membrane endosomale lorsque l'endosome s'acidifie, ce qui facilite la libération du complexe hors de l'endosome. Ce phénomène est lié au changement d'une phase lamellaire à une phase hexagonale inverse initiée par DOPE.^{36,37} Ces points seront discutés plus loin.

Récemment, il a été développé au laboratoire des lipoplexes fluorés formulés à partir de lipides (poly)cationiques fluorés (cf composé [F4C11][F8C2]-GS dans le Schéma 1b) ou de lipides (poly)cationiques conventionnels en combinaison avec des co-lipides “ helper ” perfluoroalkylés (cf composé DF4C11OPE dans le Schéma 1c). Ces lipides et lipoplexes fluorés possèdent des propriétés originales comme une plus forte hydrophobie et surtout lipophobie. Ces propriétés sont à l'origine de leur capacité transfectante plus importante que celle des lipoplexes conventionnels aussi bien *in vitro* (y compris dans des milieux agressifs contenant des détergents) qu'*in vivo*.³⁸⁻⁴⁰ Ces lipoplexes fluorés se sont révélés être aussi efficaces dans des expériences de transfection *in vivo* que des polyplexes formulés avec PEI⁴¹. Par ailleurs, il est à noter un pouvoir “ helper ” plus important pour les co-lipides perfluoroalkylés que pour DOPE.^{39,41}

Un des inconvénients majeurs liés aux lipides (poly)cationiques (et aux polymères polycationiques) qui limitent leur potentiel en tant que vecteurs de transfert de gènes, est la formation d'agrégats renfermant plusieurs copies d'ADN dont il est difficile de contrôler la taille et donc la diffusion. Pour contourner cet inconvénient, l'élaboration de particules nanométriques ne renfermant qu'une seule copie du plasmide a été explorée (figure 4). Cette stratégie repose sur l'utilisation de détergents cationiques qui présentent une fonction thiol, facilement oxydée en liaison disulfide. Ces détergents forment des structures micellaires et lorsqu'ils sont mélangés avec le plasmide à une concentration proche de leur cmc (concentration micellaire critique), ils conduisent à des particules d'une taille proche de 30 nm qui ne renferment qu'une copie de plasmide.⁴² Ces particules sont alors stabilisées par dimérisation du détergent en lipide. Un autre intérêt, lié à la faible taille de ces nanoparticules, est leur possibilité de diffusion au travers des pores nucléaires de la cellule. Malheureusement, il est à noter que ces particules ne sont pas efficaces pour transfecter les cellules par la voie non-spécifique car elles portent une charge globale négative (nous reviendrons plus loin sur le mécanisme de transfection par les vecteurs non-viraux).⁴³

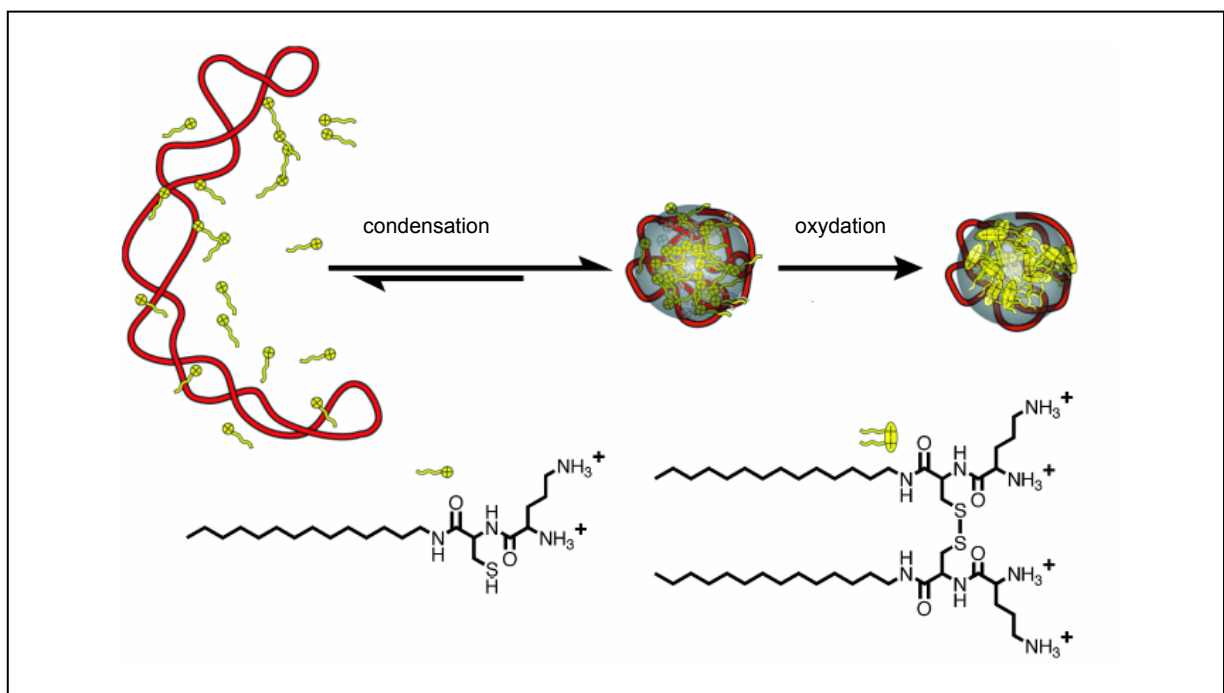


Figure 4 : formation de particules nanométriques à partir de détergents cationiques dimérisables

b) Les liposomes

Les liposomes sont des assemblages lipidiques capables d'encapsuler et de véhiculer dans leur compartiment aqueux interne des principes actifs. Ce type de vectorisation est utilisé pour le transport de médicaments depuis de nombreuses années.^{44;45} Des liposomes cationiques dans lesquels le gène est encapsulé ont aussi été développés pour le transfert de gènes.⁴⁶ Cependant, ces formulations sont plus complexes à préparer que les lipoplexes, ce qui limite leur utilisation pour le transfert de gènes.

III-1-2-2 Les systèmes polymériques et les polyplexes⁴⁷

La modularité et la solubilité en phase aqueuse des vecteurs polymériques polycationiques permettent de les utiliser rapidement et encore plus facilement que les lipides cationiques. La simplicité d'élaboration des polyplexes est un des atouts majeurs des vecteurs polymériques. Comme dans le cas des vecteurs lipidiques, il existe une multitude de vecteurs polymériques de nature chimique variée.

Les vecteurs polymériques les plus utilisés et les plus efficaces *in vitro* et *in vivo* sont les PEI (polyéthylèneimines)^{48;49} (Schéma 2). De nombreux PEI qui diffèrent par leur masse moléculaire et leur géométrie (branchée ou linéaire),^{50;51} furent synthétisés et testés. Le plus efficace d'entre eux est un PEI linéaire de masse moléculaire 22 kDa, commercialisé sous le nom d'ExGenTM500 et récemment de jetPEITM.^{52;53} Ces molécules sont capables de condenser efficacement l'ADN⁵⁴, pour conduire à des polyplexes très stables dont la taille moyenne est très homogène (environ 100 nm). Cette faible taille et la protection optimale du transgène contre les dégradations par les nucléases constituent des atouts des PEI. Par ailleurs, le nombre important de fonctions amines primaires, secondaires et tertiaires (pour les PEI branchés) leur confère un pouvoir tampon couvrant une large gamme de pH, même à pH acide et cette propriété est à l'origine de leur remarquable pouvoir "transfectant". Cette capacité tampon des PEI permet de s'opposer à l'acidification des endosomes (propriété connue sous le nom d' "éponge à protons"^{49;55}) et de provoquer leur rupture favorisant ainsi la libération dans le cytosol des polyplexes qui ont été endocytés par les cellules. Toutefois, il est à souligner une toxicité des PEI qui peut limiter leurs possibilités d'applications *in vivo*.

Parmi les polymères polycationiques explorés et qui présentent des comportements comparables à ceux des PEI, il y a les dendrimères, comme les PAMAM (polyamidoamine, StarbustTM).⁵⁶ Ce sont des macromolécules sphériques hautement réticulées qui portent en surface, un grand nombre de fonctions amines. Ce nombre dépend de leur degré de réticulation exprimé en “ génération ”. De manière identique aux PEI, les dendrimères ont une forte densité de fonctions amines à leur périphérie et couvrent une large gamme de pKa qui leur confère un pouvoir tampon à des pH également acides.

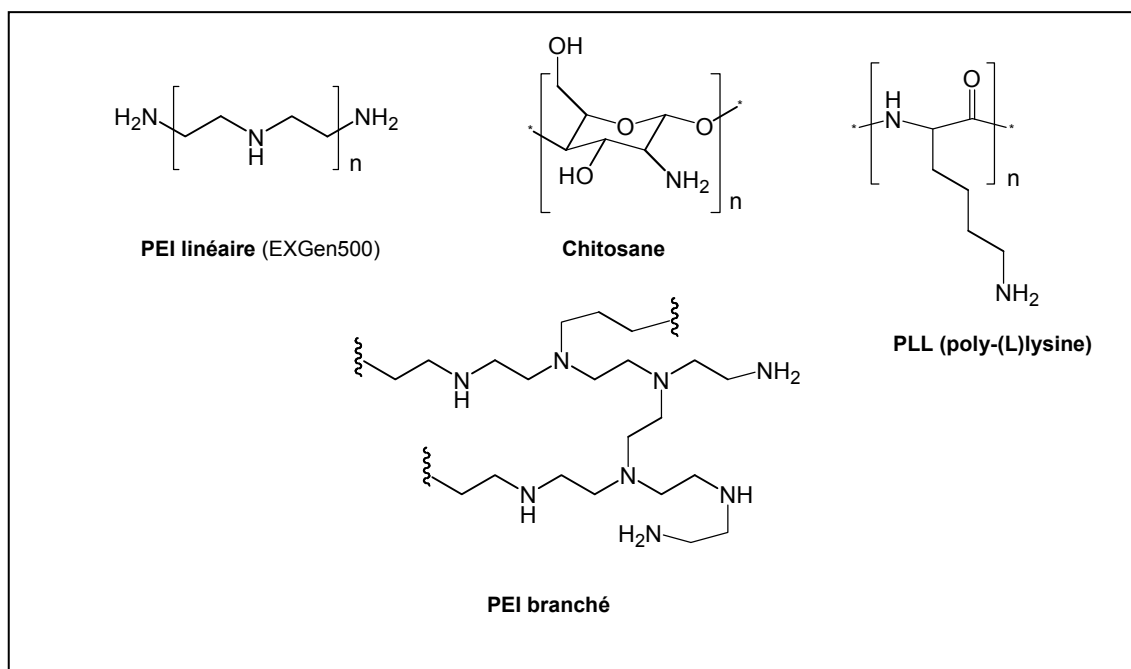


Schéma 2 : polymères cationiques

Parmi les autres polymères très utilisés en transfert de gènes, citons les poly(L-lysines) (PLL, Schéma 2) qui furent les premiers polymères utilisés comme vecteurs de gènes non viraux. Leur structure peptidique leur confère une certaine biocompatibilité, davantage en accord avec des applications *in vivo*.⁴⁷ Cependant, leur efficacité de transfection est généralement faible, ces PLL n’ayant pas le pouvoir tampon des PEI à des pH inférieurs à 7.⁵⁷

Précisons que, récemment, des polymères type polylysine obtenus par polycondensation oxydative d’un oligopeptide Cys-Lys₁₀-Cys, ont conduit à des polyplexes très efficaces en transfection.⁵⁸ Cette stratégie permet une décomplexation et une libération plus aisée du transgène dans la cellule, grâce à la fragmentation du polymère par réduction des ponts disulfures. Par ailleurs, cette fragmentation s’accompagne également d’une diminution de la toxicité généralement liée à la présence de polymères aminés dans la cellule.

Au laboratoire, une grande diversité de (lipo)polymères polyaminés originaux a été développée comme vecteurs de gènes. Il s'agit de télomères ou cotélomères qui sont obtenus via une synthèse chimique originale : la télomérisation⁵⁹. La synthèse (décrite plus en détail dans le chapitre II) permet d'obtenir des polymères ayant un degré de polymérisation contrôlé. La facilité d'élaboration et de modifications structurales a permis d'obtenir des télomères et cotélomères, molécules composées respectivement d'un ou deux résidus polymérisés aléatoirement (schéma 3). Les (co)téloplexes issus de la complexation de ces molécules avec l'ADN ont démontré une excellente aptitude à transférer les cellules en culture.^{60;61}

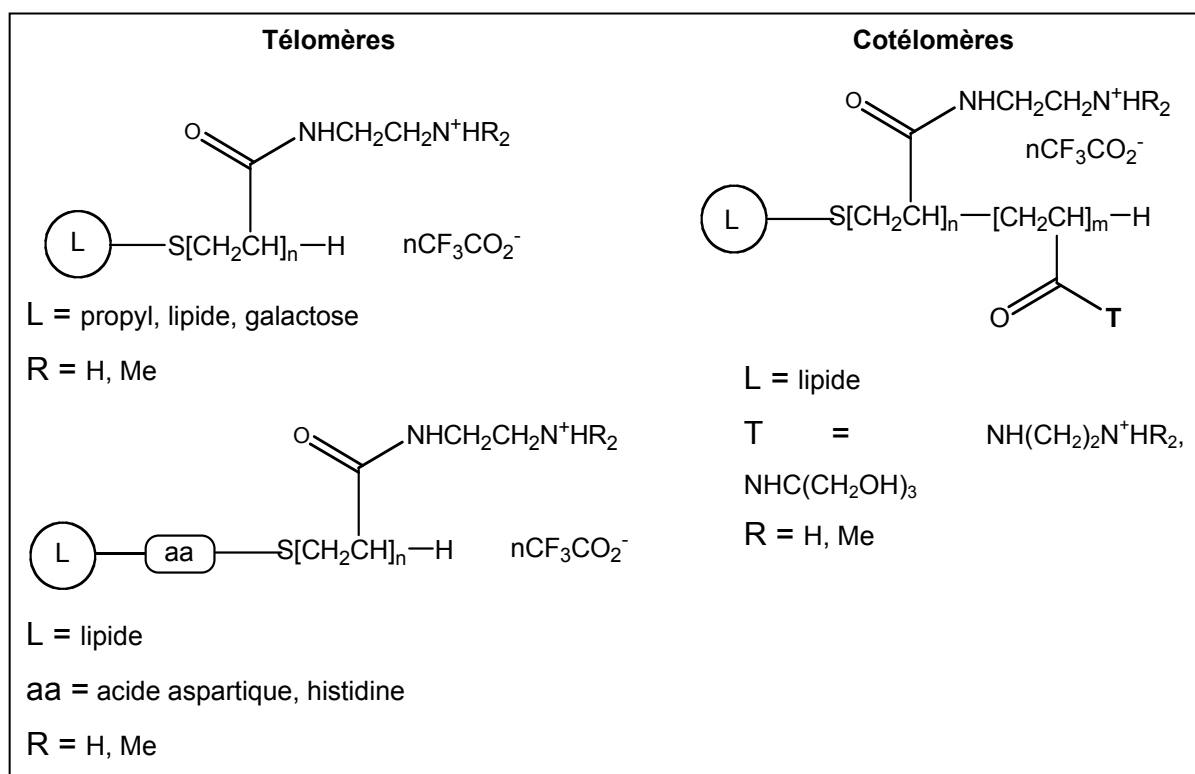


Schéma 3 : télomères et cotélomères

La diversité structurale de ces (co)télomères a permis de mettre en évidence l'impact de quelques éléments structuraux sur l'efficacité de transfection et la toxicité. Ainsi, on observe un optimum de transfection pour les lipotélomères portant une vingtaine de fonctions amines. Le remplacement des fonctions NH_3^+ par des fonctions NHMe_2^+ , ou d'une partie des fonctions NH_3^+ par des fonctions THM n'affecte pas l'expression du transgène, ces substitutions se traduisant par une amélioration de la viabilité cellulaire. Il est surtout à noter que l'introduction d'un résidu aspartate entraîne une très nette augmentation de l'expression

du transgène (2 ordres de grandeur dans certains cas) alors qu'un résidu histidine n'a pas d'effet.

III-2 Les méthodes physiques

III-2-1 L'injection d'ADN nu

De part sa nature polyanionique, on a longtemps pensé que l'ADN ne pouvait pénétrer passivement à travers la membrane cellulaire, elle-même relativement anionique. Mais depuis 1990, diverses expériences d'injection directe *in situ* d'ADN ont démontré une expression du gène dans plusieurs tissus (muscle cardiaque, muscle squelettique^{62;63}, cerveau). Cependant, l'injection intramusculaire d'ADN nu reste faiblement efficace, car moins de 1% de la dose injectée est internalisé par les cellules. De plus, cette expression reste très localisée au niveau du site d'injection. Récemment, l'injection hydrodynamique rapide (5-8 secondes), d'un grand volume (1,6 mL) d'une solution d'ADN nu dans la veine caudale d'une souris, a permis d'obtenir une expression du transgène non négligeable dans divers organes.¹⁴ Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette transfection, mais cette technique reste difficilement applicable à l'homme.⁶⁴

III-2-2 La biolistique ou "Gene Gun"

La biolistique est une méthode initialement utilisée pour incorporer un gène dans les cellules végétales. Depuis quelques années, cette pratique s'est appliquée aux cellules de mammifères. Le principe de cette technique repose sur de minuscules particules d'or recouvertes d'ADN plasmidique propulsées dans les cellules cibles. Ces particules sont accélérées soit par un gaz, soit par un système d'arme à feu (Gene gun).⁶⁵ L'efficacité de transfection de cette méthode varie suivant l'organe ciblé, on observe 10 à 20% de cellules épidermiques transfectées et seulement 1 à 5% de cellules musculaires.⁶⁶ Toutefois, l'expression du gène reste visible 14 jours après injection dans la peau ou dans le foie de souris. Mais, l'importante limitation de cette méthode réside dans la faible pénétration de la particule dans les tissus, qui n'excède pas 0,5 mm de profondeur. Néanmoins, un avantage de cette technique est que l'ADN ne subit pas les dégradations du milieu biologique, car il

pénètre directement dans le cytosol ou dans le noyau, évitant ainsi sa destruction enzymatique dans le sang ou dans les compartiments intracellulaires comme les endosomes.

III-2-3 L'électroporation

L'électroporation utilise l'effet d'impulsions électriques pour déstabiliser la membrane cellulaire pendant de courtes périodes, permettant ainsi la pénétration du plasmide ou d'autres molécules. Cette technique a été préalablement développée pour améliorer l'entrée dans la cellule de molécules ou principes actifs peu perméables. Cette méthode appliquée à l'ADN est utilisée depuis 1982⁶⁷ pour de multiples applications *in vivo*.⁶⁸⁻⁷⁴ Elle est applicable à de nombreux tissus et notamment le tissu musculaire.⁷⁵ Son efficacité dépend de nombreux paramètres, comme le type de tissus, ou la puissance de l'impulsion électrique.

III-2-4 Les techniques parallèles

Parmi les techniques parallèles, citons la magnétofection. Cette méthode utilise l'énergie cinétique des particules magnétiques placées un champ magnétique pour introduire dans les cellules des acides nucléiques ou d'autres molécules, associés à ces particules magnétiques. Cette technique a aussi été utilisée dans des expériences *in vivo* pour permettre l'acheminement des vecteurs de gènes associés aux particules magnétiques vers les cellules cibles.⁷⁶

Soulignons encore l'utilisation très récente des ultrasons (US). Il a été montré, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, que l'irradiation par les US de vecteurs synthétiques au contact des cellules augmentait l'expression du transgène.^{77;78}

IV Etapes et mécanismes de la transfection par les lipoplexes et polyplexes⁷⁹

Le succès d'un transfert de gènes est largement dépendant du comportement du vecteur au cours de son trajet entre le site d'injection et le noyau de sa cible cellulaire. Ce parcours est jalonné d'étapes limitantes qui affaiblissent ou inhibent les capacités du vecteur à délivrer le gène à sa cible, le noyau cellulaire. Ces principales étapes sont schématisées ci-dessous et nous insisterons davantage sur les deux premières. (figure 5)

		Limitations et conséquences
1	Le trafic extracellulaire : les fluides sanguins et la matrice extracellulaire	Agrégation des particules, opsonisation, élimination par les macrophages, temps de circulation limité, expression du gène dans les premiers tissus rencontrés, toxicité
2	<p>Adhésion non spécifique 2a : interactions électrostatiques avec les protéines anioniques de la surface cellulaire</p> <p>Adhésion spécifique 2b : Reconnaissance spécifique entre des ligands de ciblage du complexe et des récepteurs cellulaires</p>	<p>Manque de spécificité</p> <p>Récepteurs sur plusieurs types cellulaires, toxicité et immunogénicité des ligands de ciblage</p>
3	Endocytose	Taille du complexe à endocyter, capacité des cellules à endocyter, non-intériorisation des récepteurs, redistribution des matériaux endocytés vers la surface de la cellule
4	Sortie des endosomes	Acidification des endosomes et évolution vers les lysosomes Dégradation enzymatique et destruction des complexes endocytés
5	Trafic intracytosolique migration vers et dans le noyau	Faible diffusion des complexes dans le cytosol vers le noyau et pénétration dans le noyau des cellules quiescentes, dégradation du gène par les nucléases, non-importation du gène dans le noyau

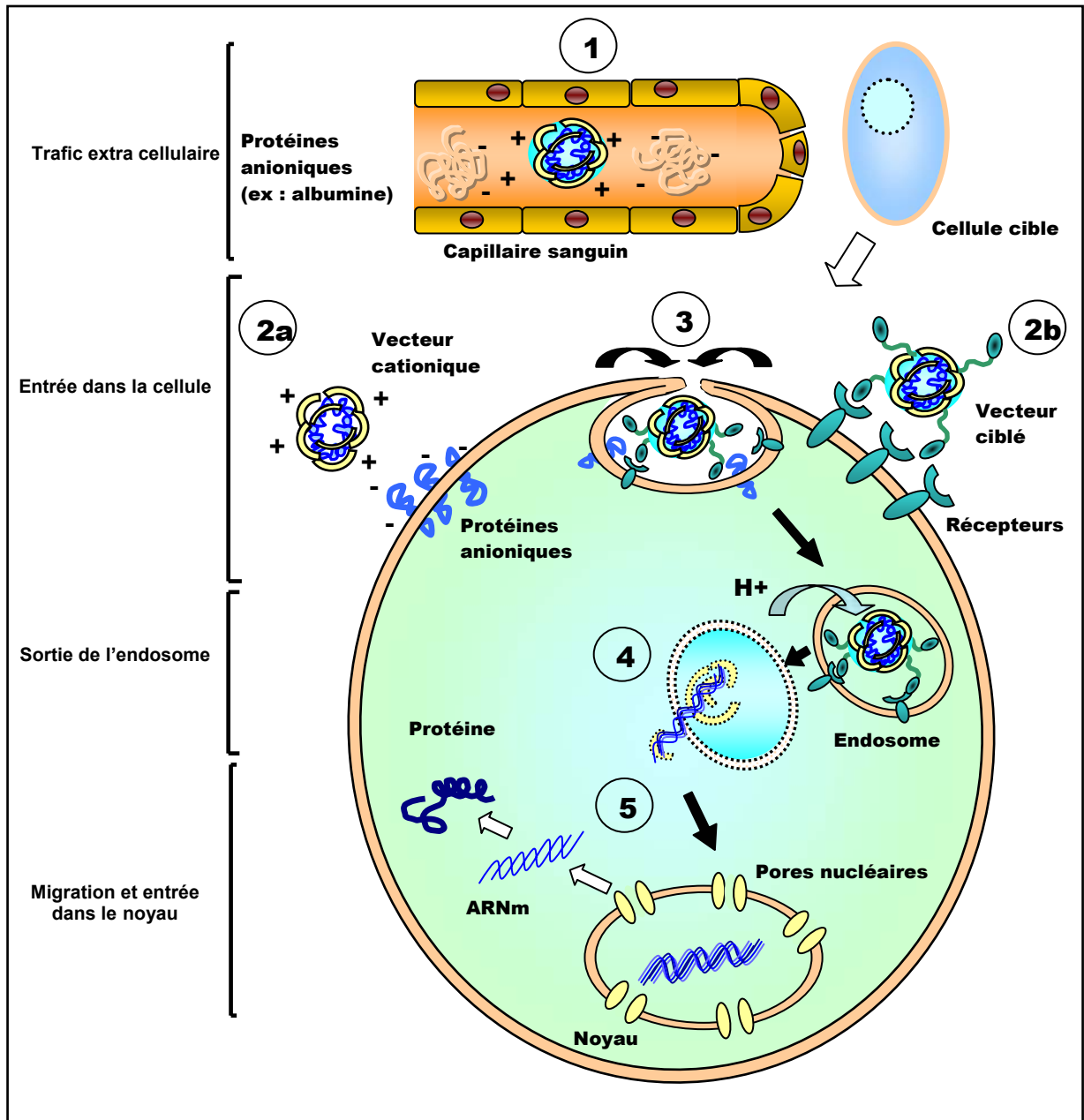


Figure 5: les barrières du transfert de gènes

IV-1 Le trafic extracellulaire

Dans les expériences de transfection *in vitro*, la présence des protéines sériques constitue le seul obstacle que rencontre le vecteur pour atteindre la surface cellulaire. Lorsque ces expériences sont réalisées en présence de sérum, une inhibition de la transfection des cellules en culture par les lipoplexes ou les polyplexes est généralement observée.^{80;81}

In vivo, ces protéines ainsi que le long cheminement du vecteur depuis son site d'administration jusqu'à la cible cellulaire, et les différentes barrières physiologiques que le vecteur doit surmonter ou traverser pour atteindre la cellule cible constituent, en revanche, des handicaps majeurs à l'efficacité des vecteurs synthétiques (et des vecteurs viraux). De nombreux facteurs et acteurs (mode d'administration, prolifération cellulaire, densité de charge, disponibilité des récepteurs de surface, capacité des cellules à endocyter, présence de sels, protéines, lipides, sucres, opsonines ou enzymes dans les différents milieux biologiques - circulation sanguine, système lymphatique-...) influent en effet sur la destinée *in vivo* des lipoplexes et des polyplexes et donc sur leur efficacité. Le modèle des cultures cellulaires ne reflète pas, et de loin, la totalité de tous ces facteurs biologiques qui sont critiques pour la délivrance du gène *in vivo*. La prolifération cellulaire, même pour des cellules tumorales, est très nettement moins rapide *in vivo* qu'en culture. Mis à part les cellules du MPS (système phagocytaire mononucléé) dont la fonction principale est d'endocyter les espèces exogènes, la capacité des autres cellules à endocyter est généralement faible. Les cellules *in vivo* étant entourées d'une matrice interstitielle, polarisée et même couplée à des cellules adjacentes, leur capacité à endocyter est également très différente de celle des cellules en culture. Il est donc extrêmement difficile d'apprécier, à partir de données *in vitro*, les propriétés des complexes administrés *in vivo*, et cela d'autant plus que leurs propriétés physico-chimiques peuvent être modifiées radicalement *in vivo* par les constituants des fluides biologiques dans lesquels ils sont placés. Par ailleurs, il est également très fréquent que les résultats d'évaluations *in vivo* et *in vitro* ne soient pas corrélés entre-eux. Citons par exemples, la meilleure efficacité *in vivo* des lipoplexes formulés avec le cholestérol en tant que co-lipide par rapport à ceux formulés avec DOPE⁸², ou encore la meilleure efficacité *in vivo* des lipoplexes formulés avec des lipides monocationiques comme le DOTMA et le DOTAP par rapport à ceux issus des lipides polycationiques, alors que dans les expérimentations *in vitro*, ce sont les lipoplexes formulés avec DOPE ou avec les lipides polycationiques qui sont plus efficaces.

Enfin, il est également relativement difficile de comparer les divers systèmes entre eux, car les études de transfection sont rarement réalisées dans des conditions identiques. De plus, quand une telle comparaison est possible, il n'est pas aisé d'extrapoler ces résultats à une autre lignée cellulaire et encore moins dans le cadre d'une évaluation *in vivo*.⁸³

IV-1-1 Les lipoplexes et polyplexes « conventionnels »

Les différents modes d'administration des médicaments (injection par voie intraveineuse, intraartérielle ou de façon locale - intramusculaire, intratrachéale, intratumorale, intracrânienne...) peuvent être utilisés pour l'administration des complexes. L'injection intraveineuse permet d'atteindre l'ensemble du système endothélial et d'accéder aux métastases, par exemple. La faible corrélation entre les résultats issus de transfection *in vitro* et *in vivo* a conduit à mieux définir les paramètres physico-chimiques des complexes qui conditionnent le transfert de gènes *in vivo* puis à élaborer des formulations mieux adaptées à cette utilisation. Alors qu'*in vitro*, on observe généralement une meilleure transfection avec des particules ayant un rapport de charge élevé et de taille importante (≥ 500 nm). De telles particules sédimentent et s'adsorbent plus facilement sur les cellules adhérentes qui tapissent le fond des puits, et y pénètrent donc plus facilement. Pour une administration par voie intraveineuse, il n'est pas concevable d'injecter des particules dont la taille excède 400-500 nm.

Les nombreuses études de transfection *in vivo* par les lipoplexes et polyplexes ont mis en évidence leur faible efficacité. Leurs principales limitations résident, après une administration par la voie systémique, dans leur rapide élimination de la circulation sanguine et dans leur accumulation dans les organes filtres (poumons, foie, rate) peu de temps après cette administration. Ces inconvénients, qui résultent de la morphologie et du comportement des complexes dans les fluides biologiques, constituent un handicap majeur à une application plus vaste des vecteurs synthétiques en thérapie génique puisqu'ils n'atteignent que rarement leurs cibles cellulaires.⁸⁴ Ces lipoplexes ou polyplexes interagissent de façon non spécifique avec les constituants sériques (albumine, fibronectine, opsonines, immunoglobulines, etc...)⁸⁵ et forment de larges agrégats qui sont rapidement éliminés par les macrophages du système réticulo-endothélial (RES⁸⁶) dont un grand nombre est localisé au niveau des organes filtres. Par ailleurs, plus les particules sont chargées, plus elles interagissent fortement avec les constituants sanguins et plus rapidement elles sont éliminées de la circulation sanguine par les macrophages. Parallèlement, un phénomène de décomplexation peut également avoir lieu, par interaction du complexe avec des macromolécules anioniques (comme l'héparine).⁸⁷ L'ADN se trouve alors exposé à la dégradation par les nucléases.

Alors qu'un fort pourcentage (50-60 %) de complexes injectés est piégé dans le foie, les niveaux d'expression du transgène les plus élevés mesurés dans les différents tissus sont généralement observés dans les poumons et la rate.⁸⁸⁻⁹⁰ Cette biodistribution et cette expression pulmonaire suggèrent que les complexes s'agrègent en particules de grandes tailles, sans doute par interaction avec des protéines du sérum et ne peuvent quitter de manière efficace le système vasculaire. Ces particules sont donc mécaniquement retenues par les filtres naturels que constituent le foie et les poumons. Les cellules endothéliales pulmonaires sont très riches en protéines anioniques (protéoglycanes⁹¹), ce qui permet aux complexes d'y adhérer et d'y délivrer le transgène plus aisément que dans les cellules des autres tissus, d'où une expression du transgène plus importante au niveau des poumons.^{92;93} Quant à la faible expression du transgène au niveau des hépatocytes, celle-ci serait liée à une phagocytose des complexes par les cellules de Kupffer qui tapissent le système vasculaire hépatique, ce qui a pour conséquence la destruction du plasmide, et/ou à une difficulté des complexes à atteindre le parenchyme hépatique (taille trop importante pour traverser les capillaires fenestrés).

Pour contourner la capture des complexes par le système réticuloendothélial, les voies d'administration locale peuvent être utilisées pour le transfert de gènes dans les tissus cibles.

L'administration par voie intratrachéale ou par aérosol contourne les barrières endothéliales et apporte directement les gènes aux cellules épithéliales pulmonaires^{94;95}, ce qui est particulièrement adapté au traitement de maladies pulmonaires génétiques ou acquises qui nécessitent la délivrance du matériel génétique dans l'épithélium pulmonaire. Ces deux modes d'administration y ont bien conduit à une expression du transgène.^{96;97}

L'injection intratumorale de complexes est une approche intéressante pour la thérapie génique des tumeurs cancéreuses. Cette méthode a conduit à une atténuation de la croissance de la tumeur.^{98;99}

Si dans le cas de ces administrations locales, l'efficacité de transfection des complexes est généralement améliorée, la présence des constituants de la matrice extracellulaire influe néanmoins sur la durée de vie des complexes. Malgré la plus grande proximité des cellules cibles, l'efficacité des vecteurs synthétiques est encore dépendante des obstacles imposés par leur pénétration dans les cellules et par le trafic intracellulaire vers le noyau. Ces étapes limitantes du cheminement intracellulaire seront discutées plus loin.

Afin de résoudre les problèmes de trafic extracellulaire que pose le transfert de gènes *in vivo* par voie intraveineuse, de nombreuses stratégies ont été explorées pour tenter d'optimiser ce transfert vers le tissu ou la cellule cible. Citons l'élaboration de particules nanométriques stables par condensation monomoléculaire de l'ADN par l'intermédiaire de cations polymérisables ou de détergents cationiques dimérisables (cf page 23). Leur faible taille (< 30 nm) leur permettrait plus facilement d'échapper à la reconnaissance du système réticuloendothélial mais leur densité de charge négative les rend inefficaces pour la transfection. Des ligands de ciblage cellulaire et des ligands qui facilitent leur entrée dans la cellule (peptides fusogènes) devront leur être greffés pour rendre ces particules fonctionnelles pour le transfert de gènes.

Une autre approche pour induire ou augmenter la transfection dans les organes cibles, consiste à réaliser un prétraitement avec des liposomes qui encapsulent du clodronate avant l'injection intraveineuse des complexes.¹⁰⁰ Le clodronate détruit, entre autres, les macrophages responsables de la capture des lipoplexes qui peuvent ainsi atteindre leur cible cellulaire. Un tel prétraitement chez la souris a permis d'améliorer très nettement la transfection par des lipoplexes dans les poumons. Par contre, ce prétraitement a l'effet inverse sur la transfection avec des polyplexes (ExGen500/ADN). L'explication avancée est que les liposomes contenant le clodronate seraient aussi responsables de l'élimination (de la modification) des cellules transfectées par ces polyplexes. Ceci suggère qu'*in vivo* les cellules transfectées par les polyplexes sont différentes de celles transfectées par des lipoplexes.

Enfin, la stratégie qui a bénéficié d'une attention toute particulière pour augmenter la persistance intravasculaire des lipoplexes et polyplexes concerne la formulation de préparations dites "furtives" que nous allons davantage expliciter maintenant.

IV-1-2 Les lipoplexes et polyplexes "furtifs"

L'élaboration de formulations dites "furtives" avait été mise au point avec succès pour l'obtention de liposomes "furtifs" en tant que vecteurs de médicaments. De tels liposomes présentent en effet une persistance intravasculaire très nettement prolongée par rapport à des liposomes conventionnels.¹⁰¹ Ces stratégies ont été appliquées pour l'élaboration de polyplexes et lipoplexes "furtifs".^{85;102;103} Ces formulations sont obtenues par l'utilisation de polymères (poly)cationiques ou de lipides greffés à des polyéthylènes glycols (PEG) ou par

un greffage des PEG après complexation du polycation sur l'ADN. Cette dernière stratégie consiste à formuler préalablement les complexes avec des vecteurs cationiques puis à greffer les PEG sur les fonctions amines du polymère cationique exposées à la surface des particules¹⁰⁴. Les chaînes PEG peuvent par la suite être fonctionnalisées ou non par des ligands.

Les PEG sont des molécules hydrophiles et non immunogènes. Généralement, les PEG2000 à PEG5000 (c'est à dire de masse molaire 2000 à 5000) sont utilisés. Le recouvrement de la surface des lipoplexes et polyplexes par des PEG crée un réseau hydrophile dense autour de ces particules. La morphologie qu'adoptent ces polymères est variable (brosse, champignon) et le maillage qui en résulte crée une barrière stérique entre la particule et le milieu qui l'entoure. Ce masquage stérique et hydrophile empêche toutes interactions hydrophobes ou électrostatiques et entraîne une diminution des phénomènes d'adsorption ou d'adhérence des constituants sanguins sur les particules, ce qui limite leur capture par le RES (système réticulo-endothélial) et augmente ainsi leur biodisponibilité (figure 6).¹⁰⁵ Ce masquage des charges des polyplexes ou lipoplexes par les PEG se traduit aussi par une réduction des interactions électrostatiques entre les complexes et les cellules,^{106,107} et diminue significativement les niveaux de transfection aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Toutefois, il est à noter que le greffage de PEG sur des complexes formulés entre PEI et le transgène entraîne bien une augmentation du temps de demi-vie dans la circulation sanguine.¹⁰⁸ Par ailleurs, de tels complexes conduisent, après injection par voie intraveineuse dans des souris dans lesquelles ont été implantées des tumeurs, à une expression du transgène qui est significativement plus importante dans les tumeurs que celle obtenue avec les polyplexes conventionnels.⁸⁵ Ce résultat est à attribuer à une persistance intravasculaire prolongée qui permet une meilleure distribution vers les tumeurs autour desquelles la vascularisation est fragilisée.

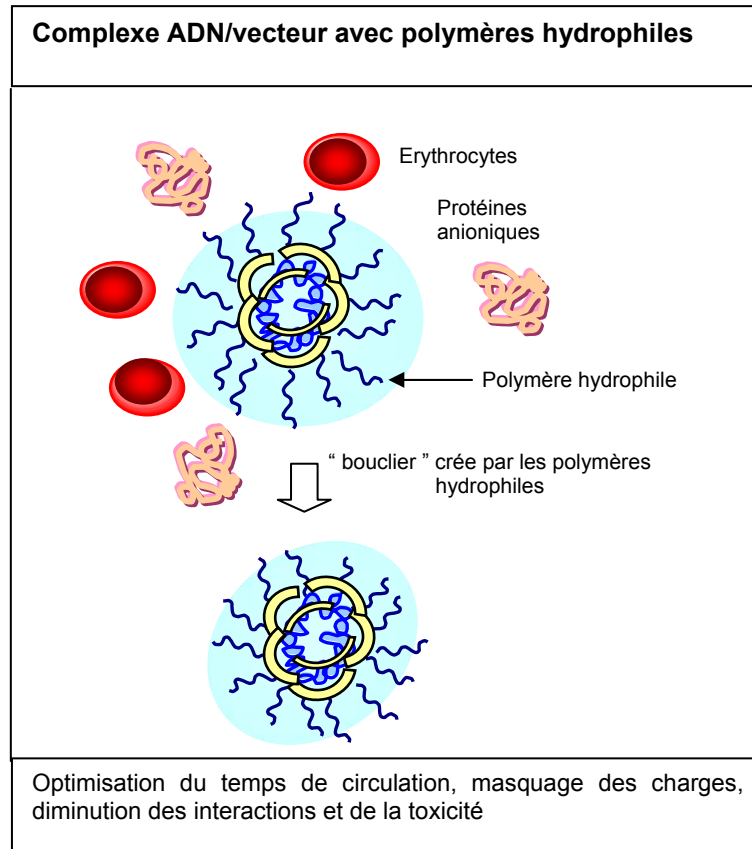


Figure 6 : effets des polymères hydrophiles sur la biodisponibilité

IV-2 L'entrée dans la cellule

IV-2-1 Les interactions non spécifiques

L'ADN nu se lie très difficilement à la membrane cellulaire suite aux répulsions électrostatiques entre l'ADN polyanionique et les charges anioniques présentes à la surface de la membrane cellulaire. Ceci n'est pas le cas des lipoplexes et polyplexes qui interagissent avec la membrane cellulaire d'autant plus fortement qu'ils sont chargés positivement et que la membrane cellulaire exprime des protéines anioniques. Ces protéines anioniques de la surface cellulaire sont en particulier des protéoglycanes du type sulfate d'héparine (HSPGs)^{91;109} impliquées dans de multiples processus d'adhésion et de reconnaissance cellulaire.¹¹⁰ Celles-ci sont sur-exprimées dans les cellules adhérentes en culture, alors que les cellules en suspension en expriment nettement moins. Ceci rend compte de la relative facilité à transfecter les cellules adhérentes et des difficultés à transfecter des cellules en suspension.

Des expériences d'inhibition de l'expression de ces protéines par action enzymatique ou métabolique ont permis de corrélérer le niveau de transfection à la présence de ces protéines.³² D'autres études *in vitro* ont révélé que la stimulation par des esters de phorbol de certaines cellules augmentait la concentration en protéines anioniques membranaires, comme les perlécans, et favorisait leur transfection. Le rôle exact des protéoglycanes dans le processus de transfection n'est pas totalement expliqué. Mais étant donné les fortes interactions électrostatiques entre les complexes cationiques et ces protéines anioniques¹¹⁰, la fixation des complexes sur ces protéines peut être un stimulus à leur internalisation entraînant les complexes qui se sont fixés sur elles.⁹¹

Une hypothèse communément admise est que les complexes qui adhèrent ainsi à la surface des cellules pénètrent dans celles-ci essentiellement par endocytose. L'entrée dans la cellule par un phénomène de fusion, qui implique le mélange entre les constituants des complexes et de la membrane cellulaire, est un événement très mineur qui ne peut avoir lieu que si des composants fusogènes - lipides fusogènes et/ou peptides fusogènes couplés aux lipides ou aux polymères- sont utilisés pour la formulation des lipoplexes et polyplexes.

Dans l'optique d'une administration *in vivo* par voie systémique, nous avons vu précédemment qu'une forte densité de charge cationique des complexes favorisait de manière non-spécifique leurs interactions avec un grand nombre de cellules très diverses qui expriment de telles protéines anioniques, mais surtout avec les protéines plasmatiques. Ces interactions non-spécifiques sont donc un inconvénient majeur car elles conduisent ou à une dispersion et une dilution du transgène dans l'organisme et dans des sites trop variés et/ou surtout à une très rapide élimination des complexes de la circulation sanguine. Cependant, ces interactions non-spécifiques peuvent être mises à profit dans des applications qui nécessitent une administration très localisée.¹¹¹

IV-2-2 Les interactions spécifiques : le ciblage cellulaire

Favoriser l'expression du gène thérapeutique dans les cellules cibles est un des objectifs majeurs pour un vecteur de transfert de gènes. Un tel ciblage peut être réalisé par l'association du vecteur avec des ligands spécifiques qui sont reconnus par des récepteurs présents à la surface cellulaire. Ce ciblage permet en outre de concentrer spécifiquement le vecteur de gène sur la cellule cible et d'augmenter la possibilité d'internalisation du transgène

à condition que la formation du complexe ligand-récepteur induise une endocytose par récepteur médié.

A ce jour, de multiples vecteurs lipidiques ou polymériques couplés à divers ligands ont été synthétisés et évalués *in vitro* et *in vivo*.¹¹²⁻¹²³ Quelques exemples de ligands, de structures ciblées (majoritairement des protéines) et de types cellulaires sont répertoriés dans le tableau suivant.

Structure ciblée	Ligand	Tissus ou cellules cibles
Récepteur folate	Acide folique	Nombreux tissus
Intégrines	Peptide RGD	Tumeurs endothéliales
Récepteur à la transferrine	Transferrine	Cellules en division
Asialoglycoprotéines	Lactose	Hépatocytes
Récepteur	Galactose	Hépatocytes
"	Mannose	Cellules dendritiques
"	Asialoglycoprotéine	Hépatocytes
Récepteur LDL	LDL	Nombreux tissus
Récepteur FGF	FGF	Nombreux tissus
Récepteur EGF	EGF	Nombreux tissus
Antigène ou récepteur	Anticorps anti-JL1	Lymphocytes T leucémiques
Antigène ou récepteur	Anticorps anti-CD3	Cellules sanguines mononuclées

La stratégie d'élaboration du complexe ciblé dépend de nombreux facteurs comme la nature du vecteur et du ligand, le mode d'administration et le type de cible cellulaire. Cependant, quel que soit le ligand, les stratégies d'élaboration visent deux constructions ciblées, l'une "conventionnelle", l'autre "furtive" si une utilisation par voie systémique est aussi envisagée. L'assemblage "conventionnel" consiste en des complexes portant à leur surface le ligand, l'assemblage "furtif" en des complexes portant à leur surface le ligand et un polymère hydrophile (généralement un PEG), le ligand pouvant aussi être situé à l'autre extrémité du PEG. Les méthodes d'obtention de ces structures ciblées qui ont été testées sont résumées dans la figure 7 ci-après.

- **voie A** : formulation des structures conventionnelles ciblées par complexation de l'ADN avec des lipides ou polymères ciblés, les structures furtives étant ensuite obtenues par conjugaison du polymère hydrophile sur la surface des particules;
- **voie B** : formulation des lipoplexes ou polyplexes, puis formulation des structures furtives par conjugaison d'un polymère hydrophile hétéro-bifonctionnel sur la surface des particules, puis greffage du ligand sur la seconde fonction du polymère ;
- **voie C** : formulation des lipoplexes ou polyplexes furtifs et ciblés par complexation de l'ADN avec un mélange ternaire de lipides ou de polymères (poly)cationiques non greffés et greffés, le lipide ou le polymère (poly)cationique étant greffé, d'une part, avec un PEG et, d'autre part, avec un PEG portant à son autre extrémité le ligand.

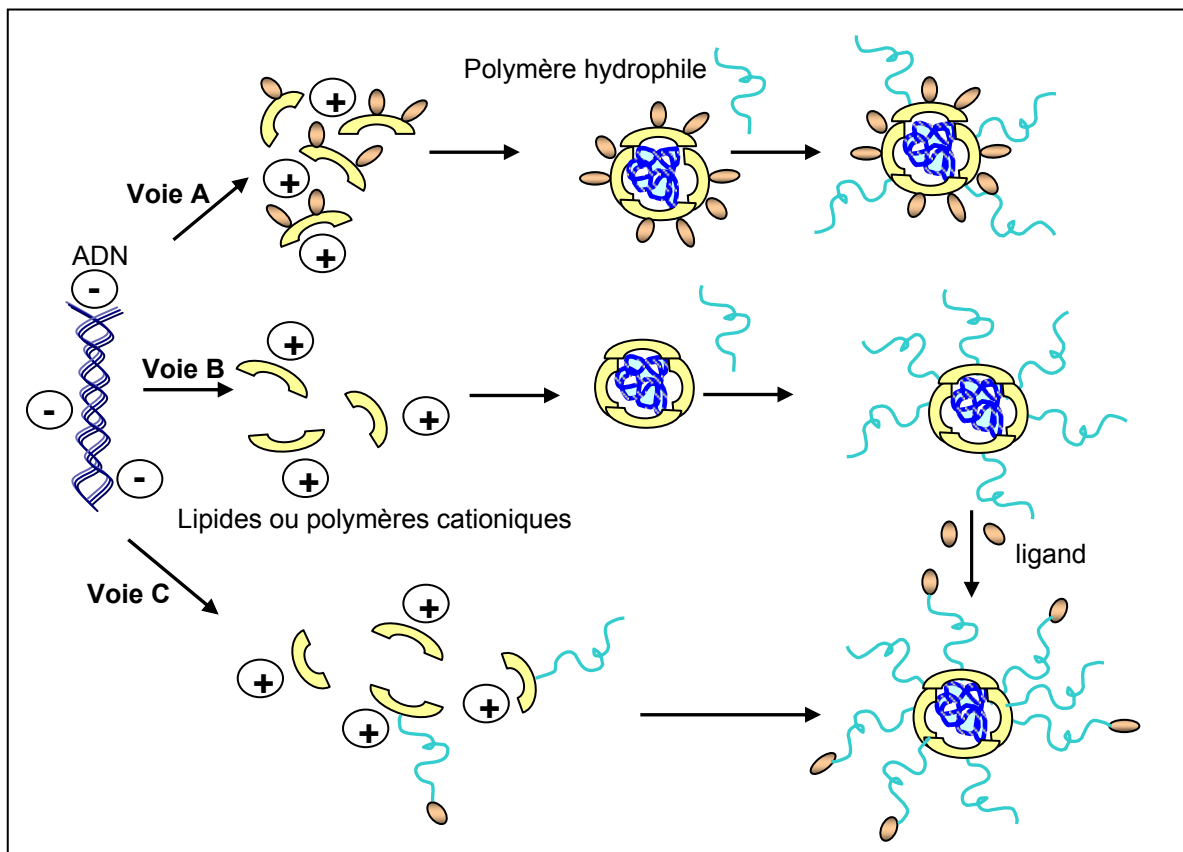


Figure 7 : voies d'obtention de complexes ciblés

Il est à noter que la présence du PEG peut entraver la formulation de lipoplexes ou polyplexes furtifs lorsque celle-ci est réalisée à partir de lipides et polymères greffés au PEG.¹²⁴ C'est pourquoi les stratégies présentées ci-dessus permettent des formulations optimales de complexes ciblés avec différents ligands.

La transferrine. Les récepteurs de la transferrine ont été parmi les premières cibles des vecteurs synthétiques. Ces récepteurs permettent l'entrée dans les cellules des complexes hétéroprotéiques transferrine-fer indispensables au métabolisme cellulaire. Ce type de récepteur est exprimé par de nombreux tissus cellulaires, et surtout par les cellules qui sont en prolifération comme les cellules tumorales.

In vitro, la transfection par des lipoplexes et polyplexes (PEI, PLL) conjugués à la transferrine (Tf) a été amplement explorée^{85;122;125-128}. Pour ce qui concerne les constructions “ conventionnelles ” ciblées, celles-ci permettent de transférer plus efficacement diverses lignées cellulaires tumorales (Neuro2a, Jurkat et K562) qui expriment le récepteur Tf par rapport aux complexes non ciblés. Ces améliorations sont bien liées à la présence des récepteurs sur les cellules et à une endocytose récepteur-médiée. En effet, leur saturation avec de la transferrine libre abolit complètement le gain d'efficacité de transfection obtenu avec les complexes ciblés. Par ailleurs, aucune amélioration de la transfection de cellules qui n'expriment que peu de récepteurs Tf (comme les lignées cellulaires B16 ou H225) n'est observée avec des complexes ciblés.¹²⁵ Il est aussi à noter qu'*in vitro*, la “ post-pégylation ” des particules ciblées, comme illustrée dans la Figure 7 voie A, n'a que peu d'incidence sur la transfection, les polyplexes PEI/Tf/PEG étant aussi efficaces que les polyplexes PEI/Tf.⁸⁵

In vivo, de nombreux résultats encourageants ont été obtenus aussi bien avec des constructions Tf-ciblées “ conventionnelles ” que “ furtives ”.^{102;119;127;129-134}

Ainsi, l'injection intratumorale de complexes PEI800-Tf (800 kDa) par rapport à celled'ADN nu conduit à une très nette amélioration de l'expression du transgène dans les tumeurs.¹⁰² Dans le cas d'injection par la voie systémique des polyplexes Tf-ciblés “ conventionnels ” et “ furtifs ” dans des souris porteuses de tumeurs, la nature du polymère semble avoir un impact sur l'expression du transgène dans les différents organes (poumons, foie, tumeurs). Si l'on observe une expression du transgène plus importante au niveau des tumeurs pour des complexes formulés avec Tf-PEI25 (25 kDa)^{129;133}, celle-ci n'est pas améliorée avec les formulations ciblées et furtives du type PEI25/PEI25-PEG-Tf/PEI25-PEG (voie C Figure).¹³⁴ En revanche, l'expression reste plus importante au niveau des poumons lorsque les polyplexes sont formulés avec Tf-PEI800 alors qu'elle est nettement plus importante dans les tumeurs que dans les poumons avec les formulations ciblées et furtives du type PEG-PEI800-Tf (voie A, Figure).^{85;133}

Rappelons qu'une expression du transgène préférentielle dans les poumons est généralement obtenue avec des formulations non-ciblées. Lorsque la biodistribution de l'expression du transgène est en faveur des tumeurs, celle-ci peut être la conséquence d'un ciblage spécifique mais aussi d'une plus longue biodisponibilité des complexes, ce qui leur permet d'atteindre les tumeurs. En effet, il a été montré que la "post-pégylation" des complexes PEI800-Tf entraînait une nette augmentation de la dose de complexes présente dans la circulation sanguine (6% pour Tf-PEI800 contre 30% de la dose injectée pour Tf-PEI800-PEG après 30 min).⁸⁵

Les folates. Les folates appartiennent à une famille de vitamines indispensables aux cellules eucaryotes, car ces cellules sont déficientes en une enzyme capable d'assurer la biosynthèse de ces composés. Les cellules ont donc développé plusieurs stratégies qui permettent de récupérer les folates apportés par les nutriments. Parmi ces mécanismes, on trouve un récepteur glycoprotéique (dénommé récepteur folate RF) qui assure l'endocytose de folate oxydé comme l'acide folique.¹²⁰ La surexpression de ce récepteur dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines en a fait une cible idéale pour réaliser un transfert de gènes spécifique vers les tumeurs.¹³⁵⁻¹³⁷

Les résultats de transfection *in vitro* observés avec des polylysines (PLL) conjuguées à l'acide folique ont mis en évidence l'augmentation des niveaux de transfection par rapport aux polylysines non modifiées.¹³⁸ Par ailleurs, la saturation des récepteurs RF diminue radicalement l'expression du transgène, ce qui corrobore l'hypothèse d'une transfection spécifique récepteur-médiée. Cependant, il est à noter que la conjugaison du folate sur des PEI n'a pas conduit à des polyplexes ciblés plus efficaces que les polyplexes non ciblés.¹³⁹ Toutefois, en éloignant le ligand folate de la surface des polyplexes, comme dans les polyplexes PEI-PEG-folate (le folate et le PEI sont situés chacun à une extrémité du PEG), on obtient des systèmes qui transfectent, par une voie récepteur-médiée, plus efficacement que les polyplexes PEI, PEI-folate ou PEI-PEG.¹³⁹ Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres constructions polymère-PEG-folate.^{140;141}

In vivo, à notre connaissance, seule l'expression de gènes par des lipoplexes "conventionnels" et "furtifs" conjugués au folate a été étudiée. Des résultats encourageants ont là aussi été obtenus avec de tels lipoplexes lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse dans des souris dans lesquelles des tumeurs ont été implantées.¹¹⁵ On observe une augmentation de l'expression du transgène dans les tumeurs et une diminution dans les poumons aussi bien avec les formulations folates "conventionnelles" qu'avec les formulations folates "furtives". Cependant, les deux types de formulations donnent des niveaux d'expression du transgène dans les tumeurs qui sont comparables. Les bénéfices liés à l'utilisation de PEG sont donc à espérer sur d'autres plans que celui de la transfection. Quant aux formulations "furtives" non-ciblées, celles-ci conduisent à une expression du transgène comparable dans les deux tissus mais cette expression reste inférieure à celle observée avec les formulations folates "conventionnelles" et "furtives".¹¹⁵

Les sucres. Les récepteurs aux protéines glycosylées sont abondamment exprimés dans des organes comme le foie. Citons par exemple les récepteurs asialoglycoprotéiques sur les hépatocytes qui ont une grande affinité pour le lactose ou encore le galactose, les récepteurs au mannose sur les macrophages ou les cellules endothéliales hépatiques^{142;143}. Ces récepteurs asialoglycoprotéiques ont par ailleurs l'avantage d'être internalisés par la cellule¹⁴². La forte expression de tels récepteurs sur les hépatocytes a stimulé la recherche et l'élaboration de systèmes de vectorisation ciblés.

In vitro, de nombreuses études ont montré une transfection spécifique d'hépatocytes aussi bien avec des lipoplexes que des polyplexes galactosylés.^{123;144-151} Des résultats similaires ont aussi été obtenus avec des formulations "furtives" galactosylés.¹⁵²

D'autres types cellulaires comme des cellules épithéliales pulmonaires qui expriment des lectines spécifiques du lactose et du mannose ont été transfectées avec des polyplexes (PEI ou PLL) conjugués au lactose de manière plus spécifique et efficace que par des polyplexes non-conjugués ou conjugués au mannose. Par ailleurs, il a été montré que ces différentes formulations se fixaient de manière équivalente aux lectines membranaires. Ces résultats montrent aussi que d'autres facteurs et notamment des différences en terme de trafic intracellulaire sont à prendre en compte.¹⁵³

Enfin des macrophages ont été transfectés par des polyplexes (PLL) conjugués au mannose de manière plus spécifique et efficace que par des polyplexes non-conjugués ou conjugués à d'autres groupements glycosylés.¹⁵⁴

Quelques études ont aussi été menées *in vivo* avec des lipoplexes et des polyplexes galactosylés et mannosylés (pour une revue, voir¹⁴⁸). Ces études visaient surtout à obtenir une expression du transgène dans les hépatocytes qui sont le siège de nombreuses infections. Ainsi, après une injection par voie intraveineuse de lipoplexes conjugués à des résidus galactosylés, une expression du transgène plus importante a été mesurée dans les hépatocytes que dans d'autres organes comme les poumons.¹⁵⁵ Lorsque des lipoplexes conjugués à des résidus mannoses ou fucoses sont injectés, on observe là-aussi une expression du transgène préférentiellement au niveau du foie mais ce sont les cellules endothéliales et les cellules de Kupfer qui ont essentiellement été transfectées. Ces résultats sont liés à la présence de récepteurs asialoglycoprotéiques sur les hépatocytes qui reconnaissent les trois types de résidus glycosylés alors que les cellules de Kupfer possèdent des récepteurs plus spécifiques du mannose et du fucose.¹⁵⁶

Les intégrines et les peptides RGD. Les intégrines sont des récepteurs hétéroprotéiques membranaires qui participent aux interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire. Elles sont abondamment exprimées dans les endothéliums tumoraux et de nombreux organismes exogènes utilisent ces récepteurs pour se fixer et s'introduire dans les cellules (bactéries, virus). Certains peptides comme la fibronectine ou les enveloppes de nombreux virus contiennent un motif arginine-glycine-acide aspartique (RGD) hautement conservé qui interagit spécifiquement avec les intégrines. C'est pourquoi de nombreux vecteurs synthétiques conjugués à un peptide RGD ont été synthétisés et évalués.^{118;157-160}

A notre connaissance, ces évaluations ne concernent que des études *in vitro*. Toutes ces études montrent un réel bénéfice des lipoplexes ou polyplexes porteurs de séquences RGD par rapport aux complexes non-ciblés. Par ailleurs, le remplacement de l'acide aspartique par un acide glutamique inhibe cet accroissement, corroborant ainsi l'implication des récepteurs intégrines dans le mécanisme de transfection.¹⁵⁹ Il est à souligner que la taille et la morphologie des peptides RGD se sont révélées être importantes. En effet, des ligands oligopeptidiques cycliques contenant le motif RGD ont démontré une meilleure affinité du ligand pour les récepteurs et donc une expression du transgène améliorée.^{47;158}

Les intégrines et autres ligands. Récemment, il a été montré que des nanoparticules cationiques, conjuguées à un ligand ayant une forte affinité pour les chaînes $\alpha v \beta 3$ des intégrines, permettaient de délivrer spécifiquement des gènes dans les cellules endothéliales des capillaires sanguins angiogéniques chez des souris porteuses de tumeurs.¹⁶¹ L'efficacité thérapeutique de cette approche a été testée avec un gène Raf mutant (ATP μ -Raf) qui bloque l'angiogenèse en réponse à de multiples facteurs de croissance. Les injections systémiques de ces nanoparticules ciblées ont conduit à une apoptose des cellules de l'endothélium associé à la tumeur, suivie d'une apoptose des cellules tumorales et d'une régression des tumeurs primaires et métastatiques.¹⁶² Cette étude fait suite à des travaux réalisés avec ces mêmes particules ayant comme ligand de ciblage un anticorps (LM609) dirigé vers les intégrines. Ces nanoparticules ont permis de délivrer avec succès un agent de contraste permettant de visualiser les vaisseaux sanguins angiogéniques de tumeurs.¹⁶³

Les anticorps. Les anticorps comptent parmi les ligands les plus spécifiques. Leur grande diversité et leur haute spécificité permettent de cibler efficacement de nombreux récepteurs. C'est pourquoi ces résidus sont des candidats attractifs pour un transfert spécifique de gène. Des lipoplexes et polyplexes couplés à des anticorps anti-CD3,¹⁶⁴ anti-CD19,¹⁶⁴ anti-JL1¹⁶⁵ ou anti-GD2¹⁵¹ ont été élaborés.¹⁶⁶ Si dans tous les cas on observe une spécificité d'adhésion sur les cellules qui expriment l'antigène correspondant, on n'observe pas systématiquement une amélioration de l'expression du transgène.¹⁵¹ Ainsi une amélioration n'a été obtenue qu'avec les complexes couplés aux anticorps anti-CD3 ou anti-CD19¹⁶⁴ ou encore anti-JL1¹⁶⁵. Toutefois, ces diverses expériences confirment le potentiel des anticorps comme éléments de ciblage. Il reste à souligner que la taille, la difficulté d'élaboration et l'immunogénicité des anticorps constituent un handicap majeur pour des applications *in vivo*.

Les facteurs de croissance épidermales (EGF)^{104;116;167-169}, de fibroblastes (FGF).¹¹⁴ Conjointement aux différents ligands cités précédemment, les facteurs de croissance ont fait l'objet d'évaluation comme ligands pour délivrer spécifiquement des gènes.

Ainsi, EGF, associé à des vecteurs synthétiques et dans des essais *in vitro*, a permis de réaliser une transfection spécifique de cellules de carcinome épidermal ou rénal qui expriment le récepteur EGF.¹⁰⁴

In vivo, l'injection par voie systémique de complexes "furtifs" PEI-PEG-EGF a conduit à une délivrance et une expression du transgène nettement plus importantes dans des tumeurs de carcinome hépatique humain greffées sur des souris SCID plutôt que dans d'autres organes comme le foie ou les poumons.¹⁶⁹ Il est important de noter que l'issue de tels tests est fortement dépendante du type de tumeurs implantées chez les souris. Les variations qui ont été observées, sont liées à la vascularisation des tumeurs, à la nécrose des cellules et à l'infiltration de macrophages dans ces tumeurs. Ainsi, on observe une forte expression du transgène avec des tumeurs très vascularisées et dans lesquelles les macrophages s'infiltrent peu (cas de la tumeur hépatique). L'expression est plus faible lorsqu'il y a présence de cellules nécrosées dans la tumeur et donc une importante infiltration de macrophages qui dégradent rapidement l'ADN (cas des mélanomes M3, et ce malgré une importante vascularisation et une capture significative d'ADN au niveau de la tumeur). Enfin, aucune expression ni capture d'ADN sont décelables dans des tumeurs très faiblement vascularisées (cas de tumeurs KB, 518A2, A549, SW480).¹⁷⁰

IV-3 Le trafic intracellulaire^{171;172}

Après adhésion à la surface cellulaire, les lipoplexes et polyplexes pénètrent dans la cellule le plus souvent par un phénomène d'endocytose impliquant des puits de clathrines. Ce phénomène peut être non-spécifique s'il ne fait intervenir que les interactions électrostatiques ou être médié par un récepteur dans le cas où les vecteurs portent un ligand spécifique de ce récepteur et que la formation du complexe ligand-récepteur entraîne l'internalisation de ce complexe. Une fois internalisés, les lipoplexes et polyplexes se retrouvent piégés dans des endosomes dits précoces. Pour atteindre leur cible nucléaire, ils doivent obligatoirement s'échapper de ces endosomes le plus rapidement possible pour éviter la dégradation de l'ADN. Les endosomes ont en effet pour fonction de dégrader les composants intravésiculaires inutiles au fonctionnement de la cellule. Les endosomes précoces progressent lentement vers l'intérieur des cellules et après une acidification croissante suite à l'action de pompes à protons ATPase dépendantes vont évoluer en endosomes tardifs. Ceux-ci fusionnent avec des lysosomes qui sont des vésicules renfermant des hydrolases (dont des nucléases) dans lesquelles le pH est d'environ 5. Les particules endocytées subissent alors une

dégradation par ces enzymes. Ainsi, l'ADN, pour ne pas être dégradé lors de ce processus, doit quitter les endosomes avant qu'ils n'aient fusionné avec les lysosomes.

IV-3-1 Sortie des endosomes

Deux mécanismes permettent de rendre compte de la déstabilisation de la membrane de l'endosome et de la sortie des lipoplexes et des polyplexes de l'endosome. La déstabilisation de la membrane endosomale peut être initiée (i) par les interactions électrostatiques entre ses composants anioniques et les composants cationiques des complexes¹⁷³ et/ou par la présence de composants fusogènes (comme DOPE³³ si les lipoplexes ont été co-formulés avec DOPE), ou de peptides fusogènes couplés au lipide ou au polymère¹⁷⁴, (ii) par le phénomène “éponge à protons” lié au pouvoir tampon du vecteur polycationique qui provoque une entrée massive d'ions chlorures et d'eau dans l'endosome, le gonflement de l'endosome puis sa rupture.^{49;175}

La déstabilisation initiale liée au mélange entre les lipides du lipoplexe et ceux de la membrane endosomale est vraisemblablement une étape cruciale, ce que confirme la présence de peptides ou de lipides fusogènes. En effet, dans de nombreux cas, l'utilisation conjointe de DOPE avec les lipides (poly)cationiques pour la formulation des lipoplexes est même indispensable pour qu'il y ait transfection. Très souvent, sa présence l'améliore de manière très significative. Ce pouvoir fusogène de DOPE est lié aux changements morphologiques (passage d'une phase lamellaire à une phase hexagonale inverse) initiés par l'acidification (à pH neutre et acide, DOPE a une géométrie respectivement cylindrique et conique). Ce mécanisme de libération de l'endosome rend également compte de la remarquable efficacité de transfection des lipospermines comme le DOGS car il forme avec l'ADN des complexes de structures hexagonales¹⁷⁶. Les lipospermines (DOGS, DOSPA, etc...) possèdent une tête polaire de taille relativement importante par rapport à la partie hydrophobe, conférant à ces molécules un fort rayon de courbure positif d'où une organisation en phase hexagonale. De telles structures non lamellaires déstabilisent les membranes, de la même façon que DOPE.

Le mécanisme “éponge à protons” peut avoir lieu si les composants des complexes possèdent des fonctions ionisables dont les pKa permettent de tamponner le milieu endosomal (pH 5-7). Les endosomes possèdent des pompes à protons ATPase dépendantes dont le rôle est d'acidifier l'intérieur du compartiment. Si une molécule ionisable ayant un pKa de 5-7 est

présente dans l'endosome, celle-ci va s'opposer à l'acidification sans pour autant pouvoir arrêter le fonctionnement des pompes à protons. Cet effet tampon va empêcher la maturation de l'endosome et sa fusion avec les lysosomes, retardant ainsi l'action des enzymes lysosomales hydrolysantes qui ne sont effectives qu'à pH acide. Comme cet effet tampon se traduit par une entrée massive de protons dans le compartiment endosomal et que cette entrée est couplée à celle d'ions chlorures, il s'ensuit une augmentation importante de la concentration ionique et, pour compenser, une entrée conséquente d'eau, ce qui induit un gonflement de l'endosome puis sa rupture. Les divers lipides et polymères polycationiques qui participent activement à ce mécanisme sont ceux qui possèdent une ou plusieurs amines non protonées (ou partiellement) à pH physiologique. C'est le cas, par exemple, de DOGS (avec un pKa à 5.5), des PEI (large gamme de pKa allant de 8.2 à 3.6 soit environ 50 % des amines qui ne sont pas protonées à pH \approx 5), des dendrimères PAMAM (pKa des amines tertiaires de 3.9). Par contre, ce mécanisme est inopérant pour les PLL qui possèdent des amines primaires dont le pKa est de l'ordre de 9-10. L'introduction sur ces PLL de groupements histidines (pKa \approx 6) qui auront donc un effet tampon dans l'endosome, a été développée et a permis d'améliorer l'expression du transgène.⁵⁵

Les différentes hypothèses " passage par la voie endosome " et " éponge à proton " ont été corroborées par l'utilisation d'agents lysosomotropiques (comme la chloroquine, le sucrose ou le glycérol¹⁷⁷, certaines protéines virales¹⁷⁸) ou d'inhibiteurs des pompes à protons (comme la bafilomycine A1 ou la concanamycine).^{177;179;180} La chloroquine est une base faible qui s'accumule dans les endosomes et lysosomes où elle agit par effet tampon (comme une éponge à protons). Par ailleurs, si sa présence dans le milieu d'incubation a un effet bénéfique sur la transfection, cela confirme que la transfection a lieu par la voie endocytose. Lorsque la chloroquine n'a pas d'effet sur la transfection, cela indique que les lipides ou les polymères polycationiques possèdent leur propre effet tampon ou alors que les complexes ont été internalisés par une autre voie que l'endocytose.⁵⁷ Quant aux inhibiteurs des pompes à protons et lorsque leur présence dans le milieu d'incubation inhibe la transfection, cela indique que la sortie de l'endosome des complexes n'est plus sous le contrôle du mécanisme " éponge à protons " qui entraîne le gonflement et la rupture de l'endosome.

Par ailleurs, le mécanisme " éponge à protons " est opérationnel dès le stade endosome précoce. En effet, il a été montré que, lorsque la transfection était effectuée avec des polyplexes formulés avec des PEI, la fusion entre les endosomes renfermant les polyplexes et les lysosomes n'avaient pas lieu, tout au moins durant les 6 premières heures d'incubation, et

que ces polyplexes avaient atteint le noyau cellulaire. Par contre, lorsque la transfection était effectuée avec des polyplexes formulés avec des PLL qui n'ont pas de pouvoir tampon à des pH légèrement acides, la fusion endosome/lysosome se produisait effectivement.¹⁸¹

IV-3-2 Le trafic intracytoplasmique et l'entrée dans le noyau

Le routage intracellulaire du plasmide et/ou du complexe de sa sortie de l'endosome jusqu'au noyau de la cellule est une étape mal connue et sans doute la plus limitante dans le transfert de gènes par les vecteurs synthétiques. En effet, le cytoplasme est un milieu très visqueux dans lequel la diffusion de particules est très lente et l'enveloppe nucléaire est constituée d'une double bicouche lipidique qui ne peut être traversée qu'au niveau des pores nucléaires ou bien lors de sa rupture au moment de la division cellulaire (mitose).

Pour ce qui concerne le routage des complexes dans le cytosol jusqu'au noyau, un mécanisme a été proposé pour le transport de complexes cationiques dans la cellule, indépendamment de la morphologie des complexes lors de leur sortie de l'endosome. Ce mécanisme serait tributaire du gradient de polyanion dans le cytosol. Dans cette approche, les polycations suivraient un gradient d'affinité polyanionique en passant par la tubuline, puis l'actine pour atteindre des régions très riches en acides nucléiques.¹⁸² Une hypothèse plus probable est que les complexes utilisent le cytosquelette de la cellule pour diffuser dans le cytoplasme, et se comporteraient ainsi comme certains matériels viraux.^{172;183}

Les vecteurs synthétiques étant relativement plus efficaces pour transférer des gènes dans des cellules en division que dans des cellules quiescentes, ils pénétreraient dans le noyau des cellules en division lors de leur mitose. Des études montrent qu'en inhibant la croissance des cellules par des facteurs chimiques, de faibles niveaux d'expression du transgène sont observés. Ces observations ainsi que diverses expériences de transfection réalisées à différentes étapes du cycle cellulaire confirment que la rupture de l'enveloppe nucléaire au moment de la division cellulaire est fondamentale pour une expression du transgène délivré par les vecteurs synthétiques.¹⁸⁴ Néanmoins, la transfection *in vitro*¹⁸⁵ et *in vivo*¹⁸⁶ de cellules neuronales (qui ne se divisent pas) avec des complexes formulés avec des PEI, laissent penser que d'autres mécanismes interviennent dans le processus de migration intranucléaire. Si l'augmentation du transport intranucléaire est un défi important pour les cellules quiescentes, elle l'est tout autant dans le cas des cellules en division.

Pour les cellules quiescentes, le plasmide ne peut accéder à la machinerie nucléaire que par passage par les pores nucléaires. Les pores nucléaires sont des “ tuyaux ” de communications enchâssés dans l’enveloppe nucléaire avec une densité importante de 3000 à 4000 pores par noyau.^{79;187} Ces tuyaux sont constitués de protéines “ navettes ” de transport (importines α et β) et présentent deux états conformationnels, un état “ fermé ” qui permet la diffusion passive de molécules de diamètre inférieur à 9 nm ou de masse moléculaire \leq 40 kDa, et un état “ ouvert ” qui autorise la diffusion de molécules dont la taille n’excède pas 26 nm.¹⁸⁷

L’incorporation de séquences virales SV40¹⁸⁸ dans la séquence plasmidique du transgène a permis l’amélioration du transport nucléaire de l’ADN et son expression. Ces fragments nucléiques sont reconnus par les facteurs de transcription pour conduire à des séquences peptidiques particulières appelées NLS (pour Nuclear Localisation Signal) qui assurent le cheminement du matériel nucléaire vers et dans le noyau. Les NLS ont une grande affinité pour les importines. De nombreux virus possèdent une séquence NLS, ce qui leur permet de transporter efficacement leur matériel génétique jusqu’au noyau de la cellule hôte. Le transport nucléaire n’est donc pas une étape limitante de la transfection par des vecteurs viraux.

Pour tenter d’améliorer encore davantage le transport nucléaire de l’ADN, des séquences NLS ont été associées aux lipoplexes et polyplexes. Ces associations concernent un couplage covalent (i) soit avec le lipide ou polymère puis formulation avec le plasmide, (ii) soit avec une séquence oligonucléotidique (ou analogue) puis hybridation avec le plasmide puis formulation, (iii) soit avec un intercalant puis complexation avec le plasmide puis formulation avec les lipides ou polymères, (iv) soit avec le plasmide puis formulation avec les lipides ou polymères.¹⁸⁹ C’est dans ce dernier cas seulement qu’une très nette amélioration de la transfection a été obtenue (jusqu’à trois ordres de grandeur).¹⁹⁰ Ces résultats constituent une avancée très importante qui ouvre de réelles perspectives pour le transfert de gènes par des vecteurs synthétiques. Ces divers résultats montrent aussi que le plasmide doit rester intimement et fortement associé au peptide NLS tout au long de son trafic intracellulaire qui l’amène jusqu’au noyau.

Pour mieux appréhender le rôle du vecteur (lipides ou polymères (poly)cationiques) dans le trafic intracytoplasmique et l'entrée de l'ADN dans le noyau, diverses études de microinjections de lipoplexes ou de polyplexes dans le cytoplasme et dans le noyau ont été réalisées. Ces études avaient pour but de déterminer si le plasmide parvenait au noyau lié ou libéré (partiellement ou totalement) du vecteur, et quel était l'impact de cette association sur son expression en protéine.

Tout d'abord, la microinjection de l'ADN nu dans le cytoplasme se traduit par une expression négligeable comparativement à une microinjection directe dans le noyau.¹⁹¹ Ce résultat précise les rôles prépondérants que joue le vecteur lors du trafic de l'ADN du cytoplasme vers le noyau, protégeant sans doute l'ADN de la dégradation par des nucléases présentes dans le cytoplasme et facilitant la diffusion de l'ADN compacté dans le cytoplasme. En ce qui concerne les complexes ADN/vecteur, leur devenir et l'expression de l'ADN semblent être différents selon la nature "lipide" ou "polymère" du vecteur.

Avec les systèmes lipidiques de transfert de gènes, les expériences de microinjections intranucléaire et intracytoplasmique de lipoplexes ont montré des niveaux d'expression du gène très faibles, contrairement à une transfection "classique" par la voie endocytose.^{191;192} Ces différents résultats suggèrent que l'ADN dans le cytoplasme doit rester partiellement complexé avec le système lipidique pour pouvoir accéder au noyau et être exprimé. Ceci est confirmé par une expression du transgène à la suite d'une microinjection intranucléaire d'un lipoplexe dans lequel l'ADN est partiellement complexé (rapport N/P < 1). La nécessité d'une dissociation partielle de l'ADN du lipoplexe est à l'origine de l'élaboration du lipide DOGSDO qui contient un pont disulfure¹⁹³. Ce lipide est un agent de transfert de gènes nettement plus efficace que son homologue qui ne possède pas de liaison disulfure. DOGSDO conduit à des lipoplexes plus facilement dissociables dans le cytoplasme. En effet, le cytoplasme est un milieu réducteur qui permet la coupure des liaisons disulfures, ce qui entraîne la transformation du lipide DOGSDO en détergent et donc facilite la décomplexation de l'ADN.

En ce qui concerne les polyplexes (PLL/ADN ou PEI/ADN), et contrairement aux lipoplexes, leur injection intranucléaire conduit à une meilleure expression du gène que leur injection intracytoplasmique.¹⁹¹ Par ailleurs, la même cinétique d'expression du gène est obtenue après une injection intracytoplasmique ou une transfection "classique" du polyplexe.

Ces expériences montrent donc que l'accès au noyau est également l'étape limitante de la transfection par les polyplexes^{194;195} mais que la présence des polymères facilite l'accès de

l'ADN au noyau, même après la mitose. Ces différents résultats sont davantage en faveur d'une pénétration nucléaire d'un complexe que d'ADN nu, la localisation intranucléaire de complexes PEI/ADN ayant effectivement été observée par microscopie confocale en utilisant un marquage fluorescent.¹⁹⁶

Par ailleurs, une autre étude portant sur les polymères p(DMAEMA) et ses analogues soutient le fait que plus l'ADN se dissocie facilement du polyplexe, plus la transfection est efficace. La modélisation moléculaire des interactions polymère/ADN indique que, parmi ces différents dérivés, c'est p(DMAEMA) qui interagit le plus faiblement avec l'ADN. C'est effectivement lui qui s'est révélé être l'agent de transfert le plus efficace.¹⁹⁷ Pour faciliter l'étape de dissociation de l'ADN des polyplexes, la même stratégie que celle utilisée pour la formulation lipoplexes nanométriques à partir de détergents dimérisables a été appliquée avec des polyamines polymérisables.¹⁹⁸ Cependant, cette stratégie n'a pas été concluante car les polyplexes obtenus étaient des particules négatives qui ne pénétraient pas les cellules.

IV-3-3 De la transcription du plasmide à la protéine

L'avant dernière étape consiste à la transcription de l'ADN plasmidique en ARN messager. Cette étape a lieu dans le noyau cellulaire et nécessite que l'ARN polymérase de la machinerie cellulaire se fixe sur le promoteur du plasmide. Par conséquent, le choix du promoteur revêt une importance particulière. Le promoteur cytogémalovirus (pCMV) apporte une meilleure efficacité de transfection *in vivo* du plasmide que les promoteurs SV40, thymidine kinase (TK) ou d'adénovirus.⁸⁸

Le choix des promoteurs peut également se porter sur des promoteurs réglables, dont l'expression peut être induite ou réprimée, ou sur des promoteurs spécifiques d'un type cellulaire. Ces derniers présentent l'avantage de ne permettre une expression du transgène que dans des cellules bien précises.¹⁹⁹

La dernière étape qui consiste à traduire l'ARN messager en protéine est elle aussi sous le contrôle de la machinerie cellulaire.

IV-3-4 Expression cytoplasmique du transgène

La très faible efficacité du transport nucléaire de l'ADN plasmidique par les systèmes synthétiques de transfert de gènes est un des problèmes majeurs à résoudre. Pour s'affranchir de cette étape limitante de l'expression du transgène, l'utilisation de systèmes permettant aux gènes d'être exprimés au niveau cytoplasmique a été explorée. De tels systèmes offrent des perspectives intéressantes pour le futur car ils sont en principe adaptables à n'importe quel type cellulaire. Il n'est pas non plus nécessaire que la cellule soit en division pour que le transgène puisse être exprimé au niveau du cytoplasme.

Une première stratégie, qui repose sur la délivrance simultanée dans le cytoplasme de la protéine ARN T7 polymérase et d'un plasmide qui contient un gène reporter sous le contrôle du promoteur T7, a été élaborée.²⁰⁰ Cette polymérase, d'origine bactérienne, a la particularité de transcrire l'ADN plasmidique en ARN messager dans le cytoplasme, avec une efficacité bien supérieure à celle de polymérases eucaryotes. Par ailleurs, cette polymérase ne pénètre pas dans le noyau. Ce système a conduit à une expression du transgène dans le cytoplasme avec une cinétique relativement plus rapide (8-10 h) que celle qui nécessite un transport nucléaire du gène. Mais l'expression obtenue avec ce système s'est révélée transitoire (2-3 jours), ceci ayant été attribué à la dégradation/inactivation de la polymérase dans la cellule.

Pour remédier aux différents inconvénients liés à cette première approche, une stratégie " autogène T7 " a été développée.²⁰¹ Un autogène T7 est une séquence d'ADN qui code à la fois pour la protéine ARN T7 polymérase et pour une protéine reporter ou thérapeutique.

Les résultats les plus significatifs ont été obtenus avec un autogène T7 codant pour la polymérase ARN T7 placé sous le contrôle de deux promoteurs, l'un qui est actif dans le noyau (pCMV) et l'autre dans le cytoplasme (promoteur T7). Le promoteur pCMV sert à initier le premier cycle de synthèse de la polymérase ARN T7 dans le noyau (cette phase n'est pas limitante car elle ne nécessite seulement qu'une petite fraction de l'autogène puisse atteindre le noyau). Une fois dans le cytoplasme, cette polymérase qui possède une haute affinité pour le promoteur T7, transcrit les autogènes T7 *via* un mécanisme autorégulé. Les ARNm codant pour la protéine reporter ou thérapeutique et pour l'ARN T7 polymérase

(enzyme qui accélère le processus de transcription) sont produits ainsi que leurs protéines respectives.

Cette approche a conduit à des niveaux élevés d'expression de la protéine reporter et sur une période de plus de 7 jours.^{202;203}

Cette technologie présente également plusieurs avantages :

- les autogènes, qui sont produits par des bactéries, peuvent être facilement amplifiés et purifiés,

- la polymérase est produite de manière endogène et “ en continu ” à l'intérieur de la cellule, ce qui permet d'éviter les problèmes liés à l'utilisation d'enzymes exogènes (purification, réaction immune, dégradation, inactivation, pénétration cellulaire),

- les niveaux d'expression cytoplasmique sont plus élevés que ceux obtenus par les systèmes qui dépendent d'une expression nucléaire.

V Conclusion

Si la thérapie génique ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour traiter de nombreuses maladies, l'expérience et les connaissances acquises ces quinze dernières années permettent d'avoir un certain recul sur les vecteurs de transfert de gènes, leurs potentialités et leurs limites.

L'obstacle majeur à sa réalisation réside encore dans les difficultés techniques à transférer le transgène dans les cellules avec efficacité, aussi bien en terme d'expression que de durée et de spécificité cellulaire, et à obtenir une transfection qui soit sans risques pour le patient.

Aujourd'hui, aucun de ces vecteurs, qu'il dérive ou non de virus, ne présente l'efficacité et la sécurité requise pour une utilisation thérapeutique chez l'homme. Il est d'ailleurs probable qu'il n'y aura pas un vecteur idéal mais différents vecteurs selon le type de pathologies à traiter, le mode d'administration, les caractéristiques du gène... d'où l'intérêt de disposer d'un large éventail de vecteurs, et les vecteurs synthétiques occupent dès lors une place de choix. En effet, ils présentent de multiples avantages en terme de coût, de facilité de mise en œuvre, de sécurité et d'éthique, par rapport aux vecteurs viraux.

La thérapie génique est encore dans une phase de mise au point. Ses avancées passent aujourd'hui par une meilleure connaissance de la virologie, de la biologie moléculaire et de l'élucidation des mécanismes de transfert de gènes des virus et des vecteurs synthétiques, et par le développement de nouveaux vecteurs ayant une biodisponibilité accrue et permettant une transfection cellulaire spécifique et efficace.

Références bibliographiques

1. Cohen-Haguenaer, O. Gene therapy: regulatory issues and international approaches to regulation. *Current Opinion in Biotechnology* **1997**, *8*, 361-369.
2. <http://www.genome.gouv>
3. International Human Genome Sequencing Consortium Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
4. Gene Therapy Trials. <http://www.search.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>
5. Carmen, I. H. A death in the laboratory: the politics of the Gelsinger aftermath. *Mol. Ther.* **2001**, *3*, 425-428.
6. Cavazzana-Calvo, M.; Hacein-Bey, S.; Yates, F.; de Villartay, J. P.; Le Deist, F.; and Fischer, A. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 201-206.
7. Fischer, A.; Hacein-Bey, S.; and Cavazzana-Calvo, M. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 615-621.
8. Hacein-Bey-Abina, S.; Von Kalle, C.; Schmidt, M.; Le Deist, F.; Wulffraat, N.; McIntyre, E.; Radford, I.; Villeval, J. L.; Fraser, C. C.; Cavazzana-Calvo, M.; and Fischer, A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 255-256.
9. Aiuti, A.; Slavin, S.; Aker, M.; Ficara, F.; Deola, S.; Mortellaro, A.; Morecki, S.; Andolfi, G.; Tabucchi, A.; Carlucchi, F.; Marinello, E.; Cattaneo, F.; Vai, S.; Servida, P.; Miniero, R.; Roncarolo, M. G.; and Bordignon, C. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* **2002**, *296*, 2410-2413.
10. VandenDriessche, T.; Collen, D.; and Chuah, M. K. Gene therapy for the hemophilias. *J. Thromb. Haemost.* **2003**, *1*, 1550-1558.
11. Ledley, F. D. Pharmaceutical approach to somatic gene therapy. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 1595-1614.
12. Martin, S. G. and Murray, J. C. Gene-transfer systems for human endothelial cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, *41*, 223-233.
13. Imazu, S.; Nakagawa, S.; Nakanishi, T.; Mizuguchi, H.; Uemura, H.; Yamada, O.; and Mayumi, T. A novel nonviral vector based on vesicular stomatitis virus. *J. Control Release* **2000**, *68*, 187-194.
14. Niidome, T. and Huang, L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther.* **2002**, *9*, 1647-1652.
15. Whittaker, G. R. Virus nuclear import. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 733-747.

16. Kay, M. A.; Glorioso, J. C.; and Naldini, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 33-40.
17. Ruitenbergh, M. J.; Eggers, R.; Boer, G. J.; and Verhaagen, J. Adeno-associated viral vectors as agents for gene delivery: application in disorders and trauma of the central nervous system. *Methods* **2002**, *28*, 182-194.
18. Lai, C. M.; Lai, Y. K.; and Rakoczy, P. E. Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol.* **2002**, *21*, 895-913.
19. Buchschacher, G. L., Jr. Introduction to retroviruses and retroviral vectors. *Somat. Cell Mol. Genet.* **2001**, *26*, 1-11.
20. St George, J. A. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther.* **2003**, *10*, 1135-1141.
21. Burton, E. A.; Fink, D. J.; and Glorioso, J. C. Gene delivery using herpes simplex virus vectors. *DNA Cell Biol.* **2002**, *21*, 915-936.
22. Felgner, P. L.; Barenholz, Y.; Behr, J. P.; Cheng, S. H.; Cullis, P.; Huang, L.; Jessee, J. A.; Seymour, L.; Szoka, F.; Thierry, A. R.; Wagner, E.; and Wu, G. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum. Gene Ther.* **1997**, *8*, 511-512.
23. Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; and Danielsen, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1987**, *84*, 7413-7417.
24. Liu, D.; Ren, T.; and Gao, X. Cationic transfection lipids. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1307-1315.
25. Miller, A. D. The problem with cationic liposome/micelle-based non-viral vector systems for gene therapy. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1195-1211.
26. Ilies, M. A.; Seitz, W. A.; and Balaban, A. T. Cationic lipids in gene delivery: principles, vector design and therapeutical applications. *Curr. Pharm. Des* **2002**, *8*, 2441-2473.
27. Ren, T.; Zhang, G.; Liu, F.; and Liu, D. Synthesis and evaluation of vitamin D-based cationic lipids for gene delivery in vitro. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 891-894.
28. Behr, J. P. DNA strongly binds to micelles and vesicles containing lipopolyamines or lipointercalants. *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 5861-5864.
29. Birchall, J. C.; Waterworth, C. A.; Luscombe, C.; Parkins, D. A.; and Gumbleton, M. Statistical modelling of the formulation variables in non-viral gene delivery systems. *J. Drug Target* **2001**, *9*, 169-184.
30. Niculescu-Duvaz, D.; Heyes, J.; and Springer, C. J. Structure-activity relationship in cationic lipid mediated gene transfection. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1233-1261.

31. Ishiwata, H.; Suzuki, N.; Ando, S.; Kikuchi, H.; and Kitagawa, T. Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes. *Journal of Controlled Release* **2000**, *69*, 139-148.
32. Mislick, K. A. and Baldeschwieler, J. D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1996**, *93*, 12349-12354.
33. Farhood, H.; Serbina, N.; and Huang, L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1995**, *1235*, 289-295.
34. Gao, X. and Huang, L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, *179*, 280-285.
35. Safinya, C. R. Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 440-448.
36. Koltover, I.; Salditt, T.; Radler, J. O.; and Safinya, C. R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* **1998**, *281*, 78-81.
37. Lin, A. J.; Slack, N. L.; Ahmad, A.; Koltover, I.; George, C. X.; Samuel, C. E.; and Safinya, C. R. Structure and structure-function studies of lipid/plasmid DNA complexes. *J. Drug Target* **2000**, *8*, 13-27.
38. Gaucheron, J.; Santaella, C.; and Vierling, P. Highly fluorinated lipospermines for gene transfer: synthesis and evaluation of their in vitro transfection efficiency. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 114-128.
39. Gaucheron, J.; Boulanger, C.; Santaella, C.; Sbirrazzuoli, N.; Boussif, O.; and Vierling, P. In vitro cationic lipid-mediated gene delivery with fluorinated glycerophosphoethanolamine helper lipids. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 949-963.
40. Gaucheron, J.; Santaella, C.; and Vierling, P. Transfection with fluorinated lipoplexes based on fluorinated analogues of DOTMA, DMRIE and DPPES. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 349-358.
41. Boussif, O.; Gaucheron, J.; Boulanger, C.; Santaella, C.; Kolbe, H. V.; and Vierling, P. Enhanced in vitro and in vivo cationic lipid-mediated gene delivery with a fluorinated glycerophosphoethanolamine helper lipid. *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 109-114.
42. Dauty, E.; Behr, J. P.; and Remy, J. S. Development of plasmid and oligonucleotide nanometric particles. *Gene Ther.* **2002**, *9*, 743-748.
43. Dauty, E.; Remy, J. S.; Blessing, T.; and Behr, J. P. Dimerizable cationic detergents with a low cmc condense plasmid DNA into nanometric particles and transfect cells in culture. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9227-9234.
44. Sharma, A. and Sharma, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, *154*, 123-140.

45. Voinea, M. and Simionescu, M. Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs. *J. Cell Mol. Med.* **2002**, *6*, 465-474.
46. Maurer, N.; Fenske, D. B.; and Cullis, P. R. Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opin Biol Ther* **2001**, *1*, 923-947.
47. Merdan, T.; Kopecek, J.; and Kissel, T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 715-758.
48. Merlin, J. L.; N'Doye, A.; Bouriez, T.; and Dolivet, G. Polyethylenimine Derivatives as Potent Nonviral Vectors for Gene Transfer. *Drug News Perspect.* **2002**, *15*, 445-451.
49. Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; and Behr, J. P. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1995**, *92*, 7297-7301.
50. Wightman, L.; Kircheis, R.; Rossler, V.; Carotta, S.; Ruzicka, R.; Kursu, M.; and Wagner, E. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 362-372.
51. Brissault, B.; Kichler, A.; Guis, C.; Leborgne, C.; Danos, O.; and Cheradame, H. Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 581-587.
52. Ferrari, S.; Moro, E.; Pettenazzo, A.; Behr, J. P.; Zacchello, F.; and Scarpa, M. ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **1997**, *4*, 1100-1106.
53. <http://www.polyplus-transfection.com>
54. Campeau, P.; Chapdelaine, P.; Seigneurin-Venin, S.; Massie, B.; and Tremblay, J. P. Transfection of large plasmids in primary human myoblasts. *Gene Ther.* **2001**, *8*, 1387-1394.
55. Behr, J. P. L'éponge à protons: un moyen d'entrer dans une cellule auquel les virus n'ont pas pensé. *Médecine & Sciences* **1996**, *12*, 56-59.
56. Yoo, H.; Sazani, P.; and Juliano, R. L. PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense oligonucleotides. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1799-1804.
57. Forrest, M. L. and Pack, D. W. On the kinetics of polyplex endocytic trafficking: implications for gene delivery vector design. *Mol. Ther* **2002**, *6*, 57-66.
58. Read, M. L.; Bremner, K. H.; Oupicky, D.; Green, N. K.; Searle, P. F.; and Seymour, L. W. Vectors based on reducible polycations facilitate intracellular release of nucleic acids. *J. Gene Med.* **2003**, *5*, 232-245.
59. Boutevin, B. and Pietrasanta, Y. Telomerization. In *Comprehensive polymer science. The synthesis, characterization, reactions and applications of polymers. Chain polymerization part I*. Pergamon Press: Oxford, 1989; pp 185-194.

60. Van Craynest, N.; Santaella, C.; Boussif, O.; and Vierling, P. Polycationic telomers and cotelomers for gene transfer: synthesis and evaluation of their an vitro transfection efficiency. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 59-75.
61. Verderone, G.; Van Craynest, N.; Boussif, O.; Santaella, C.; Bischoff, R.; Kolbe, H. V.; and Vierling, P. Lipopolycationic telomers for gene transfer: synthesis and evaluation of their in vitro transfection efficiency. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1367-1379.
62. Lu, Q. L.; Bou-Gharios, G.; and Partridge, T. A. Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. *Gene Ther.* **2003**, *10*, 131-142.
63. Jayankura, M.; Boggione, C.; Frisen, C.; Boyer, O.; Fouret, P.; Saillant, G.; and Klatzmann, D. In situ gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer. *J. Gene Med.* **2003**, *5*, 618-624.
64. Hodges, B. L. and Scheule, R. K. Hydrodynamic delivery of DNA. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **2003**, *3*, 911-918.
65. Biewenga, J. E.; Destree, O. H.; and Schrama, L. H. Plasmid-mediated gene transfer in neurons using the biolistics technique. *J. Neurosci. Methods* **1997**, *71*, 67-75.
66. Zelenin, A. V.; Kolesnikov, V. A.; Tarasenko, O. A.; Shafei, R. A.; Zelenina, I. A.; Mikhailov, V. V.; Semenova, M. L.; Kovalenko, D. V.; Artemyeva, O. V.; and Ivaschenko, T. E. Bacterial [beta]-galactosidase and human dystrophin genes are expressed in mouse skeletal muscle fibers after ballistic transfection. *FEBS Letters* **1997**, *414*, 319-322.
67. Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; and Hofschneider, P. H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1982**, *1*, 841-845.
68. Baron, S.; Poast, J.; Rizzo, D.; McFarland, E.; and Kieff, E. Electroporation of antibodies, DNA, and other macromolecules into cells: a highly efficient method. *J. Immunol. Methods* **2000**, *242*, 115-126.
69. Dean, D. A.; Machado-Aranda, D.; Blair-Parks, K.; Yeldandi, A. V.; and Young, J. L. Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung. *Gene Ther.* **2003**, *10*, 1608-1615.
70. Fattori, E.; La Monica, N.; Ciliberto, G.; and Toniatti, C. Electro-gene-transfer: a new approach for muscle gene delivery. *Somat. Cell Mol. Genet.* **2002**, *27*, 75-83.
71. Haas, K.; Sin, W. C.; Javaherian, A.; Li, Z.; and Cline, H. T. Single-cell electroporation for gene transfer in vivo. *Neuron* **2001**, *29*, 583-591.
72. Li, S. and Benninger, M. Applications of muscle electroporation gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **2002**, *2*, 101-105.
73. Nakamura, H. and Funahashi, J. Introduction of DNA into chick embryos by in ovo electroporation. *Methods* **2001**, *24*, 43-48.

74. Scherman, D.; Bigey, P.; and Bureau, M. F. Applications of plasmid electrotransfer. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2002**, *1*, 351-354.
75. Lucas, M. L.; Jaroszeski, M. J.; Gilbert, R.; and Heller, R. In vivo electroporation using an exponentially enhanced pulse: a new waveform. *DNA Cell Biol.* **2001**, *20*, 183-188.
76. Plank, C.; Anton, M.; Rudolph, C.; Rosenecker, J.; and Krotz, F. Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **2003**, *3*, 745-758.
77. Hosseinkhani, H.; Aoyama, T.; Ogawa, O.; and Tabata, Y. Ultrasound enhancement of in vitro transfection of plasmid DNA by a cationized gelatin. *J. Drug Target* **2002**, *10*, 193-204.
78. Hosseinkhani, H.; Aoyama, T.; Ogawa, O.; and Tabata, Y. Ultrasound enhances the transfection of plasmid DNA by non-viral vectors. *Curr Pharm Biotechnol* **2003**, *4*, 109-122.
79. Wiethoff, C. M. and Middaugh, C. R. Barriers to nonviral gene delivery. *J Pharm Sci* **2003**, *92*, 203-217.
80. Escriou, V.; Ciolina, C.; Lacroix, F.; Byk, G.; Scherman, D.; and Wils, P. Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1368*, 276-288.
81. Yang, J. P. and Huang, L. Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Ther* **1997**, *4*, 950-960.
82. Sakurai, F.; Nishioka, T.; Saito, H.; Baba, T.; Okuda, A.; Matsumoto, O.; Taga, T.; Yamashita, F.; Takakura, Y.; and Hashida, M. Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: the role of the neutral helper lipid. *Gene Ther.* **2001**, *8*, 677-686.
83. Bragonzi, A.; Boletta, A.; Biffi, A.; Muggia, A.; Sersale, G.; Cheng, S. H.; Bordignon, C.; Assael, B. M.; and Conese, M. Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs. *Gene Ther* **1999**, *6*, 1995-2004.
84. Dash, P. R.; Read, M. L.; Barrett, L. B.; Wolfert, M. A.; and Seymour, L. W. Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther.* **1999**, *6*, 643-650.
85. Ogris, M.; Brunner, S.; Schuller, S.; Kircheis, R.; and Wagner, E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* **1999**, *6*, 595-605.
86. Plank, C.; Mechtler, K.; Szoka, F. C., Jr.; and Wagner, E. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum. Gene Ther* **1996**, *7*, 1437-1446.

87. Xu, Y. and Szoka, F. C., Jr. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616-5623.
88. Liu, Y.; Liggitt, D.; Zhong, W.; Tu, G.; Gaensler, K.; and Debs, R. Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *J. Biol Chem.* **1995**, *270*, 24864-24870.
89. Zhu, N.; Liggitt, D.; Liu, Y.; and Debs, R. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* **1993**, *261*, 209-211.
90. Thierry, A. R.; Lunardi-Iskandar, Y.; Bryant, J. L.; Rabinovich, P.; Gallo, R. C.; and Mahan, L. C. Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1995**, *92*, 9742-9746.
91. Belting, M. Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends in Biochemical Sciences* **2003**, *28*, 145-151.
92. Liu, F.; Qi, H.; Huang, L.; and Liu, D. Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration. *Gene Ther* **1997**, *4*, 517-523.
93. Song, Y. K.; Liu, F.; Chu, S.; and Liu, D. Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration. *Hum. Gene Ther* **1997**, *8*, 1585-1594.
94. Yoshimura, K.; Rosenfeld, M. A.; Nakamura, H.; Scherer, E. M.; Pavirani, A.; Lecocq, J. P.; and Crystal, R. G. Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the mouse lung after in vivo intratracheal plasmid-mediated gene transfer. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3233-3240.
95. Meyer, K. B.; Thompson, M. M.; Levy, M. Y.; Barron, L. G.; and Szoka, F. C., Jr. Intratracheal gene delivery to the mouse airway: characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics. *Gene Ther* **1995**, *2*, 450-460.
96. Tsan, M. F.; White, J. E.; and Shepard, B. Lung-specific direct in vivo gene transfer with recombinant plasmid DNA. *Am. J. Physiol* **1995**, *268*, L1052-L1056.
97. Stribling, R.; Brunette, E.; Liggitt, D.; Gaensler, K.; and Debs, R. Aerosol gene delivery in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1992**, *89*, 11277-11281.
98. Nabel, G. J.; Nabel, E. G.; Yang, Z. Y.; Fox, B. A.; Plautz, G. E.; Gao, X.; Huang, L.; Shu, S.; Gordon, D.; and Chang, A. E. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1993**, *90*, 11307-11311.
99. Plautz, G. E.; Yang, Z. Y.; Wu, B. Y.; Gao, X.; Huang, L.; and Nabel, G. J. Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1993**, *90*, 4645-4649.
100. Schughart, K.; Bischoff, R.; Hadji, D. A.; Boussif, O.; Perraud, F.; Accart, N.; Rasmussen, U. B.; Pavirani, A.; van Rooijen, N.; and Kolbe, H. V. Effect of liposome-encapsulated clodronate pretreatment on synthetic vector-mediated gene expression in mice. *Gene Ther* **1999**, *6*, 448-453.

101. Lasic, D. D. Recent developments in medical applications of liposomes: sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo. *J. Control Release* **1997**, *48*, 203-222.
102. Kircheis, R.; Schuller, S.; Brunner, S.; Ogris, M.; Heider, K. H.; Zauner, W.; and Wagner, E. Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J. Gene Med.* **1999**, *1*, 111-120.
103. Monfardini, C. and Veronese, F. M. Stabilization of substances in circulation. *Bioconjug. Chem.* **1998**, *9*, 418-450.
104. Blessing, T.; Kursa, M.; Holzhauser, R.; Kircheis, R.; and Wagner, E. Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 529-537.
105. Ross, P. C. and Hui, S. W. Polyethylene glycol enhances lipoplex-cell association and lipofection. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1421*, 273-283.
106. Choi, J. H.; Choi, J. S.; Suh, H.; and Park, J. S. Effect of poly(ethylene glycol) grafting on polyethylenimine as a gene transfer vector in vitro. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2001**, *22*, 46-52.
107. Sung, S. J.; Min, S. H.; Cho, K. Y.; Lee, S.; Min, Y. J.; Yeom, Y. I.; and Park, J. K. Effect of polyethylene glycol on gene delivery of polyethylenimine. *Biol Pharm Bull* **2003**, *26*, 492-500.
108. Kunath, K.; von Harpe, A.; Petersen, H.; Fischer, D.; Voigt, K.; Kissel, T.; and Bickel, U. The structure of PEG-modified poly(ethylene imines) influences biodistribution and pharmacokinetics of their complexes with NF-kappaB decoy in mice. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 810-817.
109. Bernfield, M.; Gotte, M.; Park, P. W.; Reizes, O.; Fitzgerald, M. L.; Lincecum, J.; and Zako, M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 729-777.
110. Wiethoff, C. M.; Smith, J. G.; Koe, G. S.; and Middaugh, C. R. The potential role of proteoglycans in cationic lipid-mediated gene delivery. Studies of the interaction of cationic lipid-DNA complexes with model glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 32806-32813.
111. Audouy, S. A.; de Leij, L. F.; Hoekstra, D.; and Molema, G. In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1599-1605.
112. Anwer, K.; Bailey, A.; and Sullivan, S. M. Targeted gene delivery: a two-pronged approach. *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2000**, *17*, 377-424.
113. Backer, M. V.; Aloise, R.; Przekop, K.; Stoletov, K.; and Backer, J. M. Molecular vehicles for targeted drug delivery. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 462-467.
114. Fisher, K. D.; Ulbrich, K.; Subr, V.; Ward, C. M.; Mautner, V.; Blakey, D.; and Seymour, L. W. A versatile system for receptor-mediated gene delivery permits

- increased entry of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression. *Gene Ther.* **2000**, *7*, 1337-1343.
115. Hofland, H. E.; Masson, C.; Iginla, S.; Osetinsky, I.; Reddy, J. A.; Leamon, C. P.; Scherman, D.; Bessodes, M.; and Wils, P. Folate-targeted gene transfer in vivo. *Mol. Ther.* **2002**, *5*, 739-744.
 116. Kircheis, R.; Wightman, L.; Kursa, M.; Ostermann, E.; and Wagner, E. Tumor-targeted gene delivery: an attractive strategy to use highly active effector molecules in cancer treatment. *Gene Ther.* **2002**, *9*, 731-735.
 117. Kunath, K.; von Harpe, A.; Fischer, D.; and Kissel, T. Galactose-PEI-DNA complexes for targeted gene delivery: degree of substitution affects complex size and transfection efficiency. *J Control Release* **2003**, *88*, 159-172.
 118. Kunath, K.; Merdan, T.; Hegener, O.; Haberlein, H.; and Kissel, T. Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J. Gene Med.* **2003**, *5*, 588-599.
 119. Kursa, M.; Walker, G. F.; Roessler, V.; Ogris, M.; Roedl, W.; Kircheis, R.; and Wagner, E. Novel Shielded Transferrin-Polyethylene Glycol-Polyethylenimine/DNA Complexes for Systemic Tumor-Targeted Gene Transfer. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 222-231.
 120. Leamon, C. P. and Low, P. S. Folate-mediated targeting: from diagnostics to drug and gene delivery. *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 44-51.
 121. Ogris, M. and Wagner, E. Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 479-485.
 122. Ogris, M. and Wagner, E. Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes. *Somat. Cell Mol. Genet.* **2002**, *27*, 85-95.
 123. Ren, T.; Zhang, G.; and Liu, D. Synthesis of galactosyl compounds for targeted gene delivery. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2969-2978.
 124. Wolfert, M. A.; Schacht, E. H.; Toncheva, V.; Ulbrich, K.; Nazarova, O.; and Seymour, L. W. Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers. *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 2123-2133.
 125. Kircheis, R.; Kichler, A.; Wallner, G.; Kursa, M.; Ogris, M.; Felzmann, T.; Buchberger, M.; and Wagner, E. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther.* **1997**, *4*, 409-418.
 126. Lee, J. H.; Engler, J. A.; Collawn, J. F.; and Moore, B. A. Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2004-2012.
 127. Simoes, S.; Slepishkin, V.; Pretzer, E.; Dazin, P.; Gaspar, R.; Pedroso de Lima, M. C.; and Duzgunes, N. Transfection of human macrophages by lipoplexes via the combined use of transferrin and pH-sensitive peptides. *J. Leukoc. Biol.* **1999**, *65*, 270-279.

128. Tros, d., I and Duzgunes, N. Efficient gene transfer by transferrin lipoplexes in the presence of serum. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1463*, 333-342.
129. Kircheis, R.; Wightman, L.; Schreiber, A.; Robitza, B.; Rossler, V.; Kursa, M.; and Wagner, E. Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther.* **2001**, *8*, 28-40.
130. Rudolph, C.; Schillinger, U.; Plank, C.; Gessner, A.; Nicklaus, P.; Muller, R.; and Rosenecker, J. Nonviral gene delivery to the lung with copolymer-protected and transferrin-modified polyethylenimine. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1573*, 75-83.
131. Tan, P. H.; King, W. J.; Chen, D.; Awad, H. M.; Mackett, M.; Lechler, R. I.; Larkin, D. F.; and George, A. J. Transferrin receptor-mediated gene transfer to the corneal endothelium. *Transplantation* **2001**, *71*, 552-560.
132. Tros, d., I; Arangoa, M. A.; Moreno-Aliaga, M. J.; and Duzgunes, N. Enhanced gene delivery in vitro and in vivo by improved transferrin-lipoplexes. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1561*, 209-221.
133. Kircheis, R.; Blessing, T.; Brunner, S.; Wightman, L.; and Wagner, E. Tumor targeting with surface-shielded ligand--polycation DNA complexes. *J. Control Release* **2001**, *72*, 165-170.
134. Ogris, M.; Walker, G.; Blessing, T.; Kircheis, R.; Wolschek, M.; and Wagner, E. Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes. *J. Control Release* **2003**, *91*, 173-181.
135. Ross, J. F.; Chaudhuri, P. K.; and Ratnam, M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer* **1994**, *73*, 2432-2443.
136. Ward, C. M. Folate-targeted non-viral DNA vectors for cancer gene therapy. *Curr. Opin Mol. Ther* **2000**, *2*, 182-187.
137. Lu, Y. and Low, P. S. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 675-693.
138. Mislick, K. A.; Baldeschwieler, J. D.; Kayyem, J. F.; and Meade, T. J. Transfection of folate-polylysine DNA complexes: evidence for lysosomal delivery. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6*, 512-515.
139. Guo, W. and Lee, R. L. Receptor-targeted gene delivery via folate-conjugated polyethylenimine. *AAPS. PharmSci.* **1999**, *1*, E19.
140. Benns, J. M.; Maheshwari, A.; Furgeson, D. Y.; Mahato, R. I.; and Kim, S. W. Folate-PEG-folate-graft-polyethylenimine-based gene delivery. *J. Drug Target* **2001**, *9*, 123-139.
141. van Steenis, J. H.; van Maarseveen, E. M.; Verbaan, F. J.; Verrijck, R.; Crommelin, D. J.; Storm, G.; and Hennink, W. E. Preparation and characterization of folate-targeted pEG-coated pDMAEMA-based polyplexes. *J Control Release* **2003**, *87*, 167-176.

142. Stockert, R. J. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev.* **1995**, *75*, 591-609.
143. Arangoa, M. A.; Duzgunes, N.; and de Ilarduya, C. T. Increased receptor-mediated gene delivery to the liver by protamine-enhanced-asialofetuin-lipoplexes. *Gene Ther.* **2003**, *10*, 5-14.
144. Fabio, K.; Gaucheron, J.; Di Giorgio, C.; and Vierling, P. Novel galactosylated polyamine bolaamphiphiles for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 358-367.
145. Gaucheron, J.; Santaella, C.; and Vierling, P. In vitro gene transfer with a novel galactosylated spermine bolaamphiphile. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 569-575.
146. Wu, G. Y. and Wu, C. H. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol Chem.* **1987**, *262*, 4429-4432.
147. Zanta, M. A.; Boussif, O.; Adib, A.; and Behr, J. P. In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Bioconjug. Chem.* **1997**, *8*, 839-844.
148. Hashida, M.; Nishikawa, M.; Yamashita, F.; and Takakura, Y. Cell-specific delivery of genes with glycosylated carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *52*, 187-196.
149. Kawakami, S.; Yamashita, F.; Nishida, K.; Nakamura, J.; and Hashida, M. Glycosylated cationic liposomes for cell-selective gene delivery. *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2002**, *19*, 171-190.
150. Bettinger, T.; Remy, J. S.; and Erbacher, P. Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 558-561.
151. Erbacher, P.; Bettinger, T.; Belguise-Valladier, P.; Zou, S.; Coll, J. L.; Behr, J. P.; and Remy, J. S. Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J. Gene Med.* **1999**, *1*, 210-222.
152. Sagara, K. and Kim, S. W. A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes. *J. Control Release* **2002**, *79*, 271-281.
153. Fajac, I.; Thevenot, G.; Bedouet, L.; Danel, C.; Riquet, M.; Merten, M.; Figarella, C.; Ava-Santucci, J. D.; Monsigny, M.; and Briand, P. Uptake of plasmid/glycosylated polymer complexes and gene transfer efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J. Gene Med.* **2003**, *5*, 38-48.
154. Erbacher, P.; Bousser, M. T.; Raimond, J.; Monsigny, M.; Midoux, P.; and Roche, A. C. Gene transfer by DNA/glycosylated polylysine complexes into human blood monocyte-derived macrophages. *Hum. Gene Ther* **1996**, *7*, 721-729.
155. Murao, A.; Nishikawa, M.; Managit, C.; Wong, J.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; and Hashida, M. Targeting efficiency of galactosylated liposomes to hepatocytes in vivo: effect of lipid composition. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1808-1814.

156. Kawakami, S.; Wong, J.; Sato, A.; Hattori, Y.; Yamashita, F.; and Hashida, M. Biodistribution characteristics of mannosylated, fucosylated, and galactosylated liposomes in mice. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1524*, 258-265.
157. Jasseron, S.; Contino-Pepin, C.; Maurizis, J. C.; Rapp, M.; and Pucci, B. Synthesis and preliminary biological assessments of RGD bearing biocompatible telomers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12*, 1067-1070.
158. Scott, E. S.; Wiseman, J. W.; Evans, M. J.; and Colledge, W. H. Enhanced gene delivery to human airway epithelial cells using an integrin-targeting lipoplex. *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 125-134.
159. Erbacher, P.; Remy, J. S.; and Behr, J. P. Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther* **1999**, *6*, 138-145.
160. Parker, A. L. and Seymour, L. W. Targeting of polyelectrolyte RNA complexes to cell surface integrins as an efficient cytoplasmic transfection mechanism. *JOURNAL OF BIOACTIVE AND COMPATIBLE POLYMERS* **2002**, *17*, 229-238.
161. Hood, J. D.; Bednarski, M.; Frausto, R.; Guccione, S.; Reisfeld, R. A.; Xiang, R.; and Cheresch, D. A. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* **2002**, *296*, 2404-2407.
162. Reynolds, A. R.; Moein, M. S.; and Hodivala-Dilke, K. Nanoparticle-mediated gene delivery to tumour neovasculature. *Trends Mol Med* **2003**, *9*, 2-4.
163. Sipkins, D. A.; Cheresch, D. A.; Kazemi, M. R.; Nevin, L. M.; Bednarski, M. D.; and Li, K. C. Detection of tumor angiogenesis in vivo by alphaVbeta3-targeted magnetic resonance imaging. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 623-626.
164. Guillem, V. M.; Tormo, M.; Revert, F.; Benet, I.; Garcia-Conde, J.; Crespo, A.; and Alino, S. F. Polyethyleneimine-based immunopolyplex for targeted gene transfer in human lymphoma cell lines. *J. Gene Med.* **2002**, *4*, 170-182.
165. Suh, W.; Chung, J. K.; Park, S. H.; and Kim, S. W. Anti-JL1 antibody-conjugated poly (L-lysine) for targeted gene delivery to leukemia T cells. *J. Control Release* **2001**, *72*, 171-178.
166. Guillem, V. M.; Tormo, M.; Moret, I.; Benet, I.; Garcia-Conde, J.; Crespo, A.; and Alino, S. F. Targeted oligonucleotide delivery in human lymphoma cell lines using a polyethyleneimine based immunopolyplex. *J. Control Release* **2002**, *83*, 133-146.
167. Cristiano, R. J. and Roth, J. A. Epidermal growth factor mediated DNA delivery into lung cancer cells via the epidermal growth factor receptor. *Cancer Gene Ther* **1996**, *3*, 4-10.
168. Lee, H.; Kim, T. H.; and Park, T. G. A receptor-mediated gene delivery system using streptavidin and biotin-derivatized, pegylated epidermal growth factor. *J. Control Release* **2002**, *83*, 109-119.
169. Wolschek, M. F.; Thallinger, C.; Kurska, M.; Rossler, V.; Allen, M.; Lichtenberger, C.; Kircheis, R.; Lucas, T.; Willheim, M.; Reinisch, W.; Gangl, A.; Wagner, E.; and

- Jansen, B. Specific systemic nonviral gene delivery to human hepatocellular carcinoma xenografts in SCID mice. *Hepatology* **2002**, *36*, 1106-1114.
170. Smrekar, B.; Wightman, L.; Wolschek, M. F.; Lichtenberger, C.; Ruzicka, R.; Ogris, M.; Rodl, W.; Kursa, M.; Wagner, E.; and Kircheis, R. Tissue-dependent factors affect gene delivery to tumors in vivo. *Gene Ther* **2003**, *10*, 1079-1088.
171. Wiethoff, C. M. and Middaugh, C. R. Barriers to nonviral gene delivery. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 203-217.
172. Lechardeur, D. and Lukacs, G. L. Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr. Gene Ther.* **2002**, *2*, 183-194.
173. Zhang, Z. Y. and Smith, B. D. High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model. *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11*, 805-814.
174. Wagner, E. Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *38*, 279-289.
175. Zuber, G.; Dauty, E.; Nothisen, M.; Belguise, P.; and Behr, J. P. Towards synthetic viruses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *52*, 245-253.
176. Labat-Moleur, F.; Steffan, A. M.; Brisson, C.; Perron, H.; Feugeas, O.; Furstenberger, P.; Oberling, F.; Brambilla, E.; and Behr, J. P. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther.* **1996**, *3*, 1010-1017.
177. Ciftci, K. and Levy, R. J. Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *Int. J. Pharm.* **2001**, *218*, 81-92.
178. Wagner, E.; Plank, C.; Zatloukal, K.; Cotten, M.; and Birnstiel, M. L. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1992**, *89*, 7934-7938.
179. Cotten, M.; Langle-Rouault, F.; Kirlappos, H.; Wagner, E.; Mechtler, K.; Zenke, M.; Beug, H.; and Birnstiel, M. L. Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1990**, *87*, 4033-4037.
180. Kichler, A.; Leborgne, C.; Coeytaux, E.; and Danos, O. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 135-144.
181. Godbey, W. T.; Barry, M. A.; Saggau, P.; Wu, K. K.; and Mikos, A. G. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51*, 321-328.
182. Wiethoff, C. M. and Middaugh, C. R. Barriers to nonviral gene delivery. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 203-217.

183. Campbell, E. M. and Hope, T. J. Role of the cytoskeleton in nuclear import. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 761-771.
184. Brunner, S.; Sauer, T.; Carotta, S.; Cotten, M.; Saltik, M.; and Wagner, E. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther.* **2000**, *7*, 401-407.
185. Sola, B.; Staedel, C.; Remy, J. S.; Bahr, A.; and Behr, J. P. Lipospermine-mediated gene transfer technique into murine cultured cortical cells. *J. Neurosci. Methods* **1997**, *71*, 183-186.
186. Abdallah, B.; Hassan, A.; Benoist, C.; Goula, D.; Behr, J. P.; and Demeneix, B. A. A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum. Gene Ther* **1996**, *7*, 1947-1954.
187. Ryan, K. J. and Wentz, S. R. The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 361-371.
188. Dean, D. A.; Dean, B. S.; Muller, S.; and Smith, L. C. Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp. Cell Res.* **1999**, *253*, 713-722.
189. Escriou, V.; Carriere, M.; Scherman, D.; and Wils, P. NLS bioconjugates for targeting therapeutic genes to the nucleus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 295-306.
190. Zanta, M. A.; Belguise-Valladier, P.; and Behr, J. P. Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1999**, *96*, 91-96.
191. Pollard, H.; Remy, J. S.; Loussouarn, G.; Demolombe, S.; Behr, J. P.; and Escande, D. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7507-7511.
192. Zabner, J.; Fasbender, A. J.; Moninger, T.; Poellinger, K. A.; and Welsh, M. J. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18997-19007.
193. Tang, F. and Hughes, J. A. Introduction of a disulfide bond into a cationic lipid enhances transgene expression of plasmid DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *242*, 141-145.
194. Bieber, T.; Meissner, W.; Kostin, S.; Niemann, A.; and Elsasser, H. P. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J. Control Release* **2002**, *82*, 441-454.
195. Lecocq, M.; Wattiaux-De Coninck, S.; Laurent, N.; Wattiaux, R.; and Jadot, M. Uptake and intracellular fate of polyethylenimine in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *278*, 414-418.
196. Godbey, W. T.; Wu, K. K.; and Mikos, A. G. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1999**, *96*, 5177-5181.

197. van de, W. P.; Moret, E. E.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M.; van Steenbergen, M. J.; and Hennink, W. E. Structure-activity relationships of water-soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for nonviral gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 589-597.
198. Blessing, T.; Remy, J. S.; and Behr, J. P. Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus-like particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1998**, *95*, 1427-1431.
199. Vacik, J.; Dean, B. S.; Zimmer, W. E.; and Dean, D. A. Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Ther.* **1999**, *6*, 1006-1014.
200. Gao, X. and Huang, L. Cytoplasmic expression of a reporter gene by co-delivery of T7 RNA polymerase and T7 promoter sequence with cationic liposomes. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2867-2872.
201. Gao, X.; Jaffurs, D.; Robbins, P. D.; and Huang, L. A sustained, cytoplasmic transgene expression system delivered by cationic liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200*, 1201-1206.
202. Brisson, M.; Tseng, W. C.; Almonte, C.; Watkins, S.; and Huang, L. Subcellular trafficking of the cytoplasmic expression system. *Hum. Gene Ther* **1999**, *10*, 2601-2613.
203. Brisson, M.; He, Y.; Li, S.; Yang, J. P.; and Huang, L. A novel T7 RNA polymerase autogene for efficient cytoplasmic expression of target genes. *Gene Ther* **1999**, *6*, 263-270.

PARTIE II

*NOUVEAUX COTELOMERES POUR LA
FORMULATION DE POLYPLEXES « FURTIFS »*



I Introduction

Les vecteurs synthétiques constituent une alternative prometteuse aux vecteurs viraux pour le transfert du gène médicament. Bien qu'ils aient démontré une réelle capacité à transfecter les cellules en culture, ils souffrent néanmoins de diverses limitations dès lors qu'ils sont utilisés *in vivo*, et en particulier après une administration par la voie systémique. Ils sont notamment très rapidement éliminés de la circulation sanguine après une injection intraveineuse par les "sentinelles" du système réticuloendothélial, ce qui ne leur permet pas d'atteindre leurs cibles tissulaires et cellulaires. Par ailleurs, il est très difficile de contrôler leur biodistribution et l'expression du transgène *in vivo*, ces deux paramètres n'étant pas nécessairement corrélés entre eux.

La délivrance et l'expression de gènes spécifiquement dans un tissu ou une cellule cible sont, comme nous venons de le voir dans la partie bibliographique, des objectifs extrêmement difficiles à atteindre et nécessitent l'élaboration de stratégies qui limitent les interactions non-spécifiques entre les particules d'ADN et le milieu biologique. Dans le cas d'administration par voie systémique, la formation de larges agrégats (> 400-500 nm), leur opsonisation et leur tropisme pour le système phagocytaire mononucléé constituent des obstacles majeurs qu'il faut pouvoir éviter pour que le gène puisse atteindre, *in vivo*, sa cible. Ces obstacles peuvent en partie être surmontés par la conjugaison des vecteurs à des groupements hydrophiles comme des polyéthylènes glycols ou des polyols ET à des ligands spécifiques des récepteurs exprimés par les cellules que l'on veut cibler. De telles constructions "furtives" et "ciblées" sont schématiquement représentées ci-dessous (figure 1).

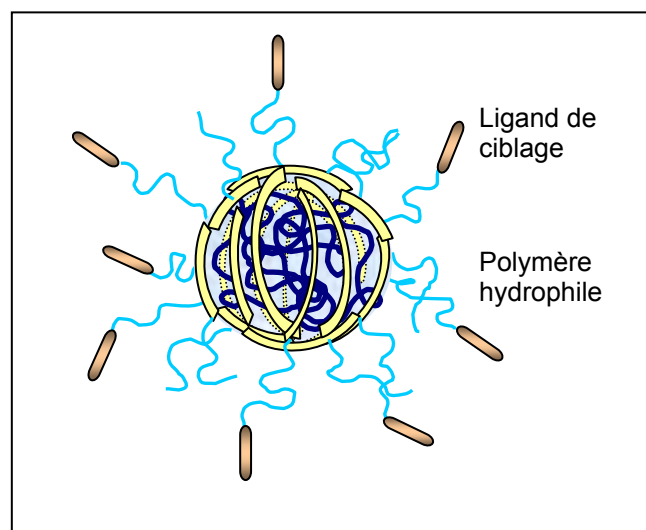


Figure 1 : vecteurs synthétiques "furtifs" et ciblés

De récents travaux au laboratoire ont mis en évidence l'efficacité de transfection de lipopolyamines télomériques et cotélomériques (cf chapitre biblio p 26).^{1,2} Ces dérivés sont obtenus par des réactions de télomérisation d'un monomère M (ou un mélange de monomères M et M', appelé(s) taxogène(s)) polymérisable qui contient un précurseur de la fonction amine, initiée par un thiol R-SH (appelé télogène). Les télomères polyaminés R-S-(M)_n-H ou cotélomères R-S-(M)_n-(M')_{n'}-H (pour lesquels la distribution et l'alternance des monomères M et M' sont aléatoires) que l'obtient ainsi, présentent des degrés de (co)polymérisation qui sont aisément contrôlables. Par ailleurs, ces réactions sont simples à mettre en œuvre. Cette simplicité et l'accès relativement aisé à des précurseurs monomères polymérisables de structures très diverses nous ont incité à développer des télomères polycationiques conjugués à un PEG (type "di-block") ainsi que des cotélomères polycationiques (type "random") dont un des deux monomères comporte un groupement tétraéthylène glycol (TEG) ou tris(hydroxyméthyl) (THM) et à tester leur potentiel en tant que vecteurs de transfert de gènes (structure générique figure 2).

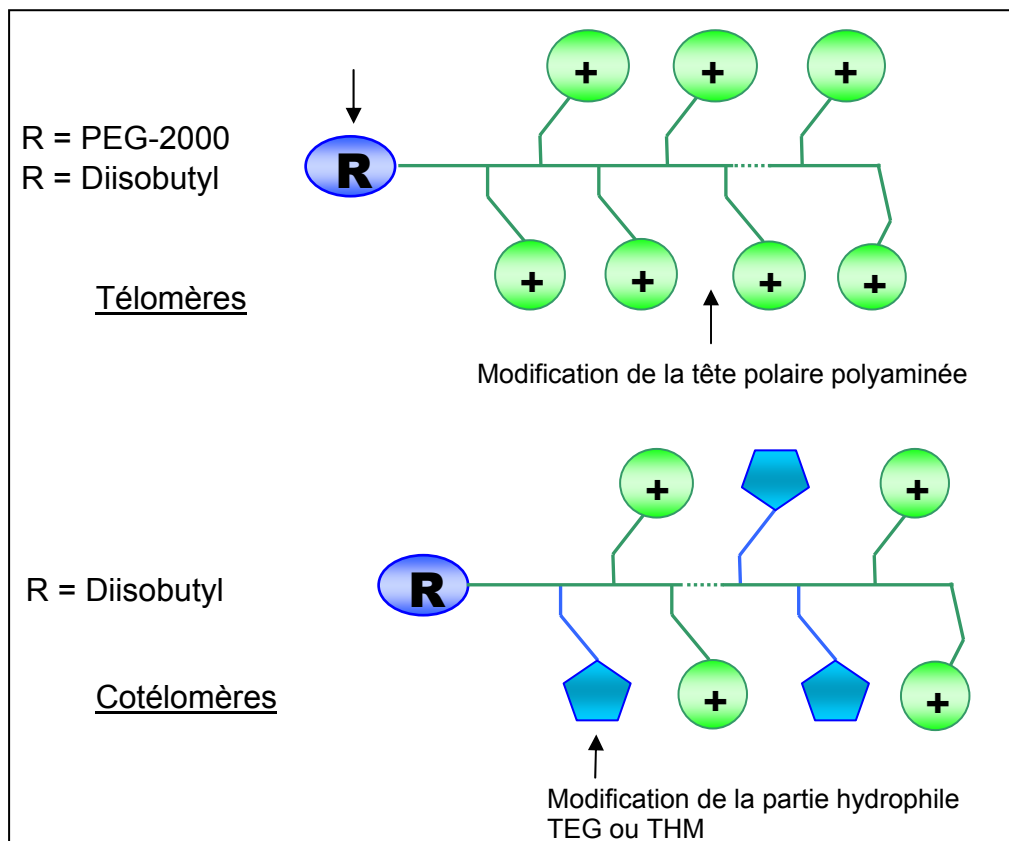


Figure 2 : structure générique des (co)télomères visés

Ces travaux ont fait l'objet de la publication " Polycationic Diblock and Random Polyethylene Glycol- or Tris(hydroxymethyl)methyl-Grafted (Co)telomers for Gene Transfer : Synthesis and Evaluation of Their in Vitro Transfection Efficiency " par B. Le Bon, N. van Craynest, O. Boussif, P. Vierling, *Bionconjugate Chem.* **2002**, 13, 1292-1301. Les résultats les plus significatifs de cette publication seront résumés ci-après, la publication dans sa totalité figurant à la page **83** de ce mémoire. Cependant, nous développerons certains points qui n'ont pas pu être décrits ou approfondis dans cette publication.

Dans cette publication, nous décrivons la synthèse et la caractérisation des divers (co)télomères " di-block " et " random ", leur capacité à compacter des gènes et le potentiel des (co)téloplexes à transfecter des cellules épithéliales pulmonaires de carcinome humain (A549) ainsi que leur cytotoxicité. Les tableaux, schémas et figures cités ci-après sont ceux de la publication. La synthèse, la caractérisation des divers (co)télomères, la formulation et la caractérisation des complexes avec le plasmide et les tests de transfection ont été réalisés par moi-même. Ces travaux ont fait l'objet d'un partenariat par la société Transgène S.A. (resp. Dr. O. Boussif) implantée à Strasbourg.

La structure moléculaire des divers composés polycationiques synthétisés est détaillée dans la Figure 1 de la publication (page 84). Ces dérivés sont caractérisés par une structure modulaire destinée à adapter les propriétés physico-chimiques (complexation de l'ADN, morphologie supramoléculaire, stabilité) et biologiques (biodégradabilité, biocompatibilité, biodisponibilité, efficacité de transfection, interactions avec les composants des milieux biologiques, opsonisation...) des complexes qu'ils vont former avec le gène à vectoriser, complexes que l'on appellera téloplexes ou cotéloplexes.

Les téloplexes " di-block " polycationiques sont couplés à un PEG2000 et comportent un nombre variable d'unités amines primaires ou tertiaires (de 4 à 360). Les cotéloplexes " random " sont constitués d'une combinaison aléatoire d'unités amines primaires et d'unités TEG ou THM. Pour pouvoir estimer l'impact de ces différents unités PEG, TEG ou THM sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des (co)téloplexes, nous avons aussi synthétisé des téloplexes contrôles (dérivés iBu-[NH₂]_n) obtenus à partir du télogène iBu-[SH]. Ce thiol a aussi été sélectionné pour les nombreux atomes d'hydrogène de ses groupements diisobutyles, afin de pouvoir déterminer plus aisément le degré de polymérisation des (co)téloplexes par RMN ¹H.

II Synthèse

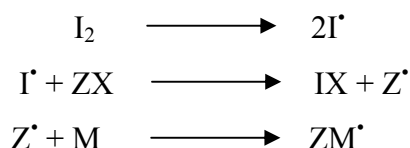
II-1 Généralités sur la télomérisation

Les composés décrits dans la publication sont obtenus par une réaction de télomérisation ou de cotélomérisation. Ces réactions consistent à faire réagir dans les conditions de polymérisation, c'est-à-dire en présence d'un initiateur de radicaux I_2 (généralement l' α, α' -azobis(isobutyronitrile) ou AIBN):

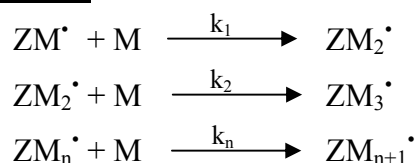
- un (ou deux) monomère(s) M (ou M et M') polymérisable(s), appelé(s) taxogène(s), contenant une fonction amine (éventuellement protégée), et
- un agent de transfert nommé télogène tel qu'un thiol (RS-H) (les thiols comptent parmi les agents de transfert les plus efficaces).

Dans le cas de la télomérisation radicalaire, le schéma diffère de celui de la polymérisation, certaines étapes supplémentaires apparaissent tandis que d'autres deviennent négligeables. Ainsi, si nous considérons un monomère M, un initiateur de radicaux I_2 et un agent de transfert Z-X (Z-X = RS-H), le processus réactionnel peut être schématisé par 4 réactions :

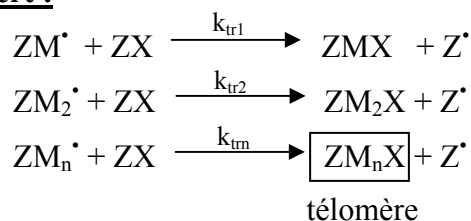
Amorçage :



Propagation :

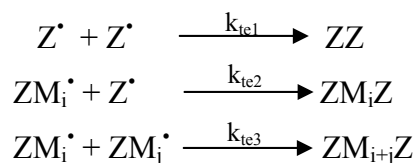


Transfert :



(si Z-X = RS-H alors on obtient comme télomère RS-(M)_n-H)

Terminaison:



La télomérisation diffère fondamentalement de la polymérisation car :

- la structure moléculaire des télomères est de type Z-(Mn)-X, alors que les polymères sont de type (M)n ;
- la masse moléculaire moyenne et, par conséquent, le degré de polymérisation moyen (DPn) des télomères sont beaucoup plus faibles que ceux des polymères, à cause de la réaction de transfert qui prime sur la réaction de terminaison ;
- l'initiateur induit la rupture du télogène, et c'est le radical créé qui agit sur le monomère, et non le radical de l'initiateur. Ceci présente l'avantage de pouvoir diversifier la structure des télomères, par le biais du télogène.

L'exploitation strictement cinétique d'un tel schéma réactionnel est très complexe et permet de proposer des équations mathématiques pour accéder aux fractions molaires de chaque télomère et ainsi de déterminer les DPn. En présence d'un agent de transfert efficace, et c'est le cas des thiols, les équations se simplifient, et le DPn s'obtient par :

$$\frac{1}{(\text{DPn})} = C_T R_0 \text{ avec } R_0 = \frac{[ZX]}{[M]}$$

Il en résulte que la connaissance de la constante de transfert C_T permet de maîtriser la taille des télomères obtenus (DPn), à partir des valeurs des concentrations initiales en télogène ($[ZX]$) et monomère ($[M]$), c'est à dire à partir du rapport molaire R_0 . Une étude a permis d'évaluer la constante de transfert d'une série d'alcanethiols linéaires vis-à-vis de différents motifs acrylamides, et a montré qu'elle était voisine de 1.³ Ce résultat présente un grand avantage car il facilite la prévision du DPn, celui-ci étant pratiquement identique au rapport R_0 .

Les réactions de télomérisation entre un taxogène M et un thiol RS-H permettent donc d'accéder à des télomères de formules $\mathbf{R-S-(M)_n-H}$ et d'ajuster, en fonction du rapport molaire M/RS-H, le nombre de charges du vecteur dans une gamme allant de quelques unités à plusieurs dizaines voire quelques centaines d'unités. Il est ainsi possible de synthétiser des

composés présentant un nombre d'unités cationiques intermédiaire entre celui des lipides polycationiques (quelques unités) et celui des polymères comme les poly-L-lysines ou les polyéthylèneimines utilisées pour la formulation des polyplexes et qui possèdent de degrés de polymérisation assez élevés (plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'unités).

La télomérisation peut également être réalisée en présence de deux (ou plusieurs) taxogènes. Il s'agit alors d'une cotélomérisation qui, si elle est effectuée à partir de taxogènes M et M' et d'un thiol RS-H comme télogène, conduit à des cotélomères de type **R-S-(M_n)-(M'_n)-H** pour lesquels la distribution et l'alternance des monomères M et M' sont aléatoires. Une telle réaction permet de réaliser de nombreuses variations structurales avec en particulier l'élaboration de cotélomères polycationiques polyfonctionnalisés. De la même façon que pour la télomérisation, les degrés moyens de polymérisation (DP_n et DP_n') sont liés aux rapports molaires initiaux M/télogène et M'/télogène.

II-2 Les PEG-Télomères “ di-block ” PEG-[NH₂]_n et PEG-[CH₂NMe₂]_m

Nous avons synthétisé deux séries de PEG-télomères de type di-block présentant l'une un motif aminoéthyl (PEG2000-[NH₂]_n), l'autre un motif diméthylpropylamine (PEG2000-[CH₂NMe₂]_n) (Figure 1 de la publication page 84). Chaque série de télomères est composée de dérivés ayant des degrés de polymérisation et donc un nombre d'unités aminés différents.

Ces deux séries sont préparées à partir du télégène PEG2000-SH (synthétisé à partir du composé commercial PEG2000-OH et, respectivement des taxogènes A (N-[2(tertbutyloxycarbonyl)amino éthyl]-acrylamide² et B (N-[3(diméthylamino)propyl]-acrylamide, commercial), en utilisant différents rapports molaires taxogène/télogène (schéma 1 et 2 de la publication page 84 et 88). Les télomères PEG2000-[NHBOC]_n et PEG2000-[CH₂NMe₂]_n sont obtenus après chromatographie sur une colonne d'exclusion stérique LH-20. Les télomères PEG2000-[NHBOC]_n ensuite déprotégés dans une solution d'acide trifluoroacétique (TFA)/dichlorométhane pour conduire aux télomères PEG2000-[NH₂]_n sous la forme de sels de TFA.

La détermination du degré moyen de télomérisation (= n) est réalisée par RMN ¹H sur les composés PEG2000-[NHBOC]_n et PEG2000-[CH₂NMe₂]_n. La déprotection des groupements BOC dans PEG2000-[NHBOC]_n étant quantitative, le degré moyen de polymérisation ainsi déterminé est également celui du copolymère PEG2000-[NH₂]_n. Ces degrés moyens sont calculés en comparant les intégrations respectives des signaux

correspondants aux protons BOC, NCH₂ et NMe₂ par rapport à l'intégration du motif CH₂CH₂O du PEG.

II-3 Les cotélobères " random " iBu-[TEG]m-[NH₂]n et iBu-[THM]m-[NH₂]n

Nous avons synthétisé deux séries de cotélobères présentant l'une des motifs aléatoires " tétraéthylène glycol " (TEG) et " aminoéthyl " (composés iBu-[TEG]m-[NH₂]n) et l'autre des motifs aléatoires " trishydroxyméthyl " (THM) et " aminoéthyl " (composés iBu-[THM]m-[NH₂]n) (Figure 1 de la publication page 84), chaque série comportant deux dérivés ayant des degrés de polymérisation et donc un nombre d'unités aminés, hydroxylés ou " pégylés " différents. Ces deux séries sont préparées à partir du télégène iBu-[SH] et, respectivement, des taxogènes A et C (acrylate de méthoxytétraéthylène glycol synthétisé à partir de chlorure d'acryloyle et de méthoxytétraéthylène glycol), et des taxogènes A et D (N-[tris-(hydroxyméthyl)méthyl]acrylamide, commercial) en utilisant différents rapports molaires taxogènes/télégène (Schéma 1 et 2 de la publication page 84 et 88). Les cotélobères iBu-[TEG]m-[NHBOC]n et iBu-[THM]m-[NHBOC]n sont isolés par chromatographie sur colonne d'exclusion stérique LH-20 et sont ensuite déprotégés dans une solution d'acide trifluoroacétique/dichlorométhane pour conduire aux cotélobères iBu-[TEG]m-[NH₂]n et iBu-[THM]m-[NH₂]n sous la forme de sels de TFA.

La détermination des degrés de polymérisation **m** et **n** est réalisée par RMN ¹H sur les cotélobères protégés iBu-[TEG]m-[NHBOC]n et iBu-[THM]m-[NHBOC]n. La déprotection étant quantitative, les degrés moyens de polymérisation ainsi déterminés sont également ceux des cotélobères iBu-[TEG]m-[NH₂]n et iBu-[THM]m-[NH₂]n. Ces degrés sont calculés en comparant respectivement :

les intégrations des signaux correspondants aux protons BOC et aux méthyles du groupe diisobutyle, pour le nombre n de motifs aminoéthyles,

les intégrations des signaux correspondants aux protons THM (CH₂OH), ou TEG (OCH₂ et OCH₃) et aux méthyles du motif diisobutyle, pour le nombre m de motifs THM ou TEG.

II-4 Les télomères témoins iBu-[NH₂]_n

La synthèse des télomères iBu-[NH₂]_n est réalisée de manière similaire à celle des copolymères PEG-[NH₂]_n en utilisant différents rapports molaires taxogène A/télogène iBu-SH. Les télomères iBu-[NHBOC]_n sont isolés par chromatographie sur colonne d'exclusion stérique LH-20 et sont ensuite déprotégés dans une solution d'acide trifluoroacétique/dichlorométhane pour conduire aux télomères iBu-[NH₂]_n sous forme de sels de TFA. Comme précédemment, la détermination des degrés de polymérisation **n** est réalisée par RMN ¹H sur les télomères protégés iBu-[NHBOC]. Ces degrés sont calculés en comparant l'intégration du signal des protons BOC à celle du signal des méthyles du groupe diisobutyle.

III Formulation et caractérisation

L'aptitude des différents (co)télomères à former des (co)téloplexes a été évaluée avec le plasmide pTG11236 (Transgène, figure 3) pour différents rapports de charge (N/P = 10 à 0,8) et deux quantités d'ADN par puits (1 et 0,5 µg). Ce plasmide de 5739 paires de bases code pour la luciférase. La procédure appliquée pour la préparation des complexes consiste à diluer un certain volume d'une solution de (co)télomères dans le glucose 5% avec une solution d'ADN pour obtenir une concentration finale de 0,1 mg/mL en ADN.

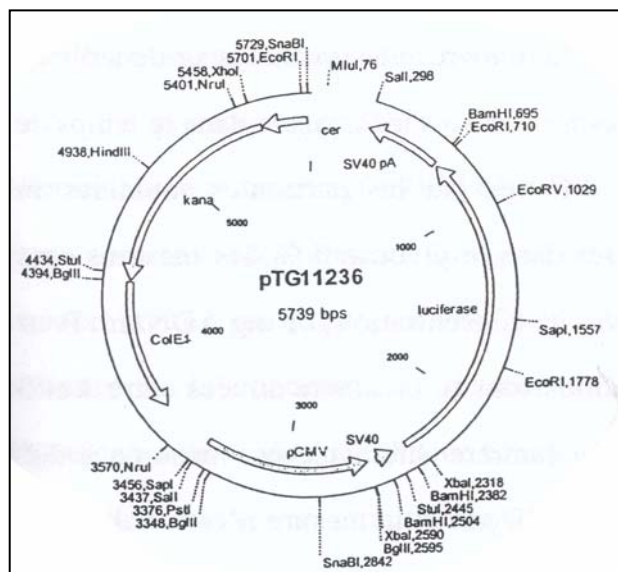


Figure 3 : plasmide pTG11236

L'analyse de la taille des (co)téloplexes (Table 1 de la publication page 88) fait apparaître une taille moyenne comprise entre 85 et 330 nm. Il est à noter que pour de nombreuses formulations N/P 1,25, on observe des précipités. Il est toutefois difficile de mettre en évidence l'impact des chaînes PEG des cotéloplexes " diblock " ou des résidus TEG et THM des cotéloplexes " random " sur la taille des (co)téloplexes obtenus. Seul le rapport N/P semble avoir une légère influence sur la taille, car celle-ci augmente lorsque le rapport N/P diminue.

L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des formulations montre l'absence d'ADN " libre " pour les formulations N/P de 10 à 2,5 et pour la plupart des formulations à 1,25, ce qui confirme une complexation totale de l'ADN par les (co)téloplexes. Toutes les formulations N/P à 0,8 contiennent de l'ADN non complexé et accessible au bromure d'éthidium (Figure 4).

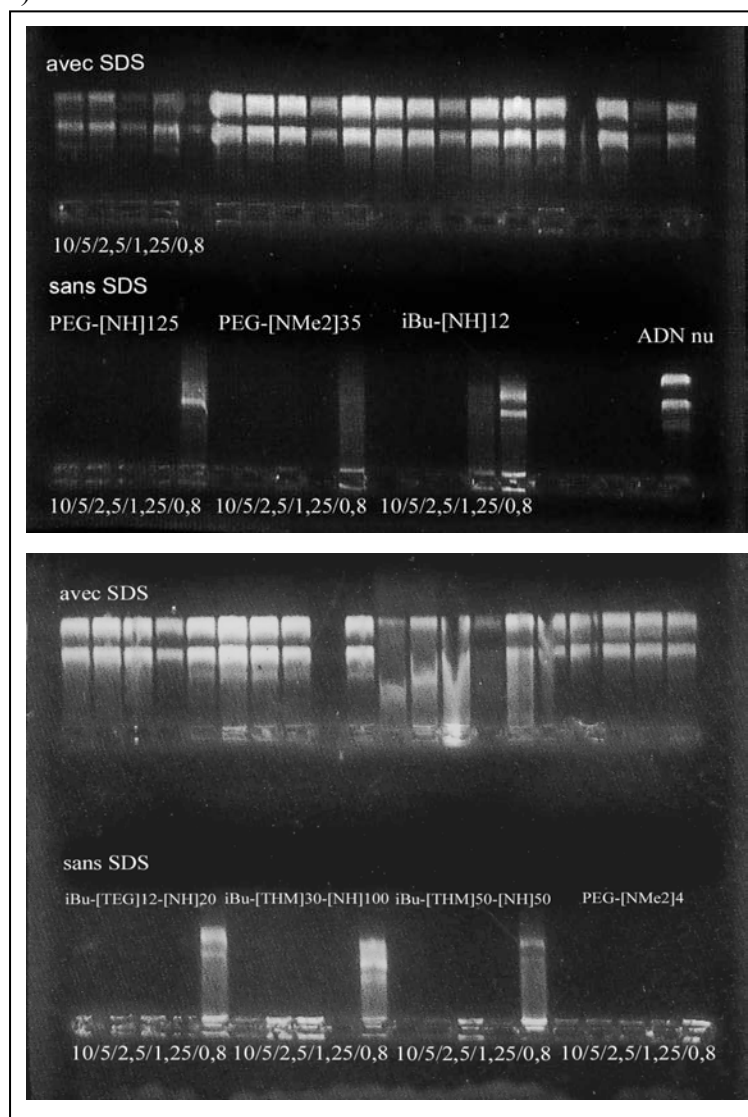


Figure 4 : gels d'électrophorèse (N.B. tous les composés ne sont pas figurés)

IV Transfection *in vitro*

Les diverses formulations obtenues précédemment ont été évaluées *in vitro* sur des cellules adhérentes A549 d'épithélium de carcinome pulmonaire humain. Bien que les efficacités de transfection soient généralement diminuées par la présence des constituants sériques, les tests ont été effectués en présence de 10% de SVF (sérum de veau fœtal). Ces tests ont aussi été effectués, à titre comparatif, avec des lipoplexes références formulés avec pcTG90/DOPE (1/1 molaire)⁴ qui comptent parmi les formulations les plus efficaces pour transférer les cellules A549, et avec l'ADN nu.

Les niveaux de transfection observés avec la plupart des téloplexes et cotéloplexes sont largement supérieurs à ceux de l'ADN nu. Il est à mentionner que les formulations N/P 1,25 et 0,8 ne sont pas actives et ne figurent pas dans la publication. Pour la plupart des (co)téloplexes testés, l'augmentation du rapport N/P ou de la quantité d'ADN se traduit par un accroissement de l'efficacité de transfection qui est accompagné par une décroissance de la viabilité cellulaire. Ce phénomène traduit un processus de transfection non spécifique grâce aux protéoglycanes exprimées à la surface cellulaire.⁵

Cependant, si la plupart des (co)télomères ne permettent d'atteindre le niveau moyen de transfection obtenu avec les lipoplexes témoins pcTG90/DOPE (figure 2 et 3 de la publication page 90 et 91), il faut souligner la performance des téloplexes formulés avec iBu-[NH₂]₇₅ ou avec le copolymère PEG2000-[NH₂]₁₉₀ qui, pour des rapports N/P de 10, sont d'une efficacité comparable aux lipoplexes témoins (figure 4 de la publication page 91) et pour une meilleure viabilité cellulaire.

L'étude des relations structure-activité des télomères et cotélomères s'est principalement orientée sur l'impact:

- i) de la présence de deux blocs (polyaminés et PEG)
- ii) de la présence aléatoires de chaînes aminées et de résidus TEG ou THM sur l'efficacité de transfection et sur la viabilité cellulaire.
- iii) du nombre de fonctions amines
- iv) de la nature de la tête polaire aminée

L'impact de la chaîne PEG sur l'efficacité de transfection n'est pas négligeable car avec un squelette polyaminé identique (éthyle amine), l'efficacité du PEG2000-[NH₂]₇₀ est inférieure à celle du télomère témoin iBu-[NH₂]₇₅. L'augmentation du degré n de télomérisation des télomères PEG2000-[NH₂]_n permet de compenser la baisse de l'efficacité de transfection liée à la présence de PEG. Comme illustré par la Figure 3 de la publication page 91, nous obtenons un optimum de transfection pour un nombre n de fonctions amines de 190. Le cotélomère di-blok PEG2000-[NH₂]₁₉₀ est par ailleurs aussi efficace que le télomère contrôle iBu-[NH₂]₇₅.

Le remplacement aléatoire des fonctions amines par des motifs hydrophiles tétraéthylène glycol (TEG) ou tris-hydroxyméthyle (THM) comme dans le cas des cotélomères conduit lui-aussi à une diminution de l'efficacité de transfection.⁶ L'activité la plus importante est obtenue pour iBu-[TEG]₇-[NH₂]₂₅ qui est le cotélomère ayant le plus grand nombre de fonctions amines pour le plus petit nombre d'unités TEG.

Ces résultats sont en accord avec d'autres résultats précédemment observés dans la littérature.^{7,8} Cette baisse de l'activité est liée à la diminution des interactions électrostatiques entre la charge des complexes, masquée par PEG, TEG ou THM, et les protéines anioniques de la cellule. Néanmoins, les (co)télomères obtenus présentent des efficacités de transfection et des niveaux de viabilité cellulaire intéressants qui font de ces composés des candidats potentiels pour des applications *in vivo*.

Quant au remplacement de la chaîne éthylamine (PEG2000-[NH₂]_n) par une chaîne diméthyle-propylamine (PEG2000-[CH₂NMe₂]_m), celui-ci diminue radicalement l'efficacité de transfection. Ces résultats sont à mettre en perspective avec ceux obtenus au laboratoire et qui concernaient l'effet du remplacement de la chaîne éthylamine par une chaîne diméthyle-éthylamine. Ce remplacement n'avait pas d'impact sur l'efficacité de transfection¹. La forte diminution des niveaux de transfection observée avec PEG2000-[CH₂NMe₂]_m, est donc liée au passage d'une chaîne éthylène à propylène qui entraîne une augmentation des pKa des fonctions amines, ce qui a pour conséquence une diminution du pouvoir tampon à pH 5-7, les polyplexes restant probablement piégés dans les endosomes.

V Conclusion

Cette étude suggère que parmi les (co)télomères synthétisés et évalués, les télomères iBu-[NH₂]₇₅ et PEG2000-[NH₂]_n sont des candidats prometteurs pour des expériences de transfert de gènes. De plus, ces résultats *in vitro* ne présagent pas de leurs comportements *in vivo* qui restent à être étudié. Par ailleurs, la facilité d'obtention de ces (co)télomères permettra de leur adjoindre d'autres fonctionnalités, comme par exemple des ligands de ciblage, pour améliorer leur tropisme vers des tissus et cellules cibles.

Références bibliographiques

1. Van Craynest, N.; Santaella, C.; Boussif, O.; and Vierling, P. Polycationic telomers and cotelomers for gene transfer: synthesis and evaluation of their an vitro transfection efficiency. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 59-75.
2. Verderone, G.; Van Craynest, N.; Boussif, O.; Santaella, C.; Bischoff, R.; Kolbe, H. V.; and Vierling, P. Lipopolycationic telomers for gene transfer: synthesis and evaluation of their in vitro transfection efficiency. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1367-1379.
3. Pucci, B.; Guy, E.; Vial-Reveillon, F.; and Pavia, A. A. Télomères et cotélomères d'intérêt biologique et biomédical--I. étude de la télomérisation radicalaire de monomères type acryloylpeptides. *European Polymer Journal* **1988**, *24*, 1077-1086.
4. Gaucheron, J.; Santaella, C.; and Vierling, P. Highly fluorinated lipospermines for gene transfer: synthesis and evaluation of their in vitro transfection efficiency. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 114-128.
5. Mislick, K. A. and Baldeschwieler, J. D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1996**, *93*, 12349-12354.
6. van de, W. P.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M.; van Steenberg, M. J.; Crommelin, D. J.; and Hennink, W. E. Copolymers of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate with ethoxytriethylene glycol methacrylate or N-vinyl-pyrrolidone as gene transfer agents. *J. Control Release* **2000**, *64*, 193-203.
7. Ogris, M.; Brunner, S.; Schuller, S.; Kircheis, R.; and Wagner, E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* **1999**, *6*, 595-605.
8. Choi, J. H.; Choi, J. S.; Suh, H.; and Park, J. S. Effect of poly(ethylene glycol) grafting on polyethylenimine as a gene transfer vector in vitro. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2001**, *22*, 46-52.

VI Publication

Polycationic Diblock and Random Polyethylene Glycol- or Tris(hydroxymethyl)methyl-Grafted (Co)telomers for Gene Transfer: Synthesis and Evaluation of Their in Vitro Transfection Efficiency

Bertrand Le Bon,[†] Nathalie Van Craynest,[†] Otmane Boussif,^{*,§} and Pierre Vierling^{*,†}

Laboratoire de Chimie Bioorganique, UMR 6001 CNRS, Université de Nice Sophia-Antipolis, Faculté des Sciences, 06108 Nice Cédex 2, France, and Transgène SA, 11 rue de Molsheim, 67082 Strasbourg Cédex, France. Received May 1, 2002; Revised Manuscript Received July 1, 2002

We report on the synthesis of a series of polycationic telomers, polycationic diblock and random polyethylene glycol (PEG)-grafted (co)telomers, and polycationic random tris(hydroxymethyl)methyl (THM) cotelomers, and on their in vitro gene transfer capability. These compounds were obtained by a telomerization process of various amino-, tetraethylene glycol-, or THM-acrylamide taxogens with thiols which might derive from PEG2000. For NP ratios [N is the number of (co)telomer amine equivalents; P is the number of DNA phosphate equivalents] from 0.8 to 10, these (co)telomers condensed DNA, forming (co)teloplexes with mean sizes in the 85–330 nm range, even for an NP ratio of 0.8 or 1.25. Some structure–transfection efficiency relationships were established. Among the new polycationic derivatives that were synthesized and investigated for their transfection efficiency, the ${}^t\text{Bu-NH}]{75}$ telomers and the diblock polyethylene glycol-conjugated PEG2000- $[\text{NH}]_n$ telomers are very promising candidates for gene transfer purposes.

INTRODUCTION

Introducing a gene into cells with synthetic (nonviral) vectors is a promising alternative for gene therapy. Although viral vectors are useful clinical tools for delivering genes and infect cells, they suffer from several serious drawbacks (1–3, and references therein). To circumvent these drawbacks, a large number of nonviral vectors, including (poly)cationic lipid- (liposome-) and polymer-based DNA complexes (lipoplexes and polyplexes, respectively) have been evaluated (3–8, and references therein). Unlike viral vectors, nonviral vectors have advantages in their large scale and easy production, simplicity of use, safety (fewer immunogenic and inflammatory responses, an inability to replicate or to recombine to form an infectious agent, and low integration frequency), and ability to transfer expression cassettes of unlimited size. Although they demonstrated in vitro a real capacity for transfecting culture cells, lipoplexes and polyplexes are not as efficient as viral vectors in achieving successful gene transfer. In addition, nonviral (and viral) gene delivery systems are currently fraught with a number of serious problems when their in vivo use, i.e., after systemic administration for example, is contemplated (3, 9–12). To successfully transfect its target cells at a remote site, the gene delivery system must, at least, reach this site while in blood circulation. Unfortunately, clearance of “conventional” DNA carriers from the bloodstream is rapid (12). Furthermore, it is very difficult to control their biodistribution and transgene expression in vivo which are not necessarily correlated (13, 14). Gene

delivery to a specific target tissue is more challenging and requires strategies that limit nonspecific interactions with the biological environment. For intravenous administrations, formation of large aggregates and interactions with the blood components (e.g., opsonization with plasma proteins) and nontarget cells such as the mononuclear phagocytic system (MPS) are most important obstacles for targeting genes in vivo. Attempts have been made to avoid aggregation of the lipoplexes and polyplexes, to reduce the level of protein binding to the DNA complexes, and to divert them from the MPS by coupling of (i) hydrophilic nonimmunogenic polymers, such as polyethylene glycol (PEG) which provides a “stealth”-like coating, and/or (ii) specific cell-binding ligands (12, 15–23).

Recently, as a contribution to this field, some of us have reported on lipoteloplexes and lipo(co)teloplexes, e.g., DNA complexes formulated with lipopolyamine telomers and random cotelomers, respectively, as alternative efficient gene transfer agents (24, 25). These lipopolyamine (co)telomers were obtained from telomerizing one polymerizable acrylamide M monomer or a mixture of polymerizable acrylamide M and M' monomers comprising a (poly)amine precursor, in the presence of a hydrophobic long chain thiol (L-SH). The lipopolyamine (co)telomers thus obtained, of formula L-S-(M)_n-H or random L-S-(M)-*n*-(M')*n'*-H, exhibited controllable degrees of (co)polymerization (24, 25).

We report herein on the synthesis of new diblock PEG-grafted polycationic telomers and of new random tetraethylene glycol (TEG)- or polyol tris(hydroxymethyl)methyl (THM)-grafted polycationic cotelomers (Figure 1), on their capabilities of compacting and transferring, in vitro, DNA into a cell, and on their effect on cell viability. These PEG-, TEG-, or THM-grafted polycationic derivatives show a modular structure aimed at modulating the physicochemical and biological properties (e.g., stability with respect to aggregation, biodegradability, cell viability, biodisponibility, and transfection efficacy) of the

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: vierling@unice.fr. Phone: 33 4 92 07 61 43. Fax: 33 4 92 07 61 51.

[†] Université de Nice Sophia-Antipolis.

[‡] Transgène SA.

[§] Present address: Aventis Pharma, 13, quai Jules Guesde, 94403 Vitry-sur-Seine Cédex, France.

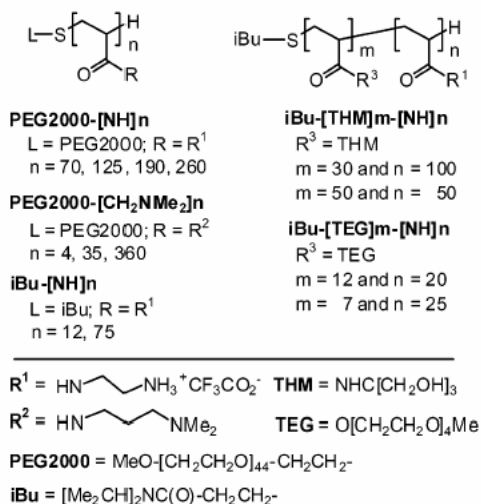


Figure 1. Molecular structure of the polycationic diblock telomers and random cotelomers and of the pcTG90-DOPE reference gene transfer lipids used in this study.

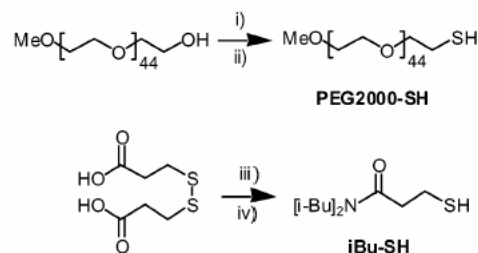
teloplexes and coteloplexes they form with DNA. The diblock PEG-grafted polycationic telomers include a long PEG chain (PEG2000) and a variable number (from 4 to 360) of primary or tertiary amine functions. The random cotelomers contain a random combination of primary amine functions and TEG or THM units. The neutral, hydrophilic PEG, TEG, and THM units were selected for improving cell viability (26, 27) and/or reducing the number of interactions with plasma constituents and opsonization of the DNA complexes (12, 15–23). For comparison, we developed and evaluated also the polycationic ³Bu-[NH]_n telomers that were obtained from telogen ³Bu-SH (Figure 1). This telogen was also selected for its diisobutyl group with the aim of facilitating the determination of the average degree of polymerization of the (co)telomers by ¹H NMR (24, 25).

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental and Analytical Conditions. All the reactions were performed in anhydrous solvents under dry and oxygen-free nitrogen. The purifications by column chromatography were carried out using silica gel 60 (Merck, 70–230 mesh) and chloroform (CHCl₃), dichloromethane (CH₂Cl₂), methanol (MeOH), or mixtures thereof as indicated. The progress of the polymerization reaction was followed by thin-layer chromatography (TLC) on silica plates (SDS 60F254, 60/15 μm). The following developing systems were used: UV light (254 nm), Draggendorff reagents, DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] (Sigma), and ninhydrin reagent (Sigma). The synthesis of taxogen A, *N*-[2-[(BOC)aminoethyl]acrylamide], was performed as reported elsewhere (24). Taxogens *N*-[3-(dimethylamino)propyl]acrylamide (**B**) and *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]acrylamide (**D**) were purchased from Aldrich and used without further purification.

¹H, ¹³C, and ¹⁹F NMR spectra were recorded on a Bruker AC-200 instrument at 200, 50.3, and 188.3 MHz, respectively. Chemical shifts were measured relative to that of CHCl₃ (δ 7.27) or CH₃OD (δ 3.35) for ¹H, to that of CDCl₃ (δ 76.9) for ¹³C and expressed indirectly in relation to TMS, and to that of CCl₃F as an internal reference for ¹⁹F. The following abbreviations are used to describe the signal multiplicities: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), and m (multiplet). Chemical shifts are expressed in parts per million and listed

Scheme 1. Synthesis of Telogen ³Bu-SH and PEG2000-SH^a



^a Reagents and conditions: (i) TsCl, NEt₃, DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C; (ii) Amberlite IR400 (SH⁻ form), NaSH in CH₃CN, 50 °C; (iii) EDC, HOBT, THF, CH₂Cl₂, 0 °C, then (t-Bu)₂NH, NEt₃, THF, 0 °C; (iv) Zn, AcOH.

as follows: shift in parts per million (multiplicity, integration, coupling, and attribution). Melting points were measured on an Electrothermal Digital Series 9100 and were not corrected. Mass spectra (MS) were recorded on a Finnigan MAT TSQ 7000 apparatus equipped with an atmospheric-pressure ionization (API) source. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was used depending on the polar moiety of the molecules to be studied. This method used in the positive mode can give either a M + H⁺ or a M + Na⁺ signal.

Synthesis of Taxogen C (2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethyl Ester Acrylate). To a solution of 0.6 mL (7.2 mmol) acryloyl chloride (Aldrich) in 10 mL of anhydrous CH₂Cl₂ was added dropwise during 1 h at 0 °C a solution of 0.7 mL (4.8 mmol) of triethylamine and 0.96 mL (4.8 mmol) of 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ol (tetraethylene glycol monomethyl ether, MeO-TEG, Acros) in 10 mL of anhydrous CH₂Cl₂. After being stirred for 4 h at room temperature, the reaction mixture was concentrated under vacuum, and the residue was chromatographed over a silica column [CHCl₃/MeOH eluent, from 100 to 97/3 (v/v)]; 540 mg (2.06 mmol, 43%) of taxogen C was obtained as a colorless oil: TLC (98/2 CHCl₃/MeOH, UV and Draggendorff) *R_f* = 0.71; ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.30 (s, 3H, OCH₃), 3.47 (m, 2H, CH₂OCH₃), 3.55 (m, 10H, CH₂OCH₂), 3.68 (m, 2H, CH₂CH₂OCO), 4.25 (m, 2H, CH₂OCO), 5.78 (dd, 1H, ³J = 1.7 Hz, ³J = 10.4 Hz, CH₂CH), 6.08 (dd, 1H, ³J = 10.4 Hz, ³J = 17.2 Hz, CH₂CH), 6.36 (dd, 1H, ²J = 1.7 Hz, ³J = 10.4 Hz, CH₂CH); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 59.0 (CH₃O), 63.7 (CH₂OCO), 69.2 (CH₂CH₂OCO), 70.6 and 70.7 (CH₂OCH₂), 72.0 (CH₂CH₂OCH₃), 128.4 (CH₂=CH), 130.9 (CH₂=CH), 166.2 (CO).

Synthesis of the Telogen *N,N*-Diisobutyl-3-mercaptopropionamide (³Bu-SH). The synthesis of the telogen ³Bu-SH was carried out in two steps as shown in Scheme 1.

Synthesis of 3-(2-Diisobutylcarbamoyl)ethylthioethylthio-*N,N*-diisobutylpropionamide. A solution of 250 mg (1.2 mmol) of 3,3'-dithiodipropionic acid (Aldrich) and 480 mg (3.6 mmol) of HOBT (1-hydroxybenzotriazole, Aldrich) in 30 mL of anhydrous THF was added to 680 mg (3.6 mmol) of EDC [1-(3-*N,N*-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide chlorohydrate, Aldrich] in 25 mL of anhydrous CH₂Cl₂ at 0 °C. Then, a solution of 0.5 mL (3.6 mmol) of triethylamine and 0.42 mL (2.4 mmol) of diisobutylamine (Aldrich) in 10 mL of THF was added dropwise at 0 °C, and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was then concentrated and CHCl₃ added. The organic solution was washed with aqueous NaHCO₃ (8%) and H₂O until the solution reached neutrality, dried over Na₂SO₄, and filtered. The solution was then concentrated

under vacuum, and the residue was chromatographed over a silica column [hexane/ethyl acetate eluent, from 9/1 to 85/15 (v/v)]; 403 mg (0.93 mmol, 78%) of the title disulfide were obtained as an oil: TLC (9/1 CH₂Cl₂/ethyl acetate, UV) $R_f = 0.61$; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.79 and 0.85 (d, d, 12H, 12H, ³J = 6.7 Hz, CH₃), 1.76–2.02 (m, 4H, CH), 2.69 (m, 4H, CH₂CO), 2.89 (m, 4H, CH₂S), 3.04 and 3.12 (d, d, 4H, 4H, ³J = 7.5 Hz, CH₂NCO); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 20.0 and 20.1 (CH₃), 26.4 and 27.8 (CH), 33.0 (CH₂S), 33.8 (CH₂CO), 54.3 and 55.5 (CH₂N), 171.0 (CO). The doubling of some signals is due to restricted rotation of the amide bond.

Synthesis of ⁴Bu-SH. To a solution of 403 mg (0.93 mmol) of the above disulfide in 8 mL of acetic acid was added 600 mg (9.31 mmol) of zinc powder (Aldrich). The solution was stirred under reflux. After completion of the reaction [followed by TLC (UV/DTNB)], the mixture was filtered over Celite 521 (Aldrich). The excess of acetic acid was removed by evaporation in the presence of CHCl₃ and cyclohexane. The residue was dissolved in CHCl₃ and washed with H₂O until the solution reached neutrality, and the organic phase was then dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under vacuum; 380 mg (1.75 mmol, 94%) of ⁴Bu-SH was obtained as a colored oil: TLC (8/2 hexane/ethyl acetate, DTNB) $R_f = 0.56$; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.89 and 0.87 (d, d, 6H, 6H, ³J = 6.7 Hz, CH₃), 1.69 (t, 1H, ³J = 8.1 Hz, SH), 1.93 (m, 2H, CH), 2.63 (m, 2H, CH₂CO), 2.77 (m, 2H, CH₂S), 3.05 and 3.16 (d, d, 2H, 2H, ³J = 7.6 Hz, CH₂N); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 20.0 and 20.1 (CH₃), 20.4 (CH₂SH), 26.4 and 27.8 (CH), 37.7 (CH₂CO), 53.3 and 55.4 (CH₂N), 171.0 (CO); ESI-MS m/z 218.4 (in agreement with the mass calculated for C₁₁H₂₃NOS + H⁺).

Synthesis of the Telogen PEG2000-SH. The synthesis of PEG2000-SH was carried out in two steps as shown in Scheme 1.

PEG2000-OTs. To a solution of 1.0 g (0.5 mmol) of PEG2000-OH (polyethylene glycol monomethyl ether 2000, Aldrich), 0.21 mL (1.5 mmol) of triethylamine, and 24.5 mg (0.2 mmol) of (dimethylamino)pyridine (DMAP, Aldrich) in 5 mL of anhydrous CH₂Cl₂ was added dropwise 143 mg (0.75 mmol) of tosyl chloride (Fluka) in 2 mL of anhydrous CH₂Cl₂ at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 day and then washed with H₂O. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under vacuum. The residue was chromatographed on a silica column [CHCl₃/MeOH eluent, from 95/5 to 85/15 (v/v)]; 815 mg (0.37 mmol, 85%) of PEG2000-OTs was obtained as a white solid: TLC (8/2 CHCl₃/MeOH, Dragendord) $R_f = 0.77$; mp 50–51 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.43 (s, 3H, CH₃, Ts), 3.36 (s, 3H, CH₃O), 3.50–3.75 (sl, 178H, CH₂OCH₂), 4.14 (dd, 2H, ³J = 5.0 Hz, CH₂OTs), 7.33 (d, 2H, ³J = 8.3 Hz, CHCH, Ts), 7.78 (d, 2H, ³J = 8.3 Hz, CHCH, Ts); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 21.2 (CH₃, Ts), 59.0 (OCH₃), 68.7 (CH₂OTs), 69.3 (CH₂CH₂OTs), 70.6 (CH₂OCH₂), 128.0 (CHC-S, Ts), 129.8 (CHC-CH₃, Ts), 134.4 (CHC-S, Ts), 144.8 (CHC-CH₃, Ts). ESI-MS shows the presence of MeO-(CH₂CH₂-O)_n-CH₂CH₂OTs compounds with an n of 30–56 (m/z 230.1 + 44*n* + 23), in agreement with the masses calculated for [C₁₀H₁₄O₄S + *n*(C₂H₄O) + Na⁺].

PEG2000-SH. To a solution of 0.5 g (0.23 mmol) of PEG2000-OTs in 5 mL of anhydrous acetonitrile (CH₃CN) was added 5 g of anion-exchange resin Amberlite IRA400 (SH⁻ form) and 130 mg (2.3 mmol) of NaSH (Aldrich). The reaction mixture was stirred at 50 °C. After completion of the reaction (followed by TLC UV, Dragendord, DTNB), the resin was filtered and washed with CH₂Cl₂. The organic phase was evaporated and concen-

trated under vacuum. The residue was purified by gel permeation chromatography on a Sephadex LH 20 column (Fluka) (CHCl₃/MeOH eluent, 9/1); 367 mg (0.18 mmol, 78%) of PEG2000-SH was obtained as a white solid: TLC (9/1 CH₂Cl₂/MeOH, UV, DTNB) $R_f = 0.51$; mp 53–54 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.82 (m, 1H, SH), 2.60 (m, 2H, CH₂S), 3.22 (s, 3H, OCH₃), 3.40–3.60 (m, 178H, CH₂O); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 58.0 (OCH₃), 69.7 (CH₂O) (the CH₂CH₂S resonances could not be detected).

Synthesis of (co)Telomers. *General Procedure for the (Co)telomerization Reactions.* An acetonitrile solution of telogen PEG2000-SH, or ⁴Bu-SH, and taxogen A, or B, or a mixture of A and C, or A and D, at a fixed taxogen/telogen molar ratio, was heated to 50 °C before AIBN was added (0.4 equiv with respect to telogen). The reaction medium was stirred under reflux until the telogen had disappeared (followed by TLC/DTNB) (~24 h). The solution was concentrated and purified by gel permeation chromatography on a Sephadex LH 20 or LH-60 column (Fluka) with CHCl₃ as the eluent. The adP_{*n*} (= *n*) values were determined by ¹H NMR on each collected fraction.

General Procedure for the TFA Deprotection of the BOC-(Co)telomers. The deprotection of telomers ⁴Bu-[NH-OC]_{*n*} and PEG2000-[NHBOC]_{*n*} and cotelomers ⁴Bu-[TEG]_{*m*}-[NHBOC]_{*n*} and ⁴Bu-[THM]_{*m*}-[NHBOC]_{*n*} was quantitatively achieved by dissolving and keeping these (co)telomers in a large excess of TFA at room temperature for 2 h. The excess of TFA was removed by evaporation in the presence of CH₂Cl₂ and cyclohexane and by gel permeation on a Sephadex LH-20 or LH-60 column. The respective telomers ⁴Bu-[NH]_{*n*} and PEG2000-[NH]_{*n*} and cotelomers ⁴Bu-[THM]_{*m*}-[NH]_{*n*} as their TFA salts, were obtained in the form of white solids, except ⁴Bu-[TEG]_{*m*}-[NH]_{*n*} which was obtained in the form of resin. The presence of the TFA anions is confirmed by ¹⁹F NMR (δ -75.7 in CD₃OD).

Synthesis of Telomers ⁴Bu-[NH]_{*n*}. The telomerization protocol applied to (i) 10 mg (46 μ mol) or (ii) 1.3 mg (5.8 μ mol) of telogen ⁴Bu-SH and (i) 197 mg (0.92 mmol) or (ii) 250 mg (1.2 mmol) of taxogen A [taxogen/telogen molar ratio of (i) 20 or (ii) 200, respectively] led after gel permeation chromatography to (i) 150 mg of telomers ⁴Bu-[NHBOC]₁₂ or (ii) 276 mg of telomers ⁴Bu-[NHBOC]₇₅, respectively. The adP_{*n*} (= *n*) values were determined by ¹H NMR: adP_{*n*} = 12*H*_{*x*}/9*H*_{*z*} or 12*H*_{*y*}/4*H*_{*x*}, *H*_{*x*} and *H*_{*z*} being the integration of the signals corresponding to the CH₃ protons of BOC and diisobutyl, respectively, and *H*_{*y*} being the integration of the signal corresponding to the NCH₂ protons. Telomers ⁴Bu-[NH]₁₂ and ⁴Bu-[NH]₇₅ were obtained quantitatively after BOC deprotection of their respective ⁴Bu-[NHBOC]_{*n*} telomers.

⁴Bu-[NHBOC]₁₂. TLC (9/1 CH₂Cl₂/MeOH, UV, ninhydrin) $R_f = 0.56$; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.80–0.90 (m, 12H, CH₃CH), 1.00–2.50 [m, (12*n* + 1)H, CH₃ (BOC), CH₂CH, CH₂CO, CHCH₃], 2.50–3.50 [m, (4*n* + 10)H, CH₂CH₂N, CH₂SCHE, CH₂CO, CH₂N], 5.50–6.50 (m, *n*H, NHCOO), 6.90–7.90 (m, *n*H, NHCO), with $n = 12$; ¹³C NMR (CDCl₃) δ 20.1 and 20.2 (CH₃CH), 26.7 and 27.9 (CHN), 28.5–30.5 (sl, CH₃, BOC, CHCH₃), 33.8 (CH₂S), 34.9 (CH₂CO), 40.2–40.4 (m, CH₂CH and CH₂CH₂), 53.3 and 55.3 (CH₂N), 79.2–79.4 [C(CH₃)₃], 156.6 (CO, BOC), 177.0 (NHCO) (the NCO resonance could not be detected).

⁴Bu-[NH]₁₂. ¹H NMR (CD₃OD) δ 0.85–0.95 (m, 12H, CH₃CH), 1.00–2.80 [m, (3*n* + 7)H, CH₂CH, CH₂SCHE, CHCH₃, CH₂CO], 2.80–4.00 [m, (4*n* + 4)H, CH₂CH₂N, CH₂N], 6.50–7.40 (m, *n*H, NHCO) with $n = 12$; ¹³C NMR (CD₃OD) δ 20.2 and 20.3 (CH₃CH), 27.7 and 29.1 (CHN), 28.0–30.0 (m, CH₂CH), 33.8 (CH₂S), 34.9 (CH₂CO), 38.2–

39.0 (m, CH₂NH₂), 40.3–40.5 (m, NHCH₂), 43.2–44.5 (m, CH₂CH), 54.7 and 56.8 (CH₂N) (the CO resonances could not be detected).

^tBu-[NHBOC]₇₅: TLC (9/1 CH₂Cl₂/MeOH, UV, ninhydrin) *R_f* = 0.43. The ¹H NMR (CDCl₃) and ¹³C NMR (CDCl₃) spectra are identical to those of **^tBu-[NHBOC]₁₂** but with *n* = 75.

^tBu-[NH]₇₅: The ¹H NMR (CD₃OD) and ¹³C NMR (CD₃OD) spectra are identical to those of **^tBu-[NH]₁₂** but with *n* = 75.

Synthesis of Diblock Telomers PEG2000-[NH]_n
The telomerization protocol applied to telogen **PEG2000-SH** [(i) 30 mg or 0.015 mmol, (ii) 30 mg or 0.015 mmol, (iii) 10 mg or 0.005 mmol, and (iv) 10 mg or 0.005 mmol] and taxogen **A** [(i) 160 mg or 0.75 mmol, (ii) 126 mg or 0.6 mmol, (iii) 106 mg or 0.05 mmol, and (iv) 212 mg or 0.09 mmol] at taxogen/telogen molar ratios of (i) 50, (ii) 40, (iii) 100, and (iv) 200 led, after gel permeation chromatography, to telomer (i) **PEG2000-[NHBOC]₇₀** (16 mg), (ii) **PEG2000-[NHBOC]₁₂₅** (150 mg), (iii) **PEG2000-[NHBOC]₁₉₀** (87 mg), and (iv) **PEG2000-[NHBOC]₂₆₀** (174 mg), respectively. The aDP_{*n*} (= *n*) values were determined by ¹H NMR: aDP_{*n*} = 178H_{*w*}/9H_{*z*} or 178H_{*y*}/4H_{*z*}, H_{*w*}, H_{*x*}, H_{*y*}, and H_{*z*} being the integration of the signals corresponding to the BOC methyl, NCH₂, and OCH₂ groups, respectively. The diblock **PEG2000-[NH]_n** telomers were obtained quantitatively after BOC deprotection of their respective **PEG2000-[NHBOC]_n** telomers.

PEG2000-[NHBOC]₇₀: TLC (7/3/0.4 CHCl₃/MeOH/NH₃, UV, ninhydrin) *R_f* = 0.50; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.05–2.50 [m, (12*n* – 1)H, CH₃ (BOC), CHCH₂CH, CH₂CO], 2.50–3.50 [m, (4*n* + 7)H, CH₂CH₂NHBOC, CH₂SCH₂, OCH₃], 3.55–3.65 (m, 178H, CH₂O), 5.40–6.30 (m, nH, NHCOO), 6.80–7.80 (m, nH, NHCO) with *n* = 70; ¹³C NMR (CDCl₃) δ 27–30 (CHCH₂CH), 28.6 (CH₃, BOC), 38.0–45.0 (m, NCH₂, CH₂CH), 58.4 (OCH₃), 70.6 (CH₂O), 77.5–81.0 (m, CCH₃), 155.0–157.0 (m, CO, BOC) (the CH₂S and CONH resonances could not be detected).

PEG2000-[NHBOC]_n with *n* = 125, 190, or 260: TLC (7/3/0.4 CHCl₃/MeOH/NH₃, UV, ninhydrin) *R_f* = 0.83 for *n* = 125; TLC (85/15 CH₂Cl₂/MeOH, UV, ninhydrin) *R_f* = 0.4 and 0.63 for *n* = 190 and 260, respectively. The ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) spectra are identical to those of telomer **PEG2000-[NHBOC]₇₀** but with *n* = 125, 190, or 260.

PEG2000-[NH]₇₀: ¹H NMR (CD₃OD) δ 1.05–3.05 [m, (3*n* + 3)H, CH₂SCH₂, CH₂CH, CH₂CO], 3.05–3.60 [m, (4*n* + 3)H, CH₂NH₂, OCH₃], 3.60–3.70 (m, 178H, CH₂O), 6.80–7.80 (m, nH, NHCO) with *n* = 70; ¹³C NMR (CD₃OD) δ 26.6–28.2 (m, CH₂CH), 38.2–39.2 (m, CH₂NH₂), 40.5–40.9 (m, NHCH₂), 43.5–44.1 (m, CH₂CH), 59.3 (OCH₃), 71.5 (CH₂O), 178.2–178.6 (m, NHCO) (the CH₂S resonances could not be detected).

PEG2000-[NH]_n with *n* = 125, 190, or 260. The ¹H NMR (CD₃OD) and ¹³C NMR (CD₃OD) spectra are identical to those of **PEG2000-[NH]₇₀** but with *n* = 125, 190, or 260.

Synthesis of Diblock Telomers PEG2000-[CH₂NMe₂]_n
The telomerization protocol applied to telogen **PEG2000-SH** [(i) 30 mg or 15 μmol and (ii) 50 mg or 25 μmol] and taxogen **B** [(i) 92 mg or 0.6 mmol and (ii) 190 mg or 1.23 mmol] at a taxogen/telogen molar ratio of (i) 40 or (ii) 50 led, after gel permeation chromatography, to diblock telomers (i) **PEG2000-[CH₂NMe₂]₄** (19 mg) and **PEG2000-[CH₂NMe₂]₃₅** (134 mg) and (ii) **PEG2000-[CH₂NMe₂]₃₆₀** (50 mg), respectively. The aDP_{*n*} values (= *n*) were determined by ¹H NMR: aDP_{*n*} = 178H_{*w*}/2H_{*z*}, 178H_{*w*}/2H_{*z*}, or 178H_{*y*}/8H_{*z*}, with H_{*w*}, H_{*x*}, and H_{*z*} being the

integration of the signals corresponding to CONHCH₂, CH₂NMe₂, and CH₂O methylenes, respectively, and H_{*y*} being the integration of the signal corresponding to the CONHCH₂CH₂ methylenes and NMe₂ groups.

PEG2000-[CH₂NMe₂]_n with *n* = 4, 35, or 360: ¹H NMR (D₂O) δ 1.05–2.80 [m, (13*n* + 3)H, CH₂CH₂CH₂N, CH₂CH, N(CH₃)₂, CH₂CO, CH₂SCH₂], 2.80–3.50 [m, (2*n* + 3)H, CH₃O, NHCH₂], 3.63 (s, 178H, CH₂O), 7.20–8.10 (m, nH, NHCO) with *n* = 4, 35, or 360; ¹³C NMR (CDCl₃) δ 24.7–24.9 (m, CH₂CH₂CH₂N), 40.4–40.5 (m, CHCH₂), 41.7–41.8 (m, NHCH₂), 43.3–43.6 (m, NCH₃, CH₂CH), 55.6–55.8 (m, CH₂N), 69.9 (CH₂O) (the CH₂S, OCH₃, and NHCO resonances could not be detected).

Synthesis of Random Cotelomers ^tBu-[TEG]_m-[NH]_n
^tBu-[TEG]_m-[NHBOC]_n with *m* = 12 and *n* = 20. The telomerization protocol applied to 20 mg (0.09 mmol) of telogen **^tBu-SH** and a mixture of 241 mg (0.9 mmol) of taxogen **A** and 197 mg (0.9 mmol) of taxogen **C** led, after gel permeation chromatography, to 214 mg of random cotelomer **^tBu-[TEG]₁₂-[NHBOC]₂₀**. The aDP_{*m,n*} values of TEG and NHBOC units were determined by ¹H NMR. The average number of NHBOC units (*n*) is equal to 12H_{*w*}/9H_{*z*} or to 12H_{*y*}/4H_{*z*}, H_{*w*}, H_{*x*}, H_{*y*}, and H_{*z*} being the integration of the signals corresponding to the BOC, NCH₂, and CH₃ (diisobutyl group) protons, respectively. The average number of TEG units (*m*) is equal to 12H_{*w*}'/14H_{*z*}, H_{*w*}' being the integration of the signal corresponding to the OCH₂ group.

^tBu-[TEG]₁₂-[NHBOC]₂₀: TLC (9/1 CH₂Cl₂/MeOH, UV, ninhydrin) *R_f* = 0.54; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.85–0.90 (m, 12H, CH₃CH), 1.00–2.90 [m, (12*n* + 3*m* + 7)H, CH₃ (BOC), CH₂CH, CH₂SCH₂, CH₂CO, CH₃CH], 2.90–4.00 [m, (3*n* + 19*m* + 4)H, CH₂N, OCH₃, OCH₂], 5.50–6.20 (m, nH, NHCOO), 6.40–7.30 (m, nH, NHCO) with *m* = 12 and *n* = 20; ¹³C NMR (CDCl₃) δ 28.6–29.5 [m, CH₃ (BOC), CH₂CH], 40.2–40.5 (m, NCH₂CH₂, CH₂CH), 59.1 (CH₃O), 68.5–68.8 (CH₂OCO), 70.1–70.6 [m, (CH₂O)₄, COOCH₂CH₂], 71.8–72.1 (CH₂OCH₃), 75.6–79.1 [C(CH₃)₃], 156.5–156.7 (m, NHCOO), 173.2 (COO), 175.5–175.8 (NHCO) (the CHCH₃, CH₂N, CH₂CO, CH₂S, and CO resonances could not be detected).

^tBu-[TEG]_m-[NHBOC]_n with *m* = 7 and *n* = 25. The telomerization protocol applied to 10.2 mg (47 μmol) of telogen **^tBu-SH** and a mixture of 300 mg (1.4 mmol) of taxogen **A** and 123 mg (0.47 mmol) of taxogen **C** led, after gel permeation chromatography, to 256 mg of random cotelomer **^tBu-[TEG]_m-[NHBOC]_n** with *m* = 7 and *n* = 25. The aDP_{*m,n*} values of TEG and NHBOC units were determined as described for **^tBu-[TEG]₁₂-[NHBOC]₂₀**.

^tBu-[TEG]₇-[NHBOC]₂₅: TLC (85/15 CH₂Cl₂/MeOH, UV, ninhydrin) *R_f* = 0.6. The ¹H NMR (CDCl₃) and ¹³C NMR (CDCl₃) spectra are identical to those of cotelomer **^tBu-[TEG]₁₂-[NHBOC]₂₀** but with *m* = 7 and *n* = 25.

^tBu-[TEG]_m-[NH]_n with *m* = 12 and *n* = 20, and *m* = 7 and *n* = 25. Cotelomers **^tBu-[TEG]_m-[NH]_n** were obtained quantitatively after BOC deprotection of their respective cotelomers **^tBu-[TEG]_m-[NHBOC]_n**.

^tBu-[TEG]₁₂-[NH]₂₀: ¹H NMR (CD₃OD) δ 0.85–0.90 (m, 12H, CH₃CH), 1.00–2.80 [m, (3*n* + 3*m* + 7)H, CH₂CH, CH₂SCH₂, CH₂CO, CH₃CH], 2.80–4.00 [m, (4*n* + 17*m* + 4)H, CH₂N, OCH₂, OCH₃], 4.00–4.50 (m, 2nH, CH₂OCO), 6.40–7.30 (m, nH, NHCO) with *m* = 12 and *n* = 20; ¹³C NMR (CD₃OD) δ 38.1–38.4 (m, CH₂NH₂), 40.6–40.8 (m, CH₂NH), 43.1–43.7 (m, CH₂CH), 59.1 (CH₃O), 70.0–70.2 (m, COOCH₂), 70.4–70.7 [m, (CH₂O)₄, COOCH₂CH₂], 71.1–71.4 (CH₂OCH₃), 177.3–177.5 (NHCO) (the CH₂S, CH₂N, CH₂CO, CHCH₃, and CO resonances could not be detected).

^3Bu -[TEG] $_7$ -[NH] $_{25}$. The ^1H NMR (CD_3OD) and ^{13}C NMR (CD_3OD) spectra are identical to those of cotelomer ^3Bu -[TEG] $_{12}$ -[NH] $_{20}$ but with $m = 7$ and $n = 25$.

Synthesis of Random Cotelomers ^3Bu -[THM] $_m$ -[NH] $_n$. Telogen ^3Bu -SH (20 mg, 0.09 mmol), taxogen A (236 mg, 1 mmol), and taxogen D (192 mg, 1 mmol) led after gel permeation chromatography to random cotelomers ^3Bu -[THM] $_{50}$ -[NHBOC] $_{50}$ (224 mg) and ^3Bu -[THM] $_{30}$ -[NHBOC] $_{100}$ (69 mg). The $a\text{DP}_n (=n)$ corresponding to the number of NHBOC units, determined by ^1H NMR, is equal to $12H_x/9H_z$ or to $12H_x/4H_z$, H_x , H_y , and H_z being the integration of the signals corresponding to the BOC methyl, NCH_2 , and isobutyl methyl groups, respectively. The $a\text{DP}_m (=m)$ corresponding to the number of THM functions, determined by ^1H NMR, is equal to $12H_x/6H_z$, H_x being the integration of the signal corresponding to the HOCH_2 methylenes. Cotelomers ^3Bu -[THM] $_{50}$ -[NH] $_{50}$ and ^3Bu -[THM] $_{30}$ -[NH] $_{100}$ were obtained quantitatively after BOC deprotection of cotelomers ^3Bu -[THM] $_{50}$ -[NHBOC] $_{50}$ and ^3Bu -[THM] $_{30}$ -[NHBOC] $_{100}$, respectively.

^3Bu -[THM] $_{50}$ -[NHBOC] $_{50}$: TLC (9/1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, UV, ninhydrin) $R_f = 0.25$; ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.85–0.90 (m, 12H, CH_3CH), 1.00–2.80 [m, $(12n + 3m + 7)\text{H}$, CH_3 (BOC), CH_2CH , NCH , CH_2SCH_2 , CH_2CO], 2.90–3.50 [m, $(4n + 4)\text{H}$, NHCH_2 , CH_2N], 3.50–4.00 (m, 6mH, CH_2OH), 6.50–7.20 (m, nH, NHCOO), 7.80–8.20 (m, nH, NHCO) with $m = 50$ and $n = 50$; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 28.4–28.9 [m, CH_3 (BOC), CH_2CH], 40.1–40.8 (m, NCH_2 , CHCH_2), 59.2–59.8 (m, CH_2OH) (the CH_2S , CH_2CO , NCH_2 , CH_3CH , NHCO , and CO resonances could not be detected).

^3Bu -[THM] $_{30}$ -[NHBOC] $_{100}$: TLC (8/2 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, UV, ninhydrin) $R_f = 0.4$. The ^1H and ^{13}C NMR spectra are identical to those of ^3Bu -[THM] $_{50}$ -[NHBOC] $_{50}$ but with $m = 30$ and $n = 100$.

^3Bu -[THM] $_{50}$ -[NH] $_{50}$: ^1H NMR (CD_3OD) δ 0.85–0.90 (m, 12H, CH_3CH), 1.00–2.80 [m, $[3(n + m) + 7]$, CH_2CH , CH , CH_2SCH_2 , CH_2CO], 2.90–4.00 [m, $(4n + 6m + 4)\text{H}$, NHCH_2 , CH_2OH , CH_2N], 7.50–8.10 (m, nH, NHCO) with $m = 50$ and $n = 50$; ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 38.0–38.5 (m, CH_2NH_3^+), 40.3–40.6 (m, NCH_2), 42.9–43.5 (m, CH_2CH), 59.6 (CH_2OH) (the CH_2S , CH_2CO , NCH_2 , CH_3CH , NHCO , and CO resonances could not be detected).

^3Bu -[THM] $_{30}$ -[NH] $_{100}$. The ^1H and ^{13}C NMR spectra are identical to those of ^3Bu -[THM] $_{50}$ -[NH] $_{50}$ but with $m = 30$ and $n = 100$.

Preparation of Complexes Composed of the Polyamine Telomer Compounds and Plasmid pTG11236. The plasmid pTG11236 was produced by Transgène SA. The endotoxin content of the plasmid preparation was checked using a Limulus Amebocyte Lysat kit (Biogenic, Maurin, France). This value was < 1 endotoxin unit/mg of plasmid, hence below the 5 eu/mg of DNA recommended for in vivo protocols. The quantities of compound used were calculated according to the desired DNA concentration of 0.1 mg/mL, the N/P ratio, the molar weight, and the number of potential positive charges in the selected (co)telomer. The polyamine (co)telomer–DNA complex is formulated by adding a desired volume of (co)telomer preparation at a concentration of 10 mg/mL (in 5% glucose) to the desired volume of a DNA solution to reach the desired DNA concentration (for example, 0.1 mg/mL), as described in refs 8, 24, and 25. This preparation was vortexed for 10 s and was used within 24 h for the particle size measurements and the in vitro transfection experiments.

Measurement of the Size of the (Co)teloplexes. The average sizes were measured by photon correlation spectroscopy using a Coulter N4Plus particle size ana-

lyzer. The analyses were performed at 25 °C, after equilibrating the sample at 25 °C for 20 min. The sample was diluted with 5% glucose in the measurement tube and homogenized. These analyses were carried out on complexes having a DNA concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The formulations and analyses were reproduced twice.

Agarose Gel Electrophoresis. Each sample (0.5 μg of plasmid) was analyzed by electrophoresis for ~ 30 min under 75 V/cm, through a 0.8% agarose gel in $1 \times$ TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer. The DNA was visualized in 400 mL of TAE buffer containing 40 μL of ethidium bromide (10 mg/mL, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). The plasmid integrity in each sample (0.25 μg) was confirmed by electrophoresis after decomplexing the lipoplexes (10 μL of a plasmid, 0.05 mg/mL) with sodium dodecyl sulfate (10 μL , 80 g/L).

In Vitro Transfection of A549 Cells. Twenty-four hours before transfection, A549 cells (epithelial cells derived from human pulmonary carcinoma) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Life Technologies, Cergy Pontoise, France), containing 1% glutamine (200 mM, Sigma), 0.4% gentamicin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma), and 10% fetal calf serum (Sigma), in 96-well plates (2×10^4 cells per well), in a wet (37 °C) and 5% $\text{CO}_2/95\%$ air atmosphere. The volume of the DNA–polyamine telomer complex (10 μL of DNA and 5 μL of telomer, respectively) was diluted to 100 μL in DMEM supplemented with 10% FCS to obtain various amounts of DNA (1 and 0.5 μg per well, respectively) in the preparation. The culture medium was removed and replaced with 100 μL of DMEM supplemented with 10% FCS and containing the desired amount of DNA. After 4 and 24 h, 50 and 100 μL of DMEM supplemented with 30 and 10% FCS, respectively, were added, respectively.

Forty-eight hours after transfection, the culture medium was discarded and the cells were washed with 100 μL of PBS and then lysed with 50 μL of lysis buffer (Promega, Charbonnières, France). The lysates were frozen at -32 °C, awaiting analysis of luciferase activity. This measurement was taken for 10 s on 10 μL of the lysis mixture in a Berthold LB96P luminometer in dynamic mode, using the "Luciferase" determination system (Promega) in 96-well plates. The total protein concentration per well was determined using conventional techniques (BCA test, Pierce, Montluçon, France). For cells grown in the absence of DNA complexes, a well contains ~ 30 –50 μg of proteins. Each (co)telomer–DNA complex was formulated twice, and each formulation was tested in triplicate.

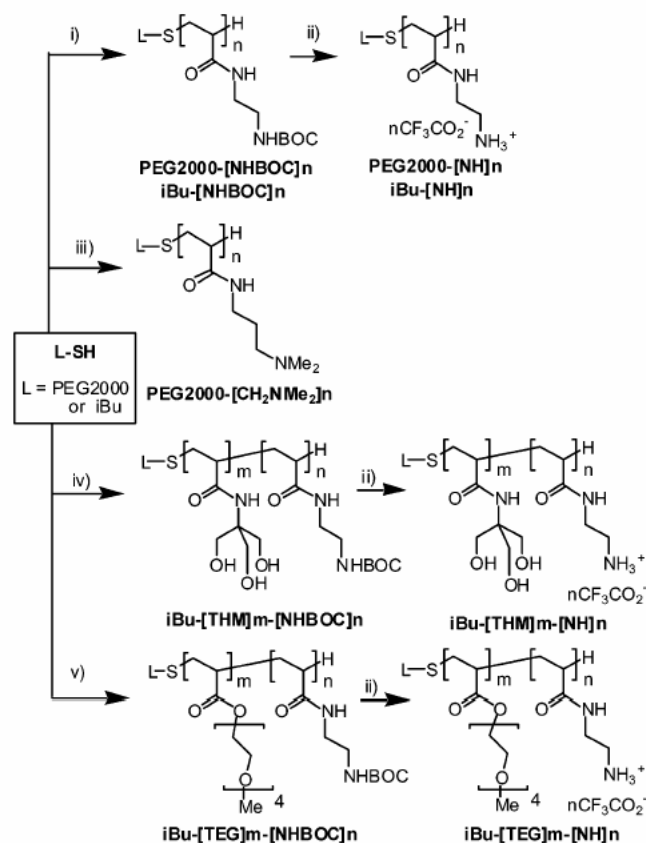
Statistical Analyses. Statistical tests were performed with STATGRAPHICS Plus5.0 software. Analysis of variance (Anova) was run on the logarithmic transformation of luciferase expression levels [log(femtograms of luciferase per milligram of protein)] to fit normal distributions of the data.

Three factors, i.e., the chemical nature of the product, the amount of DNA per well (0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{well}$), and the N/P ratio (10, 5, and 2.5), were analyzed as sources of the variation of the logarithmic transformation of the transfection levels, using a multiple-comparison procedure. Tukey's honestly significant difference (HSD) method was used to discriminate among the means of the logarithmic transformation of luciferase expression levels.

RESULTS AND DISCUSSION

Telogen and Taxogen Synthesis. Telomerization and cotelomerization reactions were performed with telogen PEG2000-SH or ^3Bu -SH (the syntheses of which are outlined in Scheme 1).

Scheme 2. Synthesis of ⁴Bu-[NH]_n Telomers, PEG2000-[NH]_n and PEG2000-[CH₂NMe₂]_n Diblock Telomers, and of ⁴Bu-[THM]_m-[NH]_n and ⁴Bu-[TEG]_m-[NH]_n Random Cotelomers^a



^a Reagents and conditions: (i) CH₂=CHC(O)NH(CH₂)₂NHBOC (A), AIBN, Δ in CH₃CN; (ii) TFA; (iii) CH₂=CHC(O)NH(CH₂)₃NMe₂ (B), AIBN, Δ in CH₃CN; (iv) A, CH₂=CHC(O)NH[C(CH₂OH)₃] (D), AIBN, Δ in CH₃CN with a 1/1 A/D molar ratio; (v) A, CH₂=CHC(O)O[(CH₂CH₂O)₄]Me (C), AIBN, Δ in CH₃CN with a 1/1 A/C molar ratio for *m* = 12 and *n* = 20 or with a 3/1 A/C molar ratio for *m* = 7 and *n* = 25.

Thiol PEG2000-SH was obtained in two steps from commercially available PEG2000-OH. The free hydroxyl was first replaced with a tosyl group by the action of tosyl chloride (85%). The resulting tosylate was then converted into the corresponding thiol using an anion-exchange resin (SH⁻ form) (78%). Thiol ⁴Bu-SH was obtained in two steps by coupling 3,3'-dithiodipropionic acid with diisobutylamine using HOBt and EDC as coupling reagents, followed by reduction of the disulfide bond with Zn and AcOH (75% overall yields).

The synthesis of taxogen C was performed from acryloyl chloride and tetraethylene glycol monomethyl ether, using the procedure described for that of the NHBOC-containing taxogen A (24). The NMe₂- and THM-containing taxogens B and D are commercially available.

Telomer and Cotelomer Synthesis. All (co)telomerization reactions (Scheme 2) were performed under nitrogen by refluxing in acetonitrile and (i) taxogen A or B, or a mixture of taxogens A and C, or A and D, (ii) the thiols PEG2000-SH, or ⁴Bu-SH in a fixed taxogen/telogen concentration ratio, and (iii) AIBN. At the end of the reaction, the solvent was evaporated under reduced pressure. The random cotelomers were purified and fractionated by gel permeation chromatography on a Sephadex LH20 or LH60 column. This allows separation of the (co)telomers from AIBN and residual disulfide which has formed during telomerization. The diblock

Table 1. Mean Sizes, Determined by Light Scattering Spectroscopy, of the (Co)teloplexes Formed by the Dilution Method Applied to Plasmid pTG11236 and the ⁴Bu-[NH]₇₅, PEG2000-[NH]_n, PEG2000-[CH₂NMe₂]_n, ⁴Bu-[TEG]₁₂-[NH]₂₀, or ⁴Bu-[THM]_m-[NH]_n (Co)telomers

(co)telomer	(co)teloplexes	
	<i>N/P</i> ratio ^a	mean diameter (nm) (SD)
⁴ Bu-[NH] ₇₅	10	75 (30)
	5	115 (55)
	2.5	135 (55)
	1.25	p ^b
	0.8	135 (50)
PEG2000-[NH] ₁₂₅	10	120 (40)
	5	130 (45)
	2.5	180 (70)
	1.25	p ^b
	0.8	200 (70)
PEG2000-[NH] ₁₉₀	10	120 (45)
	5	120 (35)
	2.5	170 (60)
	1.25	p ^b
	0.8	195 ^c
PEG2000-[NH] ₂₆₀	10	140 (50)
	5	120 (45)
	2.5	180 (60)
	1.25	175 ^c
	0.8	175 ^c
PEG2000-[CH ₂ NMe ₂] ₄	10	120 (40)
	5	100 (30)
	2.5	125 (35)
	1.25	260 (70)
	0.8	145 (50)
PEG2000-[CH ₂ NMe ₂] ₃₅	10	135 (50)
	5	140 (50)
	2.5	220 (70)
	1.25	155 (45)
	0.8	150 (50)
⁴ Bu-[TEG] ₁₂ -[NH] ₂₀	10	125 (40)
	5	105 (40)
	2.5	155 (55)
	1.25	330 ^c
	0.8	295 ^c
⁴ Bu-[THM] ₅₀ -[NH] ₅₀	10	100 (35)
	5	140 (50)
	2.5	140 (50)
	1.25	p ^b
	0.8	165 (60)
⁴ Bu-[THM] ₃₀ -[NH] ₁₀₀	10	85 (25)
	5	100 (35)
	2.5	260 (70)
	1.25	p ^b
	0.8	175 (60)

^a *N* equals the number of (co)telomer amine equivalents; *P* equals the number of plasmid phosphate equivalents. ^b Precipitate. ^c Large.

PEG2000-grafted BOC-protected telomers were purified after BOC deprotection. The *N*-BOC-telomers and cotelomers obtained from taxogen A were deprotected in excess TFA at room temperature. The (poly)cationic telomers and random cotelomers thus obtained were isolated as TFA salts by evaporation of excess reagent in the presence of cyclohexane followed by lyophilization. The diblock PEG-grafted telomers were further purified from residual PEG disulfide by washing with CH₂Cl₂ in which they are not soluble. Quantitative deprotection was confirmed by ¹H NMR (the absence of the signal corresponding to the BOC protons). For each telogen and taxogen(s), the different (co)telomers that were isolated and their code names are reported in Table 1. Oxygen- and peroxide-free solvents were used throughout these experimental procedures to avoid oxidation of sulfur into sulfoxide in the (co)telomers (24, 25).

The average degrees of polymerization, $aDP_n (=n)$, of the PEG-grafted diblock telomers resulting from taxogen A or B were determined by ^1H NMR on the protected PEG2000-[NHBOC] $_n$ or PEG2000-[CH₂NMe₂] $_n$ telomers, respectively. These aDP_n values were calculated by comparing the integration of the BOC and NCH₂ or NMe signals, respectively, with that of the PEG2000 OCH₂ protons. For the telomers resulting from taxogen A and telogen $^i\text{Bu-SH}$ and for all random cotelomers resulting from a mixture of taxogens A and C, or A and D, the average degrees of (co)polymerization corresponding to the number of NHBOC, TEG, and THM units were also determined by ^1H NMR on the BOC-protected (co)telomers. The number of NHBOC units was calculated by comparing the integration of the NCH₂CH₂NHBOC signals with that of the isobutyl methyl protons. The number of TEG and THM units was calculated by comparing the integration of the TEG (OCH₂ and OCH₃) or THM (CH₂OH) signals with that of the isobutyl methyl and NCH₂CH₂NHBOC resonances.

Formation and Characterization of the DNA Complexes. The capability of the polycationic (co)telomers to condense DNA and to form (co)teloplexes was analyzed with plasmid pTG11236, which was also used for the in vitro transfection assays described in the next section. The sizes of the DNA complexes [size being an important parameter to control when in vivo uses are contemplated or when their in vitro transfection efficiency is evaluated (28)] were analyzed by light scattering spectroscopy. The preparation of the (co)teloplexes was performed by mixing a (co)telomer solution with the plasmid in 5% glucose using N/P ratios of 10, 5, 2.5, 1.25, and 0.8 [N equals the number of amine functions of the (co)telomer; P equals the number of DNA phosphates]. Table 1 collects the mean particle diameters measured for the different (co)teloplexes. These measurements were performed after 24–48 h of aging at 25 °C.

These formulations were also analyzed by gel electrophoresis which showed the presence of a fully complexed plasmid (not accessible to ethidium bromide) for all $N/P = 10$ –2.5 formulations and for most $N/P = 1.25$ ones. DNA that is complexed, but accessible to ethidium bromide, was however detected for the PEG2000-[NH] $_{260}$ and ^iBu -[THM] $_{30}$ -[NH] $_{100}$ $N/P = 1.25$ formulations, and for all the $N/P = 0.8$ formulations that were investigated (data not shown). When gel electrophoresis of the (co)teloplexes was performed in the presence of detergent (sodium dodecyl sulfate), dissociation of the complexes was observed in all cases.

In terms of telomer impact on teloplex size and stability (with respect to aggregation), the behavior of the diblock PEG-grafted and random TEG or THM (co)telomers is worth noting. Indeed, these polycationic derivatives led often to stable formulations with a polydispersed population of small-sized teloplexes (85–330 nm), even for N/P ratios of 1.25 and 0.8, while precipitates were most frequently detected for complexes with N/P ratios close to 1 (24, 25, 29).

In Vitro Transfection. The transfection potency of the (co)teloplexes formulated with the luciferase reporter plasmid pTG11236 was assayed in vitro on lung epithelial A549 cells. Although transfection efficiencies with DNA complexes are generally impaired by the presence of serum components, these experiments were nevertheless run in a culture medium containing 10% fetal calf serum. The transfection efficiency of the (co)teloplexes (expressed in femtograms of luciferase per milligram of protein) was evaluated for a DNA dose of 0.5 and 1 μg per well, as compared to naked DNA and to control

lipoplexes based on a pcTG90-DOPE $N/P = 5$ complex (1/1 molar ratio). These lipoplexes proved to be among the most efficient nonviral formulations for transfecting A549 cells (8, 24). Cells treated with naked DNA under equivalent conditions exhibited expression levels of $\sim 10^2$ – 10^3 fg of luciferase/mg of protein. The effect on cell viability of the (co)teloplexes was also checked by determining the total amount of protein per well of the transfected cells relative to that measured for untreated cells (for which the total protein amount per well is in a 30–50 μg /well range).

The transfection and cell viability results are illustrated in Figure 2. These data indicate that the (co)teloplexes formulated with telomer ^iBu -[NH] $_{75}$, diblock PEG2000-[NH] $_n$ ($n = 70, 125, 190$, or 260), random ^iBu -[THM] $_m$ -[NH] $_n$ ($m = n = 50$, or $m = 30$ and $n = 100$), and ^iBu -[TEG] $_7$ -[NH] $_{25}$ cotelomers do allow transfection of the plasmid into the A549 cells with a much higher efficiency than with naked DNA; luciferase expression levels in the 10^5 – 10^8 fg of luciferase/mg of protein range were indeed measured for most of these formulations and for N/P ratios of 5. In contrast, for N/P ratios of 0.8 and 1.25 (data not shown) and for the NMe₂ diblock PEG2000-[CH₂NMe₂] $_n$ and random ^iBu -[TEG] $_{12}$ -[NH] $_{20}$ teloplexes, whatever the value of their N/P ratios, much lower transgene expression levels (10^3 – 10^4 fg of luciferase/mg of protein) were detected.

As most frequently observed for lipoplexes and polyplexes, the level of luciferase expression of the (co)teloplexes increased when the DNA dose was increased from 0.5 to 1 μg /well and when their N/P ratios were progressively increased from 0.8–1.25 to 10 (statistical analysis data not shown). These results are likely related to an increase in their level of binding, through electrostatic interactions, to the anionic proteoglycans expressed at the cellular surface and, consequently, of their cellular uptake by endocytosis (30–32). Concomitantly, a small decrease in their cell tolerance (Figure 2) was seen. It remained, however, very high even for a DNA dose of 1 μg /well for which 80% of the 39 formulations that were investigated displayed a percentage of cell viability within a range of 80–120%. It is therefore noticeable that high transfection levels were attained that were further compatible with high levels of cell survival.

When compared with the control pcTG90-DOPE lipids which display a high transfection efficiency (10^7 – 10^9 fg of luciferase/mg of protein), none of the new polycationic (co)telomers was found to be as efficient in mediating DNA transfer and expression. This is illustrated in Figure 3 which compares, irrespective of the N/P ratio and of the amount of DNA per well, the means of luciferase expression obtained with the control pcTG90-DOPE lipoplexes and with the (co)teloplexes. A more detailed analysis (Figure 4) shows that, for N/P ratios of 2.5 and 5, significantly higher luciferase levels (1–2 orders of magnitude) were obtained with the pcTG90-DOPE lipoplexes than with the most efficient ^iBu -[NH] $_{75}$ or PEG2000-[NH] $_{190}$ formulations found in this study (see the next section). However, for an N/P ratio of 10, these latter formulations displayed luciferase levels comparable to those of the control. One should further underline that the ^iBu -[NH] $_{75}$ or PEG2000-[NH] $_{190}$ formulations displayed a higher cell viability than the control lipoplexes, e.g., 60–120% of cell survival for the ^iBu -[NH] $_{75}$ or PEG2000-[NH] $_{190}$ formulations versus 40 to $\sim 70\%$ of cell survival for the controls for a DNA dose of 0.5 μg /well (Figure 2B).

Structure-Transfection Efficiency Relationships. One of the objectives of this study was aimed at deter-

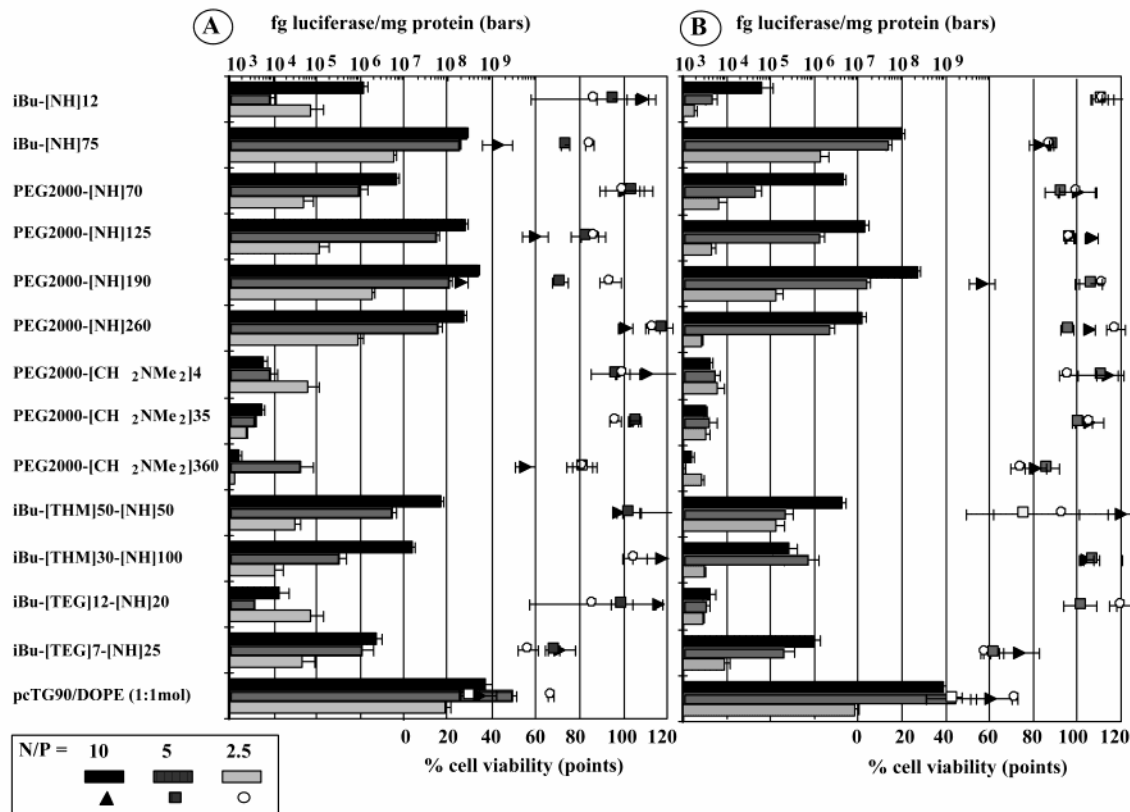


Figure 2. Luciferase expression (bars) and cell viability (points) of the pTG11236 complexes made with Bu-NH_n telomers, PEG2000- $[\text{NH}]_n$ and PEG2000- $[\text{CH}_2\text{NMe}_2]_n$ diblock telomers, and $\text{Bu-TEG}_{nr}[\text{NH}]_n$ and $\text{Bu-THM}_{nr}[\text{NH}]_n$ random cotelomers as compared to control pCG90-DOPE (1/1 molar ratio) lipoplexes in A549 cells. Transfection was performed in the presence of 10% fetal calf serum. Data represent means \pm SEM (standard error of the mean) from two independent experiments, each performed in triplicate (for more details, see Experimental Section): DNA doses of 1 (A) and 0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ (B).

mining the effects of structural elements of the polyamine (co)telomers on their transfection potential and on cell survival. The structural modifications that were investigated here concern (i) the number of amine functions, (ii) the nature of the polyamine polar head [aminoethyl vs (*N,N*-dimethylamino)propyl], (iii) the presence of a block PEG2000 moiety connected to a block polyamine unit of variable length, and (iv) a random combination of primary amines with short tetraethylene glycol (TEG) or THM residues.

One can observe, irrespective of the *N/P* value and of the DNA dose, that increasing the average number of primary amine functions from 12 to 75 in the Bu-NH_n telomer series (hence, its degree of polymerization) induced a substantial (2- to 4-orders of magnitude) transgene expression increase (see Figure 3) and, concomitantly, a slight cell toxicity increase (Figure 2). In the di-block PEG2000- $[\text{NH}]_n$ series, transgene expression rose also but to a much lesser extent when the average number of amine functions was increased from 70 to 125 then to 190. Figure 3 demonstrates further that, in this series, the dependence of the luciferase expression means with the polyamine unit length (*n*) had a bell-shaped character, an optimum of transfection being attained for *n* = 190. The multiple comparison procedure using the Tukey's HSD method indicated that five of the six different PEG2000- $[\text{NH}]_n$ /PEG2000- $[\text{NH}]_{n'}$ pairs of means show statistically significant differences at the 95.0% confidence level, the exception being the PEG2000- $[\text{NH}]_{125}$ /PEG2000- $[\text{NH}]_{260}$ pair. In the di-block PEG2000- $[\text{NH}]_n$ series, increasing the average degree of polymerization did not impair cell survival (Figure 2).

Where the impact on transfection of replacement of the ethyl- NH_3^+ functions (as in PEG2000- $[\text{NH}]_n$) with propyl- NHMe_2^+ ones (as in PEG2000- $[\text{CH}_2\text{NMe}_2]_n$) is concerned, the level of transgene expression was drastically decreased (see Figures 2 and 3). This result differs substantially from a previous study from this laboratory where it was found that the random replacement of part of NH_3^+ with NHMe_2^+ units had no effect on transfection (25). However, this result concerned aminoethyl acrylate-deriving cotelomers. The low transfection efficiency of the diblock aminopropyl acrylate PEG2000- $[\text{CH}_2\text{NMe}_2]_n$ cotelomers as compared to that of their aminoethyl acrylate analogues is more likely attributable to the ethyl-propyl backbone replacement rather than to the NH_3^+ - NHMe_2^+ substitution. Indeed, it was shown that polymers derived from 2-(dimethylamino)propyl methacrylate were less effective gene transfer agents than polymers derived from 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (33). This was attributed to the higher pK_a values of the propyl polymers and, consequently, to their lower capacity of buffering endosomes and of their DNA complexes to escape from these endosomes (33).

With regard to the impact of the block PEG2000 moiety on transfection, its presence was found to decrease the level of transgene expression. As illustrated in Figure 3, the DNA complexes made with the diblock PEG2000- $[\text{NH}]_{70}$ telomers led to much lower transgene expression levels than those formulated with Bu-NH_{75} which possesses a polyamine backbone with a comparable degree of polymerization. To compensate in part this transfection efficiency decrease, the length of the polyamine block in PEG2000- $[\text{NH}]_n$ must be increased to up

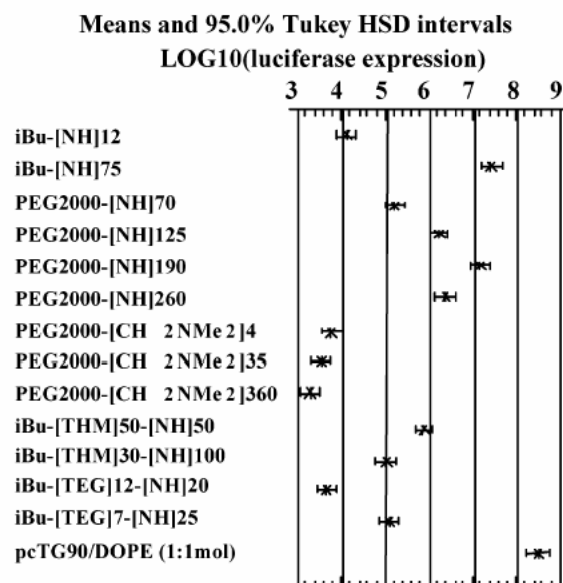


Figure 3. Means and 95.0% Tukey HSD intervals of the logarithmic transformation of luciferase expression levels [log-(femtograms of luciferase per milligram of protein)] for the pTG11236 complexes made with ⁴Bu-[NH]_n telomers, PEG2000-[NH]_n and PEG2000-[CH₂NMe₂]_n diblock telomers, or ⁴Bu-[TEG]_m-[NH]_n and ⁴Bu-[THM]_m-[NH]_n random cotelomers or with control pcTG90-DOPE (1/1 molar ratio) lipids, irrespective of the DNA dose and of the N/P ratio. Statistical tests were performed with STATGRAPHICS Plus5.0 software. This comparison was performed using the multiple-sample comparison procedure, and the method used to discriminate among the means of the logarithmic transformation of luciferase expression levels was Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure.

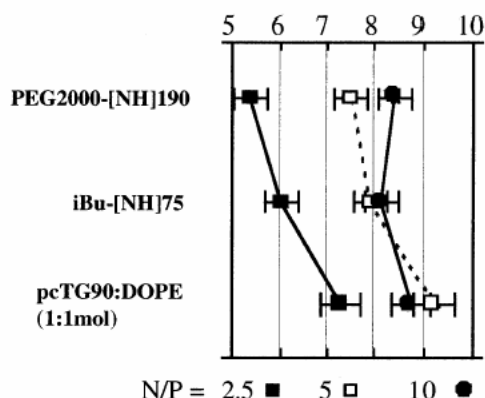


Figure 4. Means and 95.0% Tukey HSD intervals of the logarithmic transformation of luciferase expression levels [log-(femtograms of luciferase per milligram of protein)] for the pTG11236 complexes made with ⁴Bu-[NH]₇₅ telomers, PEG2000-[NH]₁₉₀ diblock telomers, or control pcTG90-DOPE (1/1 molar ratio) lipids, as a function of the N/P ratios of the complexes.

to an average number of amine units of 190, as in PEG2000-[NH]₁₉₀.

A decrease in the level of transgene expression was also observed upon random replacement of part of primary amine functions with tetraethylene glycol (TEG) residues. Among the cotelomeres formulated with random ⁴Bu-[TEG]₁₂-[NH]₂₀ or ⁴Bu-[TEG]₇-[NH]₂₅, it appears that the most efficient ones were those formulated with the random cotelomers which contain the smallest number of TEG units (see Figure 3). Comparable results were also noticed in the literature for random copolymers derived from 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate and ethoxytriethylene glycol methacrylate (26).

In a previous study from this laboratory concerning the effect on transfection of replacing randomly part of the primary amine functions by polyol THM residues in lipotelomers, transgene expression was shown to be unaffected while cell viability was seen to be improved to some extent (25). Similar results were also noticed in the literature for polylysines and polyallylamines after partial glycosylation (27). In contrast, we found here, as illustrated in Figure 3, that the random replacement of part of primary amine functions in ⁴Bu-[NH]_n with THM residues, as in ⁴Bu-[THM]₃₀-[NH]₁₀₀ or ⁴Bu-[THM]₅₀-[NH]₅₀, induced a substantial (10–500-fold) decrease in the transfection efficiency of their corresponding DNA complexes.

Altogether, these results showing a transfection potential decrease induced by the presence either of a block long polyethylene glycol residue (PEG2000) or of a random combination of primary amines with tetraethylene glycol (TEG) or THM residues were in fact to be expected. These residues provide a shielding effect, reducing the strength of electrostatic interactions between the cationic DNA complexes and the anionic cell proteoglycans, and consequently reducing their level of cellular uptake.

CONCLUSION

This work suggests that, among the new polycationic derivatives synthesized and investigated for their transfection efficiency, the ⁴Bu-[NH]₇₅ telomers and the diblock polyethylene glycol-conjugated PEG2000-[NH]_n telomers are very promising candidates for gene transfer purposes. The variation of structure parameters allowed the establishment of some structure-activity relationships, and the optimization of (co)teloplex formulations, where both high transfection levels and cell viability were achieved. Moreover, these in vitro findings do not pre-judge all of their in vitro and in vivo behaviors which remain worthy of investigation.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Transgène SA for financial support and Dr. B. Cavallini (Transgène SA) for supplying with plasmid. We also thank Drs. D. Heissler and A. Nazih (ULP Strasbourg) for supplying pcTG90. Thanks to Drs. H. V. J. Kolbe, S. Braun, and O. Meyer (Transgène SA) for their interest in this project and for helpful discussions.

LITERATURE CITED

- (1) Marshall, E. (1999) Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286, 2244–2245.
- (2) Wivel, N. A., and Wilson, J. M. (1998) Methods of gene delivery. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 12, 483–501.
- (3) Schätzlein, A. G. (2001) Non-viral vectors in cancer therapy: principles and progress. *Anti-Cancer Drugs* 12, 275–304.
- (4) Luo, D., and Saltzman, W. M. (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.* 18, 33–37.
- (5) Brown, M. D., Schätzlein, A. G., and Uchegbu, I. F. (2001) Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int. J. Pharm.* 229, 1–21.
- (6) Zuber, G., Dauty, E., Nothisen, M., Belguise, P., and Behr, J. P. (2001) Towards synthetic viruses. *Adv. Drug Delivery Rev.* 52, 245–253.
- (7) Mahato, R. I., Smith, L. C., and Rolland, A. (1999) Pharmaceutical perspectives of non-viral gene therapy. *Adv. Genet.* 41, 95–156.
- (8) Gaucheron, J., Santaella, C., and Vierling, P. (2001) Highly fluorinated lipospermines for gene transfer: synthesis and evaluation of their in vitro transfection efficiency. *Bioconjugate Chem* 12, 114–128.

- (9) Liu, F., Qi, H., Huang, L., and Liu, D. (1997) Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection *in vivo* via intravenous administration. *Gene Ther.* 4, 517–523.
- (10) Ishiwata, H., Suzuki, N., Ando, S., Kikuchi, H., and Kitagawa, T. (2000) Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes. *J. Controlled Release* 69, 139–148.
- (11) Anwer, K., Kao, G., Proctor, B., Rolland, A., and Sullivan, S. (2000) Optimization of cationic lipid/DNA complexes for systemic gene transfer to tumour lesions. *J. Drug Targeting* 8, 125–135.
- (12) Dash, P. R., Read, M. L., Barrett, L. B., Wolfert, M. A., and Seymour, L. W. (1999) Factors affecting blood clearance and *in vivo* distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther.* 6, 643–650.
- (13) Li, S., Tseng, W. C., Stolz, D. B., Wu, S. P., Watkins, S. C., and Huang, L. (1999) Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum; implications for intravenous lipofection. *Gene Ther.* 6, 585–594.
- (14) Ferrari, F. E., Rusalov, D., Enas, J., and Wheeler, C. J. (2001) Trends in lipoplex physical properties dependent on cationic lipid structure, vehicle and complexation procedure do not correlate with biological activity. *Nucleic Acids Res.* 29, 1539–1548.
- (15) Lemieux, P., Vinogradov, S. V., Gebhart, C. L., Guérin, N., Paradis, G., Nguyen, H.-K., Ochietti, B., Suzdaltseva, Y. G., Bartakova, E. V., Bronich, T. K., St-Pierre, Y., Alakhov, V. Y., and Kabanov, A. V. (2000) Block and graft copolymers and Nanogel copolymer networks for DNA delivery into cell. *J. Drug Targeting* 8, 91–105.
- (16) Harvie, P., Wong, F. M. P., and Bally, M. B. (2000) Use of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates to regulate the surface attributes and transfection activity of lipid-DNA particles. *J. Pharm. Sci.* 89, 652–663.
- (17) Oupicky, D., Carlisle, R. C., and Seymour, L. W. (2001) Triggered intracellular activation of disulfide crosslinked polyelectrolyte gene delivery complexes with extended systemic circulation *in vivo*. *Gene Ther.* 8, 713–724.
- (18) Ogris, M., Brunner, S., Schuller, S., Kircheis, R., and Wagner, E. (1999) PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* 6, 595–605.
- (19) Lee, H., Jeong, J. H., and Park, T. G. (2002) PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity. *J. Controlled Release* 79, 283–291.
- (20) Dash, P. R., Read, M. L., Fisher, K. D., Howard, K. A., Wolfert, M., Oupicky, D., Subr, V., Strohm, J., Ulbrich, K., and Seymour, L. W. (2000) Decreased binding to proteins and cells of polymeric gene delivery vectors surface modified with a multivalent hydrophilic polymer and retargeting through attachment of transferrin. *J. Biol. Chem.* 275, 3793–3802.
- (21) Garrett, S. W., Davis, O. R., Milroy, D. A., Wood, P. J., Pouton, C. W., and Threadgill, M. D. (2001) Synthesis and characterisation of polyamine-poly(ethylene glycol) constructs for DNA binding and gene delivery. *Bioorg. Med. Chem.* 8, 1779–1797.
- (22) Sagara, K., and Kim, S. W. (2002) A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes. *J. Controlled Release* 79, 271–281.
- (23) Oupicky, D., Konak, C., Ulbrich, K., Wolfert, M. A., and Seymour, L. W. (2000) DNA delivery systems based on complexes of DNA with synthetic polycations and their copolymers. *J. Controlled Release* 65, 149–171.
- (24) Verderone, G., Van Craynest, N., Boussif, O., Santaella, C., Bischoff, R., Kolbe, H. V. J., and Vierling, P. (2000) Lipopolycationic telomers for gene transfer: synthesis and evaluation of their *in vitro* transfection efficiency. *J. Med. Chem.* 43, 1367–1379.
- (25) Craynest, N. V., Santaella, C., Boussif, O., and Vierling, P. (2002) Polycationic telomers and cotelomers for gene transfer: synthesis and evaluation of their *in vitro* transfection efficiency. *Bioconjugate Chem.* 13, 59–75.
- (26) Van de Wetering, P., Moret, E. E., Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E., Van Steenberg, M. J., Crommelin, D. J. A., and Hennink, W. E. (2000) Copolymers of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate with ethoxytriethylene glycol methacrylate or *N*-vinylpyrrolidone as gene transfer agents. *J. Controlled Release* 64, 193–203.
- (27) Boussif, O., Delair, T., Brua, C., Veron, L., Pavirani, A., and Kolbe, H. V. J. (1999) Synthesis of polyallylamine derivatives and their use as gene transfer vectors *in vitro*. *Bioconjugate Chem.* 10, 877–883.
- (28) Boussif, O., Zanta, M. A., and Behr, J. P. (1996) Optimized galenics improve *in vitro* gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther.* 3, 1074–1080.
- (29) Pitard, B., Aguerre, O., Airiau, M., Lachagès, A.-M., Boukhnikachvili, T., Byk, G., Dubertret, C., Herviou, C., Scherman, D., Mayaux, J.-F., and Crouzet, J. (1997) Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14412–14417.
- (30) Girao da Cruz, M. T., Simoes, S., Pires, P. P. C., Nir, S., and De Lima, M. C. P. (2001) Kinetic analysis of the initial steps involved in lipoplex-cell interactions: effect of various factors that influence transfection activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1510, 136–151.
- (31) Mislick, K. A., and Baldeschwieler, J. D. (1996) Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12349–12354.
- (32) Mounkes, L. C., Zhong, W., Cipres-Paladin, G., Heath, T. D., and Debs, R. J. (1998) Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 273, 26164–26170.
- (33) Van de Wetering, P., Moret, E. E., Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E., Van Steenberg, M. J., and Hennink, W. E. (1999) Structure/activity relationship of water-soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for nonviral gene delivery. *Bioconjugate Chem.* 10, 589–597.

BC0255440

PARTIE III

CONJUGUES D'AMD3100 EN TANT QUE COMPOSANTS POUR LA FORMULATION DE SYSTEMES SPECIFIQUES DE TRANSFERT DE GENES



I Introduction

Améliorer le ciblage spécifique des vecteurs non viraux est un des challenges du transfert de gène. Comme il a été décrit précédemment, les vecteurs synthétiques cationiques non modifiés interagissent avec les cellules de façon électrostatique et non-spécifique. Ce mode d'interaction est particulièrement efficace *in vitro* avec les lipoplexes et polyplexes, mais dans les fluides biologiques les fortes densités de charge cationiques sont synonymes d'opsonisation et d'agrégation avec les constituants sanguins, et *in fine* d'une élimination rapide du vecteur et du transgène de la circulation sanguine. Une des possibilité pour atténuer ces phénomènes est de formuler des complexes proches de la neutralité avec des vecteurs présentant des résidus de ciblage afin d'améliorer la transfection spécifique d'un type cellulaire visé. En outre, l'élaboration de complexes capables d'atteindre spécifiquement les cellules cibles permettrait de diminuer la dose administrée en évitant ainsi les interactions " parasites " avec d'autres constituants.

Cependant, la mise au point de systèmes spécifiques de transfert de gènes implique une connaissance des récepteurs cellulaires ainsi que de leurs fonctionnements. S'il existe, comme il a été explicité dans le chapitre bibliographique, une multitude de récepteurs cellulaires potentiels, ceux-ci sont aussi et souvent exprimés par les cellules saines. Par ailleurs, l'éventail de ligands hautement spécifiques de ces récepteurs et ayant une faible masse moléculaire est extrêmement restreint.

Dans notre contribution pour améliorer le ciblage des vecteurs synthétiques, nous nous sommes intéressés à la transfection spécifique de cellules qui expriment le récepteur CXCR4 par des complexes de l'ADN conjugués à l'AMD3100 qui est un antagoniste puissant et sélectif du récepteur CXCR4. Les CXCR4 sont des récepteurs à chimiokines bien connus dans l'infection des lymphocytes T par les souches VIH-1 X4. Les études réalisées sur le mécanisme d'infection par le VIH-1 X4 ont permis de mettre en évidence l'activité antagoniste de petites molécules non peptidiques comme l'AMD-3100.¹ D'autre part CXCR4 est aussi exprimé sur les métastases du cancer du sein et sur les cellules des glioblastomes (GBM)² qui, parmi les cancers du cerveau, sont le stade ultime des cancers de la glie (astrocytes, oligodendrocytes, etc...). La durée de vie des patients atteints d'un GBM n'excède pas 36 mois et ces cancers dont les traitements actuels reposent sur l'ablation stéréotaxique et le traitement chimiothérapeutique ont la particularité de ne développer aucune métastase. Mais, malgré l'ablation chirurgicale, les quelques cellules malignes encore présentes entraînent une récurrence fatale dans la majorité des cas.

L'ensemble des vecteurs synthétisés au laboratoire ou disponibles commercialement nous a permis de choisir différentes structures moléculaires de vecteurs (lipidiques ou polymériques) qui allaient nous servir pour élaborer des lipoplexes et polyplexes ciblés et ainsi évaluer l'impact du ligand AMD3100 pour réaliser nos objectifs.

Notre choix s'est fixé sur les structures présentées dans le schéma 1 qui sont :

- un conjugué lipidique (i.e. DC18-[NH]-[AMD]) que l'on peut obtenir à partir du ligand BOC-AMD-(CH₂)₄COOH dérivé de l'AMD3100 ; ce conjugué nous permettra de formuler des lipoplexes ciblés avec des lipides (poly)cationiques conventionnels (DOGS/DOPE ou DOTAP/DOPE) ou des lipotélomères polycationiques obtenus au laboratoire (DC18-[NH₂]₂₀) ;³
- des structures polymériques, dérivées de PEI 25 kDa commercial (i.e. PEI-[AMD]_n) ou du télomère iBu-[NH₂]₉₅ disponible au laboratoire (i.e. iBu-[NH₂]_n[AMD]_m),⁴ conjuguées au même ligand Boc-AMD-(CH₂)₄COOH ; ces conjugués nous permettront de formuler directement des polyplexes ciblés.

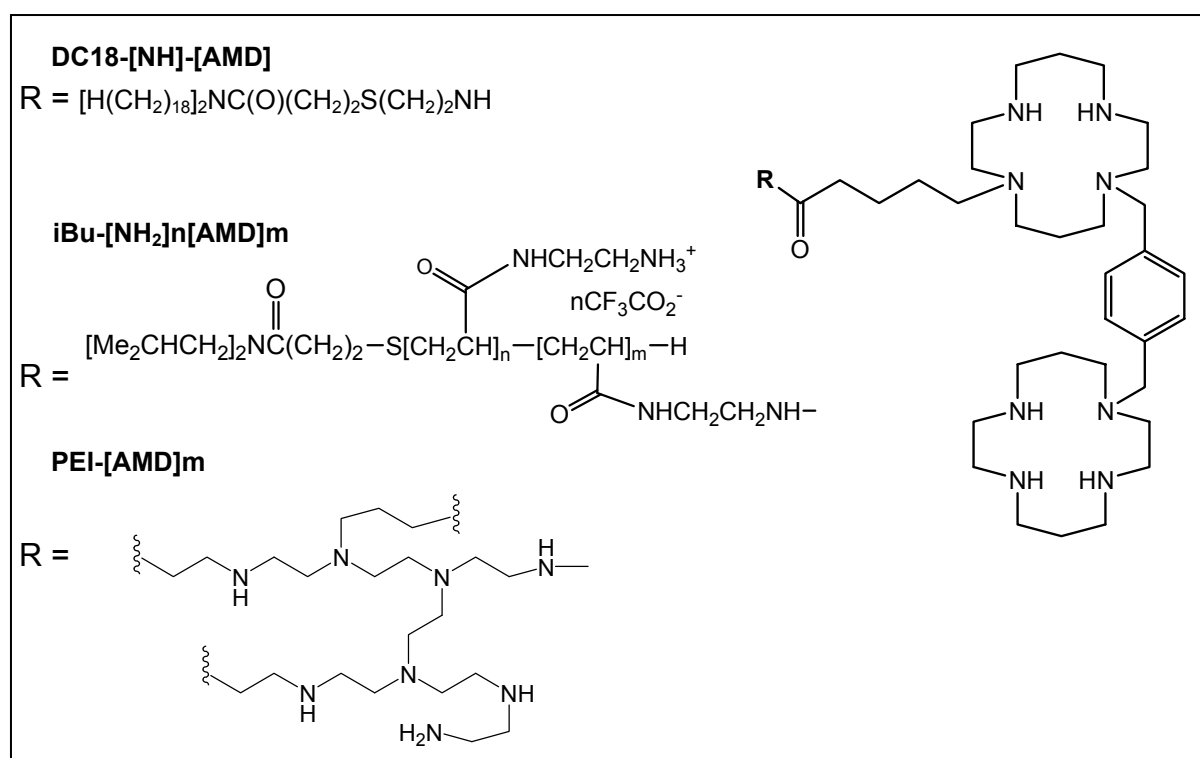


Schéma 1 : conjugués de l'AMD3100

Ces travaux ont fait l'objet de la publication “ **AMD3100 conjugates as components of targeted non-viral gene delivery systems: synthesis and in vitro transfection efficiency of CXCR4-expressing cells** ” par Bertrand Le Bon, Nathalie Van Craynest, Jean-Michel Daoudi, Christophe Di Giorgio, Abraham J. Domb, and Pierre Vierling. Cette publication a été soumise à *Bionconjugate Chemistry*. Les résultats les plus significatifs de cette publication seront résumés ci-après, la publication dans sa totalité figurant à la page **106** de ce mémoire. Cependant, nous développerons certains points qui n'ont pas pu être décrits ou approfondis dans cette publication.

Dans cette publication, nous décrivons la synthèse et la caractérisation de ces divers conjugués lipidiques et polymériques, la formulation et la caractérisation des lipoplexes et polyplexes ciblés et leur aptitude à délivrer un gène spécifiquement dans des cellules qui expriment CXCR4. Ces tests de transfection ont été réalisés avec

- des lignées cellulaires adhérentes de carcinome pulmonaire humain (A549) et des lignées de glioblastome humain (T98G), qui n'expriment pas le récepteur CXCR4, l'objectif de ces tests étant de cerner les conditions qui permettent de minimiser une transfection non-spécifique qui fait intervenir les interactions électrostatiques entre ces complexes ciblés et les protéines anioniques exprimées à la surface cellulaire ;
- la lignée Jurkat dérivant d'un lymphome humain qui exprime CXCR4. Ces cellules sont par ailleurs cultivées en suspension, ce qui permet de minimiser une transfection non-spécifique et de faciliter la mise en évidence d'une transfection “ récepteur-médiée ”, ces cellules étant très difficiles à transfecter de manière non-spécifique.

Tous ces tests ont été réalisés en l'absence et en présence de

- AMD3100 libre pour (i) saturer les récepteurs CXCR4 et ainsi mettre en évidence la transfection par la voie endocytose récepteur-médiée et (ii) mesurer l'impact de ce composé polycationique sur une transfection non spécifique de cellules CXCR4 (-) ou par des complexes non-ciblés.
- acétate et myristate de phorbol (PMA dans la publication, schéma 2) qui facilite la transfection de cellules cultivées en suspension ; ce dérivé initie l'endocytose des récepteurs exprimés à leur surface, y compris celle du récepteur CXCR4 lorsqu'il est lié au ligand AMD3100.^{5;6}

Les tableaux, schémas et figures cités ci-après sont ceux de la publication. Ma participation à cette publication concerne la synthèse du ligand et de l'AMD3100 libre ainsi que la synthèse et la caractérisation des conjugués avec le PEI et le télomère iBu-[NH]95, la formulation et la caractérisation des polyplexes et les tests de transfection réalisés avec ces polyplexes sur les cellules cultivées en suspension ainsi que l'analyse statistique des résultats sur l'ensemble des tests réalisés avec les lipoplexes et polyplexes. Ces travaux ont fait l'objet d'un partenariat avec l'équipe du Pr. A.J. Domb (Université de Jérusalem, Israël) et ont bénéficié d'un soutien financier de l'AFIRST (Association Franco-Israélienne de la Recherche Scientifique et Technologique). Je tiens à remercier le Docteur N. Taylor (UMR-CNRS 5535, IGMM, Montpellier) qui a montré par FACS l'expression des récepteurs CXCR4 sur les cellules Jurkat et leur non-expression sur les cellules A549 et T98G.

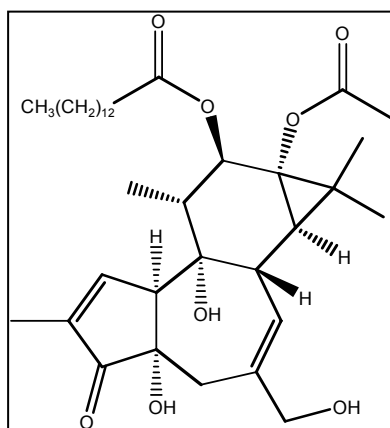


Schéma 2 : phorbol 12-myristate 13-acetate

II Synthèse

La condensation de l'AMD3100 sur le lipide DC18-[NH₂], sur le télomère iBu-[NH₂]₉₅ ou sur le PEI 25 kDa a été réalisée à partir du dérivé acide protégé BOC-AMD-(CH₂)₄-COOH synthétisé au laboratoire (figure 2 et 1 page 133) en deux étapes. La première étape consiste en une activation *in situ* de la fonction acide (BOP/NEt₃, EDC/NHS ou HOBt) qui est suivie de la condensation sur la(les) fonction(s) amine(s) du lipide ou des polymères. La seconde étape est constituée par la déprotection des fonctions amines de l'AMD3100 avec un excès de TFA/CH₂Cl₂ (1/1).

En ce qui concerne les réactions avec les polymères iBu-[NH₂]₉₅ et PEI qui possèdent respectivement un nombre moyen de 95 et 145 fonctions amines primaires, la condensation a été réalisée avec un équivalent de ligand pour 10 équivalents amines de iBu-[NH₂]₉₅ et PEI, ou pour 30 équivalents amines de PEI. Les composés protégés obtenus sont ensuite purifiés par chromatographie sur gel d'exclusion stérique LH-20 ou LH-60.

Le nombre moyen de ligands greffés et de résidus NH₂ libres des composés iBu-[NH₂]₈₀-[AMD]₄ et PEI-[AMD]_p (p = 17, 28) a été déterminé par RMN ¹H en comparant les intégrations des signaux correspondant aux protons aromatiques et BOC de la partie AMD avec, respectivement, les intégrations des signaux correspondant aux (i) protons méthyles du groupe diisobutyl et aux autres protons du squelette du télomère, et (ii) aux protons méthylènes du PEI. La déprotection quantitative des fonctions amines est confirmée par RMN ¹H (disparition des signaux correspondant aux protons BOC).

III Formulation et caractérisation

Les lipoplexes de contrôle et ciblés ont été préparés respectivement à partir des formulations cationiques DOGS/DOPE (1/1 mol.), DOTAP/DOPE (1/1 mol.) et DC18-[NH₂]₂₀ en absence et en présence de 10 ou 20% de DC18-[NH]-[AMD]. Les polyplexes de contrôle et ciblés ont été préparés respectivement à partir de iBu-[NH₂]₉₅, de PEI, de iBu-[NH₂]₈₀-[AMD]₄ et de PEI-[AMD]_p (p =17, 28). Par ailleurs, il est à noter que l'AMD3100 seul complexe les plasmides. Tous ces complexes ciblés et de contrôle ont été préparés en utilisant divers rapports de charge (de 0,8 à 10) et deux plasmides codant pour la luciférase (pTG11236 cf ; page 77 et pTG11033 figure 1).

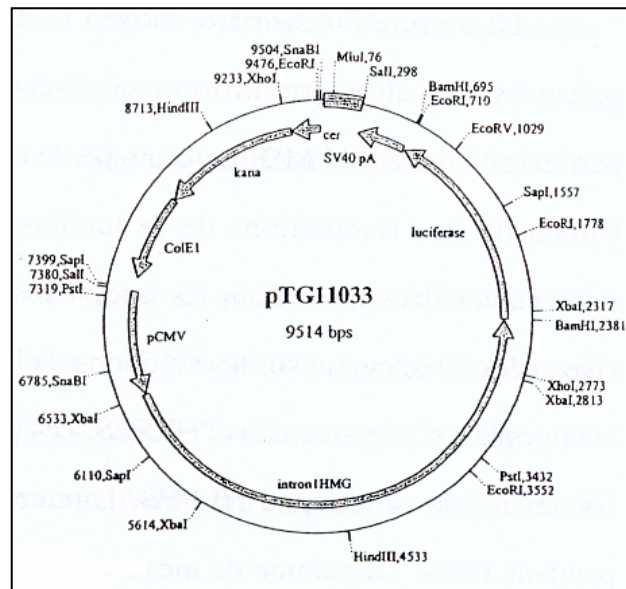


Figure 1 : structure du plasmide pTG11033

Les procédures qui ont été appliquées pour la préparation des lipoplexes et polyplexes sont des protocoles standards qui consistent à mélanger une dispersion du mélange des lipides (généralement des liposomes) ou une solution des polymères avec la solution d'ADN pour obtenir une dispersion de complexes à une concentration de 0,1 mg/mL en ADN.

L'analyse de la taille des lipoplexes ciblés et de référence révèle que la présence de 10 ou 20% du conjugué lipidique DC18-[NH]-[AMD] n'influe pas sur le diamètre moyen des lipoplexes (90 à 250 nm). Des résultats similaires sont obtenus dans le cas des polyplexes ciblés ou non (respectivement, 115-300 nm et 90-250 nm ; cf. tableau 1 de la publication page 132). Par ailleurs, de nombreuses formulations ciblés ne précipitent pas à des rapports N/P 2,5 ou 0,8 contrairement aux lipoplexes ou polyplexes conventionnels.

L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des diverses formulations obtenues à partir des lipides et polymères, ciblés ou conventionnels, et de l'AMD3100 montre que l'ADN est complexé (Figures 2 et 3). Par ailleurs, on peut noter que l'ADN n'est pas accessible au bromure d'éthidium pour des rapports N/P $\geq 2,5$, alors qu'il l'est pour les rapports N/P 1,25 et 0,8. De plus, les tests réalisés en présence de SDS montrent que, pour des N/P $\geq 2,5$, la stabilité des complexes avec l'AMD3100 et des polyplexes est supérieure à celle des lipoplexes. En effet, pour les premiers (figure 2) on peut observer la présence d'ADN partiellement complexé alors que pour les seconds (figure 3), l'ADN est totalement décomplexé.

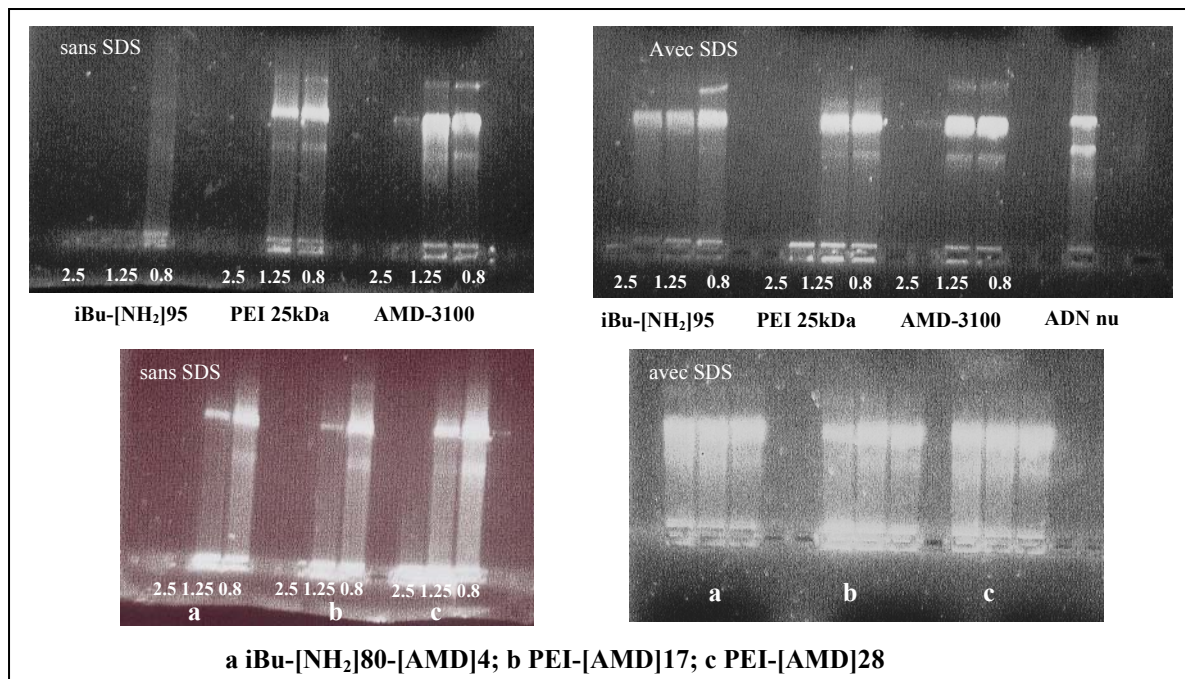


Figure 2 : électrophorèse sur gel des polyplexes ciblés et de contrôle

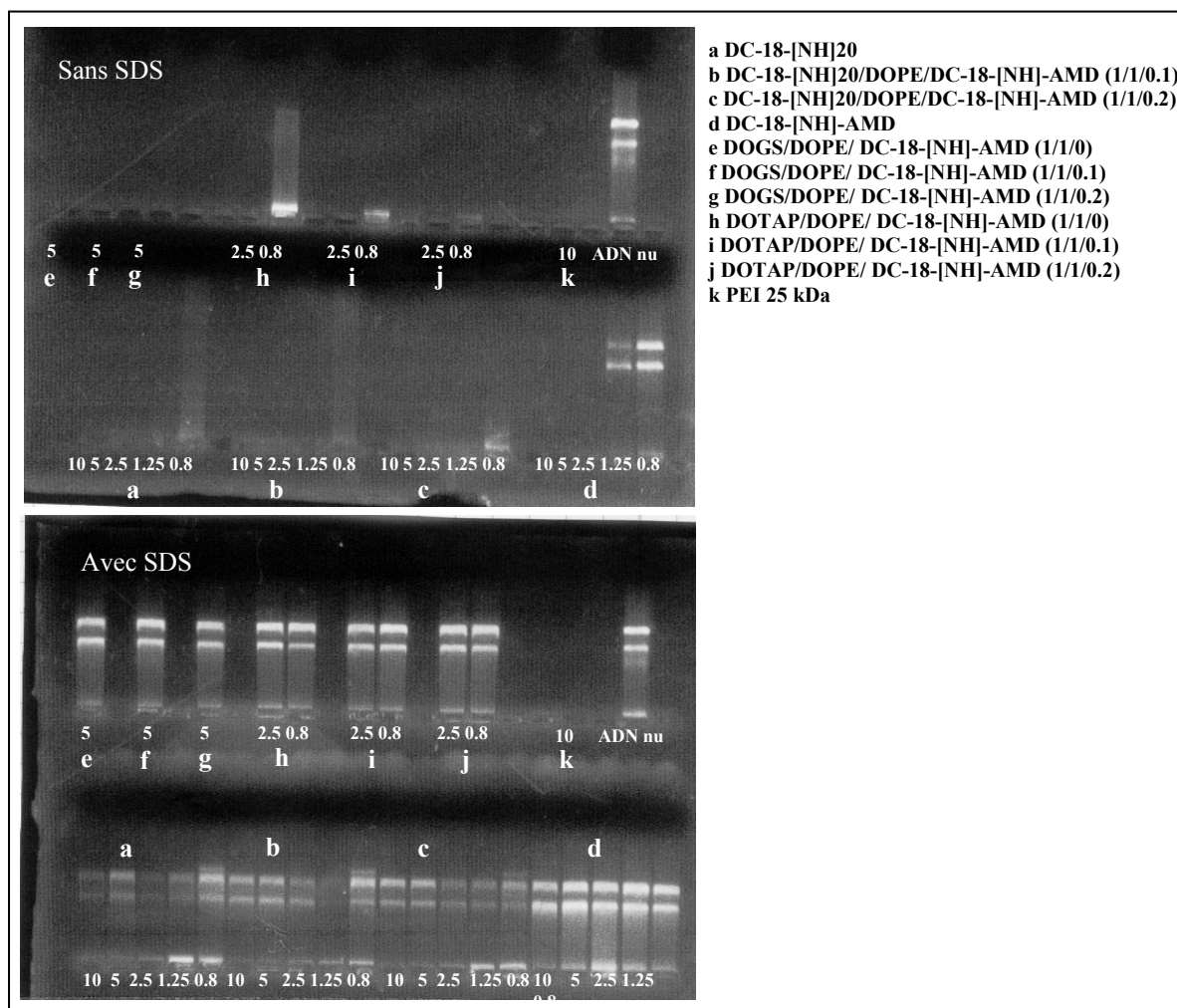


Figure 3 : électrophorèse sur gel des lipoplexes ciblés et de contrôle

IV Transfection *in vitro*

Rappelons que ces tests avaient pour objectifs de démontrer que les lipoplexes ou polyplexes formulés avec des conjugués de l'AMD3100 étaient capables de délivrer spécifiquement des gènes dans des cellules qui expriment le récepteur CXCR4. Néanmoins pour mettre en évidence ce phénomène sans ambiguïté, il était avant tout essentiel de préciser les conditions dans lesquelles ces formulations ciblées transfectaient des cellules par la voie non-spécifique. C'est pour cette raison que nous avons examiné la transfection de cellules témoins A549 et T98G CXCR4(-) avant d'aborder celle des cellules Jurkat CXCR4(+).

IV-1 Transfection non-spécifique cas des cellules CXCR4(-)

Les lipoplexes ciblés, les lipoplexes de référence ainsi que les polyplexes de références (PEI, DC18-[NH₂]₂₀ et AMD3100) utilisés pour ces tests sont ceux décrits précédemment. Ils ont été évalués en présence ou non d'AMD3100 pour mesurer l'impact de la présence dans le milieu de cette molécule polycationique sur la transfection non-spécifique par les lipoplexes et polyplexes.

Les résultats “ bruts ” obtenus pour une quantité d'ADN de 1 µg/puits sont présentés figure 3 page 134, L'analyse statistique présentée figure 4 page 135 prend en compte l'ensemble des données qui ont été obtenues pour des quantité d'ADN de 0.5 et 1 µg/puits.

Cette analyse montre que :

- les lipoplexes conjugués à l'AMD3100 sont des systèmes de transfert de gènes, non-spécifiques, très efficaces des cellules A549 et T98G qui n'expriment pas le récepteur CXCR4 ;
- la présence du conjugué lipidique n'a pas d'impact ni sur la transfection de ces cellules (figure 4A et 4B page 135) ni sur leur viabilité (figure 4G et 4H page 135);
- l'augmentation du rapport N/P des lipoplexes se traduit par une augmentation de leur efficacité de transfection (figure 4C et 4D page 135), ce qui est en faveur d'un mécanisme de transfection non spécifique qui fait intervenir les protéines anioniques exprimées à la surface de ces cellules adhérentes.
- les complexes formés entre le plasmide et l'AMD3100 ne transfectent pas les cellules A549 et T98G ;
- la présence d'AMD3100 libre (figure 4E et 4F page 135) n'influe pas sur la transfection non spécifique sauf dans le cas des cellules A549 avec les formulations DOTAP/DOPE/DC18-[NH]-[AMD] (figure 4F page 135). Dans cette situation, la présence de l'AMD libre améliore surtout la transfection avec les particules “ négatives ” (N/P 0,8) (figure 4 ci-dessous). Ces résultats peuvent être attribués au recouvrement de ces particules “ négatives ” par l'AMD3100 polycationique et à son fort pouvoir complexant de l'ADN qui est accessible dans ces particules comme nous l'avons montré plus haut. Ce fort pouvoir complexant de l'AMD3100 a davantage d'incidence sur les complexes formés avec les lipides

monocationiques (comme le DOTAP) qui sont plus facilement dissociés que ceux formés avec des lipides polycationiques comme le DOGS.

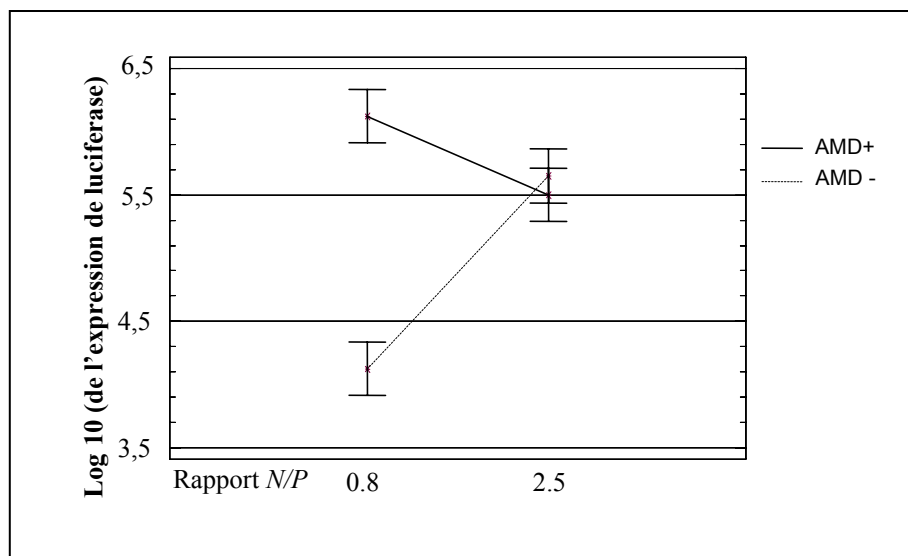


Figure 4 : moyenne et intervalles significatifs à 95% de Tukey de la transformation logarithmique de l'expression de luciférase (fg luciférase/mg de protéines) pour DOTAP/DOPE/DC18-[NH]-AMD (1/1/0,1) sur les cellules A549

IV-2 Transfection spécifique cas des cellules CXCR4(+)

Les résultats concernant la transfection et la viabilité cellulaire des cellules Jurkat CXCR4(+) par les polyplexes conjugués à l'AMD3100 et par les polyplexes contrôles sont présentés Figure 5 de la publication page 137. Les Figures 6A et 6B page 138 présentent leur analyse statistique. Ces tests ont été effectués sur les cellules Jurkat qui sont cultivées en suspension, en présence ou non d'AMD3100 et de PMA.

Dans le but de minimiser la transfection par une voie non spécifique, les tests ont été réalisés avec les formulations ayant un rapport N/P 2,5 et uniquement avec les polyplexes. En effet, la faible stabilité des lipoplexes pour de tels rapports N/P par rapport à celle des complexes PEI/ADN, AMD3100/ADN ou iBu-[NH₂]₉₅, et les fortes interactions entre l'AMD3100 et l'ADN laissent envisager que l'AMD3100 libre modifie davantage l'intégrité des lipoplexes que celle des polyplexes. Par ailleurs, comme nous l'avons vu précédemment, la présence d'AMD3100 augmentait l'efficacité de transfection de certains lipoplexes par la voie non-spécifique. Il était donc à craindre que les résultats avec les lipoplexes soient difficilement interprétables.

En ce qui concerne les tests contrôles avec les polyplexes témoins non ciblés, nos résultats montrent que ces formulations pour des rapports N/P inférieurs à 2,5 ne transfectent pas les cellules Jurkat. Ces résultats laissent envisager que les bénéfices liés à une transfection spécifique par la voie récepteur-médiée pouvaient être mis en évidence pour des rapports N/P inférieurs à 2,5. Ces résultats confirment aussi la difficulté à transfecter des cellules cultivées en suspension qui expriment peu de protéines anioniques à leur surface. En effet, ces cellules ne sont transfectées que par les formulations très cationiques de rapport N/P 10 qui, par ailleurs, ne conduisent qu'à une expression du transgène modérée (Figure 5 et 7 de la publication page 137 et 139).

Enfin, il est à souligner que l'AMD3100 libre n'est (i) ni capable d'induire une transfection spécifique en facilitant l'adsorption des polyplexes témoins sur les récepteurs CXCR4 des cellules Jurkat et leur internalisation, (ii) ni d'induire une transfection non spécifique en augmentant la charge cationique des polyplexes et donc leur fixation non-spécifique sur les protéines anioniques de la membrane. En effet, la présence d'AMD3100 libre n'affecte pas l'expression de la luciférase par les polyplexes non ciblés (figure 6A page 138).

En ce qui concerne les tests réalisés avec les polyplexes ciblés, aucune amélioration de l'expression du transgène par rapport à celle obtenue avec les polyplexes contrôles n'a été observée (figure 6 page 138). Ces résultats peuvent être liés à une inhibition de l'endocytose des récepteurs CXCR4 suite à leurs interactions avec les résidus AMD3100, comme cela a été montré dans le cas des cellules U87.^{1;6} Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons effectué des tests en présence de PMA qui est connu pour déclencher l'endocytose des polyplexes fixés de manière non-spécifique à la surface cellulaire, et celle des récepteurs CXCR4 même en présence d'AMD3100.^{5;6}

Si nous observons une nette amélioration de l'expression du transgène en présence de PMA avec l'ensemble des polyplexes, cette amélioration est statistiquement plus importante avec les polyplexes ciblés, y compris les complexes AMD3100/ADN (facteur 6 à 12) qu'avec les polyplexes témoins (facteur 2 à 4) (Figure 6A, courbe PMA(+)/AMD(-) page 138). La plus forte augmentation est observée pour le conjugué **iBu-[NH₂]80-[AMD]4**. Celle-ci, et de

façon surprenante, est encore plus importante (facteur 60) lorsque la transfection est réalisée en présence d'AMD3100. Que la transfection ne soit pas inhibée par la présence d'un excès d'AMD3100 libre, indique que l'AMD3100 participe activement dans les interactions entre les polyplexes et les récepteurs CXCR4. Ces résultats sont en faveur d'une adsorption spécifique des polyplexes conjugués à l'AMD3100 sur les récepteurs et d'une augmentation de l'internalisation récepteur-médiée des complexes ciblés déclenchée par le PMA.

Il est toutefois important de noter que le PMA favorise aussi et de manière très importante l'internalisation non-spécifique des polyplexes témoins très cationiques. En effet, l'expression de la luciférase en présence de PMA et pour les formulations iBu-[NH₂]₉₅ et PEI de rapport N/P 10 est multipliée, respectivement, par un facteur 30 et 1000 (figure 7 page 139).

En ce qui concerne la viabilité cellulaire, ces augmentations de transfection en présence de PMA sont accompagnées par une baisse de la viabilité cellulaire (figure 6B page 138), en accord avec une internalisation plus importante des complexes par les cellules.

V Conclusions

Nos résultats montrent que les polyplexes formulés avec les conjugués AMD3100 constituent, sous certaines conditions, des systèmes spécifiques de transfert de gènes dans des cellules CXCR4(+). Ceci est plus particulièrement le cas pour des formulations N/P \leq 2.5 pour lesquelles les mécanismes de transfection non-spécifiques sont minimisés, et en présence de PMA qui déclenche l'endocytose des récepteurs CXCR4. Ces polymères conjugués à l'AMD3100 sont des vecteurs synthétiques prometteurs pour un transfert spécifique de gènes *in vivo* dans des cellules exprimant CXCR-4, hypothèse qui mériterait d'être examinée. Bien que ces résultats soient encourageants, les efficacités de transfection et leur spécificité doivent être encore améliorées. Cette étude souligne aussi les difficultés à mettre en évidence et à obtenir une transfection spécifique et efficace avec des particules ciblées cationiques qui sont aussi capables d'interagir de manière non spécifique avec les cellules et en particulier les cellules adhérentes.

Références bibliographiques

1. De Clercq, E. The bicyclam AMD3100 story. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 581-587.
2. Sehgal, A.; Keener, C.; Boynton, A. L.; Warrick, J.; and Murphy, G. P. CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J Surg. Oncol.* **1998**, *69*, 99-104.
3. Verderone, G.; Van Craynest, N.; Boussif, O.; Santaella, C.; Bischoff, R.; Kolbe, H. V.; and Vierling, P. Lipopolymeric telomers for gene transfer: synthesis and evaluation of their in vitro transfection efficiency. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1367-1379.
4. Le Bon, B.; Van Craynest, N.; Boussif, O.; and Vierling, P. Polycationic Diblock and Random Polyethylene Glycol- or Tris(hydroxymethyl)methyl-Grafted (Co)telomers for Gene Transfer: Synthesis and Evaluation of Their in Vitro Transfection Efficiency. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 1292-1301.
5. Signoret, N.; Oldridge, J.; Pelchen-Matthews, A.; Klasse, P. J.; Tran, T.; Brass, L. F.; Rosenkilde, M. M.; Schwartz, T. W.; Holmes, W.; Dallas, W.; Luther, M. A.; Wells, T. N.; Hoxie, J. A.; and Marsh, M. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J. Cell Biol.* **1997**, *139*, 651-664.
6. Hatse, S.; Princen, K.; Bridger, G.; De Clercq, E.; and Schols, D. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett.* **2002**, *527*, 255-262.

AMD3100 conjugates as components of targeted non-viral gene delivery systems: synthesis and in vitro transfection efficiency of CXCR4-expressing cells

Bertrand Le Bon,¹ Nathalie Van Craynest,¹ Jean-Michel Daoudi,¹ Christophe Di Giorgio,¹ Abraham J. Domb,² and Pierre Vierling^{1*}

¹*Laboratoire de Chimie Bioorganique, UMR 6001 CNRS, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, 06108 Nice Cédex 2, France.*

²*Department of Medicinal Chemistry and Natural Products, School of Pharmacy, Faculty of Medicine, The Hebrew University, Jerusalem 91120, Israel.*

Running title: targeted non-viral gene delivery into CXCR4(+) cells

Abstract

We describe the synthesis of a series of AMD3100-lipid and AMD3100-polycationic conjugates which were used as components of targeted lipoplexes (in conjunction with (poly)cationic lipids) and polyplexes, respectively, for mediating specific gene transfer into cells expressing CXCR4 which displays a high affinity for AMD3100. Transfection studies were investigated with suspension CXCR4(+) human lymphoma Jurkat cells and with adherent CXCR4(-) human glioblastoma T98G and human lung carcinoma A549 cells lines in order to evidence a receptor-mediated endocytosis pathway and to minimize non-specific transfection pathways. Altogether, our results show that polyplexes formulated with AMD-labeled polymers constitute, under certain conditions, specific gene transfer systems into suspension CXCR4(+) Jurkat cells. This is more particularly the case when the non-specific transfection pathways are minimized (i.e. for $N/P \leq 2.5$ AMD-labeled polyplexes) and in

presence of phorbol myristate acetate which triggers CXCR4 receptor endocytosis of the AMD-labeled polyplexes to a larger extent than of their respective non-labeled ones. Although encouraging, the transfection specificities and efficiencies obtained with these compounds should however be improved. This study also illustrates the difficulties to evidence and to obtain a specific and efficient gene transfer system with cationized ligand-labeled DNA particles which provide also receptor-independent non-specific gene transfer to cells, and more particularly to adherent cells.

INTRODUCTION

The specific and efficient delivery of therapeutic genes into targeted cells such as cancer or virus-infected cells is one of the important goals in gene therapy. To increase DNA uptake by cells, viral and non-viral vehicles have been developed. In order to trigger receptor-mediated gene delivery and to increase cell and tissue DNA uptake specificity, various cell targeting ligands (for a recent review see (1)), including RGD peptides (2), folate (3, 4), transferrin (5), saccharides (6, 7) or antibodies (7), were conjugated to the DNA vectors. As part of our contribution into this field, we elaborated novel AMD3100-lipid and polycationic conjugates as targeting components of non-viral DNA vectors (lipoplexes or polyplexes) for specific gene transfer into CXCR4(+) cells. AMD3100 (Figure 1) is one of the rare non-peptidic and small synthetic molecules that binds with a high affinity and selectivity to CXCR4 thus blocking HIV entry into T-lymphocytes (8-12). The CXCR4 chemokine receptor is indeed the co-receptor used by HIV-1 X4 strains for infecting T-lymphocytes which are one of the predominant cell HIV reservoirs (13-15). CXCR4 plays an important role not only in HIV progression but also in chemotactic T-cell responses and in T-lymphocyte recruitment at sites of inflammation (16). CXCR4 has been recently described as one of the over-expressed

receptors on glioblastoma tumors (17-23). CXCR4 appears also to play a central role in breast carcinoma metastasis (24).

In an effort to address a specific gene delivery towards CXCR4-expressing tumors and T-lymphocytes, we report herein on (i) the synthesis of the AMD3100-lipid and AMD3100-polycationic conjugates (derivatives DC18-[NH]-[AMD], and PEI-[AMD]_p or iBu[NH₂]-80-[AMD]₄ in Figure 2, respectively), and (ii) our in vitro attempts to transfect Jurkat cells, a CXCR4(+) human cell line grown in suspension, *via* a receptor-mediated endocytosis pathway with AMD3100-labeled DNA complexes. However, cationized DNA particles can also provide receptor-independent gene transfer to cells owing to electrostatic interactions with anionic proteins which might be expressed on their cell surface (25, 26). Therefore, we also report on the ability of AMD3100-labeled lipoplexes and polyplexes to mediate, in vitro, a non-specific gene transfer into adherent CXCR4(-) A549 and T98G cells. Indeed, adherent cells are more easier to transfect non-specifically than cells grown in suspension. This is likely due to over-expression of anionic proteoglycans on the surface of adherent cells (25, 26) and to sedimentation of the DNA complexes onto the adherent cell monolayer recovering the well bottom. This study was aimed at optimizing the conditions under which a specific gene transfer into suspension CXCR4(+) Jurkat cells could more likely be evidenced by minimizing the non-specific transfection pathways. The AMD3100-labeled lipoplexes and polyplexes were formulated with the DC18-[NH]-[AMD] conjugate and well-documented (poly)cationic lipids (i.e. DOTAP (27), DOGS (28), or DC18-[NH₂]₂₀ (29)), and with the AMD3100-labeled polycationic polymers shown in Figure 2, respectively. With the aim at demonstrating a specific receptor-mediated transfection process, all these assays were performed in the absence or presence of an excess of “free” AMD3100 as CXCR4 antagonist. These additional control experiments were also intended to highlight the effects of AMD3100 (i) on the non-specific transfection of control CXCR4(-) cells with AMD3100-labeled DNA

complexes, and (ii) on the specific transfection of CXCR4(+) cells with control non-labeled DNA complexes. Indeed, AMD3100 is an octaamine that might coat onto the DNA complexes and/or adsorb onto the cells and, consequently, it can then take part in both these transfection processes. In the case of the CXCR4(+) Jurkat cells, transfection experiments were also performed in the absence or presence of phorbol myristate acetate (PMA) which was shown to enhance the transfection of these suspension cells (30) and to trigger CXCR4 receptor endocytosis (31), even in presence of AMD3100 (32).

MATERIALS AND METHODS

General Experimental and Analytical Conditions. All the reactions were performed in anhydrous solvents under dry and oxygen-free nitrogen. The purifications by column chromatography were carried out using silica gel 60 (Merck, 70-230 mesh) and chloroform (CHCl₃), dichloromethane (CH₂Cl₂), methanol (MeOH), or mixtures thereof as indicated. Purifications by exclusion gel chromatography were performed on Sephadex LH-20 or LH-60 (Fluka, Amersham) in methanol. Advancing of the reactions was followed by thin-layer chromatography (TLC) on silica plates (SDS 60F254, 60/15µm). The following developing systems were used: UV light (254 nm); Dragendorff reagents (Sigma), ninhydrin (Sigma), H₂SO₄ and KMnO₄.

DOGS (dioctadecylamidoglycylspermin tetrafluoroacetate) (28), DC18-[NH₂], DC18-[NH₂]₂₀ (29), iBu-[NH₂]₉₅ (33), AMD3100 and Boc-AMD-(CH₂)₄COOH (see structure in Figure 2) (34) were prepared according to literature. DOTAP (1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylammonio)-propane iodide), DOPE (dioleylphosphatidyl-ethanolamine), DCC (dicyclohexyl-carbodiimide), NHS (*N*-hydroxysuccinimide, Sigma), HOBt (hydroxybenzotriazole), EDC (*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide), NEt₃ (triethylamine), TFA (trifluoroacetic acid) were purchased from Sigma. BOP (benzotriazol-1-

xyloxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate) came from Calbiochem. These chemicals were used without further purifications.

^1H , ^{13}C and ^{19}F NMR spectra were recorded on a Bruker AC-200 at 200, 50.3 and 188.3 MHz, respectively. Chemical shifts (δ) were measured relative to CHCl_3 (δ 7.27 ppm) or CH_3OD (δ 3.35 ppm) for ^1H , to CDCl_3 (δ 76.9 ppm) for ^{13}C and expressed indirectly in relation to TMS, and to CCl_3F as internal reference for ^{19}F . The following abbreviations are used to describe the signal multiplicities: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), and m (multiplet). The signals are listed as follows: δ in ppm (multiplicity, integration, coupling, and attribution). Melting points were measured on a Electrothermal Digital Series 9100 and were not corrected. Mass spectra (MS) were recorded on a Finnigan MAT TSQ 7000 equipped with an atmospheric pressure ionisation (API) source. Electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS) was used. This method used in positive mode can give either a $(\text{M} + \text{H})^+$ or a $(\text{M} + \text{Na})^+$ signal.

Chemistry

General Boc-deprotection procedure

The *N*-Boc protected derivatives in 4 mL of anhydrous $\text{TFA}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1 v:v) were stirred for 1-5 h at 0°C then for a further 4 h period at room temperature until disappearance of the starting material (TLC and/or ^1H NMR monitoring). The reaction mixture was then evaporated under reduced pressure, followed by several co-evaporation with a CH_2Cl_2 :cyclohexane mixture (1:1 v:v), and the crude residue was purified by alumina column chromatography, size exclusion gel column chromatography, or directly lyophilised giving the desired derivatives as TFA salts.

Synthesis of DC18-[NH]-AMD

To a solution of 28 mg (0.03 mmol) of DC18-[NH₂], 36 mg (0.03 mmol) of Boc-AMD-(CH₂)₄COOH and 10 μL (0.07 mmol) of NEt₃ in 2 mL CH₂Cl₂ at 0°C, was added 16 mg (0.03 mmol) of BOP. The solution was stirred during 4h at room temperature. After completion of the reaction followed by TLC, the organic phase was washed successively with NaHCO₃ (5%), KHSO₄ (5%), water and dried over Na₂SO₄. The solution was then filtered and concentrated under vacuum. The residue was further purified by silica gel column (CH₂Cl₂:MeOH, from 100:0 to 9:1: v/v as eluent) and LH-20 gel permeation chromatography (CH₂Cl₂) to give 44 mg (0.02 mmol 74%) of DC18-[NH]-AMD(Boc) as a white solid [TLC (CH₂Cl₂:MeOH, 9:1 v:v, ninhydrine): R_f = 0.6 ; ¹H NMR (CDCl₃): 0.85 (t, 6H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, CH₃); 1.10-1.30 (m, 60H, (CH₂)₁₅); 1.30-2.00 (m, 61H, CH₃(Boc), CH₂CH₂N and CH₂CH₂CO); 2.00-2.70 (m, 20H, CH₂CO and CH₂N); 2.70-2.90 (m, 4H, CH₂S); 3.10-3.60 (m, 28H, CH₂NBoc and CH₂Ph); 6.70-7.10 (m, 2H, NHCO); 7.15 (s, 4H, Ph); ¹³C NMR CDCl₃): 14.2 (s, CH₃); 22.7 (s, CH₂CH₃); 27.1 and 28.1 (s, CH₂S); 28.4 and 28.5 (s, CH₃(Boc)); 26.9, 27.1, 27.8, 29.1, 29.4, 29.5 and 29.7 (s, (CH₂)₁₄); 31.9 (s, CH₂CH₂CH₃); 33.3 and 36.5 (s, CH₂CO); 39.8 and 40.0 (s, CH₂NH); 46.3 and 48.0 (s, CH₂NCO); 45.0-49.0 and 51.0-56.0 (m, CH₂N et CH₂NBoc); 59.4 (sl, CH₂Ph); 79.5 and 79.7 (s, C(Boc)); 128.9 (sl, CH₂Ph); 137.2 (sl, C(Ph)); 155.6 (s, CO(Boc)); 170.6 (s, CON); 172.3 and 174.1 (s, CONH); resonances for CH₂CH₂CH₂CO and CH₂CH₂CH₂N could not be detected]. The Boc-deprotection procedure, when applied to 44 mg (0.02 mmol) DC18-[NH]-AMD(Boc), afforded, after purification by alumina column chromatography (eluent CH₂Cl₂:MeOH from 100:0 to 50:50 v:v) and lyophilization, 21 mg (0.01 mmol, 39%) of DC18-[NH]-AMD as its octa-TFA salt (white solid).

¹H NMR (CDCl₃): 0.85 (t, 6 H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, CH₃); 1.10-1.40 (m, 60H, (CH₂)₁₅); 1.40-2.10 (m, 16H, CH₂CH₂CH₂N and CH₂CH₂CH₂CO); 2.10-3.10 (m, 44H, CH₂CO, CH₂N and CH₂S); 3.10-3.80 (m, 12H, CH₂NHCO, CH₂NCO and CH₂Ph); 4.20-4.90 (m, 8H, NH); 7.31

(s, 4H, Ph); 7.65-8.10 (m, 2H, NHCO). ^{13}C NMR (CDCl_3): 14.2 (s, CH_3); 22.7 (s, CH_2CH_3); 23.9, 24.7, 24.9, 25.8, 26.6 and 27.3 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 27.1 and 28.1 (s, CH_2S); 26.9, 27.4, 27.8, 29.1, 29.4, 29.5 and 29.7 (s, $(\text{CH}_2)_{14}$); 31.9 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 33.5 (s, CH_2CO); 36.5 (sl, CH_2CO); 39.4 and 39.8 (s, CH_2NHCO); 46.2 and 48.0 (s, CH_2NCO); 45.5, 46.5, 46.6, 47.6, 48.4, 49.1, 49.5, 49.7, 50.4, 51.5, 51.9 and 52.5 (s, CH_2N); 57.5 and 58.2 (s, CH_2Ph); 129.6 (sl, $\text{CH}(\text{Ph})$); 130.0 (s, $\text{CH}(\text{Ph})$); 136.4, 136.5, 136.7 and 138.3 (s, $\text{C}(\text{Ph})$); 170.7 (s, CON); 171.9 and 172.1 (s, CONH); 174.1 and 174.5 (s, CONH). The CF_3CO_2 resonances could not be located. The doubling of some signals is due to the restricted rotation of the amide bond. ^{19}F NMR (CD_3OD): -76.7 (CF_3CO_2^-). ESI-MS: $m/z = 655.5$ and $m/z = 1309.2$ in agreement with the mass calculated for $[\text{C}_{77}\text{H}_{149}\text{N}_{11}\text{O}_3\text{S} + 2\text{H}^+]/2$ and $[\text{C}_{77}\text{H}_{149}\text{N}_{11}\text{O}_3\text{S} + \text{H}^+]$, respectively.

Synthesis of iBu-[NH₂]₈₀-[AMD]₄

10 mg (9.0 μmol) of Boc-AMD-(CH_2)₄COOH, 4.0 mg (9.0 μmol) of BOP, 12.6 μL (90 μmol) of NEt_3 , and 10 mg (0.47 μmol) of iBu-[NH₂]₉₅ were dissolved in 4 mL of CH_3CN at 0°C. The solution was stirred overnight at room temperature. The solution was concentrated under vacuum. The resulting residue was washed with Et_2O and purified by gel permeation chromatography using a LH-20 column (MeOH) to give 6.0 mg (0.24 μmol) of compound iBu-[NH₂]_n-[AMD(Boc)]_p with $n = 80$ and $p = 4$, as a white amorphous solid [^1H NMR (CD_3OD): 0.74-0.90 (m, 12H, CH_3 , iBu); 1.00-2.80 [m, 539(= $3n+73p+7$)H, CH_2CH , CH_2S , CH_2CO , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CO}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}_s$]; 2.90-3.70 [m, 420(= $4n+24p+4$)H, CH_2NH]; 7.26 (sl, 16(= $4p$)H, Ph) in agreement with $n = 80$ and $p = 4$]. The Boc-deprotection procedure, when applied to 6.0 mg (0.24 μmol) of iBu-[NH₂]₈₀-[AMD(Boc)]₄, led after purification by LH-20 gel permeation chromatography (MeOH) and lyophilization to 5.9 mg (0.24 μmol) of iBu-[NH₂]₈₀-[AMD]₄ as a white solid.

^1H NMR (CD_3OD): 0.70-0.90 (m, 12H, CH_3 iBu); 1.10-2.80 [m, $359(= 3n+28p+7)\text{H}$, CH_2CH , CH_2S , CH_2CO , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CO}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$]; 2.85-3.70 [m, $420(= 4n+24p+4)\text{H}$, CH_2NH_2 , CH_2Ph]; 7.34 (m, $16(= 4p)\text{H}$, CH-Ph) in agreement with $n = 80$ and $p = 4$. ^{19}F NMR (CD_3OD): -76.7 (CF_3CO_2^-).

Synthesis of PEI-[AMD] p ($p = 17, 28$) conjugates

21 mg (1.9 μmol) of Boc-AMD- $(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$, 7.3 mg (38 μmol) of EDC and 7.7 mg (57 μmol) of HOBT were dissolved at 0°C in 4 mL CH_3CN . The solution was stirred overnight at room temperature, then cooled to 0°C before 16.4 mg (0.65 μmol) of PEI (25 kDa) (resp. 7.8 mg, 0.31 μmol) in 4 mL H_2O (resp. 2 mL) were added. After disappearance of the activated acid (TLC monitoring), the solution was concentrated under vacuum. The residue was then purified by several LH-20 and LH-60 gel permeation chromatographies (MeOH) to give 18.2 mg of PEI-[AMD(Boc)]17 (resp. 9.3 mg of PEI-[AMD(Boc)]28) as a resin [^1H NMR (CD_3OD): 1.00-2.00 [m, 57pH, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CON}$]; 2.00-3.70 [m, $(40p+2320)\text{H}$, $\text{CH}_2\text{-PEI}$, CH_2CO , CH_2N , CH_2Ph]; 7.24-7.29 (m, 4pH, CH-Ph), in agreement with $p = 17$ (resp. $p = 28$)]. The general BOC-deprotection procedure, when applied to 18.2 mg of PEI-[AMD(Boc)]17 (resp. 9.3 mg of PEI-[AMD(Boc)]28), gave 33 mg of PEI-[AMD]17 (resp. 13 mg of PEI-[AMD]28) as a white powder. ^1H NMR (D_2O): 0.70-2.70 [m, 12pH, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CON}$]; 2.75-4.20 (m, $(40p+2320)\text{H}$, $\text{CH}_2\text{-PEI}$, CH_2N , CH_2CO , CH_2Ph]; 7.30-7.40 (m, 4pH, CH-Ph) in agreement with $p = 17$ (resp. $p = 28$). ^{19}F NMR (CD_3OD): -76.7 (CF_3CO_2^-).

Preparation of the DNA complexes

The lipoplexes and polyplexes were formulated with the luciferase encoding plasmid pTG11033 (pCMV-intronHMG-luciferase-SV40pA; 9572 bp) and pTG11236 (pCMV-SV40pA, 5739 bp), respectively. These plasmids were produced by Transgène SA

(Strasbourg, France). The endotoxin content of the plasmid preparation was checked using a Limulus Amebocyte Lysat kit (Biogenic, Maurin, France). This value was below 1 endotoxin unit/mg of plasmid, hence below the 5 e.u./mg of DNA recommended for in vivo protocols.

The lipoplexes were formulated from (poly)cationic lipids, CL (CL = DOGS, DOTAP or DC18-[NH₂]₂₀), with and/or without DOPE or DC18-[NH]-AMD. These lipids were dissolved in an appropriate solvent (CHCl₃ and/or MeOH or EtOH) at a concentration of 10 mg/mL. Adequate volumes of each of the desired lipid solution were mixed in order to obtain DOGS:DOPE:DC18-[NH]-AMD and DOTAP:DOPE:DC18-[NH]-AMD 1:1:x (x = 0 and 0.1) mol, and DC18-[NH₂]₂₀:DC18-[NH]-AMD 1:x (x= 0, 0.1 and 0.2) mol solutions. Each solution was concentrated under vacuum and dispersed in a glucose solution (5%) in order to obtain a final concentration of 1 mg/mL with respect to CL. The preparations were stirred during 14 h and finally homogenised in an ultrasound bath (Branson B-30) for 5 min in order to obtain liposomal dispersions. The volumes of liposomal dispersion used to form lipoplexes were calculated according to the desired DNA concentration of 0.1 mg/ml, the N/P ratio, the molar weight and the number of potential positive charges in the selected CL (N represents the number of cationic amine equivalents brought by CL only; P represents the number of phosphate equivalents in DNA). The DNA complexes were formulated by adding a desired volume of liposomal preparation at a CL concentration of 1 mg/ml (in 5% glucose) to the desired volume of DNA solution to reach the desired DNA concentration of 0.1 mg/ml, as described in references (35, 36). This preparation was vortexed for 10 s and was used within 24 hours for the particle size measurements and the in vitro transfection experiments.

A similar procedure was used for the iBu-[NH₂]₉₅, iBu-[NH₂]₈₀-[AMD]₄, PEI, or PEI-[AMD]_p (p = 17 or 28) polyplexes (final DNA concentration of 0.1 mg/ml), except that they were formulated from solutions of the respective polymer in 5% glucose at a concentration of 10 mg/ml, as described in reference (36, 37).

Measurement of the sizes of the DNA complexes

The average sizes were measured by photon correlation spectroscopy using a Coulter N4Plus particle size analyzer. The analyses were performed at 25°C, after equilibrating the sample at 25°C for 20 min. The sample was diluted with 5% glucose in the measurement tube and homogenized. These analyses were carried out on complexes having a 10 µg/ml concentration of DNA. Formulations and analyses were reproduced twice.

Agarose gel electrophoresis

Each sample (0.5 µg of plasmid) was analysed by electrophoresis for about 30 min under 75 V/cm, through a 0.8 % agarose gel in TAE 1 x (Tris-acetate-EDTA) buffer. The DNA was visualised in 400 ml TAE buffer containing 40 µl ethidium bromide (10 mg/ml, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). The plasmid integrity in each sample (0.25 µg) was confirmed by electrophoresis after decomplexing the lipoplexes or polyplexes (10 µl of a plasmid 0.05 mg/ml) with sodium dodecyl sulfate, SDS (10 µl, 80 g/l).

In vitro transfection

Twenty-four hours before transfection, adherent A549 (epithelial cells derived from human pulmonary carcinoma), or T98G cells (neural cells derived from human glioblastoma, gift from Laboratoire de Neurobiologie Fondamentale et Clinique, Université de Nice-Sophia Antipolis, France) were grown in Dulbecco's-Modified Eagle culture Medium (DMEM) (Invitrogen, Life Technologies, Cergy Pontoise, France) with 10% foetal calf serum, FCS (Sigma) in 96-well plates (2×10^4 cells per well), in a wet (37°C) and 5% CO₂/95% air atmosphere. The medium was also containing 1% glutamine (200 mM, Sigma), 0.4% gentamicine (10 µg/ml, Sigma) for A549 cells, and 1% glutamine (200 mM, Sigma), 100 u/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma) for T98G cells. 10 µl and 5 µl of the above described lipoplex dispersion were diluted to 100 µl in DMEM supplemented with 10% FCS in order to obtain 1 and 0.5 µg of DNA per well, respectively. The resulting solutions

were then added to the cells after the culture medium has been removed. After 4 h and 24 h, 50 μ l and 100 μ l of DMEM supplemented with 30 and 10% FCS were added, respectively. Forty-eight hours after transfection, the culture medium was discarded and the cells were washed with 100 μ l of PBS and then lysed with 50 μ l of lysis buffer (Promega, Charbonnières, France). The lysates were frozen at -32°C awaiting analysis of luciferase activity.

A similar procedure was applied for the transfection of Jurkat cells (T lymphocytes from human leukemia, gift from Dr N. Taylor, UMR-CNRS 5535, IGMM, Montpellier, France). Twenty-four hours before transfection, Jurkat cells were grown in suspension in RPMI-1640 Glutamax IITM (Invitrogen, Life Technologies, Cergy Pontoise, France) containing 100 u/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin with 10% FCS in 96-well plates (1 x 10⁵ cells per well). The 96-well plates were centrifuged (5 min., 500 rcf), the medium removed and replaced by 100 μ l of RPMI-1640 supplemented with 10% FCS containing the desired amount of complexed DNA. After 4 h and 24 h, 50 μ l and 100 μ l of RPMI-1640 supplemented with 30 and 10% FCS, respectively, were added. Forty-eight hours after transfection, the plates were centrifuged (5 min, 500 rcf) and the culture medium was removed, the cells were then lysed with 50 μ l of lysis buffer (Promega, Charbonnières, France). The lysates were frozen at -32°C awaiting analysis of luciferase activity.

For the transfection experiments of the A549 or T98G cells (resp. Jurkat cells) performed in presence of AMD3100, 30 min before addition of the DNA complexes, the medium was removed (resp. after centrifugation of the 96 well plates for 5 min. at 500 rcf) and replaced by 50 μ L of AMD3100 solution (0.6 mg/mL; resp. 2 mg/mL) in DMEM (resp. RPMI-1640) containing 10% FCS. 50 μ L of a solution containing the DNA complexes at a DNA concentration of 20 or 10 μ g/mL were then added to the medium to reach a final volume of 100 μ L and a DNA concentration of 1 or 0.5 μ g per well. These solutions were

obtained by diluting to 100 μ L, 20 or 10 μ L of the above described stock DNA complexes at DNA concentration of 0.1 mg/mL with DMEM (resp. RPMI-1640) containing 10% FCS.

For the transfection experiments of the Jurkat cells performed in presence of PMA (Phorbol-Myristate-Acetate, Sigma), three hours after addition of the above described DNA complexes to the cells, 1 μ l of PMA solution (10 μ g/mL in DMSO) was added to the medium in order to reach a final concentration of 100 ng/mL per well.

Determination of luciferase expression The measurement was done for 10 s on 10 μ l of the lysis mixture in a Berthold LB96P luminometer in dynamic mode, using the "Luciferase" determination system (Promega) in 96-well plates. The total protein concentration per well was determined using conventional techniques (BCA test, Pierce, Montluçon, France). For cells grown in the absence of DNA complexes, a well contains 30-50 μ g of proteins for the T98G and A549 cells, and 90-110 μ g of proteins for the Jurkat cells. Each DNA formulation was prepared twice and each preparation was tested at least in triplicate.

Statistical analyses.

Statistical tests were performed with STATGRAPHICS Plus5.0® software. Analysis of variance (Anova) was run on the logarithmic transformation of luciferase expression levels ($\text{Log}_{10}(\text{fg luciferase}/\text{mg protein})$) or on cell viability percentages to fit normal distributions of the data. Up to five factors, i.e. component(s) of the lipoplex or polyplex formulation, DNA amount per well (0.5 and 1 μ g per well), N/P ratio, presence or not of AMD3100, and presence or not of PMA, were analyzed as source of the variation of logarithmic transformation of the transfection levels, using a multiple comparison procedure. The Tukey's honestly significant difference (HSD) method was used to discriminate among the means of the logarithmic transformation of luciferase expression levels.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis.

Conjugation of AMD3100 to the aminolipid DC18-[NH₂] (29), telomer iBu-[NH₂]95 (33), or branched 25 kDa PEI was performed from the *N*-pentanoic *N*-Boc-protected AMD3100 derivative, Boc-AMD-(CH₂)₄COOH (34), using a conventional two step procedure (Figure 2). This procedure consisted into (i) the coupling of Boc-AMD-(CH₂)₄COOH with the amino derivative via BOP/NEt₃, EDC/NHS or HOBt activation, followed by (ii) the Boc deprotection of the AMD moiety with an excess of TFA:CH₂Cl₂ (1:1).

For the reactions involving the iBu-[NH₂]95 and PEI polyamines which contain a mean of 95 and 145 primary amino functions, respectively, the conjugation was performed with one equivalent of Boc-AMD-(CH₂)₄COOH for 10 amino equivalents of iBu-[NH₂]95 or PEI and for 30 amino equivalents of PEI. The resulting Boc-AMD conjugates were purified by exclusion gel chromatography (LH-20 or LH-60). The average numbers of grafted Boc-AMD residues and of unsubstituted NH₂ groups in (i) iBu-[NH₂]80-[AMD(Boc)]₄, and (ii) PEI-[AMD]_p (p = 17 and 28) were determined by ¹H NMR by comparing the integration of the aromatic and Boc protons with the integration (i) of the methyl (isobutyl) and all the other remaining protons, and (ii) of the methylene protons of PEI, respectively. The quantitative Boc-deprotection was confirmed by ¹H NMR (absence of the resonances corresponding to the Boc protons).

Formation and characterization of targeted DNA complexes.

The non-targeted (control) and targeted lipoplexes were formulated from the cationic DOGS:DOPE (1:1 mol), DOTAP:DOPE (1:1 mol) or DC18-[NH₂]20 formulations without and with 10 or 20 mol % of the DC18-[NH]-AMD conjugate, respectively. The control and targeted polyplexes were prepared from iBu-[NH₂]95 or PEI and from the telomer iBu-[NH₂]80-[AMD]₄ or PEI-[AMD]_p (p = 17, 28) conjugates, respectively. In addition, DNA

complexes were also formulated with AMD3100 alone. All these targeted and control DNA complexes were further prepared using various N/P ratios (10, 5, 2.5, 1.25 and 0.8) where N is the number of amine equivalents of the DNA-condensing (poly)cationic lipid or polymer, and P the number of DNA phosphate equivalents. These studies were performed with luciferase encoding plasmids, also used for the in vitro transfection screening assays (see below). The procedure applied for the formulation of the DNA complexes relied on the dilution from CL:DOPE:DC18-[NH]-AMD (1:x:y mol with $x = 0$ or 1 and $y = 0, 0.1$ or 0.2) liposomal dispersions, or from iBu-[NH₂]₈₀-[AMD]₄, PEI-[AMD]_p ($p = 17, 28$), iBu-[NH₂]₉₅ or PEI solutions in 5% glucose. Their mean average sizes were measured by light scattering spectroscopy and are collected in Table 1. All the formulations were also analyzed by gel electrophoresis (data not shown) which indicated the presence of fully complexed (not accessible to ethidium bromide) plasmids for $N/P \geq 2.5$ whereas accessible DNA was observed for $N/P 1.25$ and 0.8 . It is noticeable that all the targeted and control lipid formulations and polymers as well as the octamine AMD3100 alone were able to condense DNA into often small-sized particles (Table 1). Furthermore, gel electrophoresis assays performed in the presence of excess SDS showed that, with respect to dissociation, the DNA/AMD3100 complexes displayed a stability that is comparable and higher to that of the polyplexes and lipoplexes, respectively: indeed for $N/P \geq 2.5$, the plasmid remained still partially complexed to AMD3100 or to any of the targeted and control polymers, while fully-decomplexed plasmid was detected for any of the lipoplexes investigated here.

It is worth noting that formulation of labeled lipoplexes with 10 or 20% mol of DC18-[NH]-AMD conjugate had no effect on their mean particle sizes (Table 1). Indeed, for a given cationic lipid and N/P ratio, polydispersed preparations of particles in the 90-250 nm range or precipitates for a N/P ratio of 1.25 were measured, whether DC18-[NH]-AMD was added or

not. Similar results were obtained with the non-targeted and targeted polyplexes which display a mean size in the 115-300 and 90-250 nm range, respectively (Table 1).

It should be further emphasized that several N/P 2.5, 1.25 and even 0.8 formulations do not precipitate while most often precipitates were formed with (poly)cationic lipids for N/P 2.5 or 1.25 (35, 38, 39). These results are indeed worth being noted if in vivo uses of such formulations are contemplated.

In vitro transfection

Our main objective was to demonstrate that targeted lipoplexes or polyplexes formulated with AMD3100 conjugates (used as targeting component in the lipoplexes or as condensing and targeting components in the polyplexes), were able to specifically deliver genes to cells expressing CXCR4 chemokine receptors. However, cationic DNA complexes provide also receptor-independent gene transfer to cells (and more particularly to adherent cells) which involves electrostatic interactions between the cationized-DNA particles and the anionic cell proteoglycans expressed on the cell surface (25, 26). It was therefore necessary to determine the conditions under which a non-specific gene transfer process into CXCR4(-) or CXCR4(+) cells can occur with the AMD-labeled lipoplexes and polyplexes.

Aiming at these goals, the potential of the various above-described CL:DOPE:DC18-[NH]-AMD (1:x:y mol with $x = 0$ or 1 and $y = 0.1$ or 0.2) lipoplexes and iBu-[NH₂]₈₀-[AMD]₄, PEI-[AMD]_p polyplexes for mediating a non-specific and a specific transfection was screened in vitro on control adherent CXCR4(-) human lung carcinoma A549 and human glioblastoma T98G cells, and on suspension CXCR4(+) lymphoma Jurkat cells, respectively. The (non)-expression of CXCR4 on these three cell lines was attested by FACS analysis. To further minimize the non-specific transfection pathway, we selected the CXCR4(+) Jurkat cells which are grown in suspension and are therefore more difficult to transfect non specifically because they express much less anionic proteoglycans on their cell surface.

Control experiments were also realized with non-targeted CL:DOPE (1:x mol with $x = 0$ or 1) lipoplexes, iBu-[NH₂]₉₅ and PEI polyplexes, AMD3100/DNA complexes, and naked DNA. The transfection efficiency of these DNA complexes (expressed in femtograms (fg) of luciferase/mg of protein) was evaluated (i) in the absence or presence of AMD3100 (1 mg/well) for the reasons stated in the introduction section, (ii) for a N/P ratio of 0.8, 1.25, 2.5, 5 and/or 10, (iii) for a DNA dose of 0.5 and 1 µg/well, and (iii) in the presence of 10% serum. The cell viability of the DNA complexes was also checked by determining the total protein amount per well of the transfected cells relatively to that measured for untreated cells.

Transfection of CXCR4(-) A549 and T98G cells. The results concerning the transfection and cell viability of the control CXCR4(-) A549 and T98G cells with the lipoplexes, and their statistical analyses are illustrated in Figure 3 and 4, respectively. As comparable levels of luciferase were obtained in most cases with a DNA dose of 0.5 and 1 µg/well (analysis not shown), only the data for a DNA dose of 1 µg/well are presented in Figure 3. However, the data obtained for both DNA doses were taken for the statistical analyses.

Both cell lines gave very similar results. Indeed, the highest levels of luciferase were obtained with the DOTAP:DOPE lipoplexes and the N/P 10 PEI polyplexes (Figure 4A and 4B). More importantly, the statistical analysis of the transfection data indicated that labeled lipoplexes, whether formulated with DOGS:DOPE, DOTAP:DOPE or DC18-[NH₂]₂₀, and 10 or 20 mol % of DC18-[NH]-AMD, do allow DNA transfection with an efficiency comparable with that of their respective non-labeled formulation (see abscissas b, d and g(h) as compared to abscissas a, c, and f, respectively in Figure 4A and 4B, and curves g, h as compared to curve f, in Figure 4C and 4D). Furthermore, transfection of the labeled lipoplexes increased with increasing their N/P ratio, as illustrated in Figure 4C and 4D. It should be noted that lipoplexes formulated with DC18-[NH]-AMD alone, but for a N/P ratio of 10 only, were able to transfect significantly T98G cells (curve e in Figure 4C). All these observations together

led us to foresee a non-specific endocytosis mechanism proceeding by electrostatic interactions between the cationic (un)labeled lipoplexes and the proteoglycans expressed at the cell membrane of these adherent cells. It is also noticeable that no significant in(de)crease of cell viability could be detected when DC18-[NH]-AMD conjugate was used as lipoplex component (see abscissas b, d and g(h) as compared to abscissas a, c, and f, respectively in Figure 4G and 4H).

It should further be emphasized that the various DNA complexes obtained from AMD3100 alone, whatever their N/P ratio, were unable to transfect the A549 or T98G cells. For these formulations, the level of luciferase expression was indeed close to those measured for naked DNA (Figure 3).

To highlight the effects of AMD3100 on non-specific-mediated transfection with the labeled and non-labeled lipoplexes (Figure 4E and 4F), control experiments were performed in presence of 30 μg of AMD3100 per well. This dose corresponds to a 30-fold (resp. 2000-fold) molar excess over DC18-[NH]-AMD conjugate for the formulations that contain the highest (resp. lowest) number of AMD equivalents tested, i.e. N/P 10 lipoplexes containing 20 mol % of DC18-[NH]-AMD and for a DNA dose of 1 μg per well (resp. N/P 0.8 formulations containing 10% mol of DC18-[NH]-AMD and for a DNA dose of 0.5 μg per well). The statistical analysis of our results showed likely that AMD3100 does not interfere with the non-specific transfection process of these cells with any type of lipoplexes, excepting for the transfection of the A549 cells with DOTAP:DOPE:DC18-[NH]-AMD lipoplexes (abscissa d in Figure 4F). In this latter case, the presence of AMD3100 enhanced luciferase expression, and more particularly that with the “negatively charged” N/P 0.8 ones (analysis not shown). These results are likely attributable to the electrostatic coating of these “negatively charged” lipoplexes by polycationic AMD3100, and/or to the strong DNA complexing properties of AMD3100 which is accessible in these lipoplexes, as mentioned in the precedent section. The

DNA complexing properties of AMD3100 have in turn more incidence on lipoplexes that are formulated with monocationic lipids (i.e. DOTAP) than with polycationic lipids (i.e. DOGS).

Transfection of CXCR4(+) Jurkat cells. The transfection and cell viability results obtained with the CXCR4(+) Jurkat cells, and their statistical analyses are illustrated in Figure 5 and 6, respectively. These experiments were run not only without and with AMD3100 (100 μ g per well, which corresponds to 500 to 1000 equivalents for one AMD-ligand equivalent in the labeled DNA complexes) but also without and with PMA (100 ng per well) which is known to induce phorbol ester-receptor endocytosis of lipoplexes and polyplexes and to increase transgene expression in Jurkat cells (30). In order to minimize non-specific mediated transfection pathways, mostly formulations of N/P ratio ≤ 2.5 were investigated. Transfection experiments were further performed only with polyplexes. Indeed, agarose gel electrophoresis with and without SDS highlighted the much lower stability of the AMD-labeled lipoplexes as compared with that of the AMD3100/DNA, PEI/DNA or iBu-[NH₂]₉₅/DNA complexes. The strong interactions between polycationic AMD3100 and DNA were therefore expected to modify the integrity of the lipoplexes more drastically than that of the polyplexes. Furthermore, as AMD3100 was found to increase the non-specific transfection pathway for some lipoplex formulations, it was therefore expected that the assays run with the labeled lipoplexes and in presence of AMD3100, could not be interpreted unambiguously. As comparable luciferase levels were obtained for a DNA dose of 0.5 and 1 μ g per well, only the data corresponding to a DNA dose of 1 μ g per well are shown in Figure 5. However, the statistical analyses were performed with the data obtained for both DNA doses.

The control non-labeled N/P ≤ 2.5 PEI and iBu-[NH₂]₉₅ polyplexes displayed a transfection efficiency that is comparable to naked DNA (Figure 5), indicating that an enhancement of transfection of the CXCR4(+) Jurkat cells through a CXCR4-receptor mediated endocytosis process could likely be detected for N/P ≤ 2.5 polyplexes. These results

confirmed also the difficulty of transfecting cells in suspension through a non-specific pathway (30, 40). Indeed, the Jurkat cells could be transfected only with the N/P 10 PEI formulation, although moderate levels of luciferase expression (10^4 fg per mg of protein) were obtained (Figure 5 and 7).

When the transfection of the Jurkat cells with the non-labeled N/P ≤ 2.5 PEI or iBu-[NH₂]₉₅ polyplexes was performed in presence of AMD3100, neither a decrease nor an increase of luciferase expression was detected (Figure 6). This was also the case for the N/P 10 polyplexes (Figure 7). These data indicate that polycationic AMD3100 is not able to trigger transfection of the CXCR4(+) Jurkat cells with the non-labeled PEI or iBu-[NH₂]₉₅ polyplexes neither (i) non-specifically by increasing the cationic charge of the polyplexes and consequently their non-specific binding through electrostatic interactions to anionic proteins expressed on the cell membrane surface, nor (ii) specifically by increasing their binding to CXCR4 leading to a receptor mediated endocytosis pathway.

Where transfection of the Jurkat cells with the N/P ≤ 2.5 AMD-labeled polyplexes is concerned, no improvement of luciferase expression was obtained with any of the labeled polyplexes investigated as compared with that of their respective controls (abscissas c, and e(f) versus abscissas b and d, respectively in Figure 6). That no substantial increase of transfection through specific AMD-CXCR4 interactions was detected with any of these targeted formulations, could likely be attributed to the AMD inhibition of CXCR4-mediated endocytosis pathway. Indeed, recent research has demonstrated that the binding of AMD3100 to CXCR-4 receptor in human astroglioma U87 cells inhibited endocytosis process of this receptor (32). In order to evaluate this hypothesis, we performed a series of transfection experiments in the presence of phorbol myristate acetate (PMA) which is known to trigger lipoplex and polyplex endocytosis of the Jurkat cells grown in suspension (30) and also to mediate CXCR4 receptor endocytosis (31), even in presence of AMD3100 (32).

Concerning the PMA-triggered transfection assays with the non-labeled N/P \leq 2.5 PEI or iBu-[NH₂]₉₅ polyplexes, one observed a statistically significant 2- and 4-fold increase of luciferase expression, respectively (Figure 6A, curve PMA(+)/AMD(-)). Very interestingly, a significantly larger increase (6- to 12-fold) was obtained with the AMD-targeted polyplexes and even with AMD3100/DNA complexes (9-fold). Surprisingly, when these experiments were further run in presence of AMD3100 (curve PMA(+)/AMD(+) in Figure 6A), a statistically significant additional 5-fold increase of luciferase expression was measured for the iBu-[NH₂]₈₀-[AMD]₄ polyplexes. This represents an overall 60-fold increase with respect to the luciferase level obtained without AMD3100 and PMA. That transfection with the AMD-labeled polyplexes in presence of PMA is not inhibited by AMD3100 indicates rather that AMD3100 may serve as a template between the polyplexes and CXCR4. The larger transfection improvements obtained with the AMD-labeled polyplexes as compared with their respective non-labeled polyplexes are likely attributable to a specific adsorption of the labeled AMD-polyplexes onto the CXCR4 (+) cells, as a result of AMD-CXCR4 interactions, and, consequently, to a higher receptor-mediated cellular uptake of the DNA complexes triggered by PMA. It should however be emphasized that PMA increases to a much larger extent the non-specific transfection of the Jurkat cells with the highly cationic N/P 10 PEI or iBu-[NH₂]₉₅ polyplexes (Figure 7A). Indeed, a nearly 1000- or 30-fold increase of luciferase expression, respectively, was obtained when the assays were run in the presence of PMA.

It is however worth noting that the transfection enhancements in presence of PMA were accompanied by a significant cell viability decrease (Figure 6B and 7B). Furthermore, the higher the transfection enhancement is, the lower is the cell viability. These observations are in agreement with a higher cellular uptake of the DNA complexes.

Altogether, our results show that polyplexes formulated with AMD-labeled polymers constitute, under certain conditions, specific gene transfer systems into suspension CXCR4(+)

Jurkat cells. This is more particularly the case when the non-specific transfection pathways are minimized (i.e. for $N/P \leq 2.5$ AMD-labeled polyplexes) and in presence of phorbol myristate acetate (PMA) which triggers CXCR4 receptor endocytosis of the AMD-labeled polyplexes to a larger extent than of their respective non-labeled ones. These targeted AMD-polymers appear thus as promising synthetic vectors for specific in vivo gene delivery to CXCR4-expressing tumors. Although encouraging, the transfection efficiencies and specificities obtained with these compounds should however be improved. This study illustrates also the difficulties to evidence and to obtain a specific and efficient gene transfer system with cationized ligand-labeled DNA particles which provide also receptor-independent non-specific gene transfer to cells, and more particularly to adherent cells.

Acknowledgement

B. Le Bon is grateful to the Région Provence-Alpes-Côte d'Azur and Transgène SA (Strasbourg, France) for a grant. We wish to thank Transgène, Drs S. Braun, O. Meyer, and B. Cavallini (from Transgène) for their interest into this project and for supplying with plasmids. Many thanks to Dr. N. Taylor (UMR-CNRS 5535, IGMM, Montpellier, France) for performing the FACS analyses on the A549, T98G and Jurkat cells. We are also grateful to the AFIRST, French-Israeli Cooperation on Gene Therapy, for financial support.

References

- (1) Merdan, T., Kopecek, J., and Kissel, T. (2002) Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 715-718.
- (2) Kunath, K., Merdan, T., Hegener, O., Haberlein, H., and Kissel, T. (2003) Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J. Gene Med.* 5, 588-599
- (3) Zuber, G., Zammuto-Italiano, L., Dauty, E., and Behr, J. P. (2003) Targeted Gene Delivery to Cancer Cells: Directed Assembly of Nanometric DNA Particles Coated with Folic Acid. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 42, 2666-2669 and references therein.
- (4) Hofland, H. E., Masson, C., Iginla, S., Osetinsky, I., Reddy, J. A., Leamon, C. P., Scherman, D., Bessodes, M., and Wils, P. (2002) Folate-targeted gene transfer in vivo. *Mol. Ther.* 5, 739-744 and references therein.
- (5) Ogris, M. and Wagner, E. Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. (2002) *Drug Discov. Today* 7, 479-485 and references therein.
- (6) Fabio, K., Gaucheron, J., Di Giorgio, C., and Vierling, P. (2003) Novel galactosylated polyamine bolaamphiphiles for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 14, 358-367, and references therein.
- (7) Erbacher, P., Bettinger, T., Belguise-Valladier, P., Zou, S., Coll, J. L., Behr, J. P., and Remy, J. S. (1999) Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J. Gene Med.* 1, 210-222.
- (8) De Clercq, E., Yamamoto, N., Pauwels, R., Balzarini, J., Witvrouw, M., De Vreese, K., Debysse, Z., Rosenwirth, B., Peichl, P., Datema, R. (1994) Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 668-674.

- (9) Donzella, G.A., Schols, D., Lin, S.W., Este, J.A., Nagashima, K.A., Maddon, P.J., Allaway, G.P., Sakmar, T.P., Henson, G., De Clercq, E., and Moore, J.P. (1998) AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat. Med.* 4, 72-77.
- (10) Este, J.A., Cabrera, C., De Clercq, E., Struyf, S., Van Damme, J., Bridger, G., Skerlj, R.T., Abrams, M.J., Henson, G., Gutierrez, A., Clotet, B., and Schols, D. (1999) Activity of different bicyclam derivatives against human immunodeficiency virus depends on their interaction with the CXCR4 chemokine receptor. *Mol. Pharmacol.* 55, 67-73.
- (11) Labrosse, B., Treboute, C., BreLOT, A., and Alizon, M. (2001) Cooperation of the V1/V2 and V3 domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120 for interaction with the CXCR4 receptor. *J. Virol.* 75, 5457-5464.
- (12) Schols, D., Este, J.A., Henson, G., and De Clercq, E. (1997) Bicyclams, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fusin/CXCR-4. *Antiviral Res.* 35, 147-156.
- (13) Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T.A. (1996) The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-833.
- (14) Hendrix, C.W., Flexner, C., MacFarland, R.T., Giandomenico, C., Fuchs, E.J., Redpath, E., Bridger, G., and Henson, G.W. (2000) Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1667-1673.
- (15) Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., Loetscher, M., Baggiolini, M., and Moser, B. (1996) The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382, 833-835.

- (16) Murdoch, C. (2000) CXCR4 : chemokine receptor extraordinaire. *Immunol. Rev.* 177, 175-184.
- (17) Sehgal, A., Keener, C., Boynton, A.L., Warrick, J., and Murphy, G.P. (1998) CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J. Surg. Oncol.* 69, 99-104.
- (18) Sehgal, A., Ricks, S., Boynton, A.L., Warrick, J., and Murphy, G.P. (1998) Molecular characterization of CXCR-4 : a potential brain tumor-associated gene. *J. Surg. Oncol.* 69, 239-248.
- (19) Oh, J.W., Drabik, K., Kutsch, O., Choi, C., Tousson, A., and Benveniste, E.N. (2001) CXC chemokine receptor 4 expression and function in human astrogloma cells. *J. Immunol.* 166, 2695-2704.
- (20) Zhou, Y., Larsen, P.H., Hao, C., and Yong, V.W. (2002) CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J. Biol. Chem.* 277, 49481-49487.
- (21) Rempel, S.A., Dudas, S., Ge, S., and Gutierrez, J.A. (2000) Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 6, 102-111.
- (22) Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., Florio, T., and Schettini, G. (2001) Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front. Neuroendocrinol.* 22, 147-184.
- (23) Bonavia, R., Bajetto, A., Barbero, S., Pirani, P., Florio, T., and Schettini, G. (2003) Chemokines and receptors in the CNS : expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation. *Toxicology Letters* 139, 181-189.
- (24) Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., Barrera, J.L., Mohar, A., Verastegui, E., and Zlotnik, A. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.

- (25) Wiethoff, C.M., Smith, J.G., Koe, G.S. and Middaugh, C.R. (2001) The potential role of proteoglycans in cationic lipid DNA complexes with model glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 276, 32806-32813.
- (26) Belting, M. (2003) Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 145-151.
- (27) Leventis, R. and Silvius, J. R. (1990) Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta* 1023, 124-132.
- (28) Behr, J.P., Demeinex, B., Loeffler, J.P., and Perez-Mutul, J. (1989) Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86, 6982-6986.
- (29) Verderone, G., Van Craynest, N., Boussif, O., Santaella, C., Bischoff, R., Kolbe, H.V., and Vierling, P. (2000) Lipopolycationic telomers for gene transfer : synthesis and evaluation of their in vitro transfection efficiency. *J. Med. Chem.* 43, 1367-1379.
- (30) Schifferli, K.P., and Ciccarone, V. (1996) Optimization of Cationic Lipid Reagent-Mediated Transfection for Suspension Cell Lines. *Focus* 18, 45-47.
- (31) Signoret, N. Oldridge, J., Pelchen-Matthews, A., Klasse, P.J., Tran, T., Brass, L.F., Rosenkilde, M.M., Schwartz, T.W., Holmes, W., Dallas, W., Luther, M.A., Wells, T.N., Hoxie, J.A., and Marsh, M. (1997) Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J. Cell Biol.* 139, 651-664.
- (32) Hatse, S., Princen, K., Bridger, G., De Clercq, E., and Schols, D. (2002) Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett.* 527, 255-262.
- (33) Le Bon, B., Van Craynest, N., Boussif, O., and Vierling, P. (2002) Polycationic Diblock and Random Polyethylene Glycol- or Tris(hydroxymethyl)methyl-Grafted (Co)telomers for

Gene Transfer : Synthesis and Evaluation of Their in Vitro Transfection Efficiency. *Bioconjug. Chem.* 13, 1292-1301.

(34) Dessolin, J., Galea, P., Vlieghe, P., Chermann, J.C., and Kraus, J.L. (1999) New bicyclam-AZT conjugates : design, synthesis, anti-HIV evaluation, and their interaction with CXCR-4 coreceptor. *J. Med. Chem.* 42, 229-241.

(35) Gaucheron, J., Santaella, C., and Vierling, P. (2001) Highly fluorinated lipospermines for gene transfer : synthesis and evaluation of their in vitro transfection efficiency. *Bioconjug. Chem.* 12, 114-128.

(36) Van Craynest, N., Santaella, C., Boussif, O., and Vierling, P. (2002) Polycationic telomers and cotelomers for gene transfer : synthesis and evaluation of their an vitro transfection efficiency. *Bioconjug. Chem.* 13, 59-75.

(37) Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeinex, B. and Behr, J. (1995) A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in vivo : Polyethyleneimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 7297-7301.

(38) Byk, G., Dubertret, C., Escriou, V., Frederic, M. Jaslin, G., Rangara, R., Pitard, B., Crouzet, J., Wils, P., Schwartz, B., and Scherman, D. (1998) Synthesis, activity, and structure-activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer. *J. Med. Chem.* 41, 229-235.

(39) Pitard, B., Aguerre, O., Airiau, M., Lachages, A.M., Boukhnikachvili, T., Byk, G., Dubertret, C., Herviou, C., Scherman, D., Mayaux, J.F., and Crouzet, J. (1997) Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 14412-14417.

(40) Simoes, S., Slepushkin, V., Gaspar, R., Pedroso de Lima, M.C., and Duzgunes, N. (1999) Successful transfection of lymphocytes by ternary lipoplexes. *Biosci. Rep.* 19, 601-609.

Table 1. Mean sizes determined by light scattering spectroscopy of the lipoplexes and polyplexes formed between plasmid pTG11033 and lipids, and between plasmid pTG11236 and polycationic polymers, respectively.

Formulation	Molar ratio	N/P ratio ^a	mean diameter in nm (SD)	Formulation	N/P ratio ^a	mean diameter in nm (SD)
DOGS:DOPE:	1:1:0	5	115 (40)	AMD3100	10	nr ^c
DC18-[NH]-AMD	1:1:0.1	5	nd ^b		5	95 (30)
	1:1:0.2	5	120 (45)		2.5	140 (45)
DOTAP:DOPE:	1:1:0	2.5	150 (50)		2.5	<i>p^d</i>
	1:1:0.1	2.5	130 (50)		1.25	130 (45)
DC18-[NH]-AMD	1:1:0.2	2.5	140 (50)		1.25	<i>165 (l^e)</i>
	1:1:0	0.8	170 (50)		0.8	140 (50)
	1:1:0.1	0.8	250 (75)	iBu[NH₂]95	0.8	<i>425 (l^e)</i>
	1:1:0.2	0.8	170 (50)		2.5	115 (40)
DC18-[NH₂]20:	1:0	10	nr ^c		1.25	<i>p^d</i>
DC18-[NH]-AMD	1:0.1	10	nr ^c		0.8	120 (45)
	1:0.2	10	nr ^c	iBu[NH₂]80-[AMD]4	2.5	<i>p^d</i>
	1:0	5	100 (35)		1.25	180 (70)
	1:0.1	5	110 (40)		0.8	150 (l ^e)
	1:0.2	5	110 (45)	PEI (25 kDa)	2.5	<i>p^d</i>
	1:0	2.5	100 (35)		1.25	270 (70)
	1:0.1	2.5	90 (30)		0.8	290 (l ^e)
	1:0.2	2.5	95 (35)	PEI-[AMD]28	2.5	140 (l ^e)
	1:0	1.25	<i>p^d</i>		1.25	90 (l ^e)
	1:0.1	1.25	<i>p^d</i>		0.8	175 (25)
	1:0.2	1.25	<i>p^d</i>	PEI-[AMD]17	2.5	160 (10)
	1:0	0.8	100 (35)		1.25	232 (l ^e)
	1:0.1	0.8	100 (30)		0.8	245 (20)
	1:0.2	0.8	100 (35)			

^a *N* = amine equivalents of the cationic lipid or polymer; *P* = plasmid phosphate equivalents. ^b nd = not determined. ^c nr = not reproducibe; ^d p = precipitate. ^e l = large. ^d with plasmid pTG11033 and in italics with plasmid pTG11236.

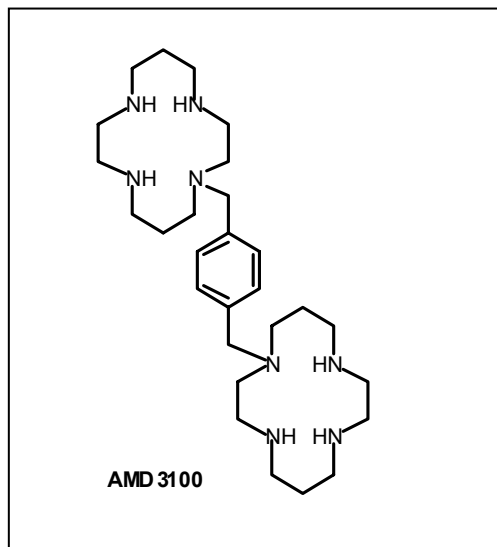


Figure 1 Chemical structure of AMD3100 (8).

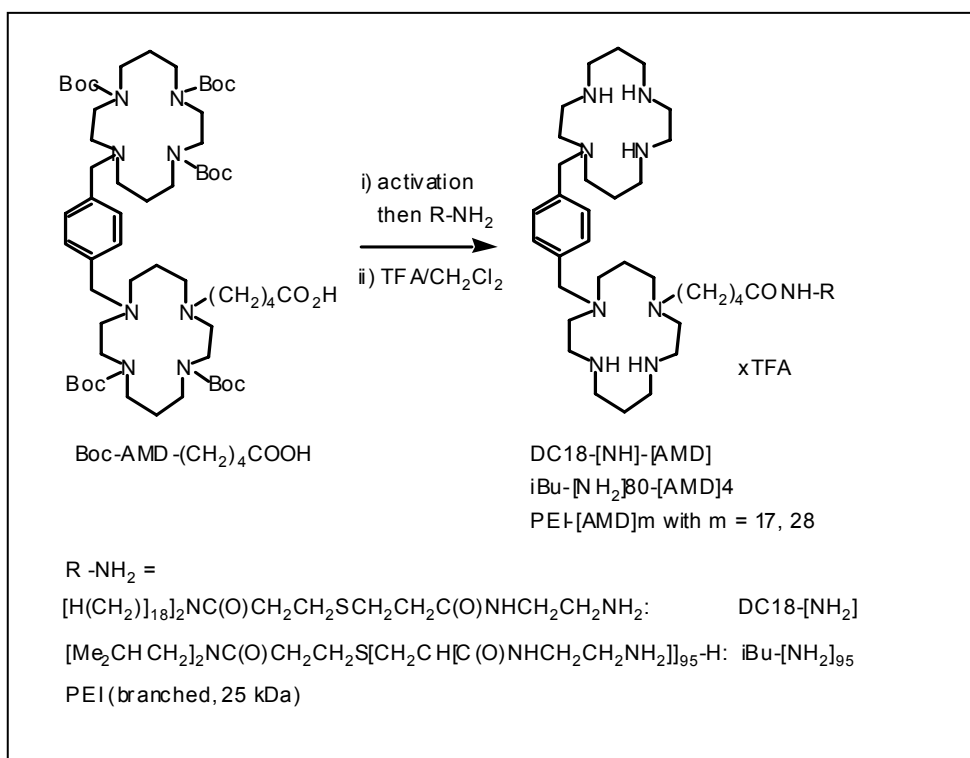


Figure 2 Synthetic pathway to the lipid and polycationic AMD3100-conjugates. For R-NH₂ = DC18-[NH₂]: i) BOP/NEt₃/CH₂Cl₂; for R-NH₂ = iBu[NH₂]₉₅: i) BOP/NEt₃/CH₃CN; for R-NH₂ = PEI: i) EDC/HOBt or DCC/NHS in CH₃CN.

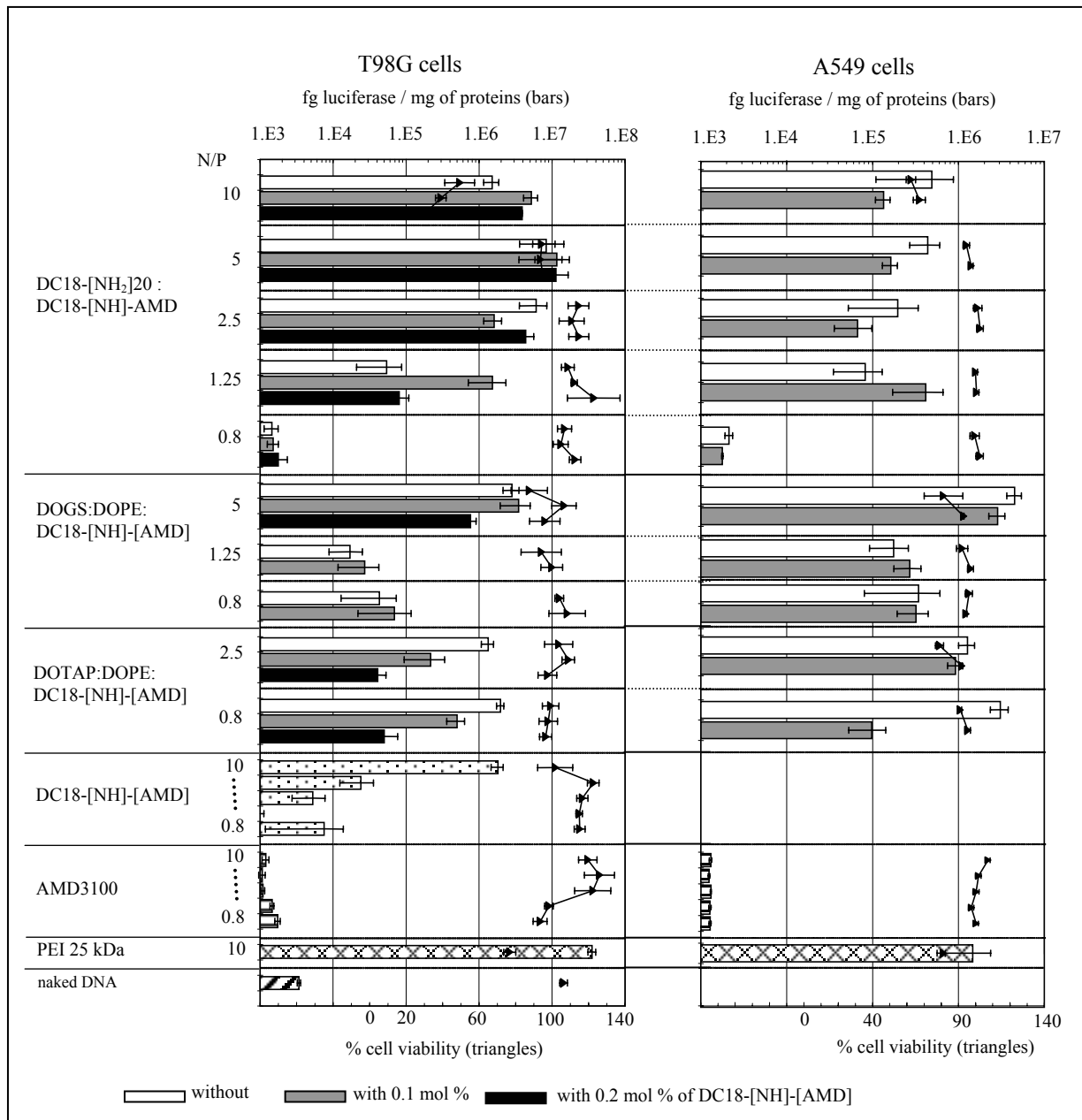


Figure 3. Luciferase expression (bars) and cell viability (triangles) of the pTG11033 complexes made with various lipid formulations [DOGS:DOPE:DC18-[NH]-AMD, DOTAP:DOPE:DC18-[NH]-AMD 1:1:x (x = 0 and 0.1) mol, and DC18-[NH₂]₂₀:DC18-[NH]-AMD 1:x (x = 0, 0.1 and 0.2) mol], PEI or AMD3100 in T98G and A549 cells, and for a DNA dose of 1 µg per well. Transfection was performed in the presence of 10% fetal calf serum. Data represent the means±SEM from two independent experiments, each performed in triplicate (for more details, see Materials and Methods section).

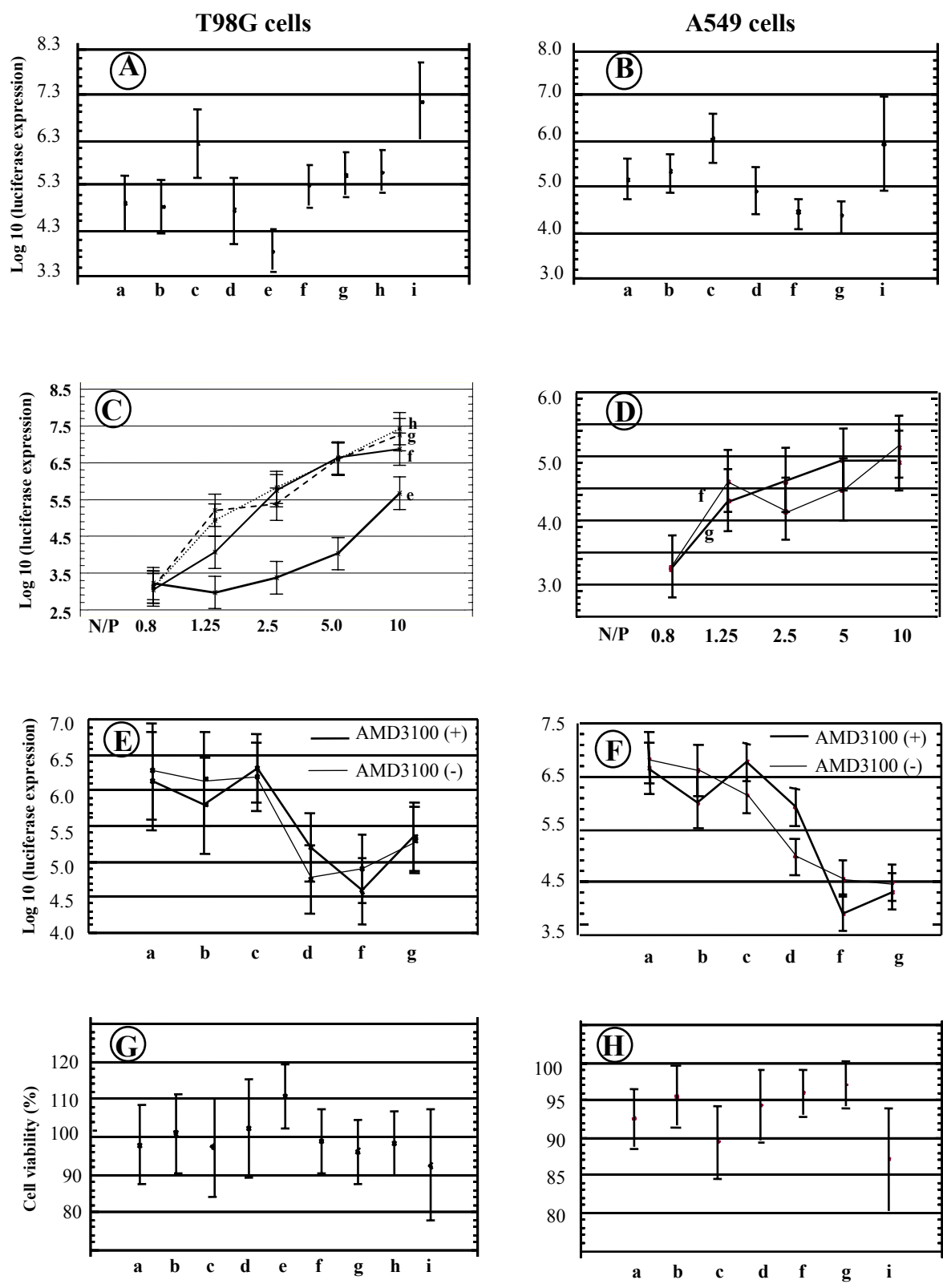


Figure 4. Means and 95.0 percent Tukey HSD intervals of the logarithmic transformation of luciferase expression levels (Log₁₀ (fg luciferase/mg protein)) (Panels A to F) and of cell viability percentages (Panels G and H) for the pTG11033 formulations of Figure 3 in T98G cells (left panels) and A549 cells (right panels). Panels A, B, G and H: irrespectively of the DNA dose (1 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$) and of the N/P ratio (0.8, 1.25 and 5 for a and b ; 0.8 and 2.5 for c and d ; 0.8, 1.25, 2.5, 5 and 10 for e, f and g ; 10 for PEI). Panels C and D :

irrespectively of the DNA dose (1 and 0.5 µg/well) and as a function of the N/P ratio for the indicated formulations. Panels E and F : irrespectively of the DNA dose (1 and 0.5 µg/well) and of the N/P ratio (5 for a and b ; 0.8 and 2.5 for c and d ; 1.25 and 2.5 for f and g), and as a function of the presence of AMD3100 (30 µg per well) or not. Statistical tests were performed with STATGRAPHICS Plus5.0® software. This comparison was performed using the multiple sample comparison procedure and the method used to discriminate among the means of the logarithmic transformation of luciferase expression levels or of the cell viability percentages was the Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. a: DOGS:DOPE (1:1) ; b: DOGS:DOPE:DC18-[NH]-[AMD] (1:1:0.1) ; c: DOTAP:DOPE (1:1) ; d: DOTAP:DOPE (1:1) ; e : DC18-[NH]-[AMD] ; f : DC18-[NH₂]₂₀ : g : DC18-[NH₂]₂₀:DC18-[NH]-[AMD] (1:0.1) ; h : DC18-[NH₂]₂₀:DC18-[NH]-[AMD] (1:0.2) ; i : PEI

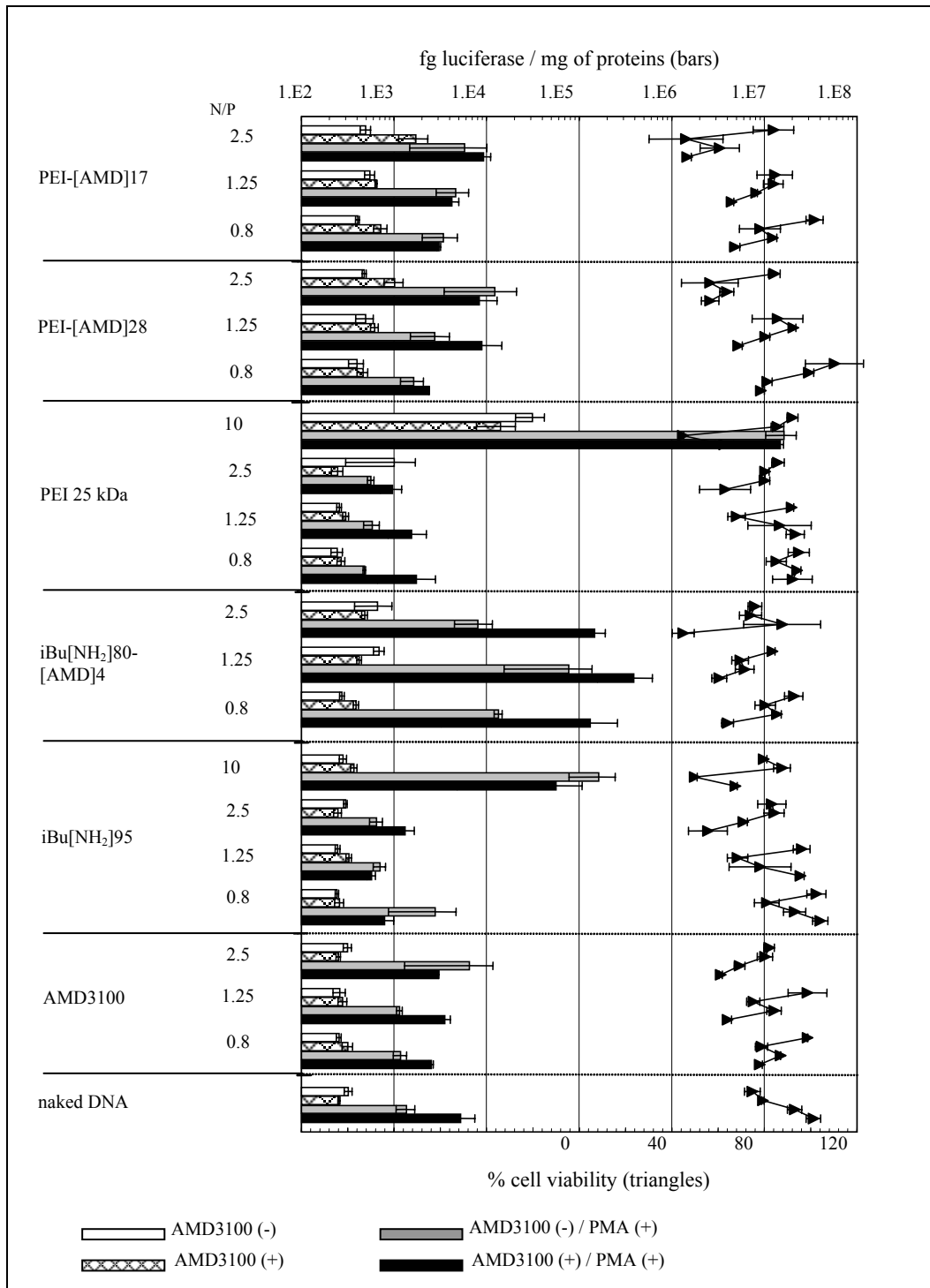


Figure 5. Luciferase expression (bars) and cell viability (triangles) in suspension CXCR4(+) Jurkat cells of the pTG11236 complexes made with various AMD-labeled polycationic polymers [PEI-[AMD]*p* (*p* = 17, 28), iBu[NH₂]₈₀-[AMD]₄, PEI, iBu[NH₂]₉₅, or AMD3100 and for a DNA dose of 1 μg per well. Transfection was performed in the presence of 10% fetal calf serum, without and with AMD3100 or PMA. Data represent the means±SEM from two independent experiments, each performed in triplicate (for more details, see Materials and Methods section).

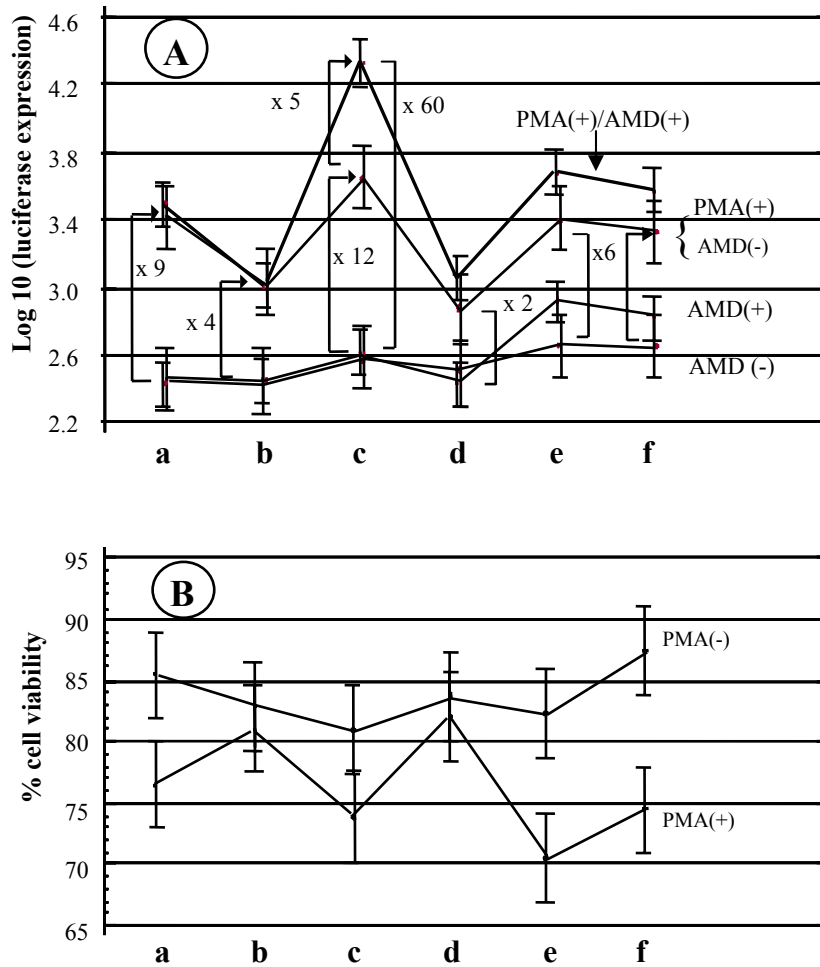


Figure 6. Means and 95.0 percent Tukey HSD intervals of the logarithmic transformation of luciferase expression levels (Log₁₀ (fg luciferase/mg protein)) (Panel A) and of cell viability percentages (Panel B) for the pTG11236 formulations of Figure 4 in Jurkat cells. Panels A and B: irrespectively of the DNA dose (1 and 0.5 μg/well) and of the N/P ratio (0.8, 1.25 and 2.5 for a to f). Panel A, curve AMD(-): without AMD3100; curve AMD(+): with AMD3100 (100 μg per well); curve PMA(+)/AMD(-): with PMA (100 ng per well) and without AMD3100; curve PMA(+)/AMD(+): with PMA (100 ng per well) and AMD3100 (100 μg per well). Panel B: curves PMA(-) and PMA(+): without and with PMA, irrespectively of the presence or absence of AMD3100. a: AMD3100; b: iBu[NH₂]₉₅; c: iBu[NH₂]₈₀-[AMD]₄; d: PEI; e: PEI-[AMD]₁₇; f: PEI-[AMD]₂₈. For more details concerning the statistical analyses, see caption of Figure 3.

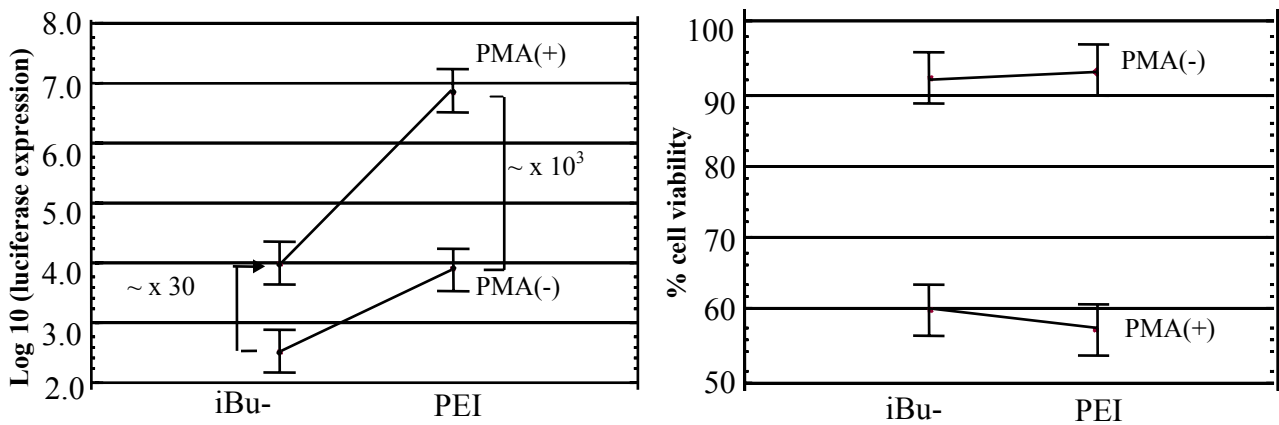


Figure 7. Means and 95.0 percent Tukey HSD intervals of the logarithmic transformation of luciferase expression levels (Log₁₀ (fg luciferase/mg protein)) (Panel A) and of cell viability percentages (Panel B) for the N/P 10 iBu[NH₂]₉₅ or PEI polyplexes made with plasmid pTG11236 in Jurkat cells with respect to the presence or absence of PMA (curves PMA(+) and PMA(-), respectively). Panels A and B: irrespectively of the DNA dose (1 and 0.5 µg/well) and of the presence or absence of AMD3100. For more details concerning the statistical analyses, see caption of Figure 3.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Le développement de la thérapie génique a connu un essor majeur ces dernières années grâce au décodage du génome humain qui va permettre de mieux connaître la cause des maladies et d'envisager comme médicaments potentiels une multitude de gènes. Néanmoins, le succès de la thérapie génique est synonyme d'une mise au point de vecteurs sûrs et efficaces qui devront être capables de véhiculer le gène jusqu'à la cellule cible et de le délivrer dans son noyau pour y être exprimé en protéines thérapeutiques. A ce jour, les nombreux vecteurs viraux et synthétiques (lipoplexes ou polyplexes) se heurtent *in vivo* à de multiples barrières physiologiques. C'est pourquoi les différents modes d'administration ainsi que le parcours que doivent suivre ces complexes, depuis leur site d'injection jusqu'au tissu et cellules cibles, sont des facteurs primordiaux à prendre en compte dans l'élaboration de systèmes de transfert de gènes. Il est acquis qu'il n'existe pas un système universel de transfert de gènes mais qu'il faut adapter et optimiser les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du système vecteur à chaque indication thérapeutique envisagée.

Le grand défi à relever réside néanmoins dans l'élaboration de systèmes vecteurs qui soient capables de délivrer le gène thérapeutique efficacement et spécifiquement dans les cellules cibles après une administration systémique dans la circulation sanguine. Dans un tel contexte, les paramètres physiques des complexes de transfection administrés par la voie systémique, comme la taille, la stabilité et la charge superficielle, déterminent pour une grande part leur biodistribution, leur toxicité et l'efficacité du transfert de gènes. Pour pouvoir franchir les nombreux obstacles qui jalonnent le parcours de ces particules *in vivo* (agrégation et opsonisation par les constituants sanguins les érythrocytes, phagocytose par les macrophages et capture par les organes filtres), il est nécessaire d'introduire des modifications qui permettront d'augmenter leur temps de circulation, leur passage au travers de barrières biologiques, et leur diffusion dans les tissus. Par ailleurs, pour une délivrance spécifique dans les tissus et cellules cibles, ces particules devront être protégées des interactions non-spécifiques non seulement avec les constituants sanguins et de la matrice extracellulaire mais aussi avec les cellules non-ciblées.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les deux projets qui font l'objet de cette thèse. L'un concerne le développement de formulations dites "furtives" pour améliorer leur

biodisponibilité dans les applications *in vivo*, l'autre, des formulations " ciblées " pour réaliser une délivrance efficace et spécifique de gènes thérapeutiques dans des cellules cibles.

Le premier projet a visé l'élaboration de cotélomères de type " diblock " (PEG2000-[NH₂]_n ; PEG2000-[CH₂NMe₂]_n) et " random " (iBu-[TEG]_m-[NH₂]_n et iBu-[THM]_m-[NH₂]_n) qui sont obtenus par des réactions de (co)télomérisation. Le design des cotélomères " diblock " comporte une partie polyaminée (pour l'interaction et la complexation de l'ADN) de degré de télomérisation variable mais contrôlé, et une partie hydrophile de type polyéthylène glycol (pour le masquage de la surface des particules cationiques formées). Pour les mêmes raisons, le design des cotélomères " random " est basé sur une combinaison aléatoire d'unités aminés et d'unités hydrophiles (tétraéthylène glycol et trishydroxyméthyl). La simplicité de mise en œuvre des réactions et la large palette de monomères polymérisables disponibles a permis ces variations structurales et ainsi d'obtenir une palette de composés polycationiques aux structures très diverses.

Ces deux séries de cotélomères polycationiques ont été évaluées en tant que vecteurs de gènes sur une lignée cellulaire adhérente de carcinome pulmonaire humain A549. La diminution de l'expression du transgène observée avec les polyplexes formulés avec ces cotélomères, liée au masquage de la charge des particules par la présence de polymères hydrophiles, est en accord avec les comportements d'autres systèmes synthétiques " furtifs " décrits dans la littérature. Toutefois, les polyplexes " furtifs " formulés avec les (co)télomères " diblock " PEG2000-[NH₂]_n, à condition que le nombre d'unités aminés soit important (n = 190), ont conduit à une expression du transgène comparable à celles obtenues avec des formulations lipidiques références (pcTG90/DOPE) qui comptent parmi les formulations les plus efficaces pour transfecter les cellules A549. Ces formulations " furtives " sont aussi moins toxiques que les formulations lipidiques références, ce qui en fait des systèmes vecteurs prometteurs pour une application *in vivo*. D'autre part, les variations structurales nous ont permis de mettre en évidence des relations structure-efficacité de transfection, comme par exemples

- l'impact très positif d'une chaîne polymérique constituée d'unités éthylammoniums ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$) plutôt que d'unités N,N-diméthylpropylammoniums ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHMe}_2^+$); cet effet est très certainement lié à une meilleure délivrance cytoplasmique des complexes endocytés et formulés avec les cotélomères constitués d'unités éthylammoniums, leur sortie des endosomes étant facilitée par le plus faible pKa de ces unités éthylaminés par rapport à celui des unités propylaminés;
- l'impact du degré de télomérisation n (aisément contrôlable lors de la synthèse) des cotéloplexes formulés avec PEG2000- $[\text{NH}_2]_n$, iBu-[TEG] m - $[\text{NH}_2]_n$ et iBu-[THM] m - $[\text{NH}_2]_n$ sur l'efficacité de transfection; celle-ci est d'autant plus importante que le nombre d'unités aminés est grand, ce qui permet de compenser la diminution des interactions non-spécifiques avec les cellules liée à la présence du motif hydrophile qui masque la densité de charge des cotéloplexes.

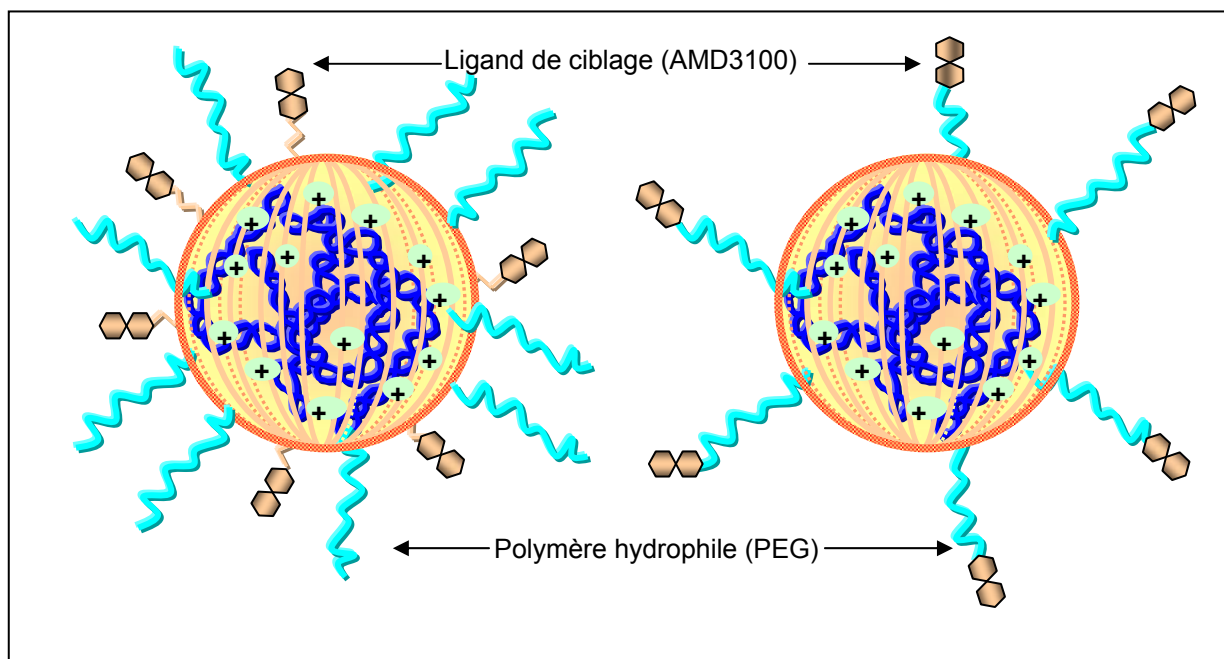
Le second projet a visé l'élaboration de vecteurs "ciblés" [i.e., DC18- $[\text{NH}]$ - $[\text{AMD}]$, iBu- $[\text{NH}_2]_{80}$ - $[\text{AMD}]_4$, PEI- $[\text{AMD}]_p$ ($p= 17, 28$)], obtenus par la conjugaison d'un lipide ou de polymères cationiques à un ligand dérivé de l'AMD3100 qui est un antagoniste puissant des récepteurs à chimiokines CXCR4. Notre choix s'est porté sur le couple ligand/récepteur AMD3100/CXCR4 car, d'une part, l'AMD3100 est un ligand de faible poids moléculaire dont la synthèse est relativement aisée, et, d'autre part, CXCR4 est un récepteur surexprimé par certaines tumeurs cérébrales et par des métastases du cancer du sein. CXCR4 est aussi impliqué dans le processus d'adhésion du virus de l'immunodéficience humaine sur les lymphocytes T4 et dans leur infection. L'utilisation du couple AMD3100/CXCR4 et de vecteurs conjugués à l'AMD3100 permettrait donc le développement d'une thérapie génique antitumorale ou antivirale ciblée.

Le potentiel des vecteurs ciblés à compacter l'ADN et à transférer des cellules de manière non-spécifique et spécifique (voie récepteur-médiée) a été évalué respectivement sur des cellules adhérentes qui n'expriment pas le récepteur CXCR4 (A549, T98G) et des cellules Jurkat en suspension qui l'expriment.

Nos résultats montrent que les polyplexes formulés avec les conjugués AMD3100 constituent, sous certaines conditions, des systèmes spécifiques de transfert de gènes dans des

cellules CXCR4(+). Ceci est plus particulièrement le cas pour des formulations $N/P \leq 2.5$ pour lesquelles les mécanismes de transfection non-spécifiques sont minimisés, et en présence d'acétate et de myristate de phorbol qui déclenche l'endocytose des récepteurs CXCR4. Ces polymères conjugués à l'AMD3100 sont des vecteurs synthétiques prometteurs pour un transfert spécifique de gènes *in vivo* dans des cellules exprimant CXCR4, hypothèse qui mériterait d'être explorée. Bien que ces résultats soient encourageants, les efficacités de transfection et leur spécificité doivent encore être améliorées. Cette étude souligne aussi les difficultés à mettre en évidence et à obtenir une transfection spécifique et efficace avec des particules ciblées cationiques qui sont aussi capables d'interagir de manière non-spécifique avec les cellules et en particulier les cellules adhérentes A549 et T98G et de les transférer efficacement.

L'étape qu'il s'agit d'explorer maintenant est l'élaboration et l'évaluation *in vivo* de particules d'ADN qui combinent à la fois des propriétés furtives et de ciblage de cellules CXCR4(+), comme celles représentées dans la Figure ci-dessous. La formulation de telles particules nécessitera un effort de synthèse et en particulier de conjugués [PEG]p-iBu-[NH₂]m-[AMD]n (ou [PEG]p-PEI-[AMD]n) qui résultent du couplage successif d'unités PEG et d'unités AMD3100 sur le polymère polycationique, ou de conjugués iBu-[NH₂]m-[[PEG]-[AMD]]n (ou PEI-[[PEG]-[AMD]]n) qui résultent du couplage sur le polymère polycationique d'unités PEG porteurs à une extrémité de PEG l'entité de ciblage AMD3100.



Particules d'ADN aux propriétés furtives et de ciblage

Résumé

Le sujet de cette thèse concerne l'élaboration de vecteurs fonctionnels de transfert de gènes destinés à la thérapie génique de tumeurs.

Deux familles de vecteurs synthétiques fonctionnels ont été synthétisées afin d'améliorer d'une part la biodisponibilité des vecteurs dans les applications *in vivo* et d'autre part leur spécificité de ciblage des tissus tumoraux.

La première famille de composés est constituée de télomères et de cotélomères « furtifs » issus des réactions de (co)télomérisation. Le design des télomères est basé sur un squelette « diblock » composé d'une partie polyaminée de degré de télomérisation aléatoire et d'une partie hydrophile (polyéthylène glycol). Le design des cotélomères est basé sur un squelette aléatoire de motifs aminés et de structures hydrophiles (tétraéthylène glycol et trishydroxyméthyl). La deuxième famille de vecteurs synthétiques est issue de la synthèse de lipides et polymères cationiques conjugués à un ligand dérivé de l'antagoniste des récepteurs à chimiokines CXCR-4, l'AMD3100 ou bicyclame.

Le potentiel des (co)télomères « furtifs » en tant qu'agents de condensation et de transfert de gènes a été évalué *in vitro* sur des cellules de carcinome pulmonaire humain A549.

Le potentiel des conjugués ciblés lipidiques et polymériques à compacter l'ADN et à transfecter de manière spécifique des cellules par la voie récepteur médiée a été évalué à la fois sur des cellules n'exprimant pas le récepteur CXCR-4 (A549, T98G) et sur des cellules l'exprimant (Jurkat).

Certains des (co)télomères « furtifs » testés (PEG2000-[NH₂]_n) ont démontré des efficacités de transfection comparables à des formulations lipidiques de référence (pcTG90/DOPE) tout en étant moins toxiques. Parmi les conjugués ciblés le cotélomère iBu-[NH]₈₀-[AMD]₄ s'est révélé être un agent de transfert de gènes spécifique sur les cellules Jurkat sous certaines conditions de formulations par rapport aux lipides et polymères conventionnels.

Mots clés : Thérapie génique, transfert de gènes, lipoplexes, polyplexes, polyéthylène glycol, biodisponibilité, AMD-3100, ciblage, transfection.

Discipline : Chimie.