

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

UTILISATION DE L'ACIDE POLY(PROPYL ACRYLIQUE) POUR AUGMENTER
L'EFFICACITÉ IN VITRO DES NANOPARTICULES À BASE DE CHITOSANE ET ARN
MESSAGER

ETIENNE JEANDUPEUX
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

DÉCEMBRE 2018

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

UTILISATION DE L'ACIDE POLY(PROPYL ACRYLIQUE) POUR AUGMENTER
L'EFFICACITÉ IN VITRO DES NANOPARTICULES À BASE DE CHITOSANE ET ARN
MESSAGER

présenté par : JEANDUPEUX Etienne

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. HENRY Olivier, Ph. D, président

M. LAVERTU Marc, Ph. D, membre et directeur de recherche

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D, membre et codirecteur de recherche

Mme ROULLIN Valérie Gaëlle, Ph. D, membre

DÉDICACE

À ma famille

“To the rational mind nothing is inexplicable, only unexplained”

-The Doctor

“Perfectly balanced. As all things should be”

-Thanos

“No one can win every battle, but no man should fall without a struggle”

-Peter Parker

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon directeur de recherche initial, le professeur Michael Buschmann pour m'avoir donnée l'opportunité de faire une maîtrise au sein de son groupe. Je voudrais exprimer ma reconnaissance pour le professeur Gregory De Crescenzo, qui m'as permis de rester inscrit à Polytechnique Montréal lors de la difficile période de transition de laboratoire. Puis j'aimerais remercier le professeur Marc Lavertu, mon directeur de recherche actuel, qui m'a beaucoup aidé à comprendre des concepts physiques. Un grand merci à Dr. Mohamad-Gabriel Alameh, qui m'a beaucoup aidé dans la planification d'expériences. Il m'a également beaucoup encouragé et il m'a appris une multitude d'astuces. J'ai commencé dans ce laboratoire en étant son stagiaire et j'ai été impressionné par la vaste étendue de ses connaissances dans divers milieu de la science (« *generalist* »). J'aimerais également remercier Martine Bail et Ousamah Soliman pour leur aide en laboratoire et pour m'avoir aidé à comprendre certains concepts. Finalement, je tiens à remercier ma famille ainsi que ma conjointe pour l'énorme support moral tout au long de cette maîtrise, et plus.

RÉSUMÉ

L'ARNm a un fort potentiel en thérapie génique pour des applications de vaccination contre le cancer, le remplacement de protéine défectueuse, l'édition du génome et la reprogrammation de cellules souches. Néanmoins, la livraison de l'ARNm représente un défi scientifique et technologique de taille, car elle est limitée par plusieurs barrières telles qu'une dégradation rapide dans le plasma, la difficulté à pénétrer dans la cellule et une séquestration/dégradation au niveau des endosomes. Cette barrière endosomale demeure à ce jour l'une des plus difficiles à franchir. Pour surmonter certains de ces obstacles, plusieurs véhicules de livraison ont été développés à base de virus, lipides, polymères. Le chitosane (CS), un polymère naturel cationique, peut lier et condenser les acides nucléiques pour former des nanoparticules, ce qui les protège et augmente leur internalisation cellulaire. Toutefois, la capacité des nanoparticules à base de CS à surmonter la séquestration endosomale demeure limitée et pourrait être augmentée par l'utilisation d'agents endosomolytiques.

L'objectif principal de ce projet était d'incorporer l'acide poly(propyle acrylique)(PPAA), un agent endosomolytique, à des nanoparticules de CS/ARNm dans le but d'accroître leur efficacité. Le PPAA a été incorporé à différentes concentrations dans des nanoparticules binaires de CS/ARNm. Les propriétés physico-chimiques (taille, Pdl, potentiel-zeta, pH) et l'efficacité de transfection *in vitro* des nouvelles formulations ternaires (CS/ARNm/PPAA) ont été caractérisées. De plus, ces formulations ont été formées avec/sans tampon et en présence/absence de tréhalose, une molécule utilisée pour la lyophilisation des nanoparticules. En présence de tréhalose et tampon, le PPAA était principalement incorporé dans les nanoparticules qui avaient une taille d'environ 170 nm et une charge de surface de 12 mV. Une augmentation de l'efficacité de transfection (~10 fois) fut observée pour une concentration intermédiaire de PPAA en présence de tampon et tréhalose. Par la suite, l'efficacité a été augmentée davantage en retirant le tréhalose et en augmentant la concentration de mélange de l'ARNm. Cette nouvelle formulation a atteint une efficacité comparable à ~86% du contrôle lipidique LipofectamineTM et ce sans aucun signe de toxicité. Ces résultats suggèrent que la présence de PPAA dans les nanoparticules favorise leur libération de l'endosome et/ou diminue leur stabilité. Néanmoins, des études de trafic intracellulaire et compétition devront être effectuées afin de confirmer ces hypothèses.

ABSTRACT

Messenger mRNA is a molecule that has a strong potential in gene therapy for a wide variety of therapeutic applications such as vaccination against infectious disease or cancer, protein replacement, genome editing and stem cells reprogramming. However, delivery of mRNA remains a scientific and technological endeavour as it is limited by many hurdles such as a fast degradation in plasma, low internalisation kinetics and a sequestration/degradation within endosomes. This endosomal barrier remains to day one of the hardest to overcome. To overcome some of these hurdles, delivery vehicles made of virus, lipids or polymers are developed worldwide. Chitosan (CS), a natural cationic polymer can bind and condense anionic nucleic acids to spontaneously form nanoparticles. These nanoparticles protect mRNA and help its cellular internalisation. However, the capacity of these nanoparticles to escape from endosomes is limited and could be augmented by adding endosomolytic agents into the nanoparticles.

The main objective of this project was to incorporate an endosomolytic agent in CS/mRNA nanoparticle in order to increase their transfection efficiency. Poly(propylacrylic acid)(PPAA), an anionic synthetic polymer was used as endosomolytic agent and added at different concentrations in the binary (CS/mRNA) nanoparticles. These newly formed ternary nanoparticles (CS/mRNA/PPAA) had their physicochemical characteristics (size, PDI, zeta-potential, pH) and transfection efficiency analysed. Furthermore, these formulations were made with/without buffer and with/without trehalose, a disaccharide used for lyophilisation of nanoparticles. In presence of buffer and trehalose, PPAA was mostly incorporated in the nanoparticles that had a size of 170 nm and a zeta potential of 12 mV. An augmentation of transfection efficiency (~10-fold) was observed for an intermediate PPAA concentration. This bioactivity was further improved by removing trehalose and increasing the mRNA mixing concentration while forming nanoparticles. This new optimal formulation reached a protein expression levels comparable to ~86% of the lipid control Lipofectamine™ 2000 messenger max, without any signs of toxicity. These results suggest that PPAA in nanoparticles favour their endosomal release and/or decrease their stability. Nevertheless, further studies such as intracellular trafficking and competition should be performed to confirm these hypotheses.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| DÉDICACE..... | III |
| REMERCIEMENTS | IV |
| RÉSUMÉ..... | V |
| ABSTRACT | VI |
| TABLE DES MATIÈRES | VII |
| LISTE DES TABLEAUX..... | XI |
| LISTE DES FIGURES | XII |
| LISTE DES FIGURES SUPPLÉMENTAIRES | XV |
| LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS | XVII |
| CHAPITRE 1 INTRODUCTION..... | 1 |
| 1.1 Thérapie génique | 1 |
| 1.2 Problématique..... | 2 |
| 1.3 Objectifs et hypothèse de recherche..... | 2 |
| 1.4 Structure générale du mémoire | 3 |
| CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE | 4 |
| 2.1 ARN Messenger (ARNm)..... | 4 |
| 2.1.1 Structure et fonctions de l'ARNm..... | 4 |
| 2.1.2 Obstacles à l'administration | 5 |
| 2.1.3 Utilisation de l'ARNm en thérapie génique | 6 |
| 2.2 Vecteurs de livraison..... | 7 |
| 2.2.1 Vecteur de livraison viraux | 8 |
| 2.2.2 Vecteur de livraison lipidiques (lipoplexes)..... | 9 |

| | | |
|--|---|----|
| 2.2.3 | Vecteur de livraison polymériques (polyplexes)..... | 10 |
| 2.3 | Chitosane..... | 11 |
| 2.3.1 | Structure et propriétés physicochimiques du chitosane | 11 |
| 2.3.2 | Utilisation du chitosane dans des polyplexes d'acides nucléiques | 13 |
| 2.4 | Libération Endosomale | 16 |
| 2.4.1 | Éviter complètement la voie endocytaire ou les lysosomes..... | 18 |
| 2.4.2 | Hypothèse de l'éponge à proton (<i>Proton-sponge hypothesis</i>) | 18 |
| 2.4.3 | Fusion et déstabilisation de la membrane endosomale | 20 |
| 2.4.4 | Libération par photochimie | 21 |
| 2.4.5 | Augmentation de la libération endosomale du chitosane..... | 22 |
| 2.5 | L'acide poly(propyle acrylique) (PPAA)..... | 23 |
| 2.5.1 | Structures et propriétés physicochimiques du PPAA..... | 23 |
| 2.5.2 | Utilisation du PPAA dans des nanoparticules..... | 25 |
| 2.6 | Tampon..... | 26 |
| 2.7 | Tréhalose | 29 |
| CHAPITRE 3 ARTICLE 1: POLY(2-PROPYLACRYLIC ACID) INCREASES IN VITRO BIOACTIVITY OF CHITOSAN/MRNA NANOPARTICLES..... | | 32 |
| 3.1 | Introduction | 33 |
| 3.2 | Materials and methods | 35 |
| 3.2.1 | Materials..... | 35 |
| 3.2.2 | Synthesis and characterization of depolymerized CS and PPAA | 36 |
| 3.2.3 | Preparation of Chitosan, mRNA, PPAA stock solutions | 36 |
| 3.2.4 | Titration of PPAA for estimation of degree of ionization and apparent pKa | 38 |
| 3.2.5 | Nanoparticle preparation and characterization..... | 38 |

| | | |
|------------|---|----|
| 3.2.6 | Quantification of free PPAA and mRNA..... | 39 |
| 3.2.7 | Cell culture and transfection | 40 |
| 3.2.8 | Assessment of nanoparticle bioactivity (Luciferase Assay) | 41 |
| 3.2.9 | Assessment of nanoparticle toxicity (AlamarBlue Assay)..... | 41 |
| 3.2.10 | Statistical analysis | 41 |
| 3.3 | Results | 42 |
| 3.3.1 | Ionization behavior of PPAA is biphasic and depends on salt concentration. | 42 |
| 3.3.2 | Addition of buffer affects the nanoparticle size, PdI and ζ -potential while the addition of PPAA has limited effect on these physicochemical characteristics. | 44 |
| 3.3.3 | Addition of <i>PPAA</i> by comixing in presence of buffer and trehalose significantly increases nanoparticles <i>in vitro</i> bioactivity | 46 |
| 3.3.4 | Formulations prepared in buffer allowed incorporation of PPAA into/onto CS/mRNA nanoparticles without displacing mRNA. | 48 |
| 3.3.5 | Bioactivity of CS nanoparticles is dependent upon endosomal acidification | 50 |
| 3.3.6 | Increasing mRNA mixing concentration in absence of trehalose can drastically increase transfection efficiency without affecting cell viability is reminiscent of CS/mRNA/HA nanoparticles. | 51 |
| 3.3.7 | Increased <i>in vitro</i> bioactivity mediated by trehalose and other saccharides is mostly due to an increase in nanoparticle solution density..... | 54 |
| 3.4 | Discussion | 56 |
| 3.5 | Conclusion..... | 60 |
| 3.6 | Acknowledgement..... | 61 |
| 3.7 | References | 61 |
| 3.8 | Supplementary Information..... | 65 |
| CHAPITRE 4 | DISCUSSION GÉNÉRALE | 72 |

CHAPITRE 5 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS 75

BIBLIOGRAPHIE 77

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 2-1 Caractéristiques et applications de quelques virus utilisés en thérapie génique. (Tableau tiré de Lundstrom, 2018)..... | 8 |
| Tableau 2-2 Degré d'ionisation(%) théorique du chitosane et PPAA dans un milieu où la force ionique est négligeable. | 27 |
| Table 3-1. Characteristics of chitosans ^a and PPAA ^b tested in this study | 36 |
| Table S. 1 Composition of luciferin mix used in luciferase assay (pH ~7.8) | 66 |
| Table S. 2 Indice of kosmotropicity of saccharides tested in this study. Saccharides are listed in increasing order of kosmotropicity, with glucose considered neutral (neither a kosmotrope nor a chaotrope)..... | 69 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 2-1 Structure typique d'un ARNm codant pour une protéine chez l'humain. Image adaptée de (Li, Zhang, & Dong, 2018) © Wiley 2018, reproduit avec permission. | 5 |
| Figure 2-2 Structure chimique du chitosane avec les unités déacétylées de glucosamine (D-unit) et les unités N-acétyl-glucosamine (A-unit). Image adaptée de (Buschmann et al., 2013) © Elsevier 2018, reproduit avec permission. | 12 |
| Figure 2-3 Schéma de la maturation de l'endosome. Image de (Hu et al., 2015) © Springer 2018, reproduit avec permission. | 17 |
| Figure 2-4 Échappement endosomal des molécules thérapeutiques. Image de (Varkouhi, Scholte, Storm, & Haisma, 2011) © Elsevier 2018, reproduit avec permission..... | 17 |
| Figure 2-5 Mécanisme de libération endosomale proposé par <i>proton-sponge</i> . Image de (Durymanov & Reineke, 2018) © Frontiers in Pharmacology 2018, reproduit avec permission. | 20 |
| Figure 2-6 Structure chimique du monomère récurrent de l'acide poly(propyle acrylique) | 23 |
| Figure 2-7 Structure chimique du tréhalose. | 29 |
| Figure 3-1 Titration curves of PPAA in presence of salt (NaCl). Figures represent the pH (A) and pKa (B) as a function of the degree of ionization. PPAA was dissolved at a 1:1 molar ratio of carboxyl group to NaOH and titrated in the absence (0 mM) or presence (15 and 150 mM) of NaCl using HCl. Data represent the average \pm standard deviation of at least 2 independent experiment (N=2). | 43 |
| Figure 3-2 Effect of mixing technique, C:P ratio, and absence or presence of buffer on nanoparticle size, polydispersity index and ζ -potential. Nanoparticles were formed in 10% (w/v) trehalose, without (water) or with 20 mM buffer (12 mM Histidine/8 mM MOPS pH 6.7) by manual mixing. An N:P ratio of 5 was used for every formulation. Dynamic light scattering was used to measure A) Nanoparticle hydrodynamic diameter (Z-ave in nm) and polydispersity index (PdI), B) Nanoparticle ζ -potential in mV. Data represent average \pm standard deviation of at least 3 independent experiment with at least 2 technical replicates per experiment (N= 3, n= 6). | 45 |

Figure 3-3 Effect of mixing technique, C:P ratio, and absence or presence of buffer on nanoparticles *in vitro* bioactivity. EGFP⁺ H1299 cells were transfected at an mRNA dose of 150 ng/well in complete RPMI-1640 containing 20 mM MOPS (pH 6.5). Luminescence and EGFP fluorescence were assessed 48h post-transfection. EGFP signal was used for normalization of the luminescence signal. Nanoparticles were formed in 10% trehalose (w/v), with or without buffer (12 mM Histidine/8 mM MOPS pH 6.7) by manually mixing 1:1:1 (v/v/v) mRNA (150 µg/mL) with PPAA, followed by addition of chitosan 92-10 (comixing) or mixing mRNA and chitosan 92-10, incubated for 10 min and coated with PPAA at different C:P ratio (coating). N:P ratio of 5 was used for all formulations. Data represent average ± standard deviation of at least 3 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 3, n= 6-9).....47

Figure 3-4 Impact of mixing technique, C:P ratio, and absence or presence of buffer on A) unbound (free) and B) mRNA encapsulation by nanoparticles. Nanoparticles were formed in water or 20 mM buffer (12 mM Histidine pH 6.9 and 8 mM MOPS pH 7.3) by manually mixing 1:1:1 (v/v/v) mRNA (150 µg/mL) with PPAA, followed by addition of chitosan 92-10 (comixing) or mixing mRNA and chitosan 92-10, incubated for 10 min and coated with PPAA at different C:P ratio (coating). N:P ratio of 5 and final trehalose concentration of 0% (w/v) was used for every formulation. Nanoparticles were then centrifuged at 50,000 rpm for 20 min and the supernatant analyzed. mRNA encapsulation (A) was determined by QuantiFluor® RNA system assay. Unbound PPAA to nanoparticles (B) was determined by TBO assay. Since no free PPAA was detected (0%) in presence of buffer, the buffer bars (grey) are not visible and their location is denoted by an asterisk (*). Data represent the average ± standard deviation of at least 2 independent experiment with at least 2 technical replicates per experiment (N= 2, n=4).49

Figure 3-5 Influence of chloroquine and BFA on nanoparticles *in vitro* bioactivity. Nanoparticles were formed in 10% (w/v) trehalose and 20 mM buffer by manually mixing 1:1:1 (v/v/v) mRNA (150 µg/mL) with PPAA at C:P ratios of 0, 0.125 (optimal) and 1, followed by addition of chitosan 92-10 (comixing) at an N:P ratio of 5. Cells were transfected as described in Figure 3-3. Chloroquine was added at the same time as nanoparticles. In contrast, BFA was added 30 mins before transfection and at the same time as nanoparticles.

Since no luminescence was detected in presence of bafilomycin A (BFA), the bars (grey) are not visible, except for the lipid control (LP-MM), and their location is denoted by an asterisk(*). Data represent the average \pm standard deviation of at least 2 independent experiment with at least 2 technical replicates per experiment (N= 2, n=4).....51

Figure 3-6 Influence of nucleic acid mixing concentration and dose on nanoparticle size, PDI and *in vitro* bioactivity. A) size in nm and PDI. B) *in vitro* bioactivity in the absence or presence of trehalose. Nanoparticles were formed in trehalose (0% or 10%) in presence of buffer by manually mixing 1:1:1 (v/v/v) of mRNA (75, 150 or 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with PPAA at the control and optimal C:P ratio of 0 and 0.125, respectively, followed by addition of chitosan 92-10 (comixing). N:P ratio of 5 was used. Due to increased chitosan concentration linked with the increase in mRNA concentration, the buffer concentration used for nanoparticles formation had to be increased in order to maintain the pH of nanoparticles at 6.7. A buffer concentration of 14, 20 and 43 mM was used for the mRNA mixing concentrations of 75, 150 and 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Transfection was performed as described in Figure 3. Data represent the average \pm standard deviation of at least 4 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 4, n= 8-12).53

Figure 3-7 Effect of nucleic acid dose and concentration on nanoparticle metabolic activity (viability) in the absence or presence of trehalose. Nanoparticles were prepared and transfection was performed as described in Figure 3-3. Metabolic activity was measured 48h post-transfection using the alamarBlue assay. Untreated cells correspond to 100% metabolic activity. Data represent the average \pm standard deviation of at least 2 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 2, n= 4-6).54

Figure 3-8 Impact of saccharide type on nanoparticles *in vitro* bioactivity. Nanoparticles were prepared as described in Figure 3-2 using the comixing technique with the control and optimal C:P ratio of 0 and 0.125 respectively. Every formulation was prepared in 20 mM buffer and 10% saccharide (glucose, sucrose, trehalose or dextran) (w/v), with the exception of the water formulation. The 20 mM buffer formulation did not have any saccharide (0%). Transfection was performed as described in Figure 3-3. Data represent the average \pm standard deviation of at least 3 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 3, n= 6-9).55

LISTE DES FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

Figure S. 3-1 Effect of PPAA, Buffer and RNase A on FLuc (mRNA) integrity. FLuc was mixed with PPAA at C:P 10 in presence/absence of 8 mM Histidine or MOPS buffer. RNase A was added afterward for a final concentration of 0.2 $\mu\text{g/mL}$. Solution was incubated at room temperature for 30 min. Migration was performed on a 1.5% agarose gel for 30 mins at 100 V, followed by staining (SBYR Gold 1X, 20 min incubation) and visualization under transillumination. Wells contents: (1) FLuc + H₂O, (2) FLuc+ PPAA in PBS, (3) FLuc+ PPAA in 8 mM MOPS, (4) FLuc+ PPAA in 8 mM Histidine, (5) FLuc + 8 mM MOPS, (6) FLuc + 8 mM Histidine, (7) FLuc + H₂O + RNase A, (8) FLuc+ PPAA in PBS + RNase A, (9) FLuc+ PPAA in 8 mM MOPS + RNase A, (10) FLuc+ PPAA in 8 mM Histidine + RNase A, (11) FLuc + PBS + RNase A, (12) FLuc + 8 mM MOPS + RNase A, (13) FLuc + 8 mM Histidine + RNase A, (14) Orange G (migration front), (15) empty.65

Figure S. 3-2 Effect of mixing technique, C:P ratio and absence or presence of buffer on pH of nanoparticles solution. Nanoparticles were formed as described in Figure 3-2. pH was measured around 20-30 min post-formation with an Orion 720 A plus coupled with an 8220BNWP PerpHecT glass microelectrode. Data represent average \pm standard deviation of at least 3 independent experiment with at least 2 technical replicates per experiment (N= 3, n= 6).67

Figure S. 3-3 Effect of mixing technique, C:P ratio and absence or presence of buffer on cells viability. EGFP⁺ H1299 cells were transfected as described in Figure 3-3. 48h post transfection, cells were washed twice with 200 μL DPBS and EGFP measured ($\lambda_{\text{ex/em}}$ of 485/535 nm) using the multiple read/wells function in 50 μL DPBS. Data represent average \pm standard deviation of at least 3 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 2, n= 4-6).68

Figure S. 3-4 Impact of saccharides on nanoparticle diameter (Z-ave) and Pdl. Nanoparticles were prepared as described in Figure 3-2 using the comixing technique with the control and optimal C:P ratio of 0 and 0.125 respectively. Every formulation was prepared in 20 mM buffer and 10% saccharide (glucose, sucrose, trehalose or dextran) (w/v), with the exception of the water formulation. The 20 mM buffer formulation did not have any saccharide (0%).

Data represent average \pm standard deviation of at least 3 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 3, n= 6-9).....69

Figure S. 3-5 Influence of buffer concentration on A) nanoparticle diameter (Z-ave) (no influence on PDI was observed, not shown) and on nanoparticle bioactivity for an mRNA mixing concentration of B) 75 $\mu\text{g/mL}$ or C) 150 $\mu\text{g/mL}$. Nanoparticles and transfection were performed as described in Figure 3-6. Data represent average \pm standard deviation of at least 2 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 3, n= 6-9).71

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

| | |
|--------------------|--|
| μ | Micro |
| ¹ H NMR | Résonance nucléaire magnétique (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>) |
| ACES | Acide N-(2-acétamido)-2-aminoéthanesulfonique |
| ADA | Acide N-(2-acétamido)-iminodiacétique |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ANOVA | Analyse de variance (<i>Analysis of variance</i>) |
| ARN | Acide ribonucléique |
| BES | Acide N-N-Bis(2-hydroxyéthyl)-2-aminoéthanosulfonique |
| Bis-tris | 1,3-bis(tris(hydroxyméthyl)méthylamino)méthane |
| BTP | 1,3-bis(tris(hydroxyméthyl)méthylamino)propane |
| CAPS | Acide N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonique |
| C:P ratio | Ratio molaire entre les groupes carboxyles (C) de l'acide poly(propyle acrylique) et les groupes phosphates (P) de l'acide nucléique |
| CPP | Peptides de pénétration cellulaire (<i>Cell Penetrating Peptide</i>) |
| CS | Chitosane |
| DDA | Degré de déacétylation |
| DLS | Diffusion dynamique de la lumière (<i>Dynamic Light Scattering</i>) |
| eGFP | Protéine verte fluorescente augmentée (<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>) |
| FBS | Sérum de veau fœtal (<i>Fetal Bovine Serum</i>) |
| FDA | Food and Drug Administration |
| H1299 | Lignée de cellules pulmonaires d'adénocarcinome humain |
| HA | Acide hyaluronique |

| | |
|-----------|--|
| HPLC | Chromatographie en phase liquide à haute performance (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>) |
| IVT-mRNA | ARN messager transcrit <i>in vitro</i> (<i>In vitro transcribed mRNA</i>) |
| kDa | Kilo Dalton |
| LBPA | Acide lysobisphosphatidique |
| Mn | Masse molaire en nombre |
| MOPS | Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique |
| MOPSO | Acide 2-hydroxy-3-morpholino-1-propanesulfonique |
| mV | Millivolt |
| Mw | Masse molaire en masse |
| nm | Nanomètre |
| N:P ratio | Ratio molaire entre les groupes amines (N) du chitosane et les groupes phosphates (P) de l'acide nucléique |
| NTA | Analyse du suivi individuel des nanoparticules (<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>) |
| PAA | Acide polyacrylic (<i>poly(acrylic acid)</i>) |
| PBAA | Acide poly(butyle acrylique) (<i>poly(butylacrylic acid)</i>) |
| PBAVE | Poly(butyle amino vinyl éther) |
| PEAA | Acide poly(éthyle acrylique) (<i>poly(ethylacrylic acid)</i>) |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| PEI | Polyéthylénimine |
| PIPES | Acide pipérazine-N,N'-bis(2-éthanesulfonique) |
| PLGA | Acide poly(lactique-co-glycolique) |
| PMAA | Acide poly(méthyle acrylique) (<i>poly(methylacrylic acid)</i>) |
| PPAA | Acide poly(propyle acrylique) (<i>poly(propylacrylic acid)</i>) |

| | |
|-----------|--|
| RES | Système réticulo-endothélial (<i>Reticuloendothelial System</i>) |
| ROS | Dérivé réactif de l'oxygène (<i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| RPMI-1640 | Roswell Park Memorial Institute medium numéro 1640 |
| TLR | Récepteur de type Toll (<i>Toll-like Receptor</i>) |
| TPP | Tripolyphosphate |
| VIH | Virus de l'immunodéficience humaine |

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Thérapie génique

L'idée de la thérapie génique est d'utiliser les acides nucléiques tels que les petits ARN interférents (pARNi), l'ADN plasmidique (ADNp) et l'ARN messager (ARNm) pour moduler l'expression d'un gène et par conséquent la synthèse d'une protéine. Les pARNi peuvent empêcher l'expression d'une protéine en clivant l'ARNm responsable de sa synthèse (Kim & Rossi, 2008). Ces pARNi peuvent être utilisés pour cibler des protéines essentielles au développement d'une tumeur. Par exemple, une étude clinique utilisant des pARNi a montré une stabilisation du cancer après 6 mois de traitement et une régression des métastases chez certains patients (Tabernero et al., 2013). À l'inverse, l'ADNp et l'ARNm génèrent une protéine. Ces acides nucléiques peuvent être utilisés pour tuer des cellules cancéreuses, en exprimant une protéine qui va induire la mort programmée des cellules (*i.e.* apoptoses) (Zarogoulidis et al., 2013). Il est toutefois nécessaire de s'assurer que ces protéines ne soient exprimées que dans les cellules cibles, sans quoi des cellules saines seront également éliminées. Une autre fonction de l'ARNm et l'ADNp est la vaccination, soit contre une maladie infectieuse ou contre le cancer. Dans ces cas, l'acide nucléique va coder pour un antigène présent sur le pathogène/cellule cancéreuse. Cet antigène sera ensuite reconnu par le système immunitaire qui va monter une réponse adaptative ciblée contre l'agent infectieux/cellule cancéreuse. Une autre utilisation très intéressante de l'ARNm et l'ADNp est de faire de l'édition du génome en remplaçant un gène défectueux par un gène sain pour guérir de façon permanente des maladies telles que l'hémophilie B (Ohmori et al., 2017) et la drépanocytose (Bourzac, 2017).

En somme, ces acides nucléiques ont une grande versatilité d'applications. Par exemple en 2017, sur les 3000 essais cliniques en thérapie génique, 65% portaient sur le traitement du cancer, 11% sur les maladies monogéniques, 7.4% sur les maladies cardiovasculaires et 7.4% sur les maladies infectieuses (Marie Beitelshes, Andrew Hill, Pooya Rostami, Charles H. Jones, & Blaine A. Pfeifer, 2017). Toutefois, les acides nucléiques sont instables dans le sang et ne peuvent atteindre leur site actif (cytosol de la cellule) lorsqu'ils sont injectés dans la circulation. Ils ont alors besoin d'un vecteur de livraison qui va les protéger de la dégradation et les aider à atteindre leur cible.

Un exemple de vecteur de livraison est le chitosane (CS); un polymère capable d'encapsuler les acides nucléiques pour former des nanoparticules qui sera discuté dans la section 2.3 Chitosane.

1.2 Problématique

Les nanoparticules à base de chitosane et acides nucléiques sont généralement moins toxiques/immunogéniques que leur contrepartie virale ou lipidique, mais comparativement à ces dernières, elles ont toutefois une efficacité de transfection qui est moindre. Une étude par Thibault *et al.* mentionne que lorsque les nanoparticules de chitosane/ADNp sont internalisées dans les cellules, une bonne proportion de celles-ci reste séquestrées dans l'endosome (estomac cellulaire) où elles seront dégradées (M. Thibault, S. Nimesh, M. Lavertu, & M. D. Buschmann, 2010). Une stratégie envisagée pour augmenter l'efficacité des nanoparticules de CS serait d'augmenter la libération endosomale.

Question de recherche : Comment augmenter l'échappement endosomal et par conséquent l'efficacité des nanoparticules de chitosane/ARNm *in vitro*?

1.3 Objectifs et hypothèse de recherche

L'objectif principal de ce projet de maîtrise est d'incorporer un agent endosomolytique, soit l'acide poly(propyle acrylique) (PPAA), dans le but d'augmenter l'efficacité de transfection des nanoparticules de CS/ARNm. Plus précisément, des nanoparticules de CS/ARNm/PPAA seront testées *in vitro* chez des cellules cancéreuses de poumon humain exprimant la EGFP (H1299 EGFP⁺) et comparées à la lipofectamineTM messenger max, une nanoparticule lipidique optimisée pour la livraison d'ARNm. Les propriétés physicochimiques de ces formulations (taille hydrodynamique, index de polydispersité, potentiel zêta) seront également mesurées. De plus, le PPAA sera titré dans le but de trouver son pKa puisqu'il y a une contradiction dans la littérature au sujet de cette valeur.

Hypothèses :

- Le pKa du PPAA sera supérieur à celui de l'acide poly(éthyle acrylique) (PEAA) (6.84), car l'augmentation de l'hydrophobicité diminue l'acidité d'une molécule.
- Le PPAA sera incorporé de manière électrostatique aux nanoparticules de CS/ARNm que s'il est suffisamment chargé (pH assez élevé grâce à un tampon).
- Les nanoparticules ternaires (CS/ARNm/PPAA) auront une efficacité de transfection supérieure aux formulations binaires (CS/ARNm), tout en étant non toxiques.
- L'augmentation de la transfection sera attribuée à un accroissement de la libération endosomale.

1.4 Structure générale du mémoire

Ce mémoire est divisé en plusieurs chapitres. En premier lieu, le **Chapitre 2** constitue une revue de la littérature qui présente les diverses composantes reliées à la nanoparticule développée dans ce projet ainsi que leur diverse utilisation en clinique ou d'autres groupes de recherche. Par la suite, le **Chapitre 3** présente une potentielle publication intitulée « *Poly(2-propylacrylic acid) increases in vitro bioactivity of chitosan/mRNA nanoparticles* », soumis au *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Cet article présente l'entièreté des résultats qui ont été générés dans ce projet de maîtrise. Par la suite, le **Chapitre 4** est une discussion générale des résultats présentés dans le **Chapitre 3**. Finalement, la conclusion ainsi que les recommandations pour des pistes de recherche futures sont présentées dans le **Chapitre 5**.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Ce chapitre présente les différents concepts qui seront abordés lors de ce projet de maîtrise. Premièrement la structure et fonctions de l'ARNm seront présentées ainsi que les obstacles qui limitent son entrée en clinique. Ensuite, son application dans le domaine biomédicale est décrite suivie des différents types de véhicules de livraison créés dans le but d'acheminer l'ARNm vers le cytosol des cellules cibles. Finalement, les différentes composantes de la nanoparticule développées dans ce projet seront abordées soit le chitosane, l'acide poly(propyle acrylique), le tampon et le tréhalose.

2.1 ARN Messenger (ARNm)

2.1.1 Structure et fonctions de l'ARNm

L'ARNm est un polymère anionique composé de nucléotides qui appartient à la grande famille d'acides nucléiques des ARN. Chaque nucléotide contient un phosphate, qui confère une charge négative à l'ARNm, un ribose et une base azotée. Les nucléotides sont reliés d'une telle façon que l'ARNm possède une extrémité 5' (phosphate) et une extrémité 3' (hydroxyle) ce qui donne une direction 5'→3' au polymère. L'ARNm comporte plusieurs différences avec l'ADN. Notamment, l'ARNm est simple brin alors que l'ADN est double brin et à un désoxyribose au lieu d'un ribose. De plus, la base azotée thymine est remplacée par l'uridine dans l'ARNm (Alberts, 2002). L'ARNm est moins stable que l'ADN à cause de sa structure monocaténaire et de son ribose qui peut induire une autohydrolyse (Voet, G Voet, & W. Pratt, 2018). Le pKa près de 1.0 du phosphate fait en sorte que l'ARNm est chargé négativement à pH physiologique. Il est à noter que les bases azotées peuvent également être ionisées, mais seulement à des pH extrêmes tels que <4 ou >9, selon le type de base (Thaplyal & Bevilacqua, 2014).

La fonction primaire de l'ARNm est de véhiculer l'information génétique de l'ADN vers le ribosome pour synthétiser une protéine. D'abord, un gène sous forme d'ADN est transcrit en ARNm (copie du gène). Cet ARNm va subir une maturation où il y aura l'ajout d'une coiffe en 5' et une queue polyA en 3' qui vont augmenter sa stabilité. L'ARNm quitte ensuite le noyau pour se rendre au cytosol où il sera traduit par un ribosome ce qui produira une protéine qui pourra avoir une fonction métabolique, structurelle, etc. (Bruce, 1989). Jusqu'à ce jour, aucun prix

Nobel n'a été octroyé pour cette découverte puisque le découvreur est toujours controversé (Cobb, 2015). Typiquement, un ARNm contient une coiffe, une région codante pour la protéine d'intérêt, une queue polyA ainsi que des régions en 5' et 3' qui ne codent pas pour la protéine (5'/3' UTR) (**Figure 2-1**). La coiffe et la queue polyA sont utiles non seulement pour la protection de l'ARNm, mais aussi pour se lier au ribosome lors de la traduction (H. Chang, Lim, Ha, & Kim, 2014; Gallie, 1991). Une queue polyA avec plus de 60 adénines monophosphates augmente l'efficacité de traduction (Elango, Elango, Shivshankar, & Katz, 2005). De plus, la séquence de la région 3'-UTR peut être modulée selon le taux de protéine désirée en contrôlant la stabilité de l'ARNm (C. Y. Chen & Shyu, 1995; Ross & Sullivan, 1985).

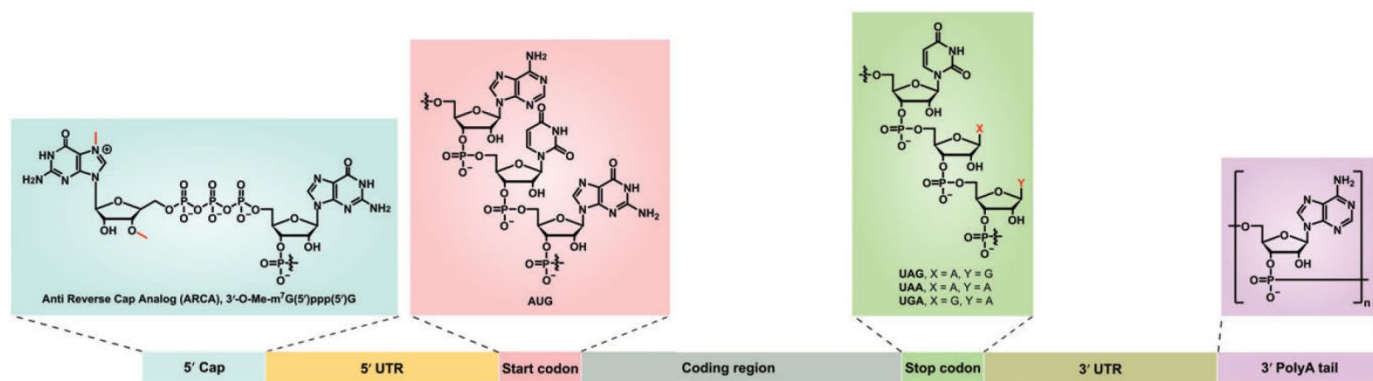


Figure 2-1 Structure typique d'un ARNm codant pour une protéine chez l'humain. Image adaptée de (Li, Zhang, & Dong, 2018) © Wiley 2018, reproduit avec permission.

Outre l'ARNm, on retrouve également les ARN de transferts (ARNt) qui acheminent les acides aminés vers le ribosome lors de la traduction, les ARN ribosomiaux (ARNr) qui constituent les ribosomes et les petits ARN interférents (pARNi) qui peuvent avoir une fonction thérapeutique en clivant un ARNm (Kim & Rossi, 2008).

2.1.2 Obstacles à l'administration

Pour que l'ARNm puisse produire sa protéine qui aura un effet thérapeutique, il doit se rendre au cytosol de la cellule. Pour atteindre ce site d'action, il doit d'abord **1**) éviter la dégradation dans le sang par les nucléases **2**) s'extravaser vers le tissu cible (*e.g.* tumeur) **3**) diffuser localement vers les cellules à travers la matrice extracellulaire **4**) rentrer dans la cellule **5**) s'échapper de la dégradation par l'endosome (estomac cellulaire) et **6**) atteindre le ribosome pour être traduit

(Meng et al., 2017). De plus, l'ARNm doit échapper au système immunitaire. Il est à noter que l'obstacle 1 et 2 peuvent être évités si l'administration se fait localement et non par voie systémique. Ce projet va se consacrer à relever l'obstacle 5 : libération endosomale.

Si l'ARNm simple (nu) est injecté par intraveineuse, il sera dégradé rapidement par les nucléases du sang. De plus la membrane plasmique ainsi que l'ARNm sont de même charge (anionique) ce qui fait en sorte que l'ARNm a tendance à être repoussé par les cellules. Si l'ARNm arrive à rentrer dans la cellule, il sera rapidement dégradé par les enzymes et le pH acide. Il y a donc eu un engouement pour développer des vecteurs (véhicules de livraison) qui vont pouvoir protéger l'ARNm et l'aider à pénétrer dans la cellule. Les différents types de vecteurs sont présentés dans la section 2.2 Vecteurs de livraison. Ces vecteurs peuvent être viraux, à base de lipides (lipoplexes) ou de polymère (polyplexes).

2.1.3 Utilisation de l'ARNm en thérapie génique

Au début, l'ARNm transcrit *in vitro* (IVT-mRNA) était très peu utilisé, car il pouvait être reconnu par divers *toll-like receptors* (TLR) ce qui induisait une réponse immunitaire et diminuait sa stabilité (Alexopoulou, Holt, Medzhitov, & Flavell, 2001; Heil et al., 2004). Une activation des TLR se traduit généralement par la production de cytokines proinflammatoires (Kawasaki & Kawai, 2014). Les travaux de Kariko *et al.* ont permis de réduire la réponse immunitaire de l'ARNm en incorporant des bases azotées modifiées qui sont naturelles tels que la pseudouridine (Ψ) (Kariko, Buckstein, Ni, & Weissman, 2005; Kariko et al., 2008). De plus, ces modifications augmentent l'efficacité de traduction. La réponse immunitaire résiduelle a été totalement éliminée suite à une purification des ARNm par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) pour enlever la contamination d'ARN double brin (ARNdb) ainsi que les ARNm qui ne contiennent pas de coiffe (Kariko, Muramatsu, Ludwig, & Weissman, 2011).

En transfection, l'ARNm a des avantages par rapport à l'ADNp. En premier lieu, l'ARNm n'a pas besoin de franchir la barrière du noyau comme l'ADNp qui doit être transcrit dans le noyau avant d'être traduit dans le cytosol (Michel, Wendel, & Krajewski, 2016). Puisque l'ARNm n'a pas à franchir la membrane nucléaire, il peut également transfecter des cellules qui ne sont pas en division cellulaire à l'opposé de l'ADNp qui transfecte plus facilement des cellules en division cellulaire où la membrane nucléaire est désagrégée. L'ARNm n'a pas besoin de

promoteur/terminateur dans sa séquence et le taux de protéine exprimé peut être prédit contrairement à l'ADNp (Tavernier et al., 2011). Un autre désavantage de l'ADNp est qu'il peut s'insérer dans le génome de l'hôte et causer une mutagenèse insertionnelle qui peut occasionner des cancers (Andreev, Terenin, Dmitriev, & Shatsky, 2016; Youn & Chung, 2015). Néanmoins, des modifications peuvent être faites sur le plasmide pour réduire la probabilité de telles mutations (Romano, 2012).

L'ARNm peut avoir plusieurs utilisations cliniques telles que le remplacement de protéines, l'édition de gènes et la vaccination thérapeutique contre le cancer et prophylactique contre les maladies infectieuses. L'avantage d'utiliser un ARNm comme vaccin est qu'il génère une réponse immunitaire plus rapidement que l'ADNp et il est moins coûteux que la synthèse de peptides *in vitro* (DeFrancesco, 2017). Toutefois, l'instabilité de l'ARNm limite l'expression de la protéine qu'a un court laps de temps (Uzgun et al., 2011). Une solution à ce problème est d'utiliser un ARNm qui peut s'autoamplifier (*self-amplifying mRNA*). Vogel et al. ont montré qu'un ARNm qui s'amplifie offre le même degré de protection contre la grippe qu'un ARNm normal, mais à une dose 64 fois moins élevée (Vogel et al., 2018). Les deux références suivantes présentent une liste exhaustive des différents essais cliniques utilisant l'ARNm à des fins de vaccin contre des maladies infectieuses (influenza, Zika) et contre le cancer (leucémie, glioblastome) (Hajj & Whitehead, 2017; Kaczmarek, Kowalski, & Anderson, 2017a). Dans ces articles, la plupart des études cliniques consistent en l'injection intramusculaire d'ARNm nu, avec quelques formulations utilisant des lipoplexes. Aucune formulation utilisée dans ces études cliniques ne contient des vecteurs de livraison à base de polymères. Dans les cas de vaccination, la stratégie la plus courante est de transfecter des cellules dendritiques *in vitro* puis les injecter dans le patient (*ex-vivo*) (Norbert Pardi, Michael J. Hogan, Frederick W. Porter, & Drew Weissman, 2018).

2.2 Vecteurs de livraison

Dans cette section, les vecteurs de livraison viraux et non viraux (lipidiques/polymériques) seront introduits. Ces vecteurs permettent entre autres de protéger l'ARNm de la dégradation, mais aussi l'internalisation cellulaire et la libération endosomale. Kreiter *et al.* ont administré un ARNm nu codant pour un antigène à des fins de vaccins où la réponse immunitaire est désirée. Les voies

d'injection utilisées étaient : sous-cutanée, intradermale, périnodulaire et intranodulaire. Seulement l'injection intranodulaire a réussi à générer une réponse immunitaire, ce qui illustre l'importance d'avoir un véhicule de livraison afin que l'ARNm puisse être protégé et générer son effet thérapeutique (Kreiter et al., 2010).

2.2.1 Vecteur de livraison viraux

Les virus sont très performants, car ils ont l'avantage d'avoir évolué pendant des millions d'années ce qui leur a permis de développer toutes sortes de mécanismes de pénétration cellulaire (*e.g.* peptides de pénétration) afin d'acheminer leur ADN/ARN dans une cellule hôte et les infecter. Parmi les virus utilisés en thérapie génique, on retrouve notamment les adénovirus, les virus herpès, les rétrovirus et les lentivirus (Lundstrom, 2018), dont quelques caractéristiques sont fournies dans le **Tableau 2-1** ci-dessous.

Tableau 2-1 Caractéristiques et applications de quelques virus utilisés en thérapie génique. (Tableau tiré de Lundstrom, 2018).

| Virus | Genome | Insert Capacity | Features |
|------------------------------|--------|-----------------|---|
| Adenoviruses Ad5 | dsDNA | <7.5 kb | broad host range transient expression strong immunogenicity |
| AAV AAV2, 3, 5, 6, 8, 9 | ssDNA | <4 kb | relatively broad host range slow expression onset chromosomal integration immune response |
| Herpes simplex HSV1, HSV | dsDNA | >30 kb | broad host range latent infection, long-term expression |
| Retroviruses MMSV MSCV | ssRNA | 8 kb | low toxicity, large insert capacity transduces only dividing cells long-term expression random integration |
| Lentiviruses HIV-1, HIV-2 | ssRNA | 8 kb | broad host range low cytotoxicity, integration long-term expression |

Plusieurs modifications sont effectuées sur les virus « sauvages » afin de réduire leur virulence, telles que la délétion d'un gène pour rendre le virus incapable de se répliquer (Srinivasakumar, 2001). Toutefois, leur utilisation en clinique est limitée par leur immunogénicité, la taille limitée

de l'ARN/ADN qui peut être chargé dans le virus (~7 kb) et leur capacité à s'insérer dans le génome ce qui peut causer des mutations néfastes (Lundstrom, 2018). Par exemple, une étude clinique datant de la fin des années 1990 a utilisé un rétrovirus pour traiter dix enfants dépourvus de système immunitaire. Le but de cette étude était de redonner un système immunitaire aux enfants en livrant le gène IL2RG (partie essentielle des récepteurs des cellules B et T). Malheureusement, deux de ces enfants ont développé la leucémie à cause d'une mutagenèse insertionnelle du virus dans le proto-oncogène LMO2 (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; McCormack & Rabbitts, 2004). Ce type de résultats a donné un élan pour développer des alternatives aux vecteurs viraux, tels que des vecteurs à base de lipides, polymères, inorganiques, etc. Néanmoins, en 2017, 70% des essais clinique en thérapie génique utilisaient un virus comme vecteur de livraison (M. Beitelshees, A. Hill, P. Rostami, C. H. Jones, & B. A. Pfeifer, 2017). De plus, le médicament à base de lentivirus Kymriah® fut le premier produit conçu pour la thérapie génique à être accepté par la FDA (Food and Drug Administration) dans le but de traiter la leucémie aiguë lymphoblastique (Philippidis, 2017). Pour plus de détails sur les virus, le lecteur est invité à consulter la revue suivante (Lundstrom, 2018).

2.2.2 Vecteur de livraison lipidiques (lipoplexes)

Les liposomes (lipoplexes) sont des vésicules constituées de phospholipides. La nature amphiphile des phospholipides permet la formation spontanée de vésicules sphériques à bicouche lipidique, avec un cœur hydrophile qui peuvent encapsuler des molécules hydrophiles telles que les acides nucléiques. Les liposomes sont le mode de livraison le plus utilisé pour l'ARNm (B. Li et al., 2018). Les phospholipides cationiques tels que le N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride (DOTMA), ont l'avantage de se coller sur la membrane cellulaire anionique (interactions électrostatiques) et faciliter l'internalisation (Maier et al., 2013). Toutefois, les liposomes cationiques ont des inconvénients tels que l'agrégation dans le sang, une rapide clairance par le système réticuloendothélial (RES) dans le foie et la rate ainsi qu'une forte toxicité *in vivo* (Kedmi, Ben-Arie, & Peer, 2010; Lv, Zhang, Wang, Cui, & Yan, 2006). Pour pallier à ces problèmes, des lipides « assistant » (*helper lipids*), cholestérol ou phospholipides pegylés (contiens du polyéthylène glycol, PEG) peuvent être incorporés dans les liposomes (Oberli et al., 2017). Le cholestérol augmente la stabilité et la fusion membranaire (Cheng & Lee,

2016) tandis que la pegylation empêche l'agrégation et évite la clairance par le système RES par répulsion stérique (Kolate et al., 2014). Toutefois, la pegylation peut également nuire à l'efficacité des liposomes en diminuant les interactions cellules-liposomes (Fang et al., 2017). La stimulation du système immunitaire par des nanoparticules à base de lipides est un autre problème significatif et est, en autres, la raison pour laquelle la FDA a demandé l'arrêt du développement d'un bon nombre de médicaments suite à des incidents de symptômes de grippe sévère survenant durant et après l'infusion de ces nanoparticules (Wittrup & Lieberman, 2015). Toutefois, cette stimulation immunitaire peut être réduite soit en effectuant une co-injection des liposomes avec des anti-inflammatoires tels que la dexaméthasone (Abrams et al., 2010; Judge, McClintock, Phelps, & Maclachlan, 2006) ou en diminuant la dose injectée. La dose peut être diminuée si l'efficacité des liposomes est augmentée (*e.g.* internalisation supérieure).

La livraison d'ARNm par le biais de liposomes est utilisée pour une multitude d'applications telles que la reprogrammation de cellules cardiaques avec de la lipofectamine (K. Lee et al., 2015), de l'immunothérapie contre le cancer (Oberli et al., 2017) et de l'édition du génome avec l'ARNm Cas9 (Finn et al., 2018). De plus, les liposomes ont été employés en vaccination. Par exemple, le groupe de Pardi *et al.* a réussi à protéger des souris contre les virus Zika et VIH en livrant un ARNm codant pour une partie du virus Zika/anticorps anti-VIH, respectivement (Pardi, Hogan, et al., 2017; Pardi, Secreto, et al., 2017). Pour plus d'exemples de nanoparticules lipidiques pour livrer l'ARNm, le lecteur est référé aux sources suivantes (B. Li et al., 2018; Meng et al., 2017).

2.2.3 Vecteur de livraison polymériques (polyplexes)

Les polymères cationiques peuvent condenser les acides nucléiques afin de les protéger de la dégradation par les nucléases et de les empêcher d'interagir avec les *toll-like receptors* (TLR) (Yin et al., 2014). La polyéthylèneimine (PEI) est l'un des polymères les plus utilisés en raison de sa forte densité en groupement amine qui lui procure une bonne affinité pour les acides nucléiques ainsi qu'une bonne capacité tampon pour s'échapper de l'endosome (Boussif et al., 1995). Lorsque mélangé avec l'ARNm, il y aura formation spontanée de nanoparticules (polyplexes). Une des applications de ces nanoparticules est la vaccination. Demoulin *et al.* ont utilisé du PEI modifiée avec de l'histidine pour encapsuler un ARNm codant pour

l'hémagglutinine du virus Influenza. Après injection sous-cutanée, les souris ont pu développer une réponse immunitaire humorale/cellulaire contre l'influenza (Demoulins et al., 2016). Pour reprogrammer des cellules adipeuses en cellules souches pluripotentes, la PEI a été conjuguée à l'oxyde de graphite afin de livrer un ARNm codant pour des facteurs de transcription (Choi et al., 2016). Toutefois, la PEI a une forte toxicité et n'est pas biodégradable ce qui limite son application en thérapie génique (Kafil & Omid, 2011; S. K. Tripathi, R. Goyal, P. Kumar, & K. C. Gupta, 2012).

Un remplaçant potentiel du PEI est la poly(β -amino esters). Cappaso Palmiero *et al.* ont montré qu'un copolymère de poly(β -amino esters)-co-poly(caprolactone) est entièrement biodégradable et est plus efficace que la PEI pour livrer l'ARNm dans un contexte de vaccination/immunothérapie contre le cancer (Capasso Palmiero, Kaczmarek, Fenton, & Anderson, 2018). Un autre bon candidat est le chitosane (voir **section 2.3 Chitosane**). Mahiny *et al.* ont utilisé un copolymère de chitosane et d'acide poly(lactique-co-glycolique)(PLGA) pour livrer un ARNm codant pour une nucléase à doigt de zinc dans le but d'éditer le génome chez la souris. Ils ont trouvé que leurs nanoparticules étaient faiblement immunogéniques et étaient plus efficace que la formulation virale à base d'adénovirus (Mahiny et al., 2015).

De leur côté, Uchida *et al.* ont développé un copolymère de PEG-polyaspartamide conjugué avec du cholestérol. Le cœur de la nanoparticule hydrophobe (cholestérol) a augmenté la stabilité du polyplexes en empêchant la décomplexation prématurée. L'ARNm livré codait pour une protéine qui inhibait l'angiogénèse (production de vaisseaux sanguins). L'inhibition de la croissance tumorale a pu être observée suite à l'injection systémique de ces micelles chez la souris (Uchida et al., 2016). Toutefois, la dose maximale pouvant être injectée ainsi que la tolérance *in vivo* n'ont pas été évaluées. Pour plus d'exemples sur les polyplexes, le lecteur est référé à la revue de littérature suivante (Stanton, 2018).

2.3 Chitosane

2.3.1 Structure et propriétés physicochimiques du chitosane

La chitine est un homopolymère linéaire constitué d'unités N-acétyle-glucosamine qui est retrouvé dans la carapace des crustacés, insectes et champignons. Une réaction de déacétylation

sur la chitine peut être réalisée pour générer du chitosane, polymère constitué d'unités glucosamine (unité D) et N-acétyl-glucosamine (unité A) reliées par un lien β (1-4) glycosidique (**Figure 2-2**). Cette déacétylation peut se faire de façon aléatoire ou en « bloc » selon la méthode utilisée (Buschmann et al., 2013). Le chitosane et la chitine sont les deuxièmes polymères naturels les plus abondants sur la terre après la cellulose.

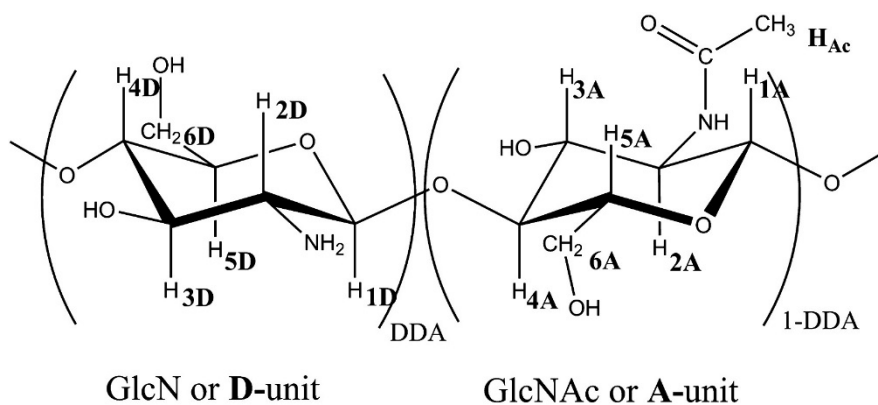


Figure 2-2 Structure chimique du chitosane avec les unités déacétylées de glucosamine (D-unit) et les unités N-acétyl-glucosamine (A-unit). Image adaptée de (Buschmann et al., 2013) © Elsevier 2018, reproduit avec permission.

Le chitosane a plusieurs caractéristiques qui motivent son application dans le domaine biomédical, notamment sa biocompatibilité, sa nature muco-adhésive ainsi qu'une faible toxicité et coût de production (Buschmann et al., 2013). Le chitosane (CS) peut également être modifié chimiquement, ce qui permet de greffer des molécules qui peuvent procurer des avantages additionnels tels qu'augmenter sa capacité tampon et éviter la détection par le système immunitaire (J. Li et al., 2018). De plus, le chitosane est biodégradable dans le corps humain par des enzymes telles que le lysozyme qui est retrouvé dans le sérum et à plus grande concentration dans les sécrétions telles que la salive, les larmes et mucus (Andrea, Marica, & Anamarija, 2017; Costa-Pinto et al., 2014; Ren, Yi, Wang, & Ma, 2005). Ce polymère peut également être dégradé dans le colon par des enzymes bactériennes (Hirano, Tsuchida, & Nagao, 1989; Y. M. Yang, Hu, Wang, & Gu, 2007).

Le chitosane peut être caractérisé par sa masse molaire et son degré de déacétylation (DDA). La masse molaire en masse (M_w) et la masse molaire en nombre (M_n) représentent la longueur du polymère et peuvent être mesurés par diffusion de la lumière ou par chromatographie d'exclusion

de taille, respectivement (Buschmann et al., 2013). L'indice de polydispersité (PDI) peut être calculé en effectuant le ratio M_w/M_n . Ceci donne une idée de la distribution de la taille des chaînes de CS dans un échantillon. Plus l'IP est proche de 1, plus l'échantillon est monodisperse (*i.e.* les chaînes de polymères ont la même taille).

Le degré de déacétylation (DDA) représente la fraction molaire de motif déacétylé (unité D) et peut être calculé selon l'équation 2.3.1, où A et D représentent les motifs acétylés et déacétylé, respectivement.

$$\% DDA = \left(\frac{D}{D+A} \right) * 100 \quad \text{Eq.2.3.1}$$

Le DDA est un paramètre très important du chitosane, car il contrôle son affinité envers les acides nucléiques ainsi que sa solubilité et biodégradabilité. Le pKa du CS est autour de 6.5-6.7, ce qui veut dire que a des pH plus faibles, la majorité des unités D seront chargées positivement grâce à leur groupe amine qui devient protonné (Filion, Lavertu, & Buschmann, 2007). Ces groupes amines chargés positivement peuvent interagir électrostatiquement avec les charges négatives des phosphates des acides nucléiques (*e.g.* ADNp, ARNm, pARNi, etc) ce qui conduit à la formation spontanée de nanoparticules (M. Alameh, Jean, Dejesus, Buschmann, & Merzouki, 2010; Buschmann et al., 2013). Un haut DDA est alors avantageux dans le cadre de livraison d'acides nucléiques. Toutefois, ceci aura un impact négatif sur sa biodégradabilité. En effet, le lysozyme va hydrolyser une séquence glucosamine-N-acetyl-glucosamine, ce qui veut dire qu'augmenter le DDA du CS diminue sa biodégradabilité (Kean & Thanou, 2010). Huang *et al.* ont trouvé qu'augmenter le DDA du CS dans les polyplexes augmentait sa cytotoxicité (Huang, Khor, & Lim, 2004). Ceci pourrait causer un problème d'accumulation dans les tissus si la période d'administration se fait sur une longue durée (Muzzarelli, 1997).

2.3.2 Utilisation du chitosane dans des polyplexes d'acides nucléiques

Cette section sera consacrée aux paramètres qui influencent l'efficacité des nanoparticules de chitosane pour la livraison d'acides nucléiques. Toutefois, il est important de savoir que le CS est utilisé dans une multitude d'applications médicales, avec quelques formulations qui ont été approuvées par les agences de santé (*e.g.* FDA, EMA), comme l'Axiostat[®] pour le traitement des

plaies et le BST-CarGel[®] pour la réparation du cartilage. Pour une liste plus détaillée, le lecteur est invité à consulter la revue de Munawar *et al.* qui présente les différentes molécules thérapeutiques et voies d'administration utilisée par les nanoparticules de chitosane (Mohammed, Syeda, Wasan, & Wasan, 2017).

En premier lieu, il a été mis en évidence par plusieurs études que l'efficacité de transfection maximale se faisait à une combinaison particulière de DDA et Mn (Kiang, Wen, Lim, & Leong, 2004; Marc Lavertu, Méthot, Tran-Khanh, & Buschmann, 2006; Nimesh, Thibault, Lavertu, & Buschmann, 2010; Sato, Ishii, & Okahata, 2001; Marc Thibault, Surendra Nimesh, Marc Lavertu, & Michael D. Buschmann, 2010). Lavertu *et al.* ont montré que la combinaison haut DDA et haut Mn était très stable, mais n'avait pas une bonne efficacité de transfection, car le chitosane restait fortement lié à l'ADNp, et ce jusqu'à 24h post-transfection (M. Lavertu, Methot, Tran-Khanh, & Buschmann, 2006). Cette stabilité en condition de haut DDA et haut Mn est reliée à une augmentation de l'affinité entre les deux polymères (CS/ADNp), telle que révélée par des mesures de titration calorimétrique (Ma, Lavertu, Winnik, & Buschmann, 2009). À l'opposé la combinaison faible DDA et faible Mn avait une internalisation cellulaire réduite et donc une efficacité faible, probablement à cause que les nanoparticules se désassemblaient prématurément et l'ADNp était détruit suite à une exposition aux hydrolases et un environnement acide. La meilleure combinaison était un haut DDA et un faible Mn où les nanoparticules se désassemblent au même moment qu'elles s'échappent de l'endosome, soit 12h post-transfection (M. Thibault et al., 2010).

Un autre paramètre important est le pH. Il a été montré que le meilleur pH de transfection est entre 6.5-7.0 pour les polyplexes de CS/ADNp et CS/ARNm et qu'aller à des valeurs supérieures diminue leur bioactivité, car le CS n'est pas suffisamment chargé pour se lier à l'acide nucléique (Lallana et al., 2017; Marc Lavertu et al., 2006). Pour les polyplexes de CS/pARNi à haut DDA, le pH de transfection optimal est décalé vers 6.5-7.4 (Mohamad Alameh et al., 2018). Lanalla *et al.* furent les premiers à livrer l'ARNm à l'aide du CS et l'acide hyaluronique (HA) (Lallana et al., 2017). Leur transfections étaient plus performantes à un pH de 6.4 comparé à un pH neutre ce qui suggère que ce type de polyplexe serait plus approprié pour une administration intra ou péri tumoral où le pH est légèrement acide (L. Q. Chen & Pagel, 2015; Kato et al., 2013).

Le ratio N:P (ratio molaire d'amine du chitosane : phosphate de l'ARNm) est un autre paramètre important à considérer. Un fractionnement d'écoulement de champs (AF4) effectué sur des nanoparticules préparées à un ratio N:P >2 a révélé qu'une bonne proportion du chitosane n'est pas lié aux polyplexes (Ma, Buschmann, & Winnik, 2010). Ce chitosane libre peut influencer l'efficacité de transfection. Par exemple, des nanoparticules de CS/ADNp formulées à N:P 2 n'ont pas réussi à transférer des cellules de rein embryonnaires (HEK293), contrairement à un N:P 5. Il a été proposé que le chitosane libre présent à N:P 5 augmente la libération endosomale par l'effet d'éponge à protons (Thibault et al., 2011), un mécanisme qui sera discuté en détail dans la **section 2.4.2**. En comparaison, les polyplexes de CS/pARNi sont souvent utilisés à des ratios N:P plus élevés (≥ 25) (Liu et al., 2007; Malmo, Sorgard, Varum, & Strand, 2012). Un ratio N:P plus élevé implique une plus grande quantité de chitosane libre qui peut potentiellement augmenter la libération endosomale, mais aussi la toxicité des nanoparticules.

En ce qui a trait à la toxicité, les nanoparticules de CS/pARNi ont montré une faible réduction de la viabilité cellulaire (~10%) pour de faibles Mn à haut DDA et que une dose de chitosane ≥ 7 mg/kg pouvait induire de l'hémagglutination sans toutefois être génotoxiques (Mohamad Alameh et al., 2018). Une autre étude a montré que le chitosane était capable d'induire de la nécrose cellulaire et déclencher une réponse immunitaire en interagissant avec la pompe Na^+/K^+ ATPase (Wei et al., 2015). Plusieurs études suggèrent une toxicité minimale du chitosane à des N:P de 5 à 60 (M. Alameh et al., 2012; M. Alameh et al., 2010; M. Lavertu et al., 2006) et une réduction significative de l'activité métabolique à un N:P très élevé de 150 chez des cellules H1299 (Liu et al., 2007). De plus, un haut ratio N:P peut causer des effets néfastes avec le sang, puisque le chitosane peut interagir avec les composantes du sang, telles que le fibrinogène, les érythrocytes et d'autres biomacromolécules anioniques en raison de sa nature cationique (Balan & Verestiuc, 2014; X. Guo et al., 2018). Un désavantage du CS est qu'il possède une faible capacité de libération endosomale ainsi qu'une grande affinité envers l'ADNp, ce qui peut limiter la dissociation de l'ADNp des complexes dans le cytoplasme (Koping-Hoggard, Mel'nikova, Varum, Lindman, & Artursson, 2003; Koping-Hoggard et al., 2001; M. Lavertu et al., 2006; Lu, Dai, Lv, & Zhao, 2014; Mao, Sun, & Kissel, 2010; M. Thibault et al., 2010). Les modifications apportées aux polyplexes de chitosane dans le but d'augmenter la libération endosomale seront

abordées dans la section 2.4.5 Introduction Augmentation de la libération endosomale du chitosane.

2.4 Libération Endosomale

Le phénomène d'internalisation cellulaire (endocytose) est très complexe et contient plusieurs catégories telles que l'endocytose clathrine dépendante, cavéole dépendante, clathrine et cavéole indépendante, phagocytose, macropinocytose, etc (Xiang et al., 2012). La voie d'internalisation qui sera utilisée va dépendre de plusieurs facteurs tel que les propriétés physicochimiques des nanoparticules (taille, charge de surface, nature chimique, présence de ligands) et le type cellulaire (Kou, Sun, Zhai, & He, 2013). Ces propriétés vont affecter la nature de la couronne de protéines (protéines qui se déposent à la surface de la nanoparticule), qui à son tour va affecter la cinétique/voie d'internalisation (Bertrand et al., 2017; Ho, Kamm, & Kah, 2018; Konduru et al., 2017). En général, lorsque les nanoparticules sont internalisées dans les cellules, elles seront enveloppées par un sac membranaire (vésicule d'internalisation). La nature de ces vésicules va dépendre de la voie endocyttaire qui est empruntée. Par exemple, les vésicules de clathrine ont un diamètre autour de 100-150 nm tandis que celle à base de cavéole font 50-80 nm (Benmerah & Lamaze, 2007; Wang, Tiruppathi, Minshall, & Malik, 2009). En général, ces vésicules d'internalisation vont fusionner avec un autre type de vésicules appelés les endosomes précoces qui vont commencer à s'acidifier (pH ~6.5) et mûrir en endosome tardif (pH ~5.5) puis en lysosome (pH ~4.5)(Hu, Dammer, Ren, & Wang, 2015)(**Figure 2-3**). Lors de cette maturation, les endosomes peuvent envoyer une partie de leur contenu vers l'appareil de Golgi et/ou membrane plasmique afin d'échapper à la dégradation (Alberts, 2002). Il a aussi été proposé que pour la voie cavéoline dépendante, le contenu internalisé passe plutôt par un caveosome, une vésicule qui ne va pas s'acidifier et ne pas fusionner avec les lysosomes (Bengali, C.Rea, & Shea, 2007). Ceci est toutefois débattu (Kiss & Botos, 2009). Néanmoins, les nanoparticules doivent s'échapper des endosomes/lysosomes afin d'éviter la dégradation par le faible pH et les hydrolases (**Figure 2-4**).

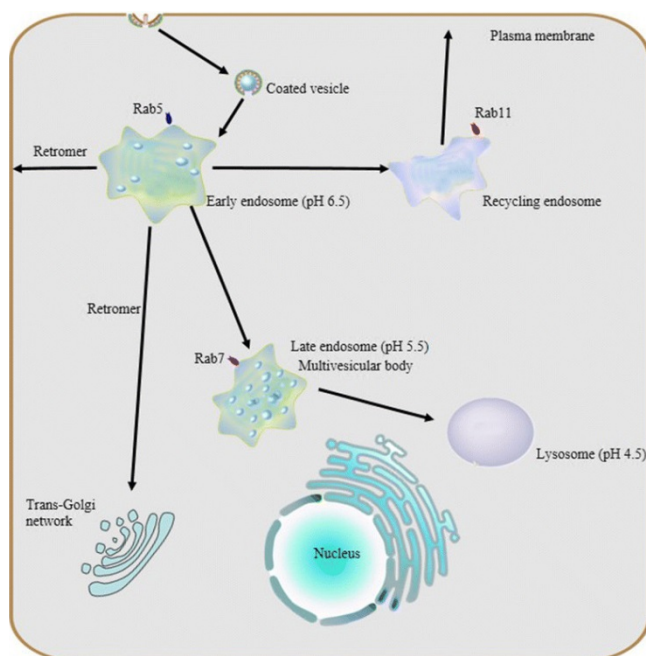


Figure 2-3 Schéma de la maturation de l'endosome. Image de (Hu et al., 2015) © Springer 2018, reproduit avec permission.

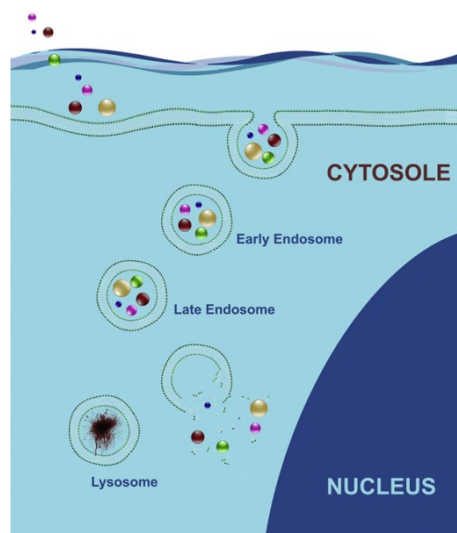


Figure 2-4 Échappement endosomal des molécules thérapeutiques. Image de (Varkouhi, Scholte, Storm, & Haisma, 2011) © Elsevier 2018, reproduit avec permission.

Pour y arriver, des agents endosomolytiques (*i.e.* capables de détruire les endosomes) peuvent être incorporés dans ces vecteurs de livraison. Ce sont généralement des protéines/peptides qui peuvent avoir une origine virale (*e.g.* l'hémagglutinine de l'influenza), bactérienne (*e.g.* toxine

diphthérique), végétale (*e.g.* ricine) et animale (*e.g.* mellitine du venin d'abeille). Ces agents sont généralement modifiés afin de réduire leur toxicité (Varkouhi, Scholte, Storm, & Haisma, 2011). On retrouve également des molécules simples telles que l'imidazole et la chloroquine ainsi que des polymères synthétiques. Idéalement, ces agents devraient avoir un mécanisme d'action qui est pH-dépendant, et agit seulement lorsqu'ils se retrouvent à bas pH (dans les endosomes). Dans cette prochaine section, quelques stratégies de libération endosomale seront d'abord présentées suivies des améliorations faites sur le chitosane afin d'augmenter son échappement endosomal.

2.4.1 Éviter complètement la voie endocytaire ou les lysosomes

Une première astuce suggérée est de complètement éviter la voie endocytaire (*lysosome bypass*) en fusionnant directement avec la membrane plasmique et livrer les acides nucléiques dans le cytosol. Ceci peut être fait en équipant les nanoparticules avec des peptides de pénétration cellulaire (*cell penetrating peptides, CPP*), tels que HIV-TAT, qui permettent la translocation à travers la membrane plasmique des cellules (Little & Kohane, 2008). D'autres articles au contraire vont mentionner que les CPP utilisent la voie d'endocytose (Lundin et al., 2008; J. P. Richard et al., 2003). En bref, leur mécanisme d'action est très peu connu, complexes et très diversifiés (Fretz et al., 2006; Futaki, 2005; Gestin, Dowaidar, & Langel, 2017).

Une autre stratégie pour éviter les lysosomes est de cibler l'endocytose cavéoline dépendante en incorporant des ligands qui vont se lier à une molécule présente dans les cavéoles (Bathori, Cervenak, & Karadi, 2004). Néanmoins, il a été proposé que le transit à travers les lysosomes est bénéfique pour les nanoparticules de CS/ADNp, en dégradant partiellement le CS, ce qui diminue son affinité envers l'ADNp, facilitant ainsi la dissociation de la nanoparticule une fois rendue dans le cytosol (M. Thibault et al., 2010). Cependant, ce transit doit être de courte durée pour éviter la dégradation du cargo (l'acide nucléique).

2.4.2 Hypothèse de l'éponge à proton (*Proton-sponge hypothesis*)

Cet effet a été observé chez des polymères cationiques qui possèdent une forte capacité tampon autour des pH acides. Ils contiennent généralement des amines tertiaires et/ou secondaires. Lorsque l'endosome mature, celui-ci pompe des protons vers sa lumière grâce à une pompe H^+ ATPase. Pour chaque proton pompé, un ion chlore diffuse vers l'intérieur de l'endosome afin de

respecter l'électroneutralité. Lorsqu'un de ces polymères se retrouve dans l'endosome, les protons vont d'abord aller se lier aux groupes amines, et comme le pH cible n'est pas atteint, la pompe va continuer de pomper des protons et ainsi augmenter l'osmolarité au sein de l'endosome. L'eau va ensuite rentrer dans l'endosome par osmose, ce qui va augmenter la pression osmotique interne et faire gonfler l'endosome jusqu'à sa rupture (Behr, 1997; Boussif et al., 1995; Pack, Hoffman, Pun, & Stayton, 2005). Le contenu de l'endosome se répand alors dans le cytosol et les nanoparticules sont libérées. Cette hypothèse est entre autre supportée par les travaux de Sonawane *et al.* qui ont mesuré l'effet de deux polymères sur les endosomes soit la polyéthylèneimine (PEI), qui possède une forte capacité tampon en raison de sa grande densité en amine, et la polylysine (PLL), qui pour sa part ne possède pas de capacité tampon au pH endosomal (Sonawane, Szoka, & Verkman, 2003). Ils ont découvert qu'en présence de PEI, les endosomes avaient un volume plus grand et contenaient une plus grande accumulation d'ion chlorure, ce qui n'était pas le cas pour la PLL. De plus, l'addition d'un inhibiteur d'acidification endosomale (bafilomycine A1) abolit l'efficacité de libération du PEI (Merdan, Kunath, Fischer, Kopecek, & Kissel, 2002). De son côté, le chitosane libre possède une capacité tampon plus forte que la PEI, mais lorsque complexé avec de l'ADNp, sa capacité est réduite de moitié (I. Richard, Thibault, De Crescenzo, Buschmann, & Lavertu, 2013).

Récemment, une étude qui a utilisé des pARNi marqués avec un fluorophore a décrit que ces molécules sortaient de l'endosome dans une direction unique, ce qui suggère que les endosomes n'explorent pas, mais ont plutôt une fuite dans leur membrane (ur Rehman, Hoekstra, & Zuhorn, 2013). De plus, la membrane intérieure endosomale accumule de l'acide lysobisphosphatidique (LBPA), un phospholipide anionique (Bissig & Gruenberg, 2014). En considérant ces résultats, une équipe de recherche a proposé des mécanismes additionnels qui interviennent dans l'effet *proton-sponge*. En premier, il y a une interaction électrostatique entre le polymère cationique et le LBPA anionique. Cette interaction est amplifiée avec la protonation des amines (lors de l'acidification) ce qui perméabilise/déstabilise de façon locale la membrane. Ensuite il y a une augmentation de la pression osmotique interne (telle que décrit précédemment). Lorsque cette pression atteint une valeur critique, elle donne une impulsion mécanique, ce qui conduit à l'éjection partielle du contenu des endosomes, entraînant la libération des acides nucléiques et polycations de l'endosome (Durymanov & Reineke, 2018). Il y aurait alors deux composantes en

jeu dans la libération endosomale par *proton-sponge* soit la pression osmotique et l'interaction électrostatique avec LBPA (**Figure 2-5**).

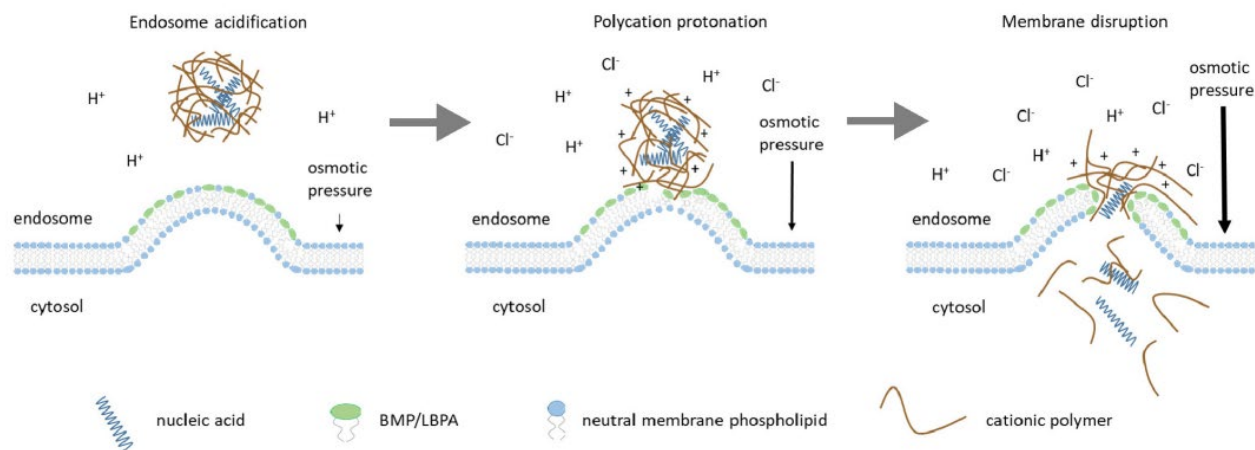


Figure 2-5 Mécanisme de libération endosomale proposé par *proton-sponge*. Image de (Durymanov & Reineke, 2018) © Frontiers in Pharmacology 2018, reproduit avec permission.

2.4.3 Fusion et déstabilisation de la membrane endosomale

Tel que mentionné précédemment, le mécanisme d'entrée cellulaire des CPP fait l'objet de controverses. Ces peptides sont amphiphiles avec leur domaine hydrophobe caché à pH physiologique. Pour ceux qui sont endocytosés, l'acidification provoque un changement de conformation, exposant le domaine hydrophobe et permettant ainsi à celui-ci de s'insérer dans la membrane endosomale et la déstabiliser/créer des pores ce qui libère le contenu de l'endosome (Liang & Lam, 2012). Il existe aussi des CPP qui ont un domaine de fusion qui est exposé à pH physiologique et acide tel que la protéine gp41 du VIH (Kwon, Bergen, & Pun, 2008), ce qui permet la fusion avec la membrane plasmique ou endosomale. La melittine, qui est retrouvée dans le venin d'abeille, peut également former des pores/fusionner avec les membranes. L'incorporation de ce peptide dans des nanoparticules pour livrer des pARNi a augmenté l'efficacité de silencage *in vitro* dans des cellules de cancer bronchique H1299 et *in vivo* (Feldmann et al., 2018).

Un exemple de polymère est le poly(butyle amino vinyl éther) (PBAVE) qui a été utilisé dans la livraison de pARNi. La nanoparticule contient du PBAVE pour déstabiliser les membranes, du polyéthylène glycol (PEG) pour augmenter sa circulation et un ligand pour cibler les hépatocytes

(Rozema et al., 2007). Les auteurs de cette formulation ont obtenu d'excellents résultats précliniques avec 99% de silençage et ont commencé des essais cliniques (Yin et al., 2014). Divers CPP ont été incorporés au chitosane tel que le peptide TAT, pénétratine, octarginine, etc dans le but d'augmenter l'internalisation cellulaire ou libération endosomale (Layek, Lipp, & Singh, 2015).

2.4.4 Libération par photochimie

Une autre stratégie très intéressante de libération endosomale est l'internalisation photochimique (*photochemical internalization*). Des agents photosensibles amphiphiles vont d'abord se loger dans la membrane plasmique puis sont internalisés et restent séquestrés dans la membrane des endosomes. Une longueur d'onde spécifique est ensuite appliquée, ce qui active la production de dérivé réactif de l'oxygène (ROS) chez ces agents qui vont déstabiliser la membrane endosomale jusqu'à sa rupture (Ohtsuki et al., 2015). Un avantage est que les ROS produits par ces agents photosensibles ont une demi-vie très courte (0.01 à 0.04 μ s) et agissent à de faibles distances (10-20 nm) ce qui limite les dommages uniquement au niveau de la membrane endosomale (Selbo et al., 2010). Un avantage *in vivo* est de limiter la libération endosomale à un endroit précis (*e.g.* tumeur) en irradiant la zone d'intérêt. Ceci est très utile surtout lorsque l'ADN/ARN livré va produire une protéine qui va tuer la cellule. Les acides nucléiques seront dégradés dans les cellules saines non irradiées et n'auront pas d'effet adverse. Un inconvénient est d'acheminer la lumière jusque dans les organes qui sont profondément enfouis dans le corps tels que les poumons et le pancréas (Oliveira, Fretz, Høgset, Storm, & Schiffelers, 2007). Toutefois, avec l'avancement de la technologie en fibres optiques et laser, ce type de libération endosomale devient de plus en plus réalisable (Liang & Lam, 2012). D'ailleurs, les agents photosensibles ont déjà été utilisés *in vitro* et *in vivo* dans la livraison d'ADNp. Par exemple, c'est grâce à ces agents photosensibles que Nishiyama *et al.* ont réussi à augmenter de 100 fois l'efficacité *in vitro* de leurs nanoparticules constituées d'un cœur d'ADNp recouvert d'un peptide cationique qui est lui-même recouvert d'un dendrimère anionique (Nishiyama et al., 2005). Cette formulation a également fonctionné *in vivo* suite à une injection sous-conjonctivale et intraveineuse (Nomoto et al., 2014). En plus de la livraison d'acides nucléiques, cette méthode est aussi utilisée pour livrer des peptides chez des cellules présentatrices d'antigènes, dans le but de créer un vaccin contre le

cancer. Une augmentation d'un facteur 30 à 100 est rapportée *in vitro* lorsque la photochimie est employée (Haug et al., 2018).

2.4.5 Augmentation de la libération endosomale du chitosane

Plusieurs formulations ont incorporé des agents endosomolytiques dans le but d'augmenter l'efficacité de transfection et ainsi réduire la dose administrée en chitosane/acide nucléique. Une première expérience a greffé du PEI de petite taille (1.5 kDa) sur du CS pour livrer de l'ADNp (Lu et al., 2014). La capacité tampon de cette formulation était plus élevée que celle à base de CS/ADNp et l'efficacité de transfection était comparable au contrôle lipidique Lipofectamine™ 2000 avec une viabilité cellulaire >90%. L'incorporation du PEI dans les polyplexes de CS/ADNp/pARNi a également été employée par d'autres groupes de recherche (Ragelle et al., 2014; Sushil K. Tripathi, Ritu Goyal, Pradeep Kumar, & Kailash C. Gupta, 2012). Dans le cas de Ragelle *et al.*, ils ont également utilisé du PEG et acide hyaluronique (HA) avec le PEI/CS/pARNi pour stabiliser les nanoparticules *in vivo* (Ragelle et al., 2014). Sun *et al.* de leur côté ont montré que l'incorporation de poly(histidine-arginine) dans des polyplexes de CS/pARNi a réussi à augmenter la libération endosomale ce qui a été traduit *in vivo* par une inhibition de la croissance tumorale et une augmentation du taux de survie (Sun et al., 2017). Lors de cette étude, des souris Balb/c ont été préalablement injectée par voie sous-cutanée avec des cellules cancéreuses 4T1, par la suite elles ont été traitées avec une dose de 0.3 mg/kg de pARNi. Zhang *et al.* ont recouvert des polyplexes de CS/10-hydroxy camptothécine avec de l'acide poly(méthyl acrylique) (PMAA) et ont observé une internalisation 453 fois plus élevée à pH 6.5 comparé à 7.4 dans des cellules HepG2 *in vitro* (Zhang et al., 2018). De plus, le PMAA a augmenté la libération endosomale ainsi que le temps de circulation chez les souris-SD (*Danforth's short tail*). Les auteurs ont suggéré que le temps de circulation est augmenté en raison de la charge négative conféré par le PMAA, ce qui réduit l'élimination des nanoparticules en limitant les interactions avec les composantes du sérum.

Un autre agent endosomolytique intéressant est la melittine. Toutefois, ce peptide est toxique et peut induire de l'hémolyse lorsqu'injecté par intraveineuse (Pincus, 2012). Bei *et al.* ont utilisé du chitosane pour encapsuler la melittine afin d'empêcher son activité lytique (Bei, Bindu, Remant, & Peisheng, 2015). Puis ils ont lié ces deux composants ensemble à l'aide de ponts

disulfures. Une fois dans l'endosome à faible pH, les liens étaient brisés et la melittine libérée pouvait tuer 100% des cellules cancéreuses. La prochaine étape de leur recherche sera de mettre des ligands sur la nanoparticule pour augmenter la spécificité envers des cellules cancéreuses. D'autres stratégies pour augmenter la libération endosomale du CS incluent notamment l'incorporation de CPP tel que le peptide TAT du VIH (Rahmat et al., 2012) et l'utilisation de chitosane de faible masse molaire conjugué aux protamines (Patil et al., 2016).

2.5 L'acide poly(propyle acrylique) (PPAA)

2.5.1 Structures et propriétés physicochimiques du PPAA

L'acide poly(propyle acrylique) (PPAA) est un polymère synthétique linéaire qui contient un groupe propane (**Figure 2-6**, en bleu) et un groupe carboxyle (**Figure 2-6**, en rouge) sur chaque monomère.

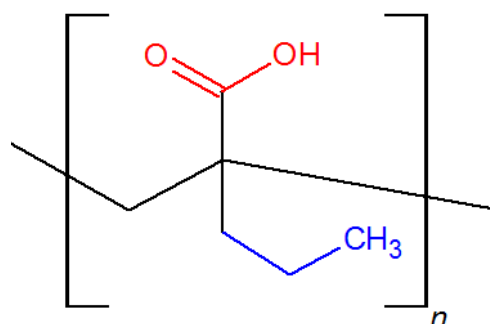


Figure 2-6 Structure chimique du monomère récurrent de l'acide poly(propyle acrylique)

Le PPAA est considéré un agent endosomolytique pH dépendant, car il peut engendrer une lyse cellulaire uniquement à des pH acides, avec une activité lytique maximale à un pH de 6.0 et moins (Murthy, Robichaud, Tirrell, Stayton, & Hoffman, 1999). Il a été proposé qu'un changement dans la balance hydrophilique-hydrophobique du polymère soit à la base de ce mécanisme d'action pH dépendant. À pH physiologique et alcalin, le groupe carboxyle perd son proton et obtient ainsi une charge négative ce qui garde le polymère soluble (hydrophile). Lorsque le pH diminue, par exemple lorsqu'il se retrouve au niveau des endosomes, le polymère commence à perdre ses charges, car le groupe carboxyle devient protoné. Le caractère hydrophobe du groupe propyle fait en sorte que le polymère a plus d'affinité pour la membrane

hydrophobe de l'endosome que la solution aqueuse et le PPAA va s'insérer dans la membrane et la déstabiliser, permettant ainsi la libération du contenu de l'endosome (Murthy et al., 1999). Cette activité endosomolytique est abolie lorsque l'acidification des endosomes est inhibée avec de la bafilomycine, ce qui appuie le concept que le PPAA est pH dépendant (Jones et al., 2003). Il existe d'autres polymères qui ressemblent au PPAA tels que l'acide poly(méthyl acrylique) (PMAA) et l'acide poly(éthyl acrylique) (PEAA) qui peuvent être obtenues en remplaçant le groupe propyle par un groupe méthyle ou éthyle, respectivement. Bien que ces polymères possèdent une activité endosomolytique, ils sont moins efficaces que le PPAA, probablement à cause d'une réduction de leur l'hydrophobicité (Jones et al., 2003). À l'inverse, si le groupe propyle est remplacé par un groupe butyle pour faire de l'acide poly(butyl acrylique) (PBAA), le polymère est trop hydrophobe à pH physiologique et peut interagir avec la membrane plasmique des cellules et causer de la lyse cellulaire.

Un des désavantages du PPAA est qu'il est chargé à des pH élevés, tandis que le chitosane est chargé à de faibles pH. Donc pour mélanger le PPAA avec le chitosane, un tampon devrait être utilisé pour atteindre un pH où les deux polymères seront suffisamment chargés pour qu'ils puissent interagir l'un avec l'autre de manière électrostatique. Pour trouver le degré d'ionisation (degré de charges), le pKa des polymères doit être connu, ce qui est le cas pour le chitosane, soit ~6.6 (Filion et al., 2007). Malheureusement, il y a un désaccord dans la littérature sur le pKa du PPAA, avec des valeurs rapportées allant de 6.7 (Evans et al., 2015), à 7.4 (Murthy et al., 1999) et 7.7 (Kyriakides et al., 2002). De son côté, le PEAA a un pKa de 6.84 (Joyce & Kurucsev, 1981; Thomas, You, & Tirrell, 1995). En théorie, le pKa du PPAA devrait être plus élevé que celui du PEAA (donc >6.84) puisqu'augmenter l'hydrophobicité d'un polymère va diminuer son acidité et donc augmenter son pKa (Murthy et al., 1999). Présentement, il n'existe aucune publication qui présente une courbe de titrage du PPAA.

Un autre inconvénient est que la voie de dégradation du PPAA n'est pas connue, et aucune toxicité a été observée *in vitro* pour des concentrations allant jusqu'à 2 μ M (Lackey, Press, Hoffman, & Stayton, 2002).

2.5.2 Utilisation du PPAA dans des nanoparticules

Dans un premier lieu, le PPAA a été utilisé pour livrer des protéines. Lackey *et al* ont lié un anticorps au PPAA à l'aide du système streptavidine /biotine et ont démontré que le PPAA est nécessaire pour que le complexe s'échappe de l'endosome et atteigne le cytosol de la cellule. En absence de PPAA, l'anticorps reste emprisonné dans les endosomes et est dégradé (Lackey et al., 2002). De leur côté, Evans *et al.* ont formé un complexe polyélectrolyte par interactions électrostatiques entre des peptides cationiques thérapeutiques et du PPAA 22 kDa dans le but de traiter la vasoconstriction pathologique (Evans et al., 2015). La libération endosomale *in vitro* a été augmentée jusqu'à 29 fois pour les complexes contenant le PPAA par opposition aux peptides seuls. De plus, le PPAA peut servir également dans la création de vaccins prophylactiques, en livrant un antigène incorporé dans des nanoparticules polymériques contenant du PPAA dans des cellules dendritiques *in vitro* (Foster, Duvall, Crownover, Hoffman, & Stayton, 2010; L. Yang et al., 2017).

Le PPAA a également été utilisé pour la livraison d'acides nucléiques. Par exemple, du PPAA 61 kDa a été incorporé dans des nanoparticules lipidiques (lipoplexes) à base de DOTAP, un lipide cationique, pour livrer de l'ADN plasmidique codant pour l'enzyme β -galactosidase *in vitro* (Cheung, Murthy, Stayton, & Hoffman, 2001). Le taux d'expression de l'enzyme était 20 fois plus élevé dans les cellules traitées avec les nanoparticules ternaires (DOTAP/ADNp/PPAA) comparées aux cellules traitées avec les nanoparticules binaires (DOTAP/ADNp). De plus, l'incorporation de l'acide poly(acrylique) (PAA), qui est dépourvue du groupe propyle, n'a pas augmenté l'expression de β -galactosidase, ce qui met en évidence que l'augmentation de la transfection est belle et bien attribuée au groupe propane et son rôle dans la libération endosomale, et non une addition d'un polyanion qui pourrait déstabiliser le complexe. Par la suite, cette formulation ternaire a été testée *in vivo* chez des souris, en utilisant un plasmide codant pour la protéine TSB2 (Kyriakides et al., 2002). Après injection locale sur une plaie cutanée, il a été observé de manière qualitative que la guérison (néovascularisation) a été meilleure avec les nanoparticules ternaires contenant du PPAA.

Jusqu'à présent le chitosane n'a été utilisé qu'une seule fois avec le PPAA, et ce pour livrer de l'ADNp *in vitro* dans des cellules HEK293 et HeLa (Tina Kiang et al., 2004). Le chitosane était

mélangé dans un tampon d'acétate de sodium (pH 5.5) afin de pouvoir le combiner avec le PPAA. La formulation la plus efficace avec PPAA pouvait augmenter l'expression génétique de 11 fois comparativement aux nanoparticules dépourvues de PPAA. Il a été proposé que l'efficacité accrue procurée par le PPAA est attribuée à **1)** une augmentation de la libération endosomale et **2)** réduction de l'interaction entre le chitosane et l'ADNp par compétition pour les charges positives du chitosane, ce qui déstabilise légèrement les nanoparticules. Cette formulation avait un diamètre hydrodynamique de 400 nm, une charge de surface de -17 mV et un ratio de charge chitosane : ADNp : PPAA de 3.3 :1 :2.9 (faible excès de charge négative). Cependant, la masse molaire du PPAA ainsi que le DDA du chitosane ne sont pas mentionnés dans l'étude. Outre l'ADNp, d'autres acides nucléiques ont été utilisés avec le PPAA comme par exemple les pARNi (Convertine, Benoit, Duvall, Hoffman, & Stayton, 2009), les oligonucléotides antisense utilisant des lipoplexes (L. K. Lee, Williams, Devore, & Roth, 2006) ou un mélange de polymères et lipoplexes (Peddada, Garbuzenko, Devore, Minko, & Roth, 2014). Dans tous ces cas, une augmentation de la libération endosomale a été notée. Bref, le PPAA a été utilisé dans une multitude de vecteurs de livraison tels que les conjugués, lipoplexes et complexes polyélectrolytes afin d'améliorer la livraison de protéines ou acides nucléiques au cytosol des cellules. Il n'a toutefois jamais été utilisé dans la livraison de l'ARNm.

2.6 Tampon

Comme mentionné précédemment, un tampon devrait être utilisé pour garder le pH à une valeur où les deux polymères (chitosane et PPAA) seront assez chargés pour interagir ensemble de façon électrostatique et ainsi former des nanoparticules. En regardant leur degré d'ionisation (**Tableau 2-2**), les pH auxquels seront complexés les polymères devront être autour de 6.6-6.8. Pour le chitosane, le degré d'ionisation correspond au degré de protonation(α) qui est calculé en utilisant: $\alpha = \frac{1}{1+10^{pH-pKa}}$. De son côté, le degré d'ionisation du PPAA correspond au degré de déprotonation qui est égale à $1 - \alpha$. À un pH supérieur ou égal à 7, le chitosane ne sera pas suffisamment chargé/soluble pour former des nanoparticules (B. Yang et al., 2010). Si le pKa du PPAA s'avère à être 6.7, un pH de 6.65 serait optimal, car les deux polymères seraient chargés également (47%). Toutefois, tel que mentionné auparavant, le pKa du PPAA devrait plus être autour de 7.4-7.7, ce qui amène le pH de complexation autour de 6.7-6.8.

Tableau 2-2 Degré d'ionisation(%) théorique du chitosane et PPAA dans un milieu où la force ionique est négligeable.

| pH du milieu | pKa du Chitosane | pKa théorique du PPAA | | |
|--------------|------------------|-----------------------|-----|-----|
| | 6.6 | 6.7 | 7.4 | 7.7 |
| 6.65 | 47% | 47% | 15% | 8% |
| 6.7 | 44% | 50% | 17% | 9% |
| 6.8 | 39% | 56% | 20% | 11% |
| 7 | 28% | 67% | 28% | 17% |

Le tampon idéal devrait **1)** avoir un pouvoir tampon autour des pH 6.6-6.8, **2)** ne pas causer de la dégradation de l'ARNm, **3)** être biocompatible et **4)** être non volatile pour des applications potentielles en lyophilisation. En 1966, le laboratoire de Good a publié une liste d'environ 11 tampons biologiques qui avec les années est montée à près de 20 (N. E. Good & Izawa, 1972; Norman E. Good et al., 1966). Les tampons de Good (*Good's buffer*) ont les propriétés suivantes **1)** être capables de tamponner entre 6.0 et 8.0 ce qui est utile en milieu biologique, **2)** être imperméables aux membranes lipidiques, **3)** leur pKa ne doit pas être influencé par la température et force ionique, **4)** ne pas participer dans des réactions biochimiques (être biochimiquement inerte) et **5)** être simples et peu coûteux à préparer. Parmi ces tampons, les ACES, ADA, BES, BTP, Bis-Tris, MOPS, MOPSO et PIPES sont intéressants, car ils peuvent tamponner à des pH allant de 6.6 à 6.8 (Ferreira, Pinto, Soares, & Soares, 2015). Cependant, seulement les MOPS, MOPSO et PIPES ne forment pas de complexe avec les métaux tels que le cuivre, selon une revue publiée en 2015 (Ferreira et al., 2015). Ainsi, ces trois tampons ont moins de chance d'interférer avec l'activité des métalloprotéinases, et sont donc plus appropriés que les autres tampons de Good pour une utilisation *in vivo*. Le PIPES contient deux groupes sulfates anioniques qui lui permettrait de réticuler (*cross-link*) le chitosane et diminuer sa solubilité. Le

MOPS quant à lui a déjà été utilisé avec des nanoparticules de CS/ADNp et acide hyaluronique (HA) à une concentration de 10 mM (Sato et al., 2017). Toutefois, le MOPS ne devrait pas être utilisé à des concentrations excédant 20 mM en culture cellulaire (Eagle, 1971) et il a été suggéré qu'il puisse modifier l'interaction entre des lipides membranaires en s'y liant (Koerner et al., 2011).

Il existe d'autres tampons que les *Good's Buffer*. Par exemple le phosphate, qui lui a aussi été utilisé avec des nanoparticules de CS/acide nucléique (Sato et al., 2017). Contrairement aux *Good's buffer* qui sont biochimiquement inertes, le phosphate participe dans une multitude de réactions biochimiques et peut inhiber plusieurs enzymes telles que la fumarase, l'uréase ainsi que plusieurs kinases et déshydrogénases (Blanchard, 1984). Ce tampon peut également former des complexes avec des métaux tout comme le tampon citrate qui peut lier des cations (Ferguson et al., 1980). Le tampon histidine peut être un autre choix intéressant, car il contient un groupe imidazole dans sa structure qui est considéré un agent endosomolytique. En effet, grâce à son pKa autour de 6, l'imidazole devient protoné à des pH acides et peut donc créer l'effet *proton-sponge* une fois dans l'endosome (Midoux, Pichon, Yaouanc, & Jaffrès, 2009). D'ailleurs, une équipe a fonctionnalisé du CS avec de l'histidine dans le but d'augmenter la libération endosomale lors de la livraison d'ADNp (K.-L. Chang, Higuchi, Kawakami, Yamashita, & Hashida, 2010). De plus, ce tampon peut être utilisé pour la lyophilisation des nanoparticules de chitosane. Une étude a montré que l'ajout d'histidine combiné à 0.5% w/v de tréhalose ou sucrose empêchait la baisse de pH ainsi que l'agrégation des nanoparticules de CS/ADNp lors de la lyophilisation (Veilleux, Nelea, Biniecki, Lavertu, & Buschmann, 2016). Une fois réhydraté, ces nanoparticules avaient une efficacité de transfection équivalent à 65% des nanoparticules fraîchement préparés. Un autre avantage du tampon histidine est que lorsqu'injecté, la douleur ressentie par l'animal est moindre comparé à une injection au tampon citrate (Laursen, Hansen, & Fisker, 2006).

Toutefois, le tampon histidine possède quelques inconvénients lorsqu'utilisé avec des acides nucléiques. Premièrement, il absorbe à 260 nm à cause de sa fonction imidazole, ce qui empêche la quantification d'acide nucléique par absorbance (Nakano, Tamai, Tsukamoto, & Abe, 2010). Deuxièmement, l'histidine est retrouvée dans le site catalytique de l'RNase A, une enzyme capable de dégrader les ARN (Raines, 1998). Comme l'histidine participe directement à

l'hydrolyse de l'ARN, il serait dangereux de le mélanger avec un ARNm. Néanmoins, aucune étude ne mentionne une dégradation d'un ARNm suite à une exposition au tampon d'histidine. À cause de cet effet catalytique, le tampon imidazole pourrait remplacer l'histidine pour permettre de garder les propriétés endosomolytiques. L'imidazole a également été fonctionnalisé sur du chitosane pour augmenter la livraison d'ADNp, et ce par un facteur 100 comparé au chitosane natif (Krishnendu, Bilal, & Sudhir Pai, 2008). Bref, plusieurs tampons sont disponibles et chacun possède ses avantages et désavantages et une fois incorporé comme excipient dans les formulations de nanoparticules, leur impact sur l'efficacité de transfection ainsi que la toxicité devront être évalués.

2.7 Tréhalose

Le tréhalose est un homodisaccharide non réducteur composé de deux molécules de glucose reliés par un lien 1,1- α -glycosidique (**Figure 2-7**). Ce sucre a diverses fonctions non seulement dans la nature où il peut être une source de carbone pour les cyanobactéries (Arguelles, 2000) ou un osmoprotecteur lors de choc osmotique chez *E.coli* (Kempf & Bremer, 1998), mais aussi servir en laboratoire comme cryoprotecteur pour des cellules mammifères (N. Guo, Puhlev, Brown, Mansbridge, & Levine, 2000) et stabilisateur de vaccins et liposomes (Crowe, Leslie, & Crowe, 1994). De plus, selon une étude publiée tout récemment, le tréhalose pourrait avoir une application médicale dans le traitement contre le diabète (Higgins et al., 2018). Un autre avantage est qu'il est dégradable dans le corps humain grâce à l'enzyme trehalase qui se retrouve dans les cellules épithéliales de la bordure en brosse du petit intestin et des tubules proximaux des reins (Sasai-Takedatsu et al., 1996).

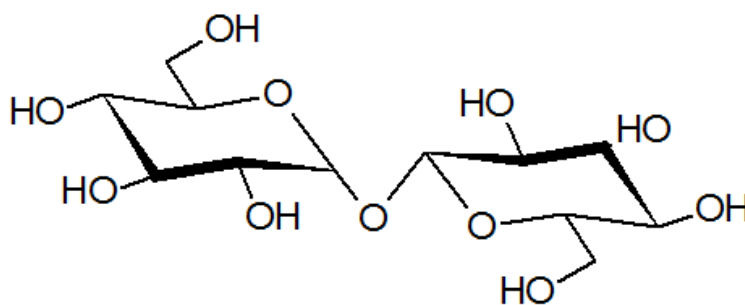


Figure 2-7 Structure chimique du tréhalose.

Le tréhalose est considéré un kosmotrope, car il peut structurer/stabiliser l'eau en augmentant les interactions entre les molécules d'eau (Moelbert, Normand, & De Los Rios, 2004). Parmi les autres sucres, le sucrose est considéré légèrement moins kosmotrope que le tréhalose alors que le glucose est considéré neutre (Cray, Russell, Timson, Singhal, & Hallsworth, 2013). À l'opposé, le fructose est un agent chaotropique (déstructure l'eau). Cette kosmotropie permet au tréhalose d'avoir une action stabilisatrice sur les protéines et il existe plusieurs hypothèses pour expliquer cet effet (Jain & Roy, 2009; Mensink, Frijlink, van der Voort Maarschalk, & Hinrichs, 2017; Rao, Gebauer, & Cölfen, 2017). La théorie de l'exclusion préférentielle propose qu'il n'y a pas de lien direct entre la protéine et le tréhalose (Olsson, Jansson, & Swenson, 2016; Timasheff, 1993). Les molécules d'eau sont isolées de la protéine par le tréhalose, ce qui a comme impact d'augmenter les interactions protéine-protéine et par conséquent la stabilité de la protéine. Une autre théorie est celle du remplacement de l'eau où le tréhalose va directement former des liens hydrogène avec la protéine et la stabiliser en maintenant sa conformation tridimensionnelle (Crowe, Crowe, & Chapman, 1984; Franks, 1977). Bref, il est possible que le tréhalose puisse augmenter la stabilité des nanoparticules en augmentant les interactions polymère-polymère.

Un autre effet à considérer *in vitro* est que ce sucre a une densité qui est supérieure à l'eau et peut être utilisé comme agent densifiant. Par exemple, le sucrose qui a une densité similaire au tréhalose est utilisé comme tampon de chargement lors des électrophorèses afin de garder les échantillons au fond des puits (Bhilocha et al., 2011; Branca et al., 2001). Il est donc possible que l'incorporation de ces sucres dans des formulations de nanoparticules destinées à usage *in vitro* augmente l'efficacité de transfection due à un effet de densité et non stabilisateur en entraînant rapidement les nanoparticules au fond du puit sur les cellules. Un tel effet permettrait de limiter l'exposition des nanoparticules au milieu de transfection (risque de décomplexation, agrégation des nanoparticules) avant leur internalisation cellulaire et ainsi de mieux isoler l'influence des barrières intracellulaires sur l'efficacité de transfection pour les diverses formulations testées. Ce phénomène pourrait donc s'avérer très utile pour l'optimisation du trafic intracellulaire de véhicules de livraison. Toutefois, il est important de mentionner que l'utilisation d'un agent densifiant n'aurait pas d'effet sur l'efficacité de livraison dans un contexte d'utilisation *in vivo*.

Dans le cadre d'application pour les nanoparticules, le tréhalose ainsi que d'autres disaccharides, sont utiles lors de la lyophilisation afin de prévenir l'agrégation des nanoparticules suite à leur

réhydratation/reconstitution. La concentration du disaccharide est un paramètre important qui va moduler la cinétique d'agrégation. Par exemple, un groupe de recherche a utilisé du tréhalose ou du sucrose pour prévenir l'agrégation de lipoplexes (Ball, Bajaj, & Whitehead, 2016). La concentration optimale en sucre s'avérait à être 20% w/v. Almalik *et al.* de leur côté ont testé l'effet de divers lyoprotecteurs sur la taille de nanoparticules de chitosane, suite à un cycle de lyophilisation/réhydratation. Parmi les lyoprotecteurs testés (sucrose, tréhalose, glucose, PEG 10 000, PEG 2000 et mannitol), ils ont trouvé que la meilleure protection était fournie lorsque le sucrose était utilisé à des concentrations de 5-50% w/v (Almalik, Alradwan, Kalam, & Alshamsan, 2017). Une autre application en nanoparticules est d'augmenter la bioactivité, telle qu'observée dans les polyplexes de CS/ARNm/HA (Soliman et al., 2018). Dans cette étude, il a été montré qu'augmenter la concentration en tréhalose a un impact bénéfique sur la transfection, jusqu'à atteindre un plateau vers 10% w/v.

En somme, il serait intéressant de tester les nanoparticules de CS/ARNm/PPAA avec divers sucres de différentes kosmotropicités et densités pour voir si l'efficacité de transfection est modulée par un effet de densité et/ou stabilisateur.

CHAPITRE 3 ARTICLE 1: POLY(2-PROPYLACRYLIC ACID) INCREASES IN VITRO BIOACTIVITY OF CHITOSAN/MRNA NANOPARTICLES

Authors: Etienne Jeandupeux², Mohamad Gabriel Alameh³, Gregory De Cresenzo^{1,2} and Marc Lavertu^{1,2*}.

Affiliation: ¹ Polytechnique Montreal, Department of Chemical engineering, Montreal, QC, Canada. ² Polytechnique Montreal, Institute of Biomedical engineering, Montreal, QC, Canada. ³ Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA.

*Corresponding author.

Corresponding author E-mail address: marc.lavertu@polymtl.ca (M. Lavertu).

European Journal of Pharmaceutical Sciences, December 2, 2018

Abstract: Chitosan-based nanoparticles have been extensively studied for the delivery of nucleic acids. Previous results suggest that these nanoparticles have limited ability to escape the endosome, one of the main cellular barrier hindering nucleic acid delivery. Escape can be improved by the addition of endosomolytic agents during the formulation process or by developing delivery systems with intrinsic properties to disrupt endosomal membranes. In this study, poly(2-propylacrylic acid) (PPAA), an anionic synthetic polymer with known membrane lytic activity was added to the binary chitosan/mRNA nanoparticles to improve bioactivity. Ionization behavior of PPAA was characterized to identify conditions in which PPAA is sufficiently charged to interact electrostatically with chitosan and thus form nanoparticles. The physicochemical characteristics (hydrodynamic diameter, polydispersity index, ζ -potential) and the *in vitro* transfection efficiency (bioactivity) of this new family of CS/mRNA/PPAA ternary nanoparticles were evaluated. Addition of PPAA to CS/mRNA nanoparticles was shown to be an efficient strategy to augment *in vitro* bioactivity. The optimal formulation reached an expression level comparable to that of the commercial lipid control without any signs of metabolic toxicity.

Key words: Chitosan; mRNA; Poly (2-propylacrylic acid); gene delivery; trehalose.

3.1 Introduction

Gene therapy is a powerful and versatile approach that uses nucleic acids (NA) to modulate gene expression and restore normal cell function. The versatility of this approach depends on the NA used with *in vitro* transcribed messenger RNA (IVT-mRNA) gaining significant momentum for therapeutic applications (Kaczmarek, Kowalski, & Anderson, 2017b; N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, & D. Weissman, 2018). However, effective delivery to target cells and tissues remains a major challenge since naked mRNA is rapidly degraded by serum nucleases and lacks the ability to translocate into the cytoplasm or escape endosomes (Meng et al., 2017). Non-viral delivery systems are being developed to overcome these barriers (B. Li et al., 2018; Riley & Vermerris, 2017).

Chitosan (CS), a cationic biopolymer derived from chitin, displays desirable properties for NA delivery (i.e. interacts electrostatically with NA, biocompatibility, amenable to chemical modifications, etc.). Transfection efficiency (TE) of CS-based systems was shown to depend on a fine balance between chitosan parameters such as charge density or degree of deacetylation (DDA), molecular weight (Mn), the amine to phosphate ratio (N:P) and the environmental context (i.e. pH, serum proteins) (Mohamad Alameh et al., 2018; Lallana et al., 2017; M. Lavertu et al., 2006; Malmo et al., 2012; Soliman et al., 2018). The bioactivity of CS-mRNA nanoparticles was improved many folds (~ 4-10X) after electrostatic coating with sulfated HA and addition of trehalose (Soliman et al., 2018). Despite efficient and non-toxic *in vitro* and *in vivo* (M. Alameh et al., 2012; Mohamad Alameh et al., 2018; Buschmann et al., 2013; Holzerny et al., 2012; Jean et al., 2012; M. Lavertu et al., 2006; Malmo et al., 2012; Soliman et al., 2018) delivery of NAs, the colloidal stability and the endosomal escape ability of CS-based delivery systems must be further improved to compete with clinically relevant lipid nanoparticles (non-toxic but still immunogenic) for the delivery of mRNA (N. Pardi et al., 2018; Pardi et al., 2015). The bioactivity and colloidal stability of CS-based nanoparticles (CS-NPs), and consequently the therapeutic window, can be improved through **1**) chemical modification, and/or **2**) incorporation of endosome disrupting agents (Bei et al., 2015; Krishnendu et al., 2008; Lu et al., 2014; Ragelle et al., 2014; Sun et al., 2017; Sushil K. Tripathi et al., 2012).

Poly(2-propyl acrylic acid) (PPAA), a linear synthetic anionic polymer that exhibits membrane lytic properties at acidic pH (Murthy et al., 1999) is able to form, at least theoretically, polyelectrolyte complexes with CS and could, therefore, be used to improve endosomal escape of CS-NPs. PPAA has been used to improve delivery of a variety of biomolecules (Evans et al., 2015; Foster et al., 2010; L. Yang et al., 2017) and NAs formulated with either lipids or polymer-based nanoparticles (Cheung et al., 2001; Convertine et al., 2009; Tina Kiang et al., 2004; Kyriakides et al., 2002; L. K. Lee et al., 2006).

The main purpose of this study was to improve the bioactivity of CS/mRNA nanoparticles by PPAA incorporation as a mean for facilitating endosomal escape. First, we characterized the ionization behavior of PPAA to identify conditions in which the polyanion is sufficiently charged to interact electrostatically with chitosan ($pK_a \sim 6.5-6.7$ (Filion et al., 2007)). PPAA was titrated at different salt concentrations to establish a clear relationship between the pH and its degree of ionization and determine its apparent pK_a . Next, we formulated ternary nanoparticles (CS/mRNA/PPAA) and investigated the effects of several factors such as the mixing technique (addition sequence of PPAA), absence/presence of buffer, molar ratio of PPAA carboxyl to mRNA phosphate (C:P ratio), mRNA mixing concentration, and dose on the physicochemical characteristics (size, polydispersity index, ζ -potential and pH) of these polyelectrolyte complexes and their *in vitro* bioactivity. The effect of trehalose and other saccharides were screened for improved bioactivity and to explore whether improved bioactivity with trehalose (Soliman et al., 2018) is due to a stabilizing effect from its kosmotropic character or to a density effect resulting in improved nanoparticle deposition on cells and subsequent uptake.

In this paper, we report the effect of salt and pH on the ionization behavior of PPAA and show **1)** successful incorporation of PPAA into/onto nanoparticles, **2)** improved bioactivity with PPAA, and **3)** demonstrate that kosmotropic effects play a minimal role in respect to the apparent increase in bioactivity in presence of trehalose.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Materials

5meC ψ U-modified mRNA encoding for the firefly luciferase (FLuc) (Cat #L-6107-1000) was purchased from Trilink Biotechnologies; **NOTE:** The L-6107-1000 product was replaced with a 5-methoxyuridine (5moU)-modified cap using the CleanCapTM system. Raw chitosan (~80%DDA, ~180kDa) derived from *Pandalus borealis* was obtained from Marinard (Rivière-au-Renard, QC, Canada). Poly(2-propylacrylic acid) (PPAA) was kindly provided by Prof. Brian C. Evans (Vanderbilt University, TN, USA). Dextran 5 kDa (Cat #5510-0005-8006) was obtained from Pharmacosmos (Holbaek, Denmark). QuantiFluorTM RNA System (Cat #E3310) was obtained from Promega (Madison, WI, USA). 35 mm glass bottom dishes (Cat #P35G-1.5-14-C) were obtained from MatTek Corporation. Bafilomycin A1 (Cat #B1793), CAPS buffer (Cat #C2632), chloroquine (Cat #C6628), DPBS (Cat #D5652), endotoxin-free hydrochloric acid 0.1M (Cat #2104), glucose (Cat #G7021), histidine buffer (Cat #H6034), hydrochloric acid 1 N (Cat #H9892), MOPS buffer (Cat #69947), DPBS enriched with magnesium chloride and sodium chloride (DPBS⁺⁺, Cat #D1283), sodium chloride (Cat #59888), sodium hydroxide 1 N (Cat #91439), sucrose (Cat #51888), trehalose dihydrate (Cat #T9531), Toluidine blue O (Cat #T3260), and Amicon Ultra-0.5 mL 3 kDa MWCO regenerated cellulose membrane centrifugal filter units (Cat #UFC500) were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). alamarBlueTM cell viability reagent (Cat # DAL1025), CorningTM CostarTM Flat Bottom Clear Cell Culture 24-well plates (Cat #09-761-146), 96-well plates (Cat #07-200-90), fetal bovine serum (FBS, Cat #26140), GeneticinTM (Cat#10131035), GlutaMAXTM 100X (Cat #35050), Lipofectamine MessengerMAX (Cat # LMRNA001), NuncTM F96 MicroWellTM white culture plates (Cat #136101), Opti-MEMTM reduced serum medium (Cat# 31985), RPMI-1640 with HEPES (Cat #30-2001), RNaseZapTM (Cat #AM9782), sodium pyruvate 100mM (Cat #11360-070), and sterile RNase-free water (Cat #10977015) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Burlington, ON, Canada). HEPES-free RPMI-1640 (Cat #350-002-CL) was obtained from Wisent (Saint-Bruno, QC, Canada).

3.2.2 Synthesis and characterization of depolymerized CS and PPAA

Raw chitosan was heterogeneously deacetylated in concentrated sodium hydroxide (HONO) to achieve the targeted degree of deacetylation followed by nitrous acid depolymerization to reach specific number-average molecular weights targets of 5 and 10 kDa (**Table 3-1**). Chitosan number- and weight-average molecular weights (M_n and M_w , respectively) were determined by size exclusion chromatography with multi-angle static light scattering (SEC-MALS), and DDA determined by ^1H NMR (Marc Lavertu et al., 2006; S. Nguyen, Winnik, & Buschmann, 2009).

Table 3-1. Characteristics of chitosans^a and PPAA^b tested in this study

| Chitosans & PPAA | DDA (%) | M_w (kDa) | M_n (kDa) | PdI (M_w/M_n) |
|------------------|---------|-------------|-------------|-------------------|
| CS:80-10 | 82.93 | 16.06 | 10.06 | 1.59 |
| CS: 92-5 | 91.7 | 6.5 | 4.3 | 1.51 |
| CS: 92-10 | 92.3 | 16.8 | 11.3 | 1.49 |
| CS:98-5 | 98.0 | 7.15 | 5.22 | 1.37 |
| PPAA | - | 32.4 | 22 | 1.47 |

^a Designation of chitosans is based on their chemical compositions, using the [DDA- M_n] nomenclature. The degree of deacetylation (DDA) was determined by ^1H NMR. Gel permeation chromatography (GPC) was used to determine the number- and weight-average molecular weights (M_n and M_w) of chitosan. ^b PPAA M_n and M_w were provided by B. C. Evans (Vanderbilt University, TN, USA).

3.2.3 Preparation of Chitosan, mRNA, PPAA stock solutions

Chitosan (CS) was dissolved at 5 mg/mL in endotoxin-free hydrochloric acid (HCl) at a 1:1 glucosamine to HCl molar ratio for at least 24h, sterile filtered using a 0.2 μm PVDF membrane and stored at 4°C for a maximum of 2 weeks until use. The 5meC- ψ U-modified FLuc stock solution was purchased at 1 mg/mL in RNase-free water, and aliquots stored at -80 °C until use. Concentration and purity were determined by UV-spectroscopy (A_{260} , A_{280} , and A_{260}/A_{280} ratio)

using a NanoQuant Plate[™] mounted on a TECAN M200 microplate reader (Tecan Systems, Mannedorf, Switzerland). PPAA was received at 25 mg/mL in phosphate buffered saline (PBS) and sodium hydroxide (NaOH) at pH 8.0. To ensure that PPAA solution did not contain RNase, mRNA was mixed with PPAA at a 10:1 (v/v) molar ratio of PPAA's carboxyl (C) to mRNA's phosphate (P), electrophoresed (1.5% agarose gel, 100 V), stained (1X SBYR Gold), and mRNA integrity visualized using a transilluminator (Montreal Biotech, Qc, Canada) (**Figure S.1**, Supp Info).

3.2.4 Titration of PPAA for estimation of degree of ionization and apparent pKa

Poly(2-propylacrylic acid) stock solution (25 mg/mL) was precipitated using 1N HCl, pelleted at 3000 g (5 min) using a Heraeus™ Fresco™ 21 Microcentrifuge (Thermo Fisher, MA, USA), and suspended in deionized water to remove traces of salts (PBS) and NaOH present in the stock solution; centrifugation-washing cycle was repeated until the pH reached ~ 6.5. The buffer exchanged solution was freeze-dried for 24 h using a FreeZone Plus 2.5 Freeze dry system (Labconco, MO, USA). PPAA powder was dissolved on a rotary mixer (24 h, room temperature) at 1.5 mg/mL (13.14 mM monomers or carboxylic units) in NaOH at a 1:1 molar ratio of carboxylic acid to NaOH, and then titrated by slow addition of 13.14 mM HCl using a 877 Titrimo plus titrator (Methrom, Al, Switzerland). The pH of the solution was measured with an 8220BNWP PerpHecT glass microelectrode (Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). The degree of ionization (β) of PPAA was calculated from the number of moles of each ion present in the solution, using the electroneutrality condition:

$$\beta = \frac{\text{Moles of Na}^+ + \text{OH}^- + \text{Cl}^-}{\text{Moles of PPAA}} \quad (1)$$

Moles of OH⁻, Cl⁻ and Na⁺ were calculated from the measured pH, using the dissociation equilibrium constant of water (K_w) (H⁺ ions were considered negligible), HCl and NaOH concentrations in the PPAA solution, respectively. The apparent pK_a (pK_{ap}) was calculated using the measured pH and β determined from Eq. (1):

$$\text{pK}_{\text{ap}} = \text{pH} - \log\left(\frac{\beta}{1-\beta}\right) \quad (2)$$

3.2.5 Nanoparticle preparation and characterization

Prior to complexation, FLuc mRNA was diluted using nuclease-free water to a working concentration of 0.15 mg/mL. Chitosans (5 mg/mL) and PPAA (25 mg/mL) stock solutions were diluted using either water or buffer (*viz.* histidine for CS and MOPS for PPAA) to achieve specific N:P:C molar ratios (CS glucosamine (N) to mRNA phosphate to PPAA carboxyl). In

addition, all working solutions (i.e. CS, mRNA, and PPAA) comprised either 0 or 10% trehalose (w/v). Nanoparticles were formed by electrostatic complexation either using the coating method (manual addition of chitosan to an mRNA solution followed by PPAA addition) or using the comixing method (manual addition of chitosan to a mixture of PPAA and mRNA). Nanoparticles with a N:P:C ratio of 5:1:0 were prepared as described above with water replacing PPAA. All volumes were added at a 1:1:1 ratio (v/v) to reach a final mRNA concentration in nanoparticles of 0.05 mg/mL. Lipofectamine™ MessengerMax™ (LP-MM) mRNA lipid nanoparticles were prepared by diluting the FLuc mRNA stock solution to 0.03 mg/mL in Opti-MEM™ and complexed as per manufacturer recommendation. Hydrodynamic diameter (z-average), polydispersity index (PdI), and zeta-potential (ζ -potential) were determined by dynamic light scattering (DLS) using a ZetaSizer Nano ZS device (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). For Z-ave and PdI measurements, nanoparticles were diluted 1:8 in water, and measurements performed at 25 °C with the scattering angle of the detector fixed at 173°. Nanoparticles formed in either water or buffer were diluted 1:2 and 1:8 in their respective dispersant medium, and ζ -potential values determined from the measured electrophoretic mobility (U_E) using the Hückel (water) and Smoluchowski (buffer) approximations (Doane, Chuang, Hill, & Burda, 2012). The pH of nanoparticles was measured with an Orion 720 A plus coupled with an 8220BNWP PerpHecT glass microelectrode (Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada).

3.2.6 Quantification of free PPAA and mRNA

Toluidine blue (TBO) depletion assay was developed and used for quantification of unbound PPAA post complexation (free in solution). In this assay, binding of cationic TBO to PPAA forms precipitates resulting in a dose-dependent decrease in absorbance and interpolation of free PPAA from a standard curve. Ternary nanoparticles were formed as described above, centrifuged for 30 min (45,000 g) using an Optima™ MAX-E ultracentrifuge (Beckman Coulter, CA, US). The supernatant was collected, analyzed (DLS) to confirm complete sedimentation (absence of nanoparticles), concentrated at 14,000g for 20 min using a 3 kDa MWCO centrifugal filter unit (Sigma-Aldrich, ON, Canada), and retentate collected for TBO depletion analysis. 90 μ L TBO (289 μ M) in 50 mM in N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (CAPS) buffer (pH 10.6) was

added to 40 μL of retentate (final TBO concentration = 200 μM), incubated for 5 min at room temperature and centrifuged for 30 min (18,000 g) before absorbance measurement (588 nm) using a TECAN M200 microplate reader. The supernatant of binary nanoparticles (C:P 0) was used as background and percent (%) free PPAA was computed using the following formula :

$$\text{Free PPAA(\%)} = \frac{\text{Retentate PPAA concentration}}{\text{Unformulated PPAA concentration}} \times 100. \quad (3)$$

Free mRNA concentration in the nanoparticle supernatant was estimated using the QuantiFluor[®] RNA system kit (Promega, Madison, USA) as per manufacturer instructions. The fluorescence signal was measured ($\lambda_{\text{ex/em}}$: 492/540 nm) using a TECAN M200 microplate reader, and percent encapsulation efficiency (EE%) was calculated using the following Eq:

$$\text{EE(\%)} = \left(1 - \frac{\text{Fluorescence of formulated mRNA}}{\text{Fluorescence of unformulated mRNA}}\right) \times 100. \quad (4)$$

3.2.7 Cell culture and transfection

The EGFP⁺ H1299 cell line was cultured in complete RPMI-1640 media supplemented, 1% GlutaMAX[™], and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ geneticin in a 37 °C and 5% CO₂ environment. Cells were seeded at 3750 cells/well in a Nunc[™] F96 MicroWell[™] culture plate (white) and a Corning[™] Costar[™] 96 well plate (clear, for qualitative assessment of confluence) to reach 75-80% confluence on the day of transfection; *viz.* 48 hours post-seeding. Prior to transfection, the cell culture medium was replaced with transfection medium (RPMI-1640 without HEPES, supplemented with 20 mM MOPS, buffered at pH 6.5 or 7.3 and 10% FBS) and cells transfected at a final mRNA dose of 150 ng/well (except in the dose-response experiment where doses of 50 and 300 ng/well were also used. The medium was replaced 24 hours post-transfection with fresh culture medium (RPMI-1640, 10% FBS), and transfection efficiency (luciferase assay) and metabolic activity/toxicity (alamarBlue) were assessed 24 hours later (48h post-transfection). For endosomal lysis/pH study, chloroquine was added at the time of transfection and bafilomycin A1 was added 30 mins before and at the time of transfection.

3.2.8 Assessment of nanoparticle bioactivity (Luciferase Assay)

For luciferase expression (bioactivity), cells were washed twice with 200 μ L DPBS and EGFP measured ($\lambda_{\text{ex/em}}$ of 485/535 nm) using the multiple read/well function in 50 μ L DPBS. Cells were then lysed for 10 min at room temperature by adding 50 μ L of lysis-luciferin mix (**Table S.1 Supp Info**) to the 50 μ L of DPBS prefilled wells, and luminescence assessed using F500 microplate reader. The bioactivity of nanoparticles was expressed as relative light units (RLU) using the following Eq;

$$\text{RLU} = \frac{\text{Total Luminescence}}{\text{Net average EGFP fluorescence for the same well}}. \quad (5)$$

The photomultiplier tube (PMT) gain and Z-position were kept constant for all plates and experiments.

3.2.9 Assessment of nanoparticle toxicity (AlamarBlue Assay)

The effect of nanoparticles on metabolic activity was measured using the alamarBlue assay 48h post-transfection. Transfection medium was discarded and replaced by 200 μ L of complete RPMI-1640 supplemented with 10% alamarBlue reagent. Resofurin (alamarBlue) reduction was measured after 1h using a TECAN infinite F500 microplate system ($\lambda_{\text{ex/em}}$ of 535/612 nm). Viability based on cell metabolic activity was evaluated as the percent reduction of alamarBlue relative to untreated cells and calculated using the following Eq;

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{Mean FI (treated)}}{\text{Mean FI (untreated)}} \times 100. \quad (6)$$

3.2.10 Statistical analysis

Data were collected and expressed as average \pm standard deviation (SD). Statistical analysis and graphing were performed using the GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Treatment effects were tested using one/two factor ANOVA followed by the Dunnett's and/or Tukey HSD post hoc tests.

3.3 Results

3.3.1 Ionization behavior of PPAA is biphasic and depends on salt concentration.

Apparent pK_a values of PPAA are often reported without specifying the salt concentration and degrees of ionization used for measurements/calculations (Evans et al., 2015; Kyriakides et al., 2002; Murthy et al., 1999). In this study, we titrated a 22 kDa PPAA at different salt (NaCl) concentrations to characterize its ionization behavior due to its relevance for polyelectrolyte formation (i.e. CS/PPAA). The degree of ionization of PPAA in function of pH (**Figure 3-1 A**) and pK_a (**Figure 3-1 B**) reveal a biphasic behavior with two mostly linear phases, where the second phase (higher values of ionization degree) had a greater slope. The transition between the two phases occurred at ~40-50% ionization and suggests that nearest neighbor interactions are important for this polymer (M. Borkovec, Daicic, & Koper, 1997; Michal Borkovec, Daicic, & Koper, 2001; Smits, Koper, & Mandel, 1993). PPAA became fully uncharged ($\beta = 0\%$) at pH of ~ 5.8, 5.1 and 4.8 for 0, 15 and 150 mM NaCl, respectively. The pH at which a given degree of ionization occurred decreased with increasing salt concentration (**Figure 3-1 A**) and this pH difference was more pronounced at a higher degree of ionization. Similarly, the apparent pK_a (**Figure 3-1 B**) decreased with increasing salt concentration. The apparent pK_a values at $\beta = 50\%$ were 9.1, 8.3 and 7.6 for 0, 150 and 150 mM NaCl, respectively. These results indicate that in physiological conditions (pH 7.4, ~150 mM NaCl), the degree of ionization of PPAA is about 50%.

Based on these titration results, a pH of 6.7 and an ionic strength lower than 15 mM were selected for the preparation of the CS/mRNA/PPAA ternary nanoparticles. We hypothesized that such conditions would ensure that CS or CS/mRNA nanoparticles remain soluble or colloidal stable at the time of mixing while ensuring that the ionization degree of PPAA would be sufficiently high to allow for its electrostatic binding to CS (or positively charged CS/mRNA nanoparticles).

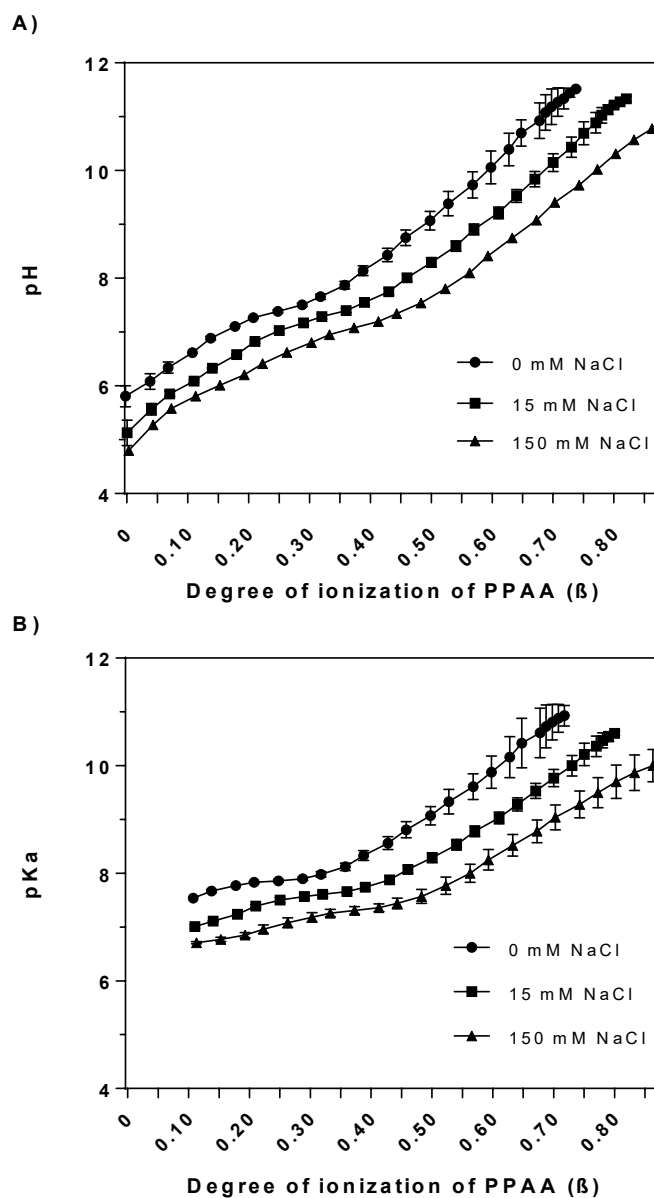


Figure 3-1 Titration curves of PPAA in presence of salt (NaCl). Figures represent the pH (A) and pKa (B) as a function of the degree of ionization. PPAA was dissolved at a 1:1 molar ratio of carboxyl group to NaOH and titrated in the absence (0 mM) or presence (15 and 150 mM) of NaCl using HCl. Data represent the average \pm standard deviation of at least 2 independent experiment (N=2).

3.3.2 Addition of buffer affects the nanoparticle size, PDI and ζ -potential while the addition of PPAA has limited effect on these physicochemical characteristics.

Next, using the comixing and the coating techniques, ternary nanoparticles were prepared in presence of buffer (pH 6.7, ionic strength < 15 mM) using an N:P ratio of 5 and various C:P ratios. As a control, mixing was also performed in water (no buffer), a condition for which pH was acidic (since CS was always used in excess) and PPAA was expected to be mostly neutral and hence possess very limited ability to bind CS or CS/mRNA nanoparticles. It was previously found that CS 80-10, 92-5, 92-10 and 98-5 (DDA-Mn) were the most efficient for mRNA delivery (Soliman et al., 2018). In this previous study, CS/mRNA nanoparticles were prepared in water (no buffer) in presence of 10% trehalose (w/v) at an N:P ratio of 5. However, in the current study, the use of a buffer with the low molecular weight chitosans (92-5 and 98-5) induced nanoparticles aggregation for every C:P ratio tested (data not shown). Also, preliminary tests showed that 80-10 had lower transfection efficiency (bioactivity) than 92-10 (data not shown). Therefore, CS 92-10 was selected for the remainder of this study.

As shown in **Figure 3-2 A**, nanoparticles prepared in water vs buffer displayed significant differences in size and behavior. For instance, nanoparticles prepared in water were around ~ 2 fold smaller (~70 nm) compared to particles prepared in buffer (~ 150-200 nm). In contrast, the polydispersity index (PDI), a measurement of size distribution, showed an opposite behavior with lower values for particles prepared in buffers (bigger in size) except for C:P 1 where strong aggregation was observed. PPAA concentration (C:P ratio) had a minimal effect on the hydrodynamic size, with a slight increase of $\sim 20 \pm 5$ nm for particles prepared at C:P ratio between 0.06 and 0.5. Increasing the C:P ratio to 1 resulted in strong aggregation (**Figure 3-2 A**).

Although the mixing technique and C:P ratio did not have an impact on ζ -potential, the addition of buffer significantly decreased the potential from ~50 (water) to ~12 mV (**Figure 3-2 B**). Additionally, the C:P ratio did not affect the pH of nanoparticles, with values around 4.4 for formulations in water and 6.7 for buffered formulations (**Figure S.2, Supp Info**).

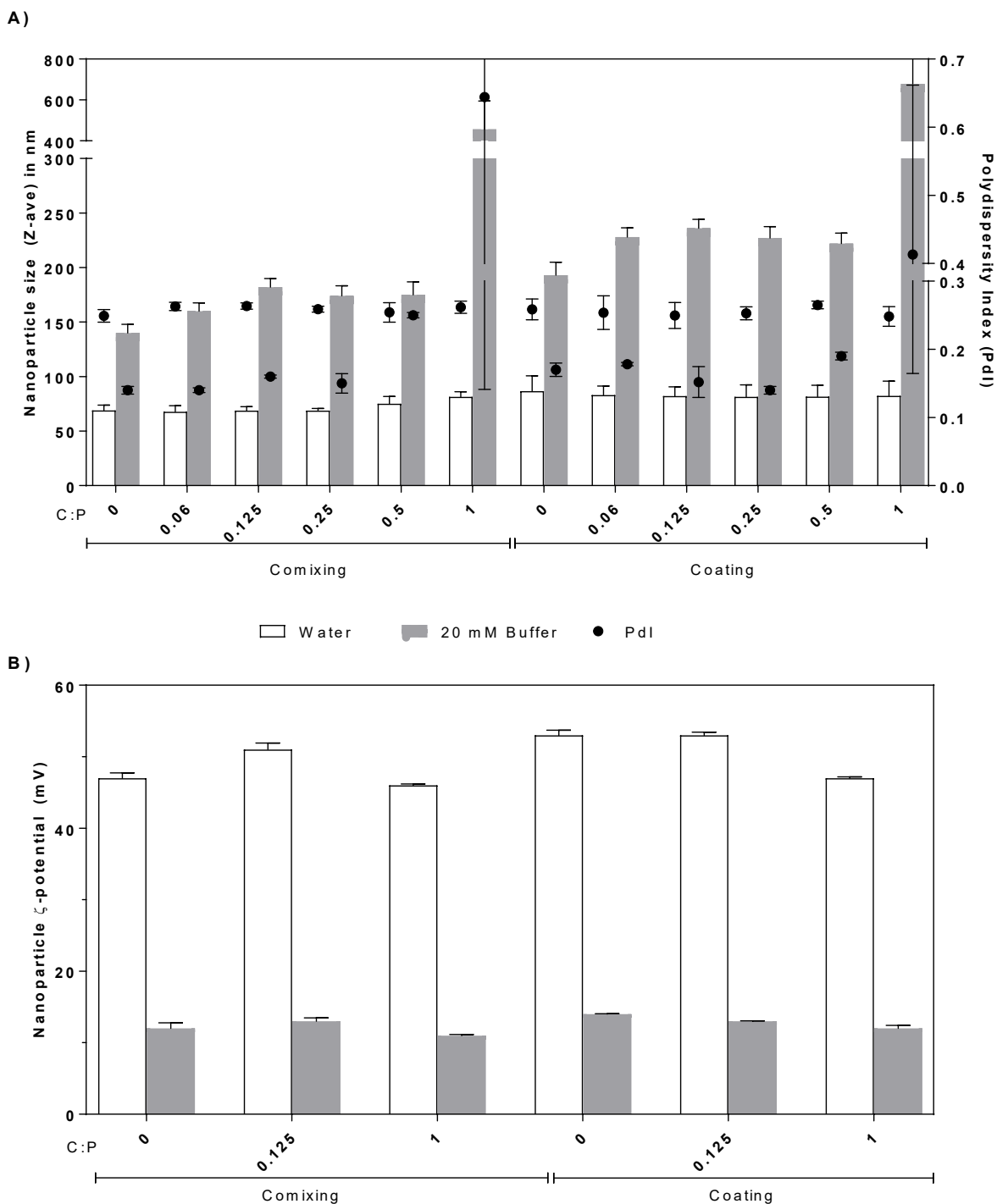


Figure 3-2 Effect of mixing technique, C:P ratio, and absence or presence of buffer on nanoparticle size, polydispersity index and ζ -potential. Nanoparticles were formed in 10% (w/v) trehalose, without (water) or with 20 mM buffer (12 mM Histidine/8 mM MOPS pH 6.7) by

manual mixing. An N:P ratio of 5 was used for every formulation. Dynamic light scattering was used to measure A) Nanoparticle hydrodynamic diameter (Z-ave in nm) and polydispersity index (Pdl), B) Nanoparticle ζ -potential in mV. Data represent average \pm standard deviation of at least 3 independent experiment with at least 2 technical replicates per experiment (N= 3, n= 6).

3.3.3 Addition of *PPAA* by comixing in presence of buffer and trehalose significantly increases nanoparticles *in vitro* bioactivity

Next, we investigated the *in vitro* bioactivity of the various formulations by transfecting EGFP⁺ H1299 cells at pH 6.5 in presence of 10% FBS. As illustrated in **Figure 3-3**, bioactivity followed a bell curve with optimal luciferase expression observed at C:P ratio of 0.125 for buffered nanoparticles and a plateau for C:P of 0.06 to 0.25 for nanoparticles prepared in water. Bioactivity started to decrease at C:P superior to 0.25 and C:P 1 and toxicity was not the reason for the observed decrease (**Figure S.3**, Supp Info). Interestingly, the inclusion of a buffer significantly increased the bioactivity of formulations prepared by comixing, whereas no significant increase was found for formulations prepared by coating. Buffered nanoparticles made by comixing at a C:P 0.125 augmented transfection by 3-fold compared to C:P 0 prepared in the same conditions. This formulation had a bioactivity that reached ~75% of lipid control (LP-MM). Intriguingly, C:P 0 in buffer made by comixing had a TE 5-fold higher than its counterpart in water, and 3-fold higher than buffered/coated at C:P 0. Based on these results, nanoparticles prepared at C:P 0.125 using the comixing method in presence of buffer were considered optimal and selected for further optimization/characterization.

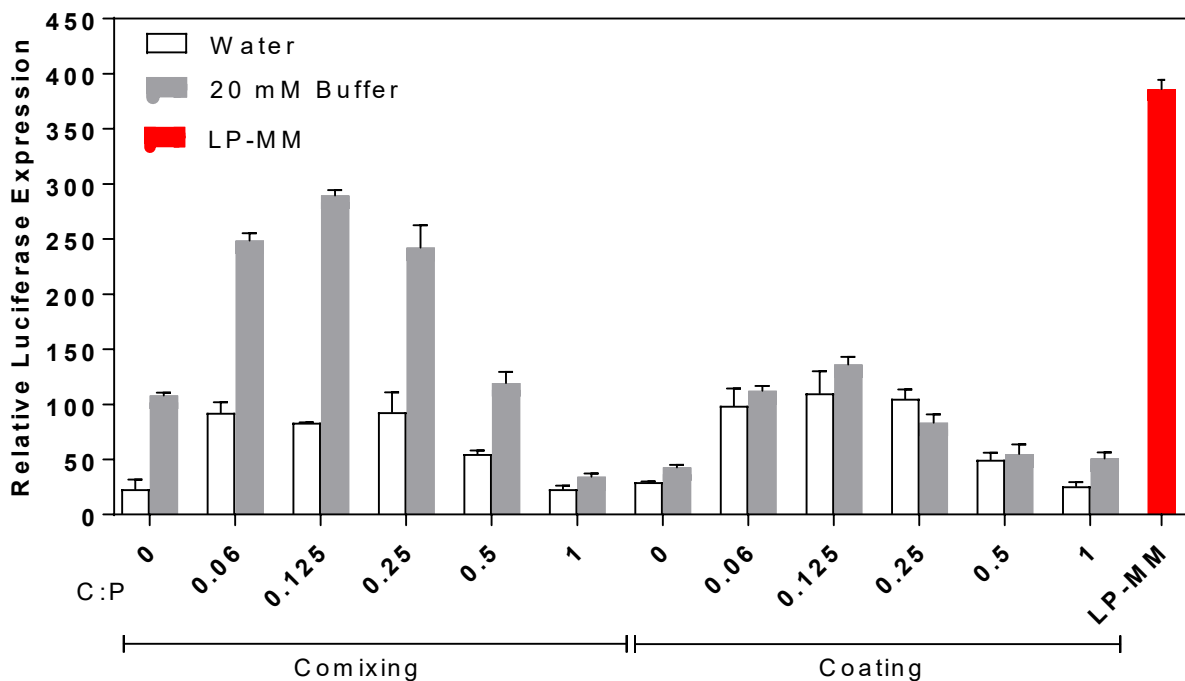


Figure 3-3 Effect of mixing technique, C:P ratio, and absence or presence of buffer on nanoparticles *in vitro* bioactivity. EGFP⁺ H1299 cells were transfected at an mRNA dose of 150 ng/well in complete RPMI-1640 containing 20 mM MOPS (pH 6.5). Luminescence and EGFP fluorescence were assessed 48h post-transfection. EGFP signal was used for normalization of the luminescence signal. Nanoparticles were formed in 10% trehalose (w/v), with or without buffer (12 mM Histidine/8 mM MOPS pH 6.7) by manually mixing 1:1:1 (v/v/v) mRNA (150 µg/mL) with PPAA, followed by addition of chitosan 92-10 (comixing) or mixing mRNA and chitosan 92-10, incubated for 10 min and coated with PPAA at different C:P ratio (coating). N:P ratio of 5 was used for all formulations. Data represent average ± standard deviation of at least 3 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 3, n= 6-9).

3.3.4 Formulations prepared in buffer allowed incorporation of PPAA into/onto CS/mRNA nanoparticles without displacing mRNA.

Afterward, we examined if the decrease in bioactivity with increasing PPAA concentrations (**Figure 3-3**) could be attributed to mRNA displacement driven by PPAA, as both anionic polymers could theoretically compete for the positive charges on chitosan, leaving the mRNA unprotected and susceptible to RNase degradation. First, unbound (free) PPAA to nanoparticles was quantified in order to know if PPAA was incorporated into CS/mRNA nanoparticles. A depletion assay based on toluidine blue (TBO), a cationic molecule that binds PPAA, was used. Nanoparticles were first removed by ultracentrifugation and supernatant recovered and analyzed.

In presence of buffer, no free PPAA was detected, indicating that all/most of PPAA were bound to nanoparticles (**Figure 3-4 A**). Interestingly, our results suggest that PPAA can partially adhere to nanoparticles while not being charged (water condition). However, these results should be treated with caution as we estimate the precision of the assay to be about 20%. On the other hand, the addition of PPAA did not affect mRNA encapsulation (**Figure 3-4 B**). An encapsulation efficiency of 95-97% was found for all tested nanoparticles.

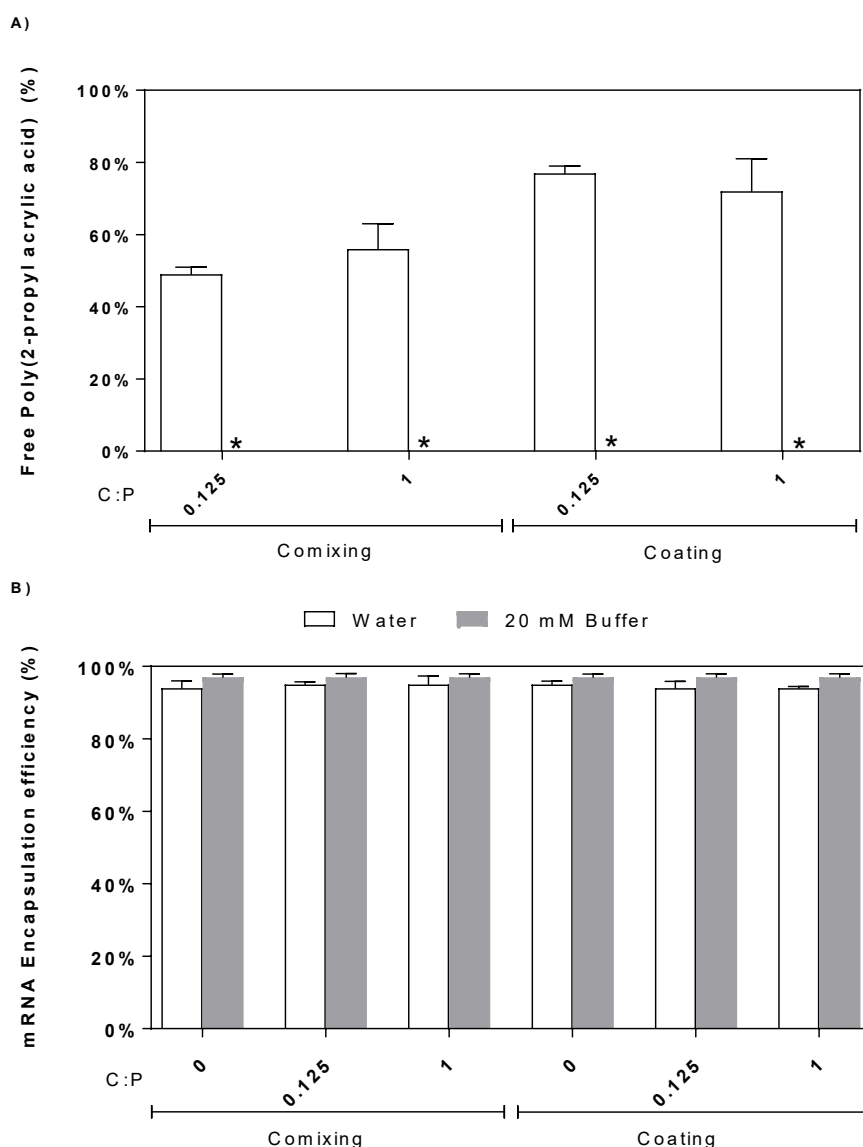


Figure 3-4 Impact of mixing technique, C:P ratio, and absence or presence of buffer on A) unbound (free) and B) mRNA encapsulation by nanoparticles. Nanoparticles were formed in water or 20 mM buffer (12 mM Histidine pH 6.9 and 8 mM MOPS pH 7.3) by manually mixing 1:1:1 (v/v/v) mRNA (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with PPAA, followed by addition of chitosan 92-10 (comixing) or mixing mRNA and chitosan 92-10, incubated for 10 min and coated with PPAA at different C:P ratio (coating). N:P ratio of 5 and final trehalose concentration of 0% (w/v) was used for every formulation. Nanoparticles were then centrifuged at 50,000 rpm for 20 min and the supernatant analyzed. mRNA encapsulation (A) was determined by QuantiFluor® RNA system assay. Unbound PPAA to nanoparticles (B) was determined by TBO assay. Since no free PPAA

was detected (0%) in presence of buffer, the buffer bars (grey) are not visible and their location is denoted by an asterisk (*). Data represent the average \pm standard deviation of at least 2 independent experiment with at least 2 technical replicates per experiment (N= 2, n=4).

3.3.5 Bioactivity of CS nanoparticles is dependent upon endosomal acidification

Next, in order to get insights about the intracellular/vesicular trafficking and mechanisms of transfection, we investigated the role of endosomes/lysosomes lysis and endosomal acidification inhibition on the bioactivity of nanoparticles using the lysosomotropic agent chloroquine (CQ) and vacuolar H⁺ ATPase inhibitor bafilomycin A1 (BFA). As shown in **Figure 3-5**, the addition of BFA completely abrogates the bioactivity of both binary (C:P 0) and ternary (C:P 0.125) nanoparticles. The lipid control was also affected by BFA but to a lesser extent (6-fold reduction). The effect of chloroquine on nanoparticle TE was limited, with an increase by a factor of 1.5 observed for C:P 0 and 0.125. In contrast, the lipid control was negatively affected by CQ, with a 4-fold reduction (**Figure 3-5**). These results indicate that endosomal acidification is required for efficient transfection with both binary (C:P 0) and ternary nanoparticles (C:P 0.125 or 1) while a lysosomotropic agent (CQ) has limited effect on TE.

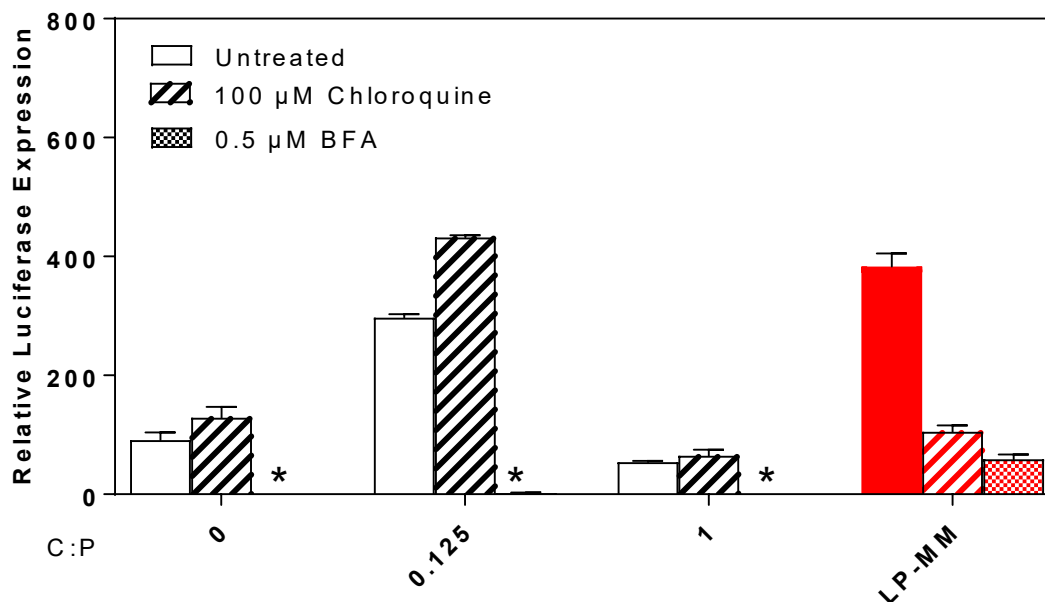


Figure 3-5 Influence of chloroquine and BFA on nanoparticles *in vitro* bioactivity. Nanoparticles were formed in 10% (w/v) trehalose and 20 mM buffer by manually mixing 1:1:1 (v/v/v) mRNA (150 μ g/mL) with PPAA at C:P ratios of 0, 0.125 (optimal) and 1, followed by addition of chitosan 92-10 (comixing) at an N:P ratio of 5. Cells were transfected as described in Figure 3-3. Chloroquine was added at the same time as nanoparticles. In contrast, BFA was added 30 mins before transfection and at the same time as nanoparticles. Since no luminescence was detected in presence of bafilomycin A (BFA), the bars (grey) are not visible, except for the lipid control (LP-MM), and their location is denoted by an asterisk(*). Data represent the average \pm standard deviation of at least 2 independent experiment with at least 2 technical replicates per experiment (N= 2, n=4).

3.3.6 Increasing mRNA mixing concentration in absence of trehalose can drastically increase transfection efficiency without affecting cell viability is reminiscent of CS/mRNA/HA nanoparticles.

It was previously found that bioactivity of CS/mRNA/HA nanoparticles significantly increases with increasing mRNA concentration used at the time of mixing, and dose (Soliman et al., 2018).

The influence of mRNA mixing concentration and delivered dose on physicochemical properties and bioactivity was also assessed herein using the optimal formulation (C:P 0.125 comixed in the buffer) as well as binary CS/mRNA nanoparticles, in presence/absence of trehalose. Modifying the mRNA mixing concentration implies a modification in the concentration of other nanoparticle components. Therefore, buffer concentrations were adjusted accordingly to maintain pH of nanoparticles at 6.7.

As shown in **Figure 3-6 A**, nanoparticle size slightly increased with increased mRNA mixing concentration. Presence of trehalose did not impact the size of PPAA nanoparticles, in contrast to observations with CS/mRNA/HA nanoparticles (Soliman et al., 2018). Next, we verified that this minor size increase is not due to differences in buffer strength between formulations prepared at higher mixing concentrations of mRNA (**Figure S.5**, Supp Info A). As illustrated in **Figure 3-7 B**, luciferase expression increased with increasing mRNA mixing concentration and dose. In absence of trehalose (0% w/v), mRNA mixing concentration significantly influenced nanoparticles bioactivity, with the highest concentration (450 $\mu\text{g/mL}$) being the most effective, reaching $\sim 86\%$ of lipid control at an equal dose (150 ng/well). In contrast, mRNA mixing concentration had a less pronounced influence in presence of trehalose (10% w/v). Again, we verified that these effects on bioactivity are due to mRNA mixing concentration and not the varying buffer strength (**Figure S.5**, Supp Info B and C). Metabolic activity was not influenced by nanoparticle dose and/or mRNA mixing concentration with viability greater than 90% measured for all tested conditions (**Figure 3-7**).

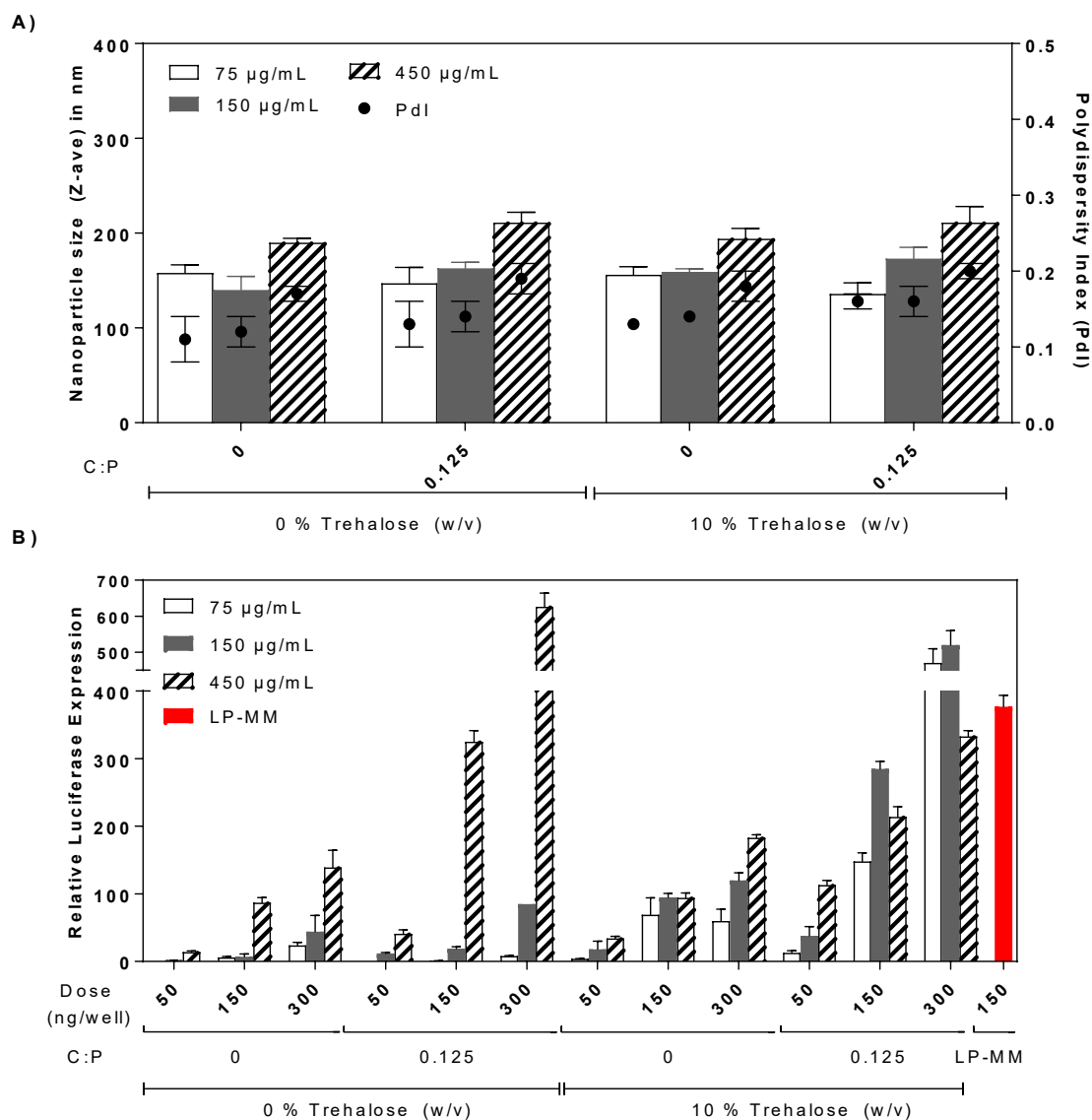


Figure 3-6 Influence of nucleic acid mixing concentration and dose on nanoparticle size, PDI and *in vitro* bioactivity. A) size in nm and PDI. B) *in vitro* bioactivity in the absence or presence of trehalose. Nanoparticles were formed in trehalose (0% or 10%) in presence of buffer by manually mixing 1:1:1 (v/v/v) of mRNA (75, 150 or 450 µg/mL) with PPAA at the control and optimal C:P ratio of 0 and 0.125, respectively, followed by addition of chitosan 92-10 (comixing). N:P ratio of 5 was used. Due to increased chitosan concentration linked with the increase in mRNA concentration, the buffer concentration used for nanoparticles formation had to be increased in order to maintain the pH of nanoparticles at 6.7. A buffer concentration of 14, 20 and 43 mM was used for the mRNA mixing concentrations of 75, 150 and 450 µg/mL, respectively. Transfection

was performed as described in Figure 3. Data represent the average \pm standard deviation of at least 4 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 4, n= 8-12).

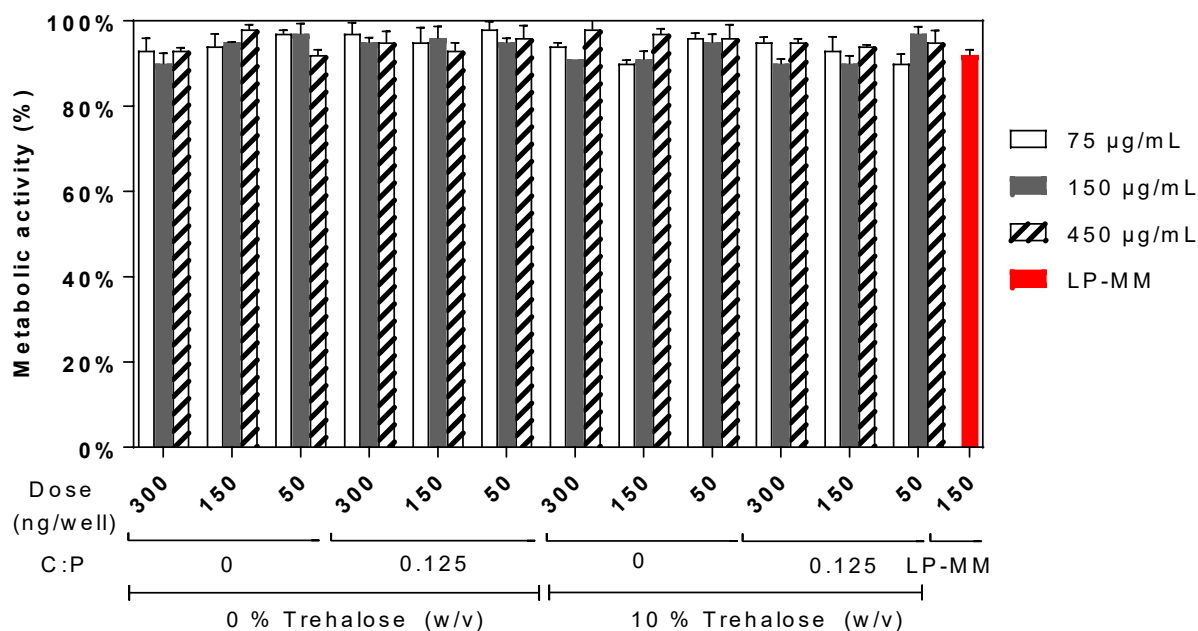


Figure 3-7 Effect of nucleic acid dose and concentration on nanoparticle metabolic activity (viability) in the absence or presence of trehalose. Nanoparticles were prepared and transfection was performed as described in Figure 3-3. Metabolic activity was measured 48h post-transfection using the alamarBlue assay. Untreated cells correspond to 100% metabolic activity. Data represent the average \pm standard deviation of at least 2 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 2, n= 4-6).

3.3.7 Increased *in vitro* bioactivity mediated by trehalose and other saccharides is mostly due to an increase in nanoparticle solution density.

Traditionally, trehalose is used as a lyoprotectant to prevent nanoparticles aggregation during freeze-drying (Veilleux et al., 2016) and was previously demonstrated to improve *in vitro* bioactivity of CS/mRNA/HA formulations (Soliman et al., 2018). Therefore, we investigated the

role of trehalose relative to improved *in vitro* bioactivity and tested if improvement in the presence of trehalose is related to its high density or kosmotropic (stabilizing) properties. Trehalose was therefore compared with other saccharides of similar densities at 10% w/v but different kosmotropivities (**Table S.2**, Supp Info).

Nanoparticle size and PDI were not affected by the type of saccharide used except for 5 kDa dextran which displayed a high PDI. Further data examination revealed a bimodal distribution of nanoparticles detected at ~150 and ~4 nm (most likely due to dextran), therefore explaining the high PDI (**Figure S.4**, Supp Info).

As illustrated in **Figure 3-8**, a significant increase in luciferase expression is achieved in the presence of all saccharides compared to control (water or buffered) conditions indicating that density is superseding kosmotropicity to positively influence TE. Irrespective of the C:P tested, nanoparticles prepared in the presence of trehalose displayed most efficient bioactivity with ~1.5-2-fold increase in luciferase expression compared to nanoparticles in the presence of other saccharides (i.e. glucose or sucrose).

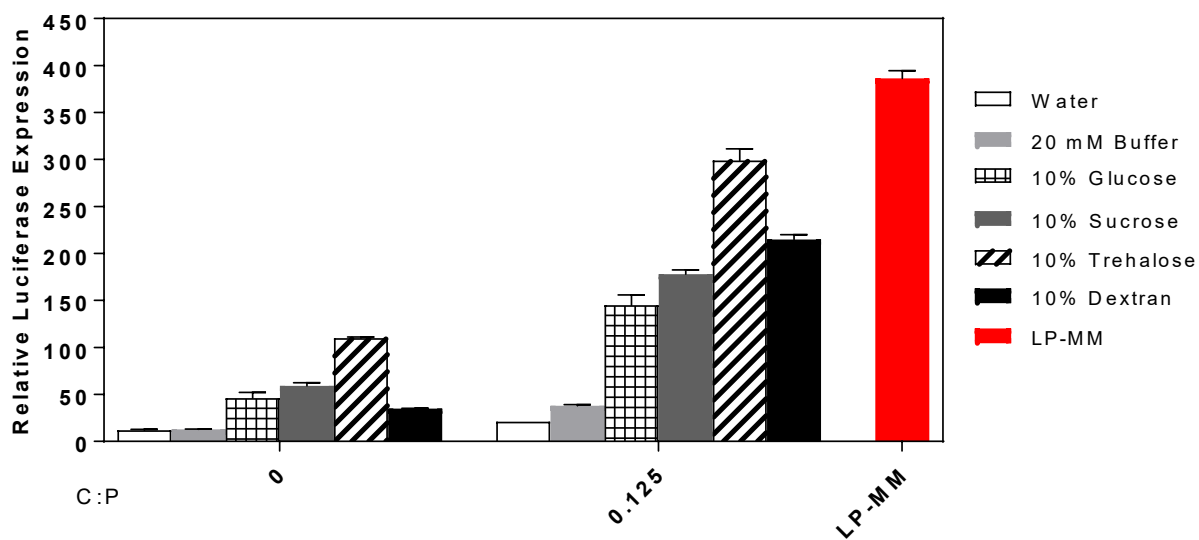


Figure 3-8 Impact of saccharide type on nanoparticles *in vitro* bioactivity. Nanoparticles were prepared as described in Figure 3-2 using the comixing technique with the control and optimal C:P ratio of 0 and 0.125 respectively. Every formulation was prepared in 20 mM buffer and 10% saccharide (glucose, sucrose, trehalose or dextran) (w/v), with the exception of the water

formulation. The 20 mM buffer formulation did not have any saccharide (0%). Transfection was performed as described in Figure 3-3. Data represent the average \pm standard deviation of at least 3 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 3, n= 6-9).

3.4 Discussion

Efficient gene delivery can be accomplished through the design of non-toxic delivery systems that are able to attain a fine balance between nucleic acid (NA) complexation and intracellular decomplexation. The effect of Mn, the degree of deacetylation, N:P ratio and pH were identified as key factors affecting bioactivity of uncoated chitosan nanoparticles (Mohamad Alameh et al., 2018; Marc Lavertu et al., 2006; Soliman et al., 2018). The inclusion of hyaluronic acids (HA) was shown to increase bioactivity, most likely by modulating chitosan affinity to NA via electrostatic competition and therefore improving intracellular decomplexation (Al-Qadi, Alatorre-Meda, Zaghloul, Taboada, & Remunan-Lopez, 2013; Soliman et al., 2018). Here, a different strategy that aims to employ the intrinsic endosmolytic properties of a polyanionic polymer was devised and tested for improved TE. First, PPAA was titrated to characterize its ionization behavior to identify conditions where it would interact electrostatically with CS and CS/mRNA nanoparticles. Nanoparticles were then prepared using two different techniques (comixing vs coating) and characterized for their size and surface charge (ζ -potential). The effect of increasing PPAA (C:P ratio) concentration, NA mixing concentration, dose, and presence of a buffer and/or a saccharide on nanoparticle bioactivity/toxicity was also assessed to optimize the system for improved mRNA expression.

The titration curves of PPAA (**Figure 3-1**) revealed a biphasic character suggesting that nearest-neighbor interactions affect the ionization behavior of the polymer (M. Borkovec et al., 1997; Michal Borkovec et al., 2001; Smits et al., 1993). The titration curve of PPAA revealed an ionization degree of 4% at pH 6.0 in the absence of salt (0 mM) (**Figure 3-1**) in agreement with the literature (Murthy et al., 1999). Under the same condition (0 mM salt), a pH increase from 6 to 7.4 increased the degree of ionization of PPAA from 4 to 27% supporting previous findings (Kyriakides et al., 2002). As expected, the ionization of PPAA was facilitated in presence of salt as it screens electrostatic interactions and an ionization degree of 46% at pH 7.4 was found in

presence of 150 mM NaCl. These findings will be useful to guide future research that uses PPAA by facilitating the approximation of its ionization degree in various salt conditions, ranging from no salt to 150 mM (physiological).

PPAA had no effect on the hydrodynamic size, irrespective of the mixing method, when particles were prepared in water (**Figure 3-2 A**). In contrast, the addition of buffer had a significant effect on size with a systemic increase in nanoparticle size (~ 2 - 2.5 -fold). Interestingly, the effect of mixing methods was highlighted under buffer controlled conditions, with coating yielding significantly bigger particles compared to comixing (**Figure 3-2 A**). This can be explained by the influence of pH on PPAA ionization degree and therefore on the polyanion ability to electrostatically bind and possibly bridge nanoparticles upon its addition post-formation of binary nanoparticles. Indeed, in absence of buffer (pH ~ 4.5), PPAA is mostly neutral and cannot bind CS or CS/mRNA nanoparticles, while in presence of buffer (pH ~ 6.7), PPAA is sufficiently ionized to interact electrostatically with oppositely charged species, as illustrated in **Figure 3-4 A**. Particle size varied between 150-250 nm with a PDI of 0.15-0.2, reminiscent of ternary chitosan based nanoparticles (Lallana et al., 2017; Soliman et al., 2018). Increasing the C:P ratio to 1 induced severe aggregation (**Figure 3-2 A**). As expected, ζ -potential values were not affected by the C:P ratio (**Figure 3-2 B**), since particles were formulated using an excess of positive charges (N:P 5). Kiang *et al.* showed no significant differences in ζ -potential following the addition of PPAA to chitosan/pDNA nanoparticles (Tina Kiang et al., 2004) in agreement with our data. As expected, ζ -potential values were significantly lower in buffer than in water as both increased ionic strength and partial neutralization of CS at pH 6.7 contribute to reducing nanoparticle surface charge (ζ -potential).

Bioactivity significantly improved following the addition of PPAA reaching $\sim 75\%$ relative to the lipid control (**Figure 3-3**). Increased bioactivity could be explained by either an increase in endosomal release (PPAA endosomolytic activity) or a decrease in nanoparticle stability (electrostatic competition between negatively charged PPAA and NA) allowing improved intracellular decomplexation of the mRNA cargo. The increase in bioactivity following the addition of PPAA was much more pronounced in presence of buffer for nanoparticles made by comixing (**Figure 3-3**). This could potentially be explained by: **1**) Improved PPAA incorporation into chitosan/mRNA nanoparticles under conditions (*viz.* buffer) ensuring optimal electrostatic

interactions between the polyions (**Figure 3-4 A**), **2**) Decreased ζ -potential (**Figure 3-2 B**), or avidity between opposite polyions when pH is close to chitosan pK_a , and **3**) Colocalization of histidine molecules present in the buffer could improve endosomal release since this positively charged amino acid was shown to promote escape from endosomes through marginal endosomolytic activity (K.-L. Chang et al., 2010).

The effect of C:P ratio on bioactivity was also studied. Luciferase expression reached a peak at C:P 0.125 and was completely abrogated at C:P 1 possibly due to severe aggregation (**Figure 3-2 A**). This profile was observed for particles prepared using both mixing methods, with an overall higher bioactivity in the case of comixing (**Figure 3-3**). Differences between the two mixing methods could potentially be explained by the underlying principles of particles formations/structure, and qualitative/quantitative differences in the complex protein corona surrounding particles. For instance, PPAA addition post nanoparticle formation (coating method) likely produces a heterogeneous population of particles comprised of CS/PPAA, CS/mRNA and CS/mRNA/PPAA nanoparticles. In contrast, the relative abundance of CS/mRNA/PPAA particles is expected to be higher using the comixing method (low CS/PPAA, CS/mRNA particles vs coating) and thus resulting in a higher colocalization of CS, mRNA and PPAA and a better TE. In addition potential differences in the protein corona due to PPAA surface shielding (coating method) might also explain differences in observed bioactivities since the corona was shown to play a critical role in internalization kinetics/endocytosis pathway (Bertrand et al., 2017; Ho et al., 2018; Konduru et al., 2017).

Chloroquine (CQ) increased the bioactivity of CS/mRNA/PPAA nanoparticles by \sim 1.25-1.5-fold (**Figure 3-5**). Although the bioactivity of binary nanoparticles increased in presence of CQ, the ensuing bioactivity was lower (\sim 4-fold) compared to ternary systems (**Figure 3-5**). Assuming the same CQ (bursting) effect on all endosomes, irrespective of treatment, the difference between binary and ternary particles on bioactivity could be either explained by an improved decomplexation efficiency (intracellular) via affinity modulation or improved cargo stability/protection in presence of PPAA. In contrast, LP-MM was negatively affected by CQ, possibly due to lipid vesicle swelling and bursting (Basore, Cheng, Kushwaha, Nguyen, & Desai, 2015; Pulcini et al., 2015) prior to endosomal escape, therefore leaving the mRNA unprotected and susceptible to degradation in the acidic endosomal compartments.

Blocking endosomal/lysosomal acidification with BFA abrogated the bioactivity of both binary and ternary nanoparticles (**Figure 3-5**). These results confirm the need for acidic pH for the endosomal release and subsequent mRNA expression required for CS nanoparticles and PPAA via the potential proton sponge effect and membrane destabilization, respectively (I. Richard et al., 2013). Interestingly, bioactivity of the lipid control was reduced, not abrogated, indicating a possible role of pH in endosomal liberation and that LP-MM, similar to lipofectamine (3:1 w/w DOSPA/DOPE), uses endocytosis rather than direct fusion with the plasma membrane (Cardarelli et al., 2016). A slight toxicity was seen for BFA treated cells with a visible decrease in confluence (data not shown) and it could be partly responsible for the observed bioactivity reduction. This toxicity was expected since it was proposed that BFA could suppress the progression of lung cancer and could be used as a new therapeutic modality (Chao-Neng et al., 2013).

Changing the mixing concentration of mRNA did not have a marked effect in presence of trehalose, whereas in water, increasing the mixing concentration to 450 $\mu\text{g/mL}$ led to improved bioactivity reaching $\sim 86\%$ of the lipid control (**Figure 3-6 B**). This trend is similar to what was observed for CS/mRNA/HA nanoparticles (Soliman et al., 2018). Further testing is needed in order to understand this behavior. However, it is possible that mRNA loading into nanoparticles increases with increased NA mixing concentration. However, unlike CS/mRNA/HA nanoparticles in trehalose where the bioactivity couldn't increase past a 150 ng/well dose (Soliman et al., 2018), the bioactivity of CS/mRNA/PPAA was increasing with increasing delivered dose (50 to 300 ng/well) (**Figure 3-6 B**). Furthermore, bioactivity was abrogated at pH 7.3, confirming previous publications with CS/pDNA (M. Lavertu et al., 2006) and CS/mRNA (Lallana et al., 2017; Soliman et al., 2018) nanoparticles. This is most likely attributed to CS being uncharged, leading to aggregation, lack of internalization and early decomplexation. Interestingly, CS/siRNA can transfect at pH 7.3 (Mohamad Alameh et al., 2018; Holzerny et al., 2012; Malmo et al., 2012; Ragelle et al., 2014). The inability for CS/mRNA nanoparticles to transfect at physiological pH is a major downfall and could limit their potential application for systemic injection *in vivo*. However, this issue can be addressed by chemically modifying chitosan. This formulation can instead be used for intra-tumoral injections, as the

microenvironment of tumors has a slightly acidic pH (L. Q. Chen & Pagel, 2015; Kato et al., 2013).

Trehalose had a positive effect on bioactivity with a 5 to 10-fold improvement in luciferase expression (Soliman et al.). Soliman *et al.*, suggested either kosmotropicity or density to explain improved bioactivity with their system. Here, we tested this hypothesis using our CS/mRNA/PPAA system in the presence of various saccharides (10% w/v) with equivalent densities but differing kosmotropicity. As illustrated in **Figure 3-8**, both glucose and dextran, two saccharides with respective nil and high kosmotropic effects, improved bioactivity by ~4 and 6-fold respectively suggesting a limited role for kosmotropicity in improving TE. Instead inclusion of a densifying agent (i.e. glucose, sucrose, trehalose or dextran) increases nanoparticle bioactivity via rapid sedimentation to the bottom of the wells, and therefore improving nanoparticle-cell interaction and internalization; less salt-induced nanoparticle aggregation in physiological media or disassembly. Trehalose showed the highest bioactivity suggesting that at similar densities, kosmotropicity might play a role with mild kosmotropicity being optimal; however other unknown factors could also explain the observed optimum bioactivity with trehalose.

Throughout this study, binary and particles optimized through PPAA incorporation, trehalose addition and/or nucleic acid mixing regimen/dose were non-toxic with no apparent change in metabolic activity or EGFP expression relative to untreated cells, confirming previous findings with chitosan (M. Alameh et al., 2010; Mohamad Alameh et al., 2018; Corbet et al., 2016; Marc Lavertu et al., 2006; Malmo et al., 2012; Ragelle et al., 2014).

3.5 Conclusion

We show that the addition of PPAA to CS/mRNA nanoparticles improves their *in vitro* bioactivity. The mechanism by which PPAA increases bioactivity has not been directly tested but has been hypothesized to operate through increasing endosomal release and/or by decreasing the stability of the CS/mRNA complex. Our data suggest that trehalose improves bioactivity by increasing the density of the nanoparticle solution. However, we show that increasing mRNA mixing concentration in the absence of trehalose further improves bioactivity, reaching a protein expression comparable to 86% of the lipid control. Further work should be directed toward

covalently linking CS to PPAA and modify chitosan to improve the transfection efficacy at pH 7.3.

3.6 Acknowledgement

This work was supported by NSERC and PRIMA Québec. E.J received a scholarship from FQRNT. The funding source had no role in study design, data collection, analysis, writing or decision to submit this paper. The author would like to thank Dr. Brian. C. Evans from Vanderbilt University for providing PPAA.

3.7 References

1. Kazmarek, J.C., P.S. Kowalski, and D.G. Anderson, *Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality*. Genome medicine, 2017. **9**(1): p. 60-60.
2. Pardi, N., et al., *mRNA vaccines - a new era in vaccinology*. Nat Rev Drug Discov, 2018. **17**(4): p. 261-279.
3. Meng, Z., et al., *A new developing class of gene delivery: messenger RNA-based therapeutics*. Biomaterials Science, 2017. **5**(12): p. 2381-2392.
4. Li, B., X. Zhang, and Y. Dong, *Nanoscale platforms for messenger RNA delivery*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2018: p. e1530.
5. Riley, M.K. and W. Vermerris, *Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery-A Review*. Nanomaterials (Basel), 2017. **7**(5).
6. Alameh, M., et al., *siRNA Delivery with Chitosan: Influence of Chitosan Molecular Weight, Degree of Deacetylation, and Amine to Phosphate Ratio on in Vitro Silencing Efficiency, Hemocompatibility, Biodistribution, and in Vivo Efficacy*. Biomacromolecules, 2018. **19**(1): p. 112-131.
7. Lallana, E., et al., *Chitosan/Hyaluronic Acid Nanoparticles: Rational Design Revisited for RNA Delivery*. Mol Pharm, 2017. **14**(7): p. 2422-2436.
8. Lavertu, M., et al., *High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation*. Biomaterials, 2006. **27**(27): p. 4815-24.
9. Malmo, J., et al., *siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing*. J Control Release, 2012. **158**(2): p. 261-8.
10. Soliman, O.Y., et al., *In Vitro Efficacy of Chitosan/Hyaluronic Acid Based mRNA Delivery Systems: Influence of Composition, Hyaluronic Acid Sulfation Degree,*

- Molecular Weight and Structural Parameters*. Molecular Pharmaceutics (Submitted), 2018.
11. Alameh, M., et al., *Low molecular weight chitosan nanoparticulate system at low N:P ratio for nontoxic polynucleotide delivery*. Int J Nanomedicine, 2012. **7**: p. 1399-414.
 12. Buschmann, M.D., et al., *Chitosans for delivery of nucleic acids*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(9): p. 1234-70.
 13. Holzerny, P., et al., *Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: profiling the polymer/siRNA interactions and bioactivity*. J Control Release, 2012. **157**(2): p. 297-304.
 14. Jean, M., et al., *Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes*. Eur J Pharm Sci, 2012. **45**(1-2): p. 138-49.
 15. Pardi, N., et al., *Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes*. J Control Release, 2015. **217**: p. 345-51.
 16. Lu, H., et al., *Chitosan-Graft-Polyethylenimine/DNA Nanoparticles as Novel Non-Viral Gene Delivery Vectors Targeting Osteoarthritis*. PLOS ONE, 2014. **9**(1): p. e84703.
 17. Ragelle, H., et al., *Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency*. J Control Release, 2014. **176**: p. 54-63.
 18. Tripathi, S.K., et al., *Linear polyethylenimine-graft-chitosan copolymers as efficient DNA/siRNA delivery vectors in vitro and in vivo*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2012. **8**(3): p. 337-345.
 19. Sun, P., et al., *siRNA-loaded poly(histidine-arginine)6-modified chitosan nanoparticle with enhanced cell-penetrating and endosomal escape capacities for suppressing breast tumor metastasis*. Int J Nanomedicine, 2017. **12**: p. 3221-3234.
 20. Bei, C., et al., *Dual secured nano-melittin for the safe and effective eradication of cancer cells*. J Mater Chem B, 2015. **3**(1): p. 25-29.
 21. Krishnendu, R., G. Bilal, and K. Sudhir Pai, *Enhancing Polysaccharide-Mediated Delivery of Nucleic Acids Through Functionalization with Secondary and Tertiary Amines*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2008. **8**(4): p. 331-340.
 22. Murthy, N., et al., *The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption*. Journal of Controlled Release, 1999. **61**(1): p. 137-143.
 23. Evans, B.C., et al., *Endosomolytic Nano-Polyplex Platform Technology for Cytosolic Peptide Delivery To Inhibit Pathological Vasoconstriction*. ACS nano, 2015. **9**(6): p. 5893-5907.
 24. Foster, S., et al., *Intracellular delivery of a protein antigen with an endosomal-releasing polymer enhances CD8 T-cell production and prophylactic vaccine efficacy*. Bioconjug Chem, 2010. **21**(12): p. 2205-12.
 25. Yang, L., et al., *Poly(2-propylacrylic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) blend microparticles as a targeted antigen delivery system to direct either CD4(+) or CD8(+) T cell activation*. Bioeng Transl Med, 2017. **2**(2): p. 202-211.

26. Cheung, C.Y., et al., *A pH-Sensitive Polymer That Enhances Cationic Lipid-Mediated Gene Transfer*. *Bioconjugate Chemistry*, 2001. **12**(6): p. 906-910.
27. Convertine, A.J., et al., *Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery*. *J Control Release*, 2009. **133**(3): p. 221-9.
28. Kiang, T., et al., *Formulation of chitosan-DNA nanoparticles with poly(propyl acrylic acid) enhances gene expression*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2004. **15**(11): p. 1405-1421.
29. Kyriakides, T.R., et al., *pH-Sensitive polymers that enhance intracellular drug delivery in vivo*. *Journal of Controlled Release*, 2002. **78**(1): p. 295-303.
30. Lee, L.K., et al., *Poly(propylacrylic acid) Enhances Cationic Lipid-Mediated Delivery of Antisense Oligonucleotides*. *Biomacromolecules*, 2006. **7**(5): p. 1502-1508.
31. Fillion, D., M. Lavertu, and M.D. Buschmann, *Ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems*. *Biomacromolecules*, 2007. **8**(10): p. 3224-3234.
32. Lavertu, M., et al., *High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation*. *Biomaterials*, 2006. **27**(27): p. 4815-4824.
33. Nguyen, S., F.M. Winnik, and M.D. Buschmann, *Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography*. *Carbohydrate Polymers*, 2009. **75**(3): p. 528-533.
34. Doane, T.L., et al., *Nanoparticle ζ -Potentials*. *Accounts of Chemical Research*, 2012. **45**(3): p. 317-326.
35. Smits, R.G., G.J.M. Koper, and M. Mandel, *The influence of nearest- and next-nearest-neighbor interactions on the potentiometric titration of linear poly(ethylenimine)*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1993. **97**(21): p. 5745-5751.
36. Borkovec, M., J. Daicic, and G.J.M. Koper, *Ionization properties of interfaces and linear polyelectrolytes: a discrete charge Ising model*. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 2001. **298**(1): p. 1-23.
37. Borkovec, M., J. Daicic, and G.J. Koper, *On the difference in ionization properties between planar interfaces and linear polyelectrolytes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. **94**(8): p. 3499-3503.
38. Veilleux, D., et al., *Preparation of Concentrated Chitosan/DNA Nanoparticle Formulations by Lyophilization for Gene Delivery at Clinically Relevant Dosages*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016. **105**(1): p. 88-96.
39. Al-Qadi, S., et al., *Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles for gene silencing: the role of hyaluronic acid on the nanoparticles' formation and activity*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013. **103**: p. 615-23.
40. Chang, K.-L., et al., *Efficient Gene Transfection by Histidine-Modified Chitosan through Enhancement of Endosomal Escape*. *Bioconjugate Chemistry*, 2010. **21**(6): p. 1087-1095.

41. Konduru, N.V., et al., *Protein corona: implications for nanoparticle interactions with pulmonary cells*. Particle and fibre toxicology, 2017. **14**(1): p. 42-42.
42. Ho, Y.T., R.D. Kamm, and J.C.Y. Kah, *Influence of protein corona and caveolae-mediated endocytosis on nanoparticle uptake and transcytosis*. Nanoscale, 2018. **10**(26): p. 12386-12397.
43. Bertrand, N., et al., *Mechanistic understanding of in vivo protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 777.
44. Basore, K., et al., *How do antimalarial drugs reach their intracellular targets?* Frontiers in pharmacology, 2015. **6**: p. 91-91.
45. Pulcini, S., et al., *Mutations in the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter, PfCRT, enlarge the parasite's food vacuole and alter drug sensitivities*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 14552.
46. Richard, I., et al., *Ionization behavior of chitosan and chitosan-DNA polyplexes indicate that chitosan has a similar capability to induce a proton-sponge effect as PEI*. Biomacromolecules, 2013. **14**(6): p. 1732-40.
47. Cardarelli, F., et al., *The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 25879.
48. Chao-Neng, T., et al., *Brefeldin A Inhibits Cancer Stem Cell Properties in Human Lung Cancer Cells*. Current Signal Transduction Therapy, 2013. **8**(2): p. 113-118.
49. Kato, Y., et al., *Acidic extracellular microenvironment and cancer*. Cancer cell international, 2013. **13**(1): p. 89-89.
50. Chen, L.Q. and M.D. Pagel, *Evaluating pH in the Extracellular Tumor Microenvironment Using CEST MRI and Other Imaging Methods*. Advances in radiology, 2015. **2015**: p. 206405.
51. Alameh, M., et al., *Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing*. Int J Nanomedicine, 2010. **5**: p. 473-81.
52. Corbet, C., et al., *Delivery of siRNA targeting tumor metabolism using non-covalent PEGylated chitosan nanoparticles: Identification of an optimal combination of ligand structure, linker and grafting method*. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2016. **223**: p. 53-63.
53. Cray, J., et al., *A universal measure of Chaotropicity and Kosmotropicity*. Environmental Microbiology, 2013. **15**(1): p.287-296.

3.8 Supplementary Information

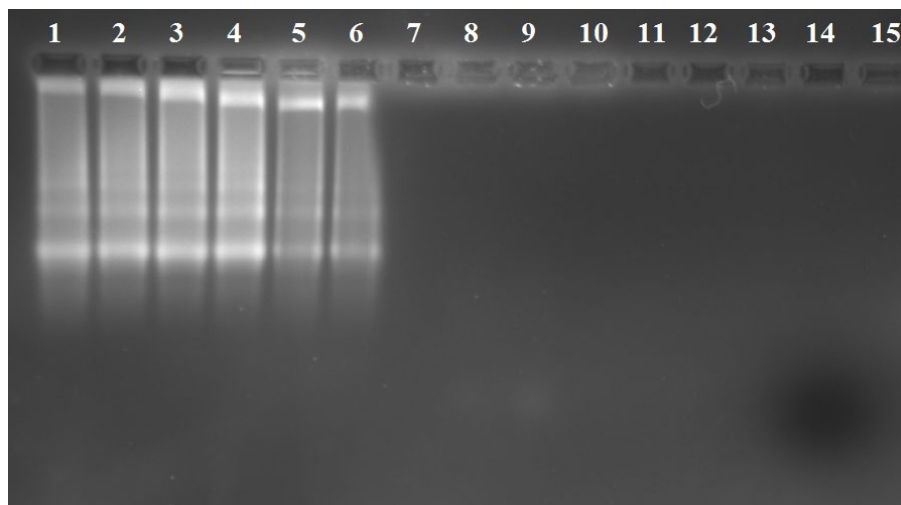


Figure S. 3-1 Effect of PPAA, Buffer and RNase A on FLuc (mRNA) integrity. FLuc was mixed with PPAA at C:P 10 in presence/absence of 8 mM Histidine or MOPS buffer. RNase A was added afterward for a final concentration of 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Solution was incubated at room temperature for 30 min. Migration was performed on a 1.5% agarose gel for 30 mins at 100 V, followed by staining (SBYR Gold 1X, 20 min incubation) and visualization under transillumination. Wells contents: (1) FLuc + H₂O, (2) FLuc+ PPAA in PBS, (3) FLuc+ PPAA in 8 mM MOPS, (4) FLuc+ PPAA in 8 mM Histidine, (5) FLuc + 8 mM MOPS, (6) FLuc + 8 mM Histidine, (7) FLuc + H₂O + RNase A, (8) FLuc+ PPAA in PBS + RNase A, (9) FLuc+ PPAA in 8 mM MOPS + RNase A, (10) FLuc+ PPAA in 8 mM Histidine + RNase A, (11) FLuc + PBS + RNase A, (12) FLuc + 8 mM MOPS + RNase A, (13) FLuc + 8 mM Histidine + RNase A, (14) Orange G (migration front), (15) empty.

Table S. 1 Composition of luciferin mix used in luciferase assay (pH ~7.8)

| Product | Concentration |
|--|----------------------|
| ATP | 1.06 mM |
| Brij-58 | 2% w/v |
| Coenzyme A | 1.08 mM |
| EDTA | 0.2 mM |
| EGTA | 4 mM |
| DTT | 66.6 mM |
| D-luciferin | 0.94 mM |
| Magnesium acetate | 40 mM |
| Magnesium carbonate hydroxide pentahydrate | 2.14 mM |
| Magnesium sulfate | 5.34 mM |
| Tricine | 40 mM |
| Trizma acetate | 200 mM |

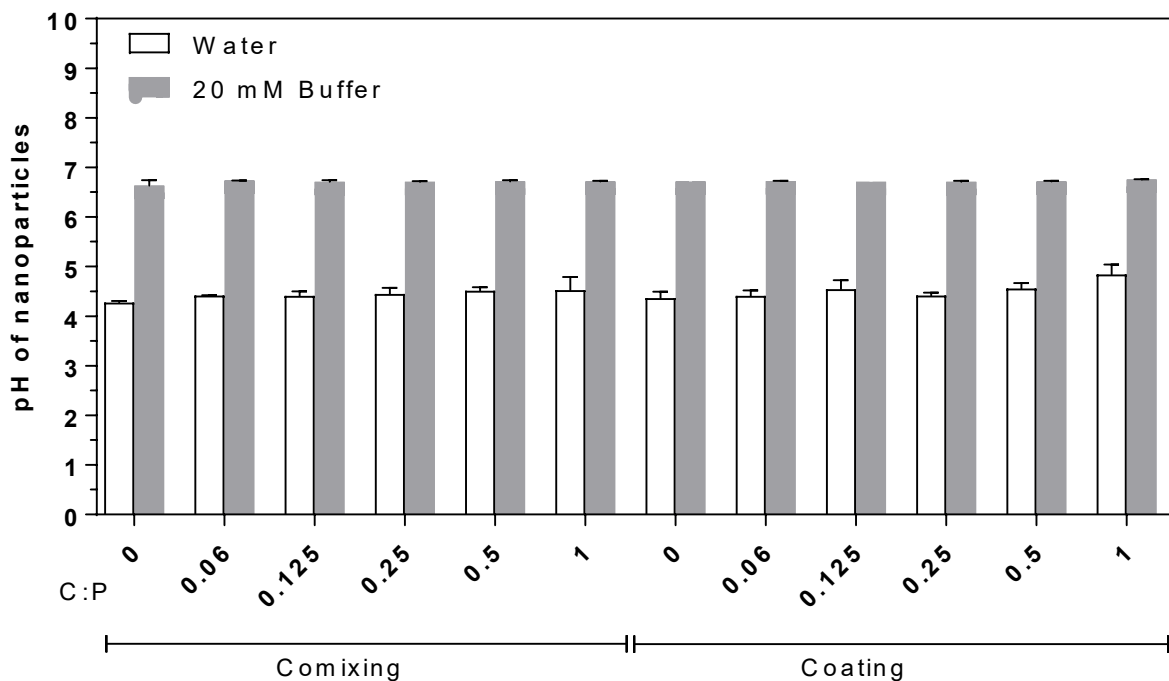


Figure S. 3-2 Effect of mixing technique, C:P ratio and absence or presence of buffer on pH of nanoparticles solution. Nanoparticles were formed as described in Figure 3-2. pH was measured around 20-30 min post-formation with an Orion 720 A plus coupled with an 8220BNWP PerpHecT glass microelectrode. Data represent average \pm standard deviation of at least 3 independent experiment with at least 2 technical replicates per experiment (N= 3, n= 6).

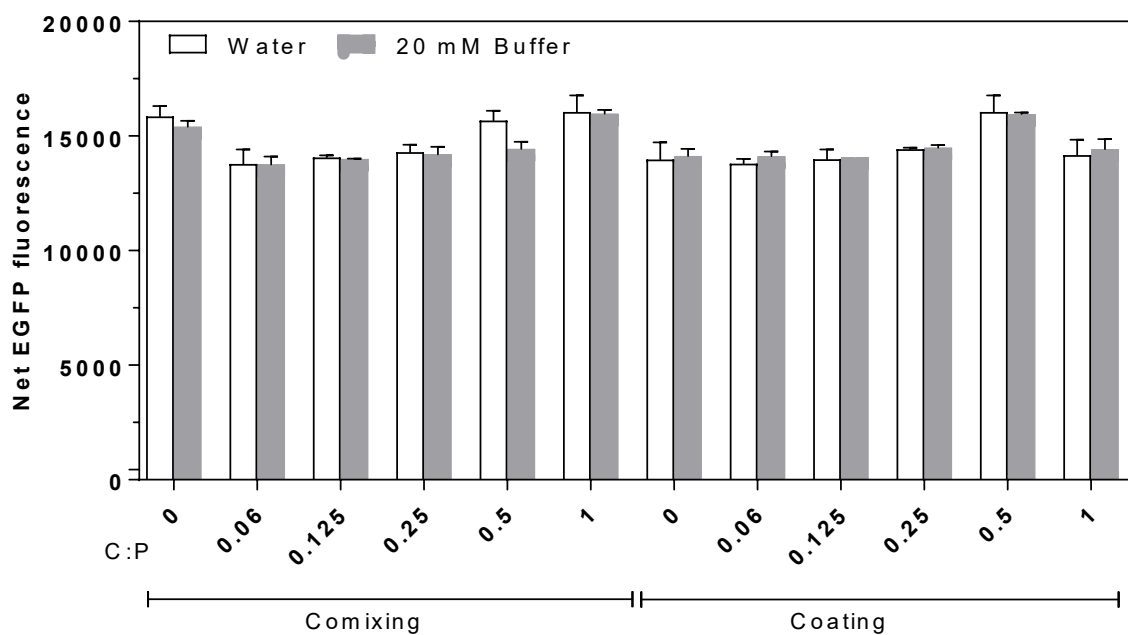


Figure S. 3-3 Effect of mixing technique, C:P ratio and absence or presence of buffer on cells viability. EGFP⁺ H1299 cells were transfected as described in Figure 3-3. 48h post transfection, cells were washed twice with 200 μ L DPBS and EGFP measured ($\lambda_{ex/em}$ of 485/535 nm) using the multiple read/wells function in 50 μ L DPBS. Data represent average \pm standard deviation of at least 3 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 2, n= 4-6).

Table S. 2 Indice of kosmotropicity of saccharides tested in this study. Saccharides are listed in increasing order of kosmotropicity, with glucose considered neutral (neither a kosmotrope nor a chaotrope).

| Saccharide type | Kosmotropicity (kJ mole/kg) [53] |
|------------------|----------------------------------|
| Glucose | +1.19 |
| Sucrose | -6.92 |
| Trehalose | -10.6 |
| Dextran (10 kDa) | -138 |

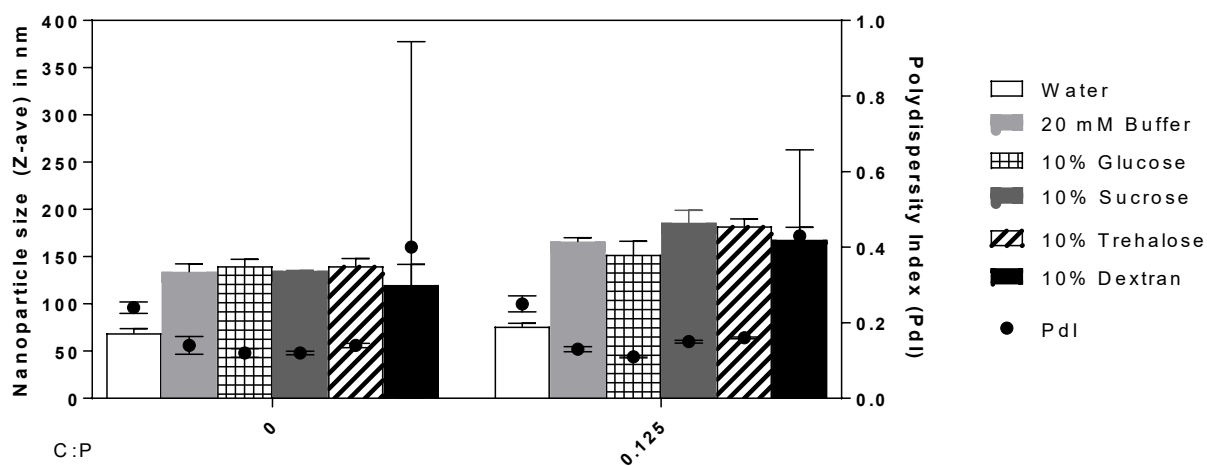


Figure S. 3-4 Impact of saccharides on nanoparticle diameter (Z-ave) and PDI. Nanoparticles were prepared as described in Figure 3-2 using the comixing technique with the control and optimal C:P ratio of 0 and 0.125 respectively. Every formulation was prepared in 20 mM buffer and 10% saccharide (glucose, sucrose, trehalose or dextran) (w/v), with the exception of the water formulation. The 20 mM buffer formulation did not have any saccharide (0%). Data represent average \pm standard deviation of at least 3 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 3, n= 6-9).

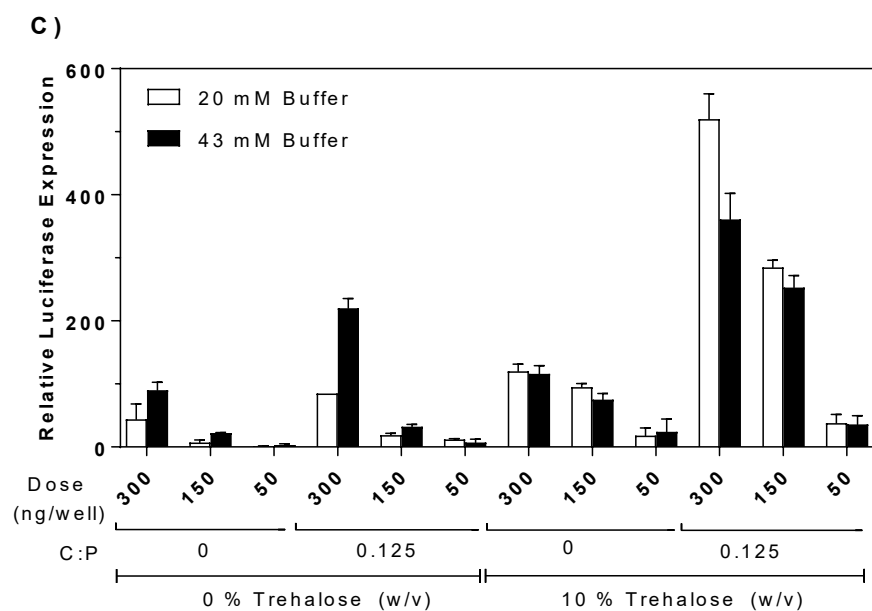
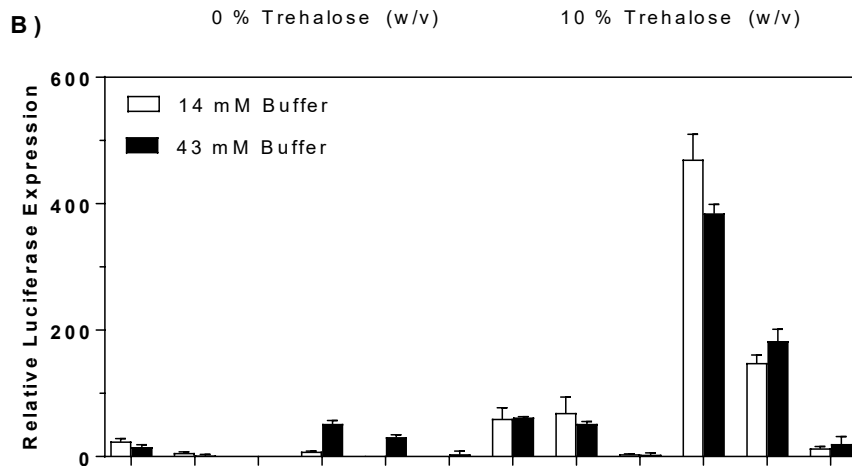
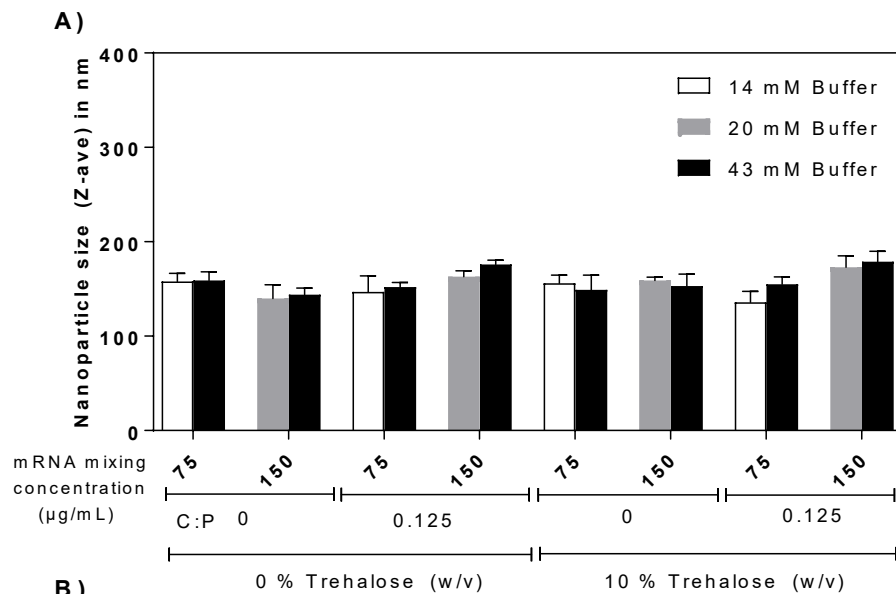


Figure S. 3-5 Influence of buffer concentration on A) nanoparticle diameter (Z-ave) (no influence on PdI was observed, not shown) and on nanoparticle bioactivity for an mRNA mixing concentration of B) 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or C) 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nanoparticles and transfection were performed as described in Figure 3-6. Data represent average \pm standard deviation of at least 2 independent experiment with at least 2 or 3 technical replicates per experiment (N= 3, n= 6-9).

CHAPITRE 4 DISCUSSION GÉNÉRALE

La formulation optimale à base de CS/ARNm/PPAA présentée dans le **Chapitre 3** est en accord avec la théorie. L'addition de PPAA est une stratégie qui fonctionne pour augmenter l'efficacité de transfection. Ceci a été observé dans divers systèmes de livraison pour livrer de l'ADN, ARN et peptides, tels que présenté dans le **Chapitre 2**.

Tout d'abord, le PPAA a été titré dans le but d'identifier son degré d'ionisation à différents pH, afin d'identifier les conditions dans lesquelles le PPAA est suffisamment chargé pour interagir avec le CS de façon électrostatique. La titration a révélé un comportement biphasique, suggérant que les interactions entre voisins proches (monomères adjacents) affectent l'ionisation du polymère. Les résultats furent en accord avec la théorie, avec un degré d'ionisation à 0 mM de 4% à pH 6.0 et de 27% à pH 7.4 (Kyriakides et al., 2002; Murthy et al., 1999). Ces résultats seront utiles pour la recherche future qui utilisera du PPAA afin de guider l'approximation du degré d'ionisation à diverses concentrations de sels.

Par la suite, les nanoparticules furent préparées en utilisant deux techniques de mélanges (*comixing* vs *coating*) et elles furent caractérisées selon leur taille hydrodynamique, potentiel de surface et leur efficacité de transfection. Les effets de la concentration de PPAA, de la concentration de mélange d'ARNm, de dose et de la présence/absence de tampon furent étudiés.

Pour les nanoparticules de CS/ARNm/PPAA, la quantité de PPAA doit être finement ajustée car une trop grande quantité (exprimé par le ratio C : P) peut faire chuter l'efficacité de transfection. Cette tendance est observée pour les deux techniques de mélange, avec toutefois une bioactivité plus élevée pour les formulations faites par *comixing*. Cette différence entre les deux techniques de mélange peut être expliquée par une différence dans la proportion de nanoparticules binaires/ternaire. Par exemple, dans le cas de *coating*, les populations de nanoparticules formées sont constituées de nanoparticules de CS/PPAA, CS/ARNm et CS/ARNm/PPAA. À l'inverse, dans la méthode *comixing*, la proportion de nanoparticules CS/ARNm/PPAA est attendue à être plus élevée, ce qui augmente la colocalisation du CS, ARNm et PPAA dans les endosomes et génère une meilleure transfection. De plus, en *coating*, le PPAA est attendu à être d'avantage en surface, ce qui peut affecter la quantité/nature des protéines qui vont adhérer aux nanoparticules et par conséquent modifier la cinétique d'internalisation/voie d'endocytose utilisée.

L'augmentation de bioactivité suite à une faible addition de PPAA est probablement reliée à une augmentation de la libération endosomale et/ou une diminution de la stabilité des nanoparticules (compétition électrostatique entre le PPAA et l'ARNm pour le CS), ce qui améliore la décomplexation intracellulaire. Cette augmentation de bioactivité a été plus élevée en présence de tampon. Ceci peut être expliqué par **1)** Une augmentation de l'adhésion du PPAA sur/dans les nanoparticules et **2)** Une diminution du ζ -potential ou de l'affinité entre les polyions lorsque le pH est trop près du pK_a du chitosan et **3)** Une colocalisation des molécules d'histidine présentes dans le tampon qui ont une faible activité endosomolytique (K.-L. Chang, Higuchi, Kawakami, Yamashita, & Hashida, 2010). À l'inverse, une trop grande addition de PPAA (C:P >0.25) diminue la bioactivité, probablement en réduisant la stabilité à un point tel où les nanoparticules se décomplexent dans le milieu extracellulaire et l'ARNm exposé est dégradé.

Pour ce qui est de la concentration de mélange de l'ARNm, elle n'a pas eu un effet marqué en présence de tréhalose, alors qu'en absence de tréhalose, l'augmentation de la concentration de mélange augmentait la bioactivité. La concentration optimale de 450 $\mu\text{g/mL}$ a pu atteindre 86% de l'expression de la nanoparticule lipidique contrôle. De plus, contrairement au système de CS/ARNm/HA où la bioactivité était limitée à une dose de 150 ng/puits en présence de tréhalose (Soliman et al., 2018), les nanoparticules de CS/ARNm/PPAA avaient une bioactivité qui augmentait avec la dose (de 50 à 300 ng/puits). La formulation optimale de CS/ARNm/PPAA était environ 100 fois plus efficace que la formulation de CS/ARNm/HA (Lallana et al., 2017). Néanmoins, comme les autres publications utilisant le CS/ADNp et CS/ARNm, les nanoparticules de CS/ARNm/PPAA ne fonctionnaient pas à pH 7.3, probablement à cause que le CS n'est pas suffisamment chargé, ce qui conduit à de l'agrégation, un manque d'internalisation et une décomplexation prématurée (M. Lavertu, Méthot, Tran-Khanh, & Buschmann, 2006; Soliman et al., 2018; Lallana et al., 2017). Ces formulations peuvent alors être utilisées dans des conditions où le pH est légèrement acide, tels que dans les tumeurs.

Finalement, le rôle du tréhalose a été élucidé d'avantage en utilisant des saccharides qui ont une densité similaire mais des propriétés de stabilisation (kosmotropicité) différentes. Le glucose (kosmotropicité nulle) et dextran (forte kosmotropicité), ont augmenté la bioactivité 4 et 6-fois, respectivement, ce qui suggère un rôle limité de la kosmotropicité dans l'augmentation de la bioactivité. Plutôt, il est possible que la présence de ces agents densifiant permettent aux

nanoparticules de sédimenter rapidement au fond des puits, sur les cellules, ce qui augmente l'interaction cellule-nanoparticule et l'internalisation, diminue l'agrégation induite par le sel et la décomplexation. Toutefois, le tréhalose a été le saccharide le plus efficace, ce qui suggère un faible rôle de la kosmotropie. La manière dont cette kosmotropie affecte la bioactivité des nanoparticules est inconnue. De plus, il est à noter que l'augmentation de l'efficacité de transfection par l'ajout d'un agent densifiant permet en quelque sorte de contourner l'influence des barrières extracellulaires, isolant ainsi les barrières intracellulaires. Ceci permet alors d'évaluer l'influence des barrières intracellulaires sur l'efficacité de transfection. Toutefois, il est important de mentionner que l'utilisation d'un agent densifiant n'aurait pas d'effet sur l'efficacité de livraison dans le cadre d'utilisation *in vivo*.

CHAPITRE 5 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

En conclusion, les hypothèses initiales ont été validées. La présence d'un tampon augmente la charge du PPAA et par conséquent son adhésion sur les nanoparticules. Néanmoins, le PPAA peut se lier aux polyplexes même s'il n'était pas chargé. L'addition de PPAA aux nanoparticules de CS/ARNm en présence de tampon a augmenté l'efficacité de transfection jusqu'à atteindre une expression de protéine comparable à 86% du contrôle lipidique. Il a été proposé que cette augmentation d'efficacité soit attribuée à **1)** une diminution de l'affinité de liaison entre le CS et l'ARNm (décomplexation facilitée) et **2)** une augmentation de la libération endosomale. Par contre, ces deux hypothèses n'ont pas été testées directement. L'étude de la diminution de la stabilité pourra être testée en remplaçant le PPAA par l'acide poly(acrylique)(PAA), un polymère qui a une structure similaire au PPAA, mais qui est dépourvu du groupement propyle et donc d'activité endosomolytique. De l'autre côté, le mécanisme de libération endosomale pourra être mis en évidence par un essai calcéine en cytométrie. L'essai calcéine utilise un fluorophore qui donne lieu au phénomène de «*self-quenching*» (diminution de la fluorescence) lorsqu'il se retrouve à forte concentration, telle que dans les endosomes. Lorsqu'il y a rupture de l'endosome, le fluorophore s'échappe et est dilué dans le cytosol, ce qui augmente le signal de fluorescence. Il est alors possible de quantifier la libération (ou la séquestration) endosomale en cytométrie en flux ou en microscopie suite à un traitement avec les nanoparticules à base de CS/ARNm/PPAA. Une autre expérience à réaliser aura comme but de valider si la différence d'efficacité entre *comixing* et *coating* est bel et bien attribuée à une différence dans le nombre de nanoparticules ternaire/binaire. Pour ce faire, l'ARNm et PPAA seront marqués avec un fluorophore, puis la taille, morphologie, PDI des nanoparticules seront analysées par NTA (*nanoparticles tracking analysis*). Cette technique procure des avantages sur la DLS notamment **1)** une meilleure sensibilité et **2)** une visualisation des nanoparticules, permettant ainsi de compter les nanoparticules binaires et ternaires. De plus, en ayant un ARNm marqué, la cinétique d'internalisation pourra être évaluée par cytométrie en même temps que la libération endosomale. D'ailleurs, utiliser cet ARNm augmentera la sensibilité de l'essai calcéine.

La plus grande limitation de la formulation établie dans ce mémoire est son inhabilité à transfecter des cellules à pH physiologique. Des modifications sur le chitosane devront être faites pour augmenter sa solubilité et la stabilité des nanoparticules afin d'éviter la décomplexation à

pH neutre. Le PPAA pourra aussi être fixé de façon covalente sur le CS. Une fois que la formulation sera capable de transférer à pH 7.4, des évaluations d'efficacité *in vivo*, de biodistribution et de toxicité (*e.g.* induction du système immunitaire) devront être effectuées avant de pouvoir considérer son application en clinique.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrams, M. T., Koser, M. L., Seitzer, J., Williams, S. C., DiPietro, M. A., Wang, W., . . . Sepp-Lorenzino, L. (2010). Evaluation of efficacy, biodistribution, and inflammation for a potent siRNA nanoparticle: effect of dexamethasone co-treatment. *Mol Ther*, *18*(1), 171-180. doi:10.1038/mt.2009.208
- Al-Qadi, S., Alatorre-Meda, M., Zaghloul, E. M., Taboada, P., & Remunan-Lopez, C. (2013). Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles for gene silencing: the role of hyaluronic acid on the nanoparticles' formation and activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*, *103*, 615-623. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.11.009
- Alameh, M., Dejesus, D., Jean, M., Darras, V., Thibault, M., Lavertu, M., . . . Merzouki, A. (2012). Low molecular weight chitosan nanoparticulate system at low N:P ratio for nontoxic polynucleotide delivery. *Int J Nanomedicine*, *7*, 1399-1414. doi:10.2147/ijn.s26571
- Alameh, M., Jean, M., Dejesus, D., Buschmann, M. D., & Merzouki, A. (2010). Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing. *Int J Nanomedicine*, *5*, 473-481.
- Alameh, M., Lavertu, M., Tran-Khanh, N., Chang, C.-Y., Lesage, F., Bail, M., . . . Buschmann, M. D. (2018). siRNA Delivery with Chitosan: Influence of Chitosan Molecular Weight, Degree of Deacetylation, and Amine to Phosphate Ratio on in Vitro Silencing Efficiency, Hemocompatibility, Biodistribution, and in Vivo Efficacy. *Biomacromolecules*, *19*(1), 112-131. doi:10.1021/acs.biomac.7b01297
- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed.). New York: Garland Science.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, *413*, 732. doi:10.1038/35099560
- Almalik, A., Alradwan, I., Kalam, M. A., & Alshamsan, A. (2017). Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *25*(6), 861-867. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.12.008>
- Andrea, L., Marica, I., & Anamarija, R. (2017). Lysozyme-Induced Degradation of Chitosan: The Characterisation of Degraded Chitosan Scaffolds. *Journal of Tissue Repair and Regeneration*, *1*(1), 12-22. doi:<https://doi.org/>
- Andreev, D. E., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., & Shatsky, I. N. (2016). Pros and cons of pDNA and mRNA transfection to study mRNA translation in mammalian cells. *Gene*, *578*(1), 1-6. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.008>
- Arguelles, J. C. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol*, *174*(4), 217-224. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081789>
- Balan, V., & Verestiuc, L. (2014). Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *European Polymer Journal*, *53*, 171-188. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.01.033>

- Ball, R. L., Bajaj, P., & Whitehead, K. A. (2016). Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: examining the effect of pH, temperature, and lyophilization. *International journal of nanomedicine*, *12*, 305-315. doi:10.2147/IJN.S123062
- Basore, K., Cheng, Y., Kushwaha, A. K., Nguyen, S. T., & Desai, S. A. (2015). How do antimalarial drugs reach their intracellular targets? *Frontiers in pharmacology*, *6*, 91-91. doi:10.3389/fphar.2015.00091
- Bathori, G., Cervenak, L., & Karadi, I. (2004). Caveolae--an alternative endocytotic pathway for targeted drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, *21*(2), 67-95.
- Behr, J.-P. (1997). *The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit* (Vol. 51).
- Bei, C., Bindu, T., Remant, K. C., & Peisheng, X. (2015). Dual secured nano-melittin for the safe and effective eradication of cancer cells. *J Mater Chem B*, *3*(1), 25-29. doi:10.1039/c4tb01401d
- Beitelshes, M., Hill, A., Rostami, P., Jones, C. H., & Pfeifer, B. A. (2017). Pressing diseases that represent promising targets for gene therapy. *Discovery medicine*, *24*(134), 313-322.
- Bengali, Z., C.Rea, J., & Shea, L. D. (2007). Gene expression and internalization following vector adsorption to immobilized proteins: dependence on protein identity and density. *The Journal of Gene Medicine*, *9*(8), 668-678. doi:10.1002/jgm.1058
- Benmerah, A., & Lamaze, C. (2007). Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic*, *8*(8), 970-982. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00585.x
- Bertrand, N., Grenier, P., Mahmoudi, M., Lima, E. M., Appel, E. A., Dormont, F., . . . Farokhzad, O. C. (2017). Mechanistic understanding of in vivo protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics. *Nat Commun*, *8*(1), 777. doi:10.1038/s41467-017-00600-w
- Bhilocha, S., Amin, R., Pandya, M., Yuan, H., Tank, M., LoBello, J., . . . Cowman, M. K. (2011). Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis methods for molecular mass analysis of 5- to 500-kDa hyaluronan. *Analytical Biochemistry*, *417*(1), 41-49. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.05.026>
- Bissig, C., & Gruenberg, J. (2014). ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol*, *24*(1), 19-25. doi:10.1016/j.tcb.2013.10.009
- Blanchard, J. S. (1984). [26] Buffers for enzymes *Methods in Enzymology* (Vol. 104, pp. 404-414): Academic Press.
- Borkovec, M., Daicic, J., & Koper, G. J. (1997). On the difference in ionization properties between planar interfaces and linear polyelectrolytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(8), 3499-3503. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108004>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC20467/>
- Borkovec, M., Daicic, J., & Koper, G. J. M. (2001). Ionization properties of interfaces and linear polyelectrolytes: a discrete charge Ising model. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, *298*(1), 1-23. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-4371\(01\)00207-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4371(01)00207-2)

- Bourzac, K. (2017). Gene therapy: Erasing sickle-cell disease. *Nature*, 549, S28. doi:10.1038/549S28a
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16), 7297-7301.
- Branca, C., Magazù, S., Maisano, G., Migliardo, F., Migliardo, P., & Romeo, G. (2001). α,α -Trehalose/Water Solutions. 5. Hydration and Viscosity in Dilute and Semidilute Disaccharide Solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(41), 10140-10145. doi:10.1021/jp010179f
- Bruce, A. (1989). *Molecular biology of the cell*: Second edition. New York : Garland Pub., [1989] ©1989.
- Buschmann, M. D., Merzouki, A., Lavertu, M., Thibault, M., Jean, M., & Darras, V. (2013). Chitosans for delivery of nucleic acids. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(9), 1234-1270. doi:10.1016/j.addr.2013.07.005
- Capasso Palmiero, U., Kaczmarek, J. C., Fenton, O. S., & Anderson, D. G. (2018). Poly(beta-amino ester)-co-poly(caprolactone) Terpolymers as Nonviral Vectors for mRNA Delivery In Vitro and In Vivo. *Adv Healthc Mater*, 7(14), e1800249. doi:10.1002/adhm.201800249
- Cardarelli, F., Digiacomo, L., Marchini, C., Amici, A., Salomone, F., Fiume, G., . . . Caracciolo, G. (2016). The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Scientific Reports*, 6, 25879. doi:10.1038/srep25879
- <https://www.nature.com/articles/srep25879#supplementary-information>
- Chang, H., Lim, J., Ha, M., & Kim, V. N. (2014). TAIL-seq: genome-wide determination of poly(A) tail length and 3' end modifications. *Mol Cell*, 53(6), 1044-1052. doi:10.1016/j.molcel.2014.02.007
- Chang, K.-L., Higuchi, Y., Kawakami, S., Yamashita, F., & Hashida, M. (2010). Efficient Gene Transfection by Histidine-Modified Chitosan through Enhancement of Endosomal Escape. *Bioconjugate Chemistry*, 21(6), 1087-1095. doi:10.1021/bc1000609
- Chao-Neng, T., Chung-Lung, C., Tzan-Wen, C., Chien-Chih, C., Hsueh-Wei, C., Fang-Rong, C., & Yung-Fu, C. (2013). Brefeldin A Inhibits Cancer Stem Cell Properties in Human Lung Cancer Cells. *Current Signal Transduction Therapy*, 8(2), 113-118. doi:<http://dx.doi.org/10.2174/15743624113086660005>
- Chen, C. Y., & Shyu, A. B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci*, 20(11), 465-470.
- Chen, L. Q., & Pagel, M. D. (2015). Evaluating pH in the Extracellular Tumor Microenvironment Using CEST MRI and Other Imaging Methods. *Advances in radiology*, 2015, 206405. doi:10.1155/2015/206405
- Cheng, X., & Lee, R. J. (2016). The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 99(Pt A), 129-137. doi:10.1016/j.addr.2016.01.022

- Cheung, C. Y., Murthy, N., Stayton, P. S., & Hoffman, A. S. (2001). A pH-Sensitive Polymer That Enhances Cationic Lipid-Mediated Gene Transfer. *Bioconjugate Chemistry*, 12(6), 906-910. doi:10.1021/bc0100408
- Choi, H. Y., Lee, T. J., Yang, G. M., Oh, J., Won, J., Han, J., . . . Cho, S. G. (2016). Efficient mRNA delivery with graphene oxide-polyethylenimine for generation of footprint-free human induced pluripotent stem cells. *J Control Release*, 235, 222-235. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.007
- Cobb, M. (2015). Who discovered messenger RNA? *Current Biology*, 25(13), R526-R532. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.032>
- Convertine, A. J., Benoit, D. S., Duvall, C. L., Hoffman, A. S., & Stayton, P. S. (2009). Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery. *J Control Release*, 133(3), 221-229. doi:10.1016/j.jconrel.2008.10.004
- Corbet, C., Ragelle, H., Pourcelle, V., Vanvarenberg, K., Marchand-Brynaert, J., Pr at, V., & Feron, O. (2016). Delivery of siRNA targeting tumor metabolism using non-covalent PEGylated chitosan nanoparticles: Identification of an optimal combination of ligand structure, linker and grafting method. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 223, 53-63. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.020
- Costa-Pinto, A. R., Martins, A. M., Castelhana-Carlos, M. J., Correlo, V. M., Sol, P. C., Longatto-Filho, A., . . . Neves, N. M. (2014). In vitro degradation and in vivo biocompatibility of chitosan-poly(butylene succinate) fiber mesh scaffolds. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 29(2), 137-151. doi:10.1177/0883911514521919
- Cray, J. A., Russell, J. T., Timson, D. J., Singhal, R. S., & Hallsworth, J. E. (2013). A universal measure of chaotropicity and kosmotropicity. *Environ Microbiol*, 15(1), 287-296. doi:10.1111/1462-2920.12018
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., & Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 223(4637), 701-703. doi:10.1126/science.223.4637.701
- Crowe, J. H., Leslie, S. B., & Crowe, L. M. (1994). Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? *Cryobiology*, 31(4), 355-366. doi:10.1006/cryo.1994.1043
- DeFrancesco, L. (2017). The 'anti-hype' vaccine. *Nat Biotechnol*, 35(3), 193-197. doi:10.1038/nbt.3812
- Demoulin, T., Milona, P., Englezou, P. C., Ebensen, T., Schulze, K., Suter, R., . . . McCullough, K. C. (2016). Polyethylenimine-based polyplex delivery of self-replicating RNA vaccines. *Nanomedicine*, 12(3), 711-722. doi:10.1016/j.nano.2015.11.001
- Doane, T. L., Chuang, C.-H., Hill, R. J., & Burda, C. (2012). Nanoparticle ζ -Potentials. *Accounts of Chemical Research*, 45(3), 317-326. doi:10.1021/ar200113c
- Durymanov, M., & Reineke, J. (2018). Non-viral Delivery of Nucleic Acids: Insight Into Mechanisms of Overcoming Intracellular Barriers. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 971. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00971>

- Eagle, H. (1971). Buffer Combinations for Mammalian Cell Culture. *Science*, 174(4008), 500. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/174/4008/500.abstract>
- Elango, N., Elango, S., Shivshankar, P., & Katz, M. S. (2005). Optimized transfection of mRNA transcribed from a d(A/T)100 tail-containing vector. *Biochem Biophys Res Commun*, 330(3), 958-966. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.067
- Evans, B. C., Hocking, K. M., Kilchrist, K. V., Wise, E. S., Brophy, C. M., & Duvall, C. L. (2015). Endosomolytic Nano-Polyplex Platform Technology for Cytosolic Peptide Delivery To Inhibit Pathological Vasoconstriction. *ACS Nano*, 9(6), 5893-5907. doi:10.1021/acs.nano.5b00491
- Fang, Y., Xue, J., Gao, S., Lu, A., Yang, D., Jiang, H., . . . Shi, K. (2017). Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the “PEG dilemma” in efficient drug delivery. *Drug Delivery*, 24(2), 22-32. doi:10.1080/10717544.2017.1388451
- Feldmann, D. P., Cheng, Y., Kandil, R., Xie, Y., Mohammadi, M., Harz, H., . . . Merkel, O. M. (2018). In vitro and in vivo delivery of siRNA via VIPER polymer system to lung cells. *Journal of Controlled Release*, 276, 50-58. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.017>
- Ferguson, W. J., Braunschweiger, K. I., Braunschweiger, W. R., Smith, J. R., McCormick, J. J., Wasmann, C. C., . . . Good, N. E. (1980). Hydrogen ion buffers for biological research. *Analytical Biochemistry*, 104(2), 300-310. doi:[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90079-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90079-2)
- Ferreira, C. M. H., Pinto, I. S. S., Soares, E. V., & Soares, H. M. V. M. (2015). (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. *RSC Advances*, 5(39), 30989-31003. doi:10.1039/C4RA15453C
- Filion, D., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2007). Ionization and Solubility of Chitosan Solutions Related to Thermosensitive Chitosan/Glycerol-Phosphate Systems. *Biomacromolecules*, 8(10), 3224-3234. doi:10.1021/bm700520m
- Finn, J. D., Smith, A. R., Patel, M. C., Shaw, L., Youniss, M. R., van Heteren, J., . . . Morrissey, D. V. (2018). A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep*, 22(9), 2227-2235. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.014
- Foster, S., Duvall, C. L., Crownover, E. F., Hoffman, A. S., & Stayton, P. S. (2010). Intracellular delivery of a protein antigen with an endosomal-releasing polymer enhances CD8 T-cell production and prophylactic vaccine efficacy. *Bioconjug Chem*, 21(12), 2205-2212. doi:10.1021/bc100204m
- Franks, F. (1977). Solvation and conformational effects in aqueous solutions of biopolymer analogues. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 278(959), 33-57.
- Fretz, M., Jin, J., Conibere, R., Penning, N. A., Al-Taei, S., Storm, G., . . . Jones, A. T. (2006). Effects of Na⁺/H⁺ exchanger inhibitors on subcellular localisation of endocytic organelles and intracellular dynamics of protein transduction domains HIV-TAT peptide and octaarginine. *J Control Release*, 116(2), 247-254. doi:10.1016/j.jconrel.2006.07.009

- Futaki, S. (2005). Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(4), 547-558. doi:10.1016/j.addr.2004.10.009
- Gallie, D. R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev*, 5(11), 2108-2116.
- Gestin, M., Dowaidar, M., & Langel, U. (2017). Uptake Mechanism of Cell-Penetrating Peptides. *Adv Exp Med Biol*, 1030, 255-264. doi:10.1007/978-3-319-66095-0_11
- Good, N. E., & Izawa, S. (1972). [3] Hydrogen ion buffers *Methods in Enzymology* (Vol. 24, pp. 53-68): Academic Press.
- Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., & Singh, R. M. M. (1966). Hydrogen Ion Buffers for Biological Research*. *Biochemistry*, 5(2), 467-477. doi:10.1021/bi00866a011
- Guo, N., Puhlev, I., Brown, D. R., Mansbridge, J., & Levine, F. (2000). Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nat Biotechnol*, 18(2), 168-171. doi:10.1038/72616
- Guo, X., Sun, T., Zhong, R., Ma, L., You, C., Tian, M., . . . Wang, C. (2018). Effects of Chitosan Oligosaccharides on Human Blood Components. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1412. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01412>
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., . . . Cavazzana-Calvo, M. (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(9), 3132-3142. doi:10.1172/JCI35700
- Hajj, K. A., & Whitehead, K. A. (2017). Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nature Reviews Materials*, 2, 17056. doi:10.1038/natrevmats.2017.56
- Haug, M., Brede, G., Hakerud, M., Nedberg, A. G., Gederaas, O. A., Flo, T. H., . . . Halaas, O. (2018). Photochemical Internalization of Peptide Antigens Provides a Novel Strategy to Realize Therapeutic Cancer Vaccination. *Front Immunol*, 9, 650. doi:10.3389/fimmu.2018.00650
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., . . . Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663), 1526-1529. doi:10.1126/science.1093620
- Higgins, C. B., Zhang, Y., Mayer, A. L., Fujiwara, H., Stothard, A. I., Graham, M. J., . . . DeBosch, B. J. (2018). Hepatocyte ALOXE3 is induced during adaptive fasting and enhances insulin sensitivity by activating hepatic PPAR γ . *JCI Insight*, 3(16). doi:10.1172/jci.insight.120794
- Hirano, S., Tsuchida, H., & Nagao, N. (1989). N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials*, 10(8), 574-576.
- Ho, Y. T., Kamm, R. D., & Kah, J. C. Y. (2018). Influence of protein corona and caveolae-mediated endocytosis on nanoparticle uptake and transcytosis. *Nanoscale*, 10(26), 12386-12397. doi:10.1039/c8nr02393j
- Holzerny, P., Ajdini, B., Heusermann, W., Bruno, K., Schuleit, M., Meinel, L., & Keller, M. (2012). Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: profiling the

- polymer/siRNA interactions and bioactivity. *J Control Release*, 157(2), 297-304. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.023
- Hu, Y. B., Dammer, E. B., Ren, R. J., & Wang, G. (2015). The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener*, 4, 18. doi:10.1186/s40035-015-0041-1
- Huang, M., Khor, E., & Lim, L. Y. (2004). Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm Res*, 21(2), 344-353.
- Jain, N. K., & Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 18(1), 24-36. doi:10.1002/pro.3
- Jean, M., Alameh, M., De Jesus, D., Thibault, M., Lavertu, M., Darras, V., . . . Merzouki, A. (2012). Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes. *Eur J Pharm Sci*, 45(1-2), 138-149. doi:10.1016/j.ejps.2011.10.029
- Jones, R. A., Cheung, C. Y., Black, F. E., Zia, J. K., Stayton, P. S., Hoffman, A. S., & Wilson, M. R. (2003). Poly(2-alkylacrylic acid) polymers deliver molecules to the cytosol by pH-sensitive disruption of endosomal vesicles. *The Biochemical journal*, 372(Pt 1), 65-75. doi:10.1042/BJ20021945
- Joyce, D. E., & Kurucsev, T. (1981). Hydrogen ion equilibria in poly(methacrylic acid) and poly(ethacrylic acid) solutions. *Polymer*, 22(3), 415-417. doi:[https://doi.org/10.1016/0032-3861\(81\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0032-3861(81)90060-4)
- Judge, A., McClintock, K., Phelps, J. R., & Maclachlan, I. (2006). Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes. *Mol Ther*, 13(2), 328-337. doi:10.1016/j.ymthe.2005.09.014
- Kaczmarek, J. C., Kowalski, P. S., & Anderson, D. G. (2017a). Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome Medicine*, 9(1), 60. doi:10.1186/s13073-017-0450-0
- Kaczmarek, J. C., Kowalski, P. S., & Anderson, D. G. (2017b). Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome medicine*, 9(1), 60-60. doi:10.1186/s13073-017-0450-0
- Kafil, V., & Omid, Y. (2011). Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in a431 cells. *BioImpacts : BI*, 1(1), 23-30. doi:10.5681/bi.2011.004
- Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., & Weissman, D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 23(2), 165-175. doi:10.1016/j.immuni.2005.06.008
- Kariko, K., Muramatsu, H., Ludwig, J., & Weissman, D. (2011). Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res*, 39(21), e142. doi:10.1093/nar/gkr695
- Kariko, K., Muramatsu, H., Welsh, F. A., Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., & Weissman, D. (2008). Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic

- vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*, 16(11), 1833-1840. doi:10.1038/mt.2008.200
- Kato, Y., Ozawa, S., Miyamoto, C., Maehata, Y., Suzuki, A., Maeda, T., & Baba, Y. (2013). Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer cell international*, 13(1), 89-89. doi:10.1186/1475-2867-13-89
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*, 5, 461-461. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(1), 3-11. doi:10.1016/j.addr.2009.09.004
- Kedmi, R., Ben-Arie, N., & Peer, D. (2010). The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials*, 31(26), 6867-6875. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.027
- Kempf, B., & Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol*, 170(5), 319-330.
- Kiang, T., Bright, C., Cheung, C. Y., Stayton, P. S., Hoffman, A. S., & Leong, K. W. (2004). Formulation of chitosan-DNA nanoparticles with poly(propyl acrylic acid) enhances gene expression. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15(11), 1405-1421. doi:10.1163/1568562042368112
- Kiang, T., Wen, J., Lim, H. W., & Leong, K. W. (2004). The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials*, 25(22), 5293-5301. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.12.036
- Kim, D., & Rossi, J. (2008). RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques*, 44(5), 613-616. doi:10.2144/000112792
- Kiss, A. L., & Botos, E. (2009). Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(7), 1228-1237. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00754.x
- Koerner, M. M., Palacio, L. A., Wright, J. W., Schweitzer, K. S., Ray, B. D., & Petrache, H. I. (2011). Electrodynamics of lipid membrane interactions in the presence of zwitterionic buffers. *Biophys J*, 101(2), 362-369. doi:10.1016/j.bpj.2011.05.062
- Kolate, A., Baradia, D., Patil, S., Vhora, I., Kore, G., & Misra, A. (2014). PEG - a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems. *J Control Release*, 192, 67-81. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.046
- Konduru, N. V., Molina, R. M., Swami, A., Damiani, F., Pyrgiotakis, G., Lin, P., . . . Brain, J. D. (2017). Protein corona: implications for nanoparticle interactions with pulmonary cells. *Particle and fibre toxicology*, 14(1), 42-42. doi:10.1186/s12989-017-0223-3
- Koping-Hoggard, M., Mel'nikova, Y. S., Varum, K. M., Lindman, B., & Artursson, P. (2003). Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo. *J Gene Med*, 5(2), 130-141. doi:10.1002/jgm.327
- Koping-Hoggard, M., Tubulekas, I., Guan, H., Edwards, K., Nilsson, M., Varum, K. M., & Artursson, P. (2001). Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property

- relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther*, 8(14), 1108-1121. doi:10.1038/sj.gt.3301492
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., & He, Z. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 1-10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.001>
- Kreiter, S., Selmi, A., Diken, M., Koslowski, M., Britten, C. M., Huber, C., . . . Sahin, U. (2010). Intranodal vaccination with naked antigen-encoding RNA elicits potent prophylactic and therapeutic antitumoral immunity. *Cancer Res*, 70(22), 9031-9040. doi:10.1158/0008-5472.can-10-0699
- Krishnendu, R., Bilal, G., & Sudhir Pai, K. (2008). Enhancing Polysaccharide-Mediated Delivery of Nucleic Acids Through Functionalization with Secondary and Tertiary Amines. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(4), 331-340. doi:<http://dx.doi.org/10.2174/156802608783790947>
- Kwon, E. J., Bergen, J. M., & Pun, S. H. (2008). Application of an HIV gp41-Derived Peptide for Enhanced Intracellular Trafficking of Synthetic Gene and siRNA Delivery Vehicles. *Bioconjugate Chemistry*, 19(4), 920-927. doi:10.1021/bc700448h
- Kyriakides, T. R., Cheung, C. Y., Murthy, N., Bornstein, P., Stayton, P. S., & Hoffman, A. S. (2002). pH-Sensitive polymers that enhance intracellular drug delivery in vivo. *Journal of Controlled Release*, 78(1), 295-303. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00504-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00504-1)
- Lackey, C. A., Press, O. W., Hoffman, A. S., & Stayton, P. S. (2002). A Biomimetic pH-Responsive Polymer Directs Endosomal Release and Intracellular Delivery of an Endocytosed Antibody Complex. *Bioconjugate Chemistry*, 13(5), 996-1001. doi:10.1021/bc0100531
- Lallana, E., Rios de la Rosa, J. M., Tirella, A., Pelliccia, M., Gennari, A., Stratford, I. J., . . . Tirelli, N. (2017). Chitosan/Hyaluronic Acid Nanoparticles: Rational Design Revisited for RNA Delivery. *Mol Pharm*, 14(7), 2422-2436. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00320
- Laursen, T., Hansen, B., & Fisker, S. (2006). Pain perception after subcutaneous injections of media containing different buffers. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 98(2), 218-221. doi:10.1111/j.1742-7843.2006.pto_271.x
- Lavertu, M., Methot, S., Tran-Khanh, N., & Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.04.029
- Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N., & Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.04.029>
- Layek, B., Lipp, L., & Singh, J. (2015). Cell Penetrating Peptide Conjugated Chitosan for Enhanced Delivery of Nucleic Acid. *Int J Mol Sci*, 16(12), 28912-28930. doi:10.3390/ijms161226142

- Lee, K., Yu, P., Lingampalli, N., Kim, H. J., Tang, R., & Murthy, N. (2015). Peptide-enhanced mRNA transfection in cultured mouse cardiac fibroblasts and direct reprogramming towards cardiomyocyte-like cells. *Int J Nanomedicine*, *10*, 1841-1854. doi:10.2147/ijn.s75124
- Lee, L. K., Williams, C. L., Devore, D., & Roth, C. M. (2006). Poly(propylacrylic acid) Enhances Cationic Lipid-Mediated Delivery of Antisense Oligonucleotides. *Biomacromolecules*, *7*(5), 1502-1508. doi:10.1021/bm060114o
- Li, B., Zhang, X., & Dong, Y. (2018). Nanoscale platforms for messenger RNA delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, e1530. doi:10.1002/wnan.1530
- Li, J., Cai, C., Li, J., Li, J., Li, J., Sun, T., . . . Yu, G. (2018). Chitosan-Based Nanomaterials for Drug Delivery. *Molecules*, *23*(10). doi:10.3390/molecules23102661
- Liang, W., & Lam, J. K. W. (2012). Endosomal escape pathways for non-viral nucleic acid delivery systems *Molecular regulation of endocytosis* (pp. 421). Rijeka, Croatia: InTech.
- Little, S. R., & Kohane, D. S. (2008). Polymers for intracellular delivery of nucleic acids. *Journal of Materials Chemistry*, *18*(8), 832-841. doi:10.1039/B712930K
- Liu, X., Howard, K. A., Dong, M., Andersen, M. O., Rahbek, U. L., Johnsen, M. G., . . . Kjems, J. (2007). The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*, *28*(6), 1280-1288. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.004
- Lu, H., Dai, Y., Lv, L., & Zhao, H. (2014). Chitosan-Graft-Polyethylenimine/DNA Nanoparticles as Novel Non-Viral Gene Delivery Vectors Targeting Osteoarthritis. *PLOS ONE*, *9*(1), e84703. doi:10.1371/journal.pone.0084703
- Lundin, P., Johansson, H., Guterstam, P., Holm, T., Hansen, M., Langel, U., & S, E. L. A. (2008). Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates. *Bioconjug Chem*, *19*(12), 2535-2542. doi:10.1021/bc800212j
- Lundstrom, K. (2018). Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases (Basel, Switzerland)*, *6*(2), 42. doi:10.3390/diseases6020042
- Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., & Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*, *114*(1), 100-109. doi:10.1016/j.jconrel.2006.04.014
- Ma, P. L., Buschmann, M. D., & Winnik, F. M. (2010). One-step analysis of DNA/chitosan complexes by field-flow fractionation reveals particle size and free chitosan content. *Biomacromolecules*, *11*(3), 549-554. doi:10.1021/bm901345q
- Ma, P. L., Lavertu, M., Winnik, F. M., & Buschmann, M. D. (2009). New insights into chitosan-DNA interactions using isothermal titration microcalorimetry. *Biomacromolecules*, *10*(6), 1490-1499. doi:10.1021/bm900097s
- Mahiny, A. J., Dewerth, A., Mays, L. E., Alkhaled, M., Mothes, B., Malaeksefat, E., . . . Kormann, M. S. D. (2015). In vivo genome editing using nuclease-encoding mRNA corrects SP-B deficiency. *Nature Biotechnology*, *33*, 584. doi:10.1038/nbt.3241

<https://www.nature.com/articles/nbt.3241#supplementary-information>

- Maier, M. A., Jayaraman, M., Matsuda, S., Liu, J., Barros, S., Querbes, W., . . . Akinc, A. (2013). Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Mol Ther*, *21*(8), 1570-1578. doi:10.1038/mt.2013.124
- Malmö, J., Sorgard, H., Varum, K. M., & Strand, S. P. (2012). siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. *J Control Release*, *158*(2), 261-268. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.012
- Mao, S., Sun, W., & Kissel, T. (2010). Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*, *62*(1), 12-27. doi:10.1016/j.addr.2009.08.004
- McCormack, M. P., & Rabbitts, T. H. (2004). Activation of the T-Cell Oncogene LMO2 after Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*, *350*(9), 913-922. doi:10.1056/NEJMra032207
- Meng, Z., O'Keeffe-Ahern, J., Lyu, J., Pierucci, L., Zhou, D., & Wang, W. (2017). A new developing class of gene delivery: messenger RNA-based therapeutics. *Biomaterials Science*, *5*(12), 2381-2392. doi:10.1039/C7BM00712D
- Mensink, M. A., Frijlink, H. W., van der Voort Maarschalk, K., & Hinrichs, W. L. J. (2017). How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *114*, 288-295. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.01.024>
- Merdan, T., Kunath, K., Fischer, D., Kopecek, J., & Kissel, T. (2002). Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm Res*, *19*(2), 140-146.
- Michel, T., Wendel, H.-P., & Krajewski, S. (2016). *Next-Generation Therapeutics: mRNA as a Novel Therapeutic Option for Single-Gene Disorders*.
- Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.-J., & Jaffrès, P.-A. (2009). Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *British journal of pharmacology*, *157*(2), 166-178. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00288.x
- Moelbert, S., Normand, B., & De Los Rios, P. (2004). Kosmotropes and chaotropes: modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability. *Biophysical Chemistry*, *112*(1), 45-57. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.06.012>
- Mohammed, M. A., Syeda, J. T. M., Wasan, K. M., & Wasan, E. K. (2017). An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics*, *9*(4), 53. doi:10.3390/pharmaceutics9040053
- Murthy, N., Robichaud, J. R., Tirrell, D. A., Stayton, P. S., & Hoffman, A. S. (1999). The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *Journal of Controlled Release*, *61*(1), 137-143. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00114-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00114-5)
- Muzzarelli, R. A. (1997). Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol Life Sci*, *53*(2), 131-140.

- Nakano, H., Tamai, N., Tsukamoto, M., & Abe, N. (2010). Change in Ultraviolet Absorption Spectra of Histidine in Aqueous Solution as a Result of Femtosecond Laser Irradiation. *Nippon Laser Igakkaishi*, 31(4), 390-393. doi:10.2530/jslsm.31.390
- Nguyen, S., Winnik, F. M., & Buschmann, M. D. (2009). Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 528-533. doi:DOI 10.1016/j.carbpol.2008.08.013
- Nguyen, V. H., & Lee, B.-J. (2017). Protein corona: a new approach for nanomedicine design. *International journal of nanomedicine*, 12, 3137-3151. doi:10.2147/IJN.S129300
- Nimesh, S., Thibault, M. M., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: effect of pH and serum. *Mol Biotechnol*, 46(2), 182-196. doi:10.1007/s12033-010-9286-1
- Nishiyama, N., Iriyama, A., Jang, W. D., Miyata, K., Itaka, K., Inoue, Y., . . . Kataoka, K. (2005). Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. *Nat Mater*, 4(12), 934-941. doi:10.1038/nmat1524
- Nomoto, T., Fukushima, S., Kumagai, M., Machitani, K., Arnida, Matsumoto, Y., . . . Kataoka, K. (2014). Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nat Commun*, 5, 3545. doi:10.1038/ncomms4545
- Oberli, M. A., Reichmuth, A. M., Dorkin, J. R., Mitchell, M. J., Fenton, O. S., Jaklenec, A., . . . Blankschtein, D. (2017). Lipid Nanoparticle Assisted mRNA Delivery for Potent Cancer Immunotherapy. *Nano Lett*, 17(3), 1326-1335. doi:10.1021/acs.nanolett.6b03329
- Ohmori, T., Nagao, Y., Mizukami, H., Sakata, A., Muramatsu, S.-i., Ozawa, K., . . . Sakata, Y. (2017). CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of AAV vector cures haemophilia B mice. *Scientific Reports*, 7(1), 4159. doi:10.1038/s41598-017-04625-5
- Ohtsuki, T., Miki, S., Kobayashi, S., Haraguchi, T., Nakata, E., Hirakawa, K., . . . Okazaki, S. (2015). The molecular mechanism of photochemical internalization of cell penetrating peptide-cargo-photosensitizer conjugates. *Scientific Reports*, 5, 18577. doi:10.1038/srep18577
- <https://www.nature.com/articles/srep18577#supplementary-information>
- Oliveira, S., Fretz, M. M., Høgset, A., Storm, G., & Schifflers, R. M. (2007). Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth factor receptor through improved endosomal escape of siRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(5), 1211-1217. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.01.013>
- Olsson, C., Jansson, H., & Swenson, J. (2016). The Role of Trehalose for the Stabilization of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(20), 4723-4731. doi:10.1021/acs.jpcc.6b02517
- Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., & Stayton, P. S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 4(7), 581-593. doi:10.1038/nrd1775

- Pardi, N., Hogan, M. J., Pelc, R. S., Muramatsu, H., Andersen, H., DeMaso, C. R., . . . Weissman, D. (2017). Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, *543*(7644), 248-251. doi:10.1038/nature21428
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*, *17*(4), 261-279. doi:10.1038/nrd.2017.243
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*, 261. doi:10.1038/nrd.2017.243
- Pardi, N., Secreto, A. J., Shan, X., Debonera, F., Glover, J., Yi, Y., . . . Weissman, D. (2017). Administration of nucleoside-modified mRNA encoding broadly neutralizing antibody protects humanized mice from HIV-1 challenge. *Nat Commun*, *8*, 14630. doi:10.1038/ncomms14630
- Pardi, N., Tuyishime, S., Muramatsu, H., Kariko, K., Mui, B. L., Tam, Y. K., . . . Weissman, D. (2015). Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release*, *217*, 345-351. doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.007
- Patil, S., Bhatt, P., Lalani, R., Amrutiya, J., Vhora, I., Kolte, A., & Misra, A. (2016). Low molecular weight chitosan–protamine conjugate for siRNA delivery with enhanced stability and transfection efficiency. *RSC Advances*, *6*(112), 110951-110963. doi:10.1039/C6RA24058E
- Peddada, L. Y., Garbuzenko, O. B., Devore, D. I., Minko, T., & Roth, C. M. (2014). Delivery of antisense oligonucleotides using poly(alkylene oxide)-poly(propylacrylic acid) graft copolymers in conjunction with cationic liposomes. *J Control Release*, *194*, 103-112. doi:10.1016/j.jconrel.2014.08.023
- Philippidis, A. (2017). Kymriah, First CAR-T Cancer Immunotherapy Approved by FDA. *Clinical OMICs*, *4*(5), 8-8. doi:10.1089/clinomi.04.05.09
- Pincus, M. R. (2012). Chapter 2 - Physiological Structure and Function of Proteins. In N. Sperelakis (Ed.), *Cell Physiology Source Book (Fourth Edition)* (pp. 19-47). San Diego: Academic Press.
- Pulcini, S., Staines, H. M., Lee, A. H., Shafik, S. H., Bouyer, G., Moore, C. M., . . . Krishna, S. (2015). Mutations in the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter, PfCRT, enlarge the parasite's food vacuole and alter drug sensitivities. *Scientific Reports*, *5*, 14552. doi:10.1038/srep14552
- <https://www.nature.com/articles/srep14552#supplementary-information>
- Ragelle, H., Riva, R., Vandermeulen, G., Naeye, B., Pourcelle, V., Le Duff, C. S., . . . Preat, V. (2014). Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency. *J Control Release*, *176*, 54-63. doi:10.1016/j.jconrel.2013.12.026
- Rahmat, D., Khan, M. I., Shahnaz, G., Sakloetsakun, D., Perera, G., & Bernkop-Schnürch, A. (2012). Synergistic effects of conjugating cell penetrating peptides and thiomers on non-viral transfection efficiency. *Biomaterials*, *33*(7), 2321-2326. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.046>

- Raines, R. T. (1998). Ribonuclease A. *Chemical Reviews*, 98(3), 1045-1066. doi:10.1021/cr960427h
- Rao, A., Gebauer, D., & Cölfen, H. (2017). Modulating Nucleation by Kosmotropes and Chaotropes: Testing the Waters. *Crystals*, 7(10). doi:10.3390/cryst7100302
- Ren, D., Yi, H., Wang, W., & Ma, X. (2005). The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Research*, 340(15), 2403-2410. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.07.022>
- Richard, I., Thibault, M., De Crescenzo, G., Buschmann, M. D., & Lavertu, M. (2013). Ionization behavior of chitosan and chitosan-DNA polyplexes indicate that chitosan has a similar capability to induce a proton-sponge effect as PEI. *Biomacromolecules*, 14(6), 1732-1740. doi:10.1021/bm4000713
- Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., . . . Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*, 278(1), 585-590. doi:10.1074/jbc.M209548200
- Riley, M. K., & Vermerris, W. (2017). Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery-A Review. *Nanomaterials (Basel)*, 7(5). doi:10.3390/nano7050094
- Romano, G. (2012). Development of Safer Gene Delivery Systems to Minimize the Risk of Insertional Mutagenesis-Related Malignancies: A Critical Issue for the Field of Gene Therapy. *ISRN Oncology*, 2012, 14. doi:10.5402/2012/616310
- Ross, J., & Sullivan, T. D. (1985). Half-lives of beta and gamma globin messenger RNAs and of protein synthetic capacity in cultured human reticulocytes. *Blood*, 66(5), 1149-1154.
- Rozema, D. B., Lewis, D. L., Wakefield, D. H., Wong, S. C., Klein, J. J., Roesch, P. L., . . . Wolff, J. A. (2007). Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(32), 12982-12987. doi:10.1073/pnas.0703778104
- Sasai-Takedatsu, M., Taketani, S., Nagata, N., Furukawa, T., Tokunaga, R., Kojima, T., & Kobayashi, Y. (1996). Human trehalase: characterization, localization, and its increase in urine by renal proximal tubular damage. *Nephron*, 73(2), 179-185. doi:10.1159/000189037
- Sato, T., Ishii, T., & Okahata, Y. (2001). In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials*, 22(15), 2075-2080.
- Sato, T., Nakata, M., Yang, Z., Torizuka, Y., Kishimoto, S., & Ishihara, M. (2017). In vitro and in vivo gene delivery using chitosan/hyaluronic acid nanoparticles: Influences of molecular mass of hyaluronic acid and lyophilization on transfection efficiency. *J Gene Med*, 19(8). doi:10.1002/jgm.2968
- Selbo, P. K., Weyergang, A., Hogset, A., Norum, O. J., Berstad, M. B., Vikdal, M., & Berg, K. (2010). Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. *J Control Release*, 148(1), 2-12. doi:10.1016/j.jconrel.2010.06.008

- Smits, R. G., Koper, G. J. M., & Mandel, M. (1993). The influence of nearest- and next-nearest-neighbor interactions on the potentiometric titration of linear poly(ethylenimine). *The Journal of Physical Chemistry*, 97(21), 5745-5751. doi:10.1021/j100123a047
- Soliman, O. Y., Alameh, M., Tran-Khanh, N., De Crescenzo, G., Buschmann, M. D., & Lavertu, M. (2018). In Vitro Efficacy of Chitosan/Hyaluronic Acid Based mRNA Delivery Systems: Influence of Composition, Hyaluronic Acid Sulfation Degree, Molecular Weight and Structural Parameters. *Molecular Pharmaceutics* (Submitted).
- Sonawane, N. D., Szoka, F. C., Jr., & Verkman, A. S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem*, 278(45), 44826-44831. doi:10.1074/jbc.M308643200
- Srinivasakumar, N. (2001). HIV-1 Vector Systems. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 26(1), 51-81. doi:10.1023/A:1021074613196
- Stanton, M. G. (2018). Current Status of Messenger RNA Delivery Systems. *Nucleic Acid Ther*, 28(3), 158-165. doi:10.1089/nat.2018.0726
- Sun, P., Huang, W., Kang, L., Jin, M., Fan, B., Jin, H., . . . Gao, Z. (2017). siRNA-loaded poly(histidine-arginine)6-modified chitosan nanoparticle with enhanced cell-penetrating and endosomal escape capacities for suppressing breast tumor metastasis. *Int J Nanomedicine*, 12, 3221-3234. doi:10.2147/ijn.s129436
- Taberero, J., Shapiro, G. I., LoRusso, P. M., Cervantes, A., Schwartz, G. K., Weiss, G. J., . . . Burris, H. A. (2013). First-in-Humans Trial of an RNA Interference Therapeutic Targeting VEGF and KSP in Cancer Patients with Liver Involvement. *Cancer Discovery*, 3(4), 406. Retrieved from <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/3/4/406.abstract>
- Tavernier, G., Andries, O., Demeester, J., Sanders, N. N., De Smedt, S. C., & Rejman, J. (2011). mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression. *J Control Release*, 150(3), 238-247. doi:10.1016/j.jconrel.2010.10.020
- Thaplyal, P., & Bevilacqua, P. C. (2014). Experimental approaches for measuring pKa's in RNA and DNA. *Methods Enzymol*, 549, 189-219. doi:10.1016/b978-0-12-801122-5.00009-x
- Thibault, M., Astolfi, M., Tran-Khanh, N., Lavertu, M., Darras, V., Merzouki, A., & Buschmann, M. D. (2011). Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes. *Biomaterials*, 32(20), 4639-4646. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.010
- Thibault, M., Nimesh, S., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan-pDNA polyplexes. *Mol Ther*, 18(10), 1787-1795. doi:10.1038/mt.2010.143
- Thibault, M., Nimesh, S., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Intracellular Trafficking and Decondensation Kinetics of Chitosan-pDNA Polyplexes. *Molecular Therapy*, 18(10), 1787-1795. doi:10.1038/mt.2010.143
- Thomas, J. L., You, H., & Tirrell, D. A. (1995). Tuning the response of a pH-sensitive membrane switch. *Journal of the American Chemical Society*, 117(10), 2949-2950. doi:10.1021/ja00115a039

- Timasheff, S. N. (1993). The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 22, 67-97. doi:10.1146/annurev.bb.22.060193.000435
- Tripathi, S. K., Goyal, R., Kumar, P., & Gupta, K. C. (2012). Linear polyethylenimine-graft-chitosan copolymers as efficient DNA/siRNA delivery vectors in vitro and in vivo. *Nanomedicine*, 8(3), 337-345. doi:10.1016/j.nano.2011.06.022
- Tripathi, S. K., Goyal, R., Kumar, P., & Gupta, K. C. (2012). Linear polyethylenimine-graft-chitosan copolymers as efficient DNA/siRNA delivery vectors in vitro and in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(3), 337-345. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.06.022>
- Uchida, S., Kinoh, H., Ishii, T., Matsui, A., Tockary, T. A., Takeda, K. M., . . . Kataoka, K. (2016). Systemic delivery of messenger RNA for the treatment of pancreatic cancer using polyplex nanomicelles with a cholesterol moiety. *Biomaterials*, 82, 221-228. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.12.031
- ur Rehman, Z., Hoekstra, D., & Zuhorn, I. S. (2013). Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis. *ACS Nano*, 7(5), 3767-3777. doi:10.1021/nm3049494
- Uzgun, S., Nica, G., Pfeifer, C., Bosinco, M., Michaelis, K., Lutz, J. F., . . . Rudolph, C. (2011). PEGylation improves nanoparticle formation and transfection efficiency of messenger RNA. *Pharm Res*, 28(9), 2223-2232. doi:10.1007/s11095-011-0464-z
- Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G., & Haisma, H. J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J Control Release*, 151(3), 220-228. doi:10.1016/j.jconrel.2010.11.004
- Veilleux, D., Nelea, M., Biniiecki, K., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2016). Preparation of Concentrated Chitosan/DNA Nanoparticle Formulations by Lyophilization for Gene Delivery at Clinically Relevant Dosages. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(1), 88-96. doi:10.1016/j.xphs.2015.11.001
- Voet, D., G Voet, J., & W. Pratt, C. (2018). *Fundamentals of biochemistry / Donald Voet, Judith G. Voet, Charlotte Pratt*.
- Vogel, A. B., Lambert, L., Kinnear, E., Busse, D., Erbar, S., Reuter, K. C., . . . Tregoning, J. S. (2018). Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Mol Ther*, 26(2), 446-455. doi:10.1016/j.ymthe.2017.11.017
- Wang, Z., Tiruppathi, C., Minshall, R. D., & Malik, A. B. (2009). Size and dynamics of caveolae studied using nanoparticles in living endothelial cells. *ACS Nano*, 3(12), 4110-4116. doi:10.1021/nm9012274
- Wei, X., Shao, B., He, Z., Ye, T., Luo, M., Sang, Y., . . . Zhang, Z. (2015). Cationic nanocarriers induce cell necrosis through impairment of Na⁺/K⁺-ATPase and cause subsequent inflammatory response. *Cell Research*, 25, 237. doi:10.1038/cr.2015.9

<https://www.nature.com/articles/cr20159#supplementary-information>

- Wittrup, A., & Lieberman, J. (2015). Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet*, *16*(9), 543-552. doi:10.1038/nrg3978
- Xiang, S., Tong, H., Shi, Q., Fernandes, J. C., Jin, T., Dai, K., & Zhang, X. (2012). Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. *Journal of Controlled Release*, *158*(3), 371-378. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.093>
- Yang, B., Li, X., Shi, S., Kong, X., Guo, G., Huang, M., . . . Qian, Z. (2010). Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydrate Polymers*, *80*(3), 860-865. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.044>
- Yang, L., Bracho-Sanchez, E., Fernando, L. P., Lewis, J. S., Carstens, M. R., Duvall, C. L., & Keselowsky, B. G. (2017). Poly(2-propylacrylic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) blend microparticles as a targeted antigen delivery system to direct either CD4(+) or CD8(+) T cell activation. *Bioeng Transl Med*, *2*(2), 202-211. doi:10.1002/btm2.10068
- Yang, Y. M., Hu, W., Wang, X. D., & Gu, X. S. (2007). The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med*, *18*(11), 2117-2121. doi:10.1007/s10856-007-3013-x
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*, *15*(8), 541-555. doi:10.1038/nrg3763
- Youn, H., & Chung, J.-K. (2015). Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy. *Expert opinion on biological therapy*, *15*(9), 1337-1348. doi:10.1517/14712598.2015.1057563
- Zarogoulidis, P., Darwiche, K., Sakkas, A., Yarmus, L., Huang, H., Li, Q., . . . Malecki, M. (2013). Suicide Gene Therapy for Cancer – Current Strategies. *Journal of genetic syndrome & gene therapy*, *4*, 16849. doi:10.4172/2157-7412.1000139
- Zhang, Y., Li, Y., Ma, J., Wang, X., Yuan, Z., & Wang, W. (2018). Convenient preparation of charge-adaptive chitosan nanomedicines for extended blood circulation and accelerated endosomal escape. *Nano Research*, *11*(8), 4278-4292. doi:10.1007/s12274-018-2014-z