

Université de Montréal

**Nanoparticules lipidiques pH-sensibles basées sur une
bascule moléculaire pour la délivrance
intracytoplasmique de siRNA**

par
Warren Viricel

Faculté de pharmacie

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

Août 2016

© Warren Viricel, 2016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Nanoparticules lipidiques pH-sensibles basées sur une
bascule moléculaire pour la délivrance
intracytoplasmique de siRNA**

présentée par :
Warren Viricel

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Maxime Ranger, président-rapporteur
Jeanne Leblond-Chain, directeur de recherche
Bastien Castagner, membre du jury
Nathalie Mignet, examinateur externe
Pascale Legault, représentant du doyen de la FES

Résumé

La délivrance intracytoplasmique de petites molécules hydrophiles et de gènes (ADN, ARN) est un défi majeur pour l'industrie pharmaceutique, puisque ces composés sont incapables de franchir les membranes biologiques par eux-mêmes. L'utilisation de nanovecteurs lipidiques permet de surmonter les étapes d'instabilité sanguine du gène thérapeutique, de pénétration cellulaire et d'échappement endosomal. Nous reportons dans cette thèse l'élaboration de nouveaux vecteurs lipidiques pH-sensibles, basés sur une bascule moléculaire capable de changer de conformation et déstabiliser le nanovecteur après protonation à pH acide, favorisant ainsi l'échappement endosomal du fragile contenu thérapeutique. Ce mécanisme de pH-sensibilité est non reporté dans la littérature jusqu'alors.

Dans un premier temps, l'élaboration de lipides bascules pH-sensibles non-cationiques destinés à la délivrance liposomale de principes actifs hydrophiles est reportée. Ce premier travail introduit les lipides bascules, valide l'implication de la bascule moléculaire pH-sensible et apporte une première preuve de concept *in vitro* de faisabilité. Dans un second temps est introduit l'utilisation de nouveaux lipides bascules cationiques pH-sensibles pour la thérapie génique (délivrance *in vitro* et *in vivo* de siRNA), validant encore une fois l'implication de la bascule moléculaire dans l'efficacité de délivrance intracytoplasmique des siRNA.

A l'issue de cette thèse sont identifiés deux lipides bascules (**2** et **CSL3**) capables d'être introduits dans des nanoparticules lipidiques pour la délivrance de drogues et de gènes respectivement. De telles formulations permettraient la délivrance intracytoplasmique de composés hydrophiles thérapeutiques (drogues, gènes) pour le traitement du cancer ou pour des applications d'édition génomique.

Mots-clés : lipides, pH-sensibilité, bascule moléculaire, thérapie génique, liposomes, nanoparticules lipidiques, échappement endosomal, délivrance de drogues, délivrance de siRNA

Abstract

Intracytoplasmic delivery of small hydrophilic molecules and genes (DNA, RNA) is a major challenge for the pharmaceutical industry, since these compounds are unable to cross biological membranes by themselves. Use of lipid nanocarriers enables overcoming the stages of blood instability of the therapeutic gene, cellular penetration, and endosomal escape. In this thesis, we report the development of new pH-sensitive lipid carriers, based on a molecular switch capable of changing its conformation upon protonation and destabilizing the nanocarrier, thus favoring endosomal escape of the therapeutic content. This pH-sensitivity mechanism has not been reported in the literature to date.

Firstly, we report the elaboration of non-cationic pH-sensitive switchable lipids for liposomal delivery of hydrophilic active ingredients. This initial work introduces switchable lipids, validates the involvement of the pH-sensitive molecular switch, and provides early evidence of *in vitro* concept feasibility. Secondly, we present the use of pH-sensitive cationic switchable lipids for gene therapy (siRNA delivery *in vitro* and *in vivo*), again validating the involvement of the molecular switch in the effectiveness of intracytoplasmic delivery of siRNA.

The two lead compounds identified during this thesis (**2** and **CSL3**) can be included into lipid nanoparticles for drug and gene delivery, respectively. Such formulations allow intracytoplasmic delivery of therapeutic hydrophilic compounds (drugs, genes) and could be used to treat diseases such as cancer or for genome editing applications.

Keywords : lipid, pH-sensitivity, molecular switch, gene therapy, liposomes, lipid nanoparticles, endosomal escape, drug delivery, siRNA delivery

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations et symboles.....	i
Remerciements.....	i
Chapitre 1 : Introduction.....	3
1.1 La thérapie génique : principes et état de l'art.....	3
1.1.1 Définition et essais cliniques historiques.....	4
1.1.2 Applications thérapeutiques.....	6
1.1.3 Les différents types d'oligonucléotides thérapeutiques.....	12
1.1.4 Les principales barrières physiologiques.....	37
1.2 La vectorisation des oligonucléotides thérapeutiques.....	42
1.2.1 Les vecteurs lipidiques.....	44
1.2.2 Les vecteurs polymériques.....	46
1.2.3 Les nanosystèmes hybrides lipide-polymère	48
1.2.4 Les exosomes	50
1.2.5 Les systèmes conjugués	51
1.3 Les nanovecteurs lipidiques pH-sensibles en thérapie génique.....	53
1.3.1 L'échappement endosomal	53
1.3.2 Les différents mécanismes de pH-sensibilité des nanovecteurs lipidiques en thérapie génique	55
1.4 Présentation du projet	63
1.4.1 Hypothèses de recherche.....	63
1.4.2 Objectifs spécifiques du projet.....	64
1.4.3 Présentation des lipides bascules pH-sensibles.....	65
1.5 Références.....	68

Chapitre 2 : Lipides Bascules : d'un Changement Conformationnel à la Délivrance Intracytoplasmique pH-sensible de Composés Hydrophiles	90
2.1 Introduction.....	92
2.2 Experimental section.....	93
2.2.1 Materials and general methods	93
2.2.2 Synthesis of the pH-sensitive switchable lipids.....	93
2.2.3 Synthesis of the negative control switchable lipid (compound 4)	98
2.2.4 Synthesis of the switchable lipids 5 and 6	101
2.2.5 Synthesis of the switchable lipid 7.....	102
2.2.6 Synthesis of octadecyl Rhodamine B (compound 19).....	103
2.2.7 NMR analysis of the pH-dependent conformational equilibrium.....	103
2.2.8 Liposome preparation	104
2.2.9 Physiochemical characterization of liposomes	105
2.2.10 Sulforhodamine B leakage assay	105
2.2.11 Lipid-mixing assay.....	106
2.2.12 Fluorescence microscopy imaging.....	106
2.2.13 <i>In vitro</i> cytotoxicity and hemocompatibility studies	107
2.3 Results & Discussion	109
2.4 Conclusion	116
2.5 Acknowledgment	116
2.6 References.....	117
2.7 Supporting Information.....	120
Chapitre 3 : Lipides Bascules Cationiques : Bascule Moléculaire pH-Sensible pour la Délivrance de siRNA	141
3.1 Introduction.....	142
3.2 Experimental section.....	144
3.2.1 Materials, general methods and cell culture	144
3.2.2 Synthesis of the pH-sensitive cationic switchable lipids CSL1 and CSL3.....	145
3.2.3 Synthesis of the pH-sensitive cationic switchable lipid CSL2	149
3.2.4 Synthesis of the negative control cationic switchable lipid CSL4.....	153
3.2.5 Lipid nanoparticle preparation by manual extrusion	155
3.2.6 siRNA complexation and encapsulation efficiency.....	155

3.2.7 Physicochemical characterization of lipid nanoparticles	156
3.2.8 <i>In vitro</i> siRNA transfection assays	156
3.2.9 <i>In vitro</i> cytotoxicity assay	157
3.2.10 Intracytoplasmic delivery of siRNA	157
3.2.11 Endosomal entrapment of the CSL4-based formulation.....	158
3.2.12 Lipid-mixing assay.....	159
3.2.13 Inhibition of GFP knockdown with Baflomycin A1	160
3.2.14 Uptake inhibition by flow cytometry	161
3.2.15 Lipid nanoparticle preparation by microfluidic mixing.....	162
3.2.16 Biodistribution and <i>ex-vivo</i> imaging in mice	163
3.2.17 In vivo Factor VII silencing in mice	163
3.3 Results & Discussion	165
3.4 Conclusion	173
3.5 Acknowledgment	173
3.6 References.....	174
3.7 Supporting Information.....	177
Chapitre 4 : Discussion et perspectives	187
4.1 Synthèse chimique des lipides bascules.....	187
4.2 Formulation des nanoparticules	188
4.2.1 Encapsulation de siRNA	188
4.2.2 Les différentes techniques de formulation.....	190
4.3 Autres applications <i>in vitro</i> de CSL3	192
4.3.1 Transfections sur lignées cellulaires cancéreuses	192
4.3.2 Délivrance d'ARN double brin synthétique poly(I:C) à des cellules d'épithélium bronchique.....	193
4.4 Discussion sur la mécanistique de la bascule pH-sensible	195
4.4.1 Discussion générale	195
4.4.2 Etude du mécanisme pH-sensible	197
4.5 Perspectives futures	201
4.5.1 Délivrance de principes actifs anticancéreux hydrophiles avec le lipide bascule pH-sensible 2	201
4.5.2 Vectorisation d'oligonucléotides thérapeutiques avec le lipide bascule pH-sensible CSL3	204

4.6 Références.....	208
Chapitre 5 : Conclusion	i
Annexe 1 : Article « Cationic Switchable Lipids: pH-Triggered Molecular Switch for siRNA Delivery », publié par le journal “Nanoscale” en Novembre 2016	i

Liste des tableaux

Tableau 1.1 - Liste non exhaustive d'essais cliniques de thérapie génique ciblant des pathologies héréditaires	9
Tableau 1.2 - Liste non exhaustive d'essais cliniques de thérapie génique ciblant des pathologies acquises	10
Tableau 1.3 - Liste non exhaustive d'essais cliniques de thérapie génique de vaccination ou désensibilisation allergique	11
Tableau 1.4 - Avantages et inconvénients de l'emploi d'ADNp en thérapie génique	15
Tableau 1.5 - Avantages et inconvénients de l'emploi d'ARNm en thérapie génique	22
Tableau 1.6 - Avantages et inconvénients de l'emploi de siRNA en thérapie génique	27
Tableau 1.7 - Avantages et inconvénients de l'emploi de CRISPR/Cas9 en thérapie génique	35
Tableau 1.8 - Présentation des principaux CPP utilisés dans les nanoparticules lipidiques et polymériques en thérapie génique	59
Tableau 4.1 - Avantages et inconvénients des deux techniques de formulation de nanoparticules lipidiques utilisées dans cette thèse	191

Liste des figures

Figure 1.1 - Essais cliniques de thérapie génique recensés en 2015	5
Figure 1.2 - Indications des essais cliniques de thérapie génique recensés en 2015	7
Figure 1.3 - Représentation schématique d'un plasmide codant pour la protéine GFP	13
Figure 1.4 - Schéma du mécanisme d'action d'un pDNA après internalisation cellulaire	14
Figure 1.5 - Vectorisation d'ADNp exprimant la GFP aux hépatocytes chez la souris	16
Figure 1.6 - Structure d'un ARNm thérapeutique	18
Figure 1.7 - Figure démontrant l'importance de la présence de modifications des ARNm pour l'expression protéique	18
Figure 1.8 - Schéma illustrant la transcription d'ARNm à partir du <i>template</i> ADN	19
Figure 1.9 - Représentation schématique de la synthèse et de la maturation d'un ARN messager dans une cellule eucaryote	20
Figure 1.10 - Structure chimique du lipidoïde 0F-02	22
Figure 1.11 - Expression plasmatique de la protéine EPO chez la souris après délivrance (nanovectorisation lipidique) d'ARNm dont la séquence a été optimisée	23
Figure 1.12 - Structure schématique d'un siRNA	24
Figure 1.13 - Mécanisme d'action d'un siRNA dans la cellule eucaryote	25
Figure 1.14 - Schéma présentant les modifications chimiques des siRNA les plus souvent rencontrées	26
Figure 1.15 - Figure démontrant le gain de stabilité plasmatique des siRNA lors de l'utilisation de bases chimiquement modifiées	27
Figure 1.16 - Courbe dose réponse du <i>silencing</i> du gène hépatique FVII chez la souris mediée par les nanoparticules lipidiques 98N12-5 (1 ^{ère} génération 1), C12-200 (2 ^{ème} génération) et cKK-E12 (3 ^{ème} génération)	28
Figure 1.17 - Structure du conjugué GalNAc-siRNA de la société Alnylam®	29
Figure 1.18 - Les 3 éditions génotypes réalisables avec la technique CRISPR/Cas9	30

Figure 1.19 - Présentation des 3 stratégies possibles pour délivrer l'endonucléase d'édition génomique Cas9	31
Figure 1.20 - Deux stratégies thérapeutiques d'édition génomique sont possibles : <i>in vivo</i> ou <i>ex vivo</i>	32
Figure 1.21 - Schéma du mécanisme d'action du système CRISPR/Cas9, illustrant les deux mécanismes de réparation de l'ADN génomique possible (NHEJ et HDR)	34
Figure 1.22 - Suppression du gène PCSK9 des hépatocytes de souris <i>in vivo</i> avec la technique CRISPR/Cas9	36
Figure 1.23 - Traitement de la tyrosinémie chez la souris par insertion génomique d'un ADN correcteur via une méthode CRISPR/Cas9 hybride (nanoparticule lipidique et AAV)	36
Figure 1.24 - Représentation schématique des différentes barrières s'opposant à la délivrance d'ADNp thérapeutique <i>in vivo</i>	37
Figure 1.25 - La taille, la forme et la charge de surface des nanovecteurs dicte leur demi-vie de circulation plasmatique et leur biodistribution	39
Figure 1.26 - Modes d'administration de gènes thérapeutiques : <i>in vivo</i> (direct delivery) et <i>ex vivo</i> (cell-based delivery)	43
Figure 1.27 - Observation en Cryo-TEM de liposomes classiques fabriqués par extrusion et de LNP cationiques fabriquées par mixage microfluidique	45
Figure 1.28 - Structure du polymère PEG- <i>b</i> -P(DPA- <i>co</i> -GMA-TEPA-C14) pour la délivrance de siRNA <i>in vivo</i>	47
Figure 1.29 - Représentation schématique des différentes architectures polymériques pouvant être utilisées en thérapie génique	47
Figure 1.30 - Représentation d'un nanovecteur hybride lipide-polymère à longue durée de circulation sanguine pour la délivrance de siRNA	48
Figure 1.31 - Courbes de survies des souris porteuses de carcinome hépatocellulaire après traitement avec des formulations hybrides lipide-polymère dendritiques	49
Figure 1.32 - Schéma présentant les résultats d'une étude de délivrance de siRNA au cerveau via des exosomes ciblés	51
Figure 1.33 - Schéma du mécanisme d'action des conjugués « Dynamic	

PolyConjugates »	52
Figure 1.34 - Représentation schématique du chemin endosomal parcouru par le nanovecteur de thérapie génique après endocytose cellulaire	53
Figure 1.35 - Structure de la DOPE et des lipides ionisables récemment découverts, ayant une valeur de pK _a apparent ~6,4	56
Figure 1.36 - Hydrolyse acide d'un lipide cationique pH-sensible libérant la partie hydrophobe et la tête cationique hydrophile	57
Figure 1.37 - Schéma illustrant l'utilisation d'un lipide-PEG clivable <i>via</i> utilisation d'un lien vinyl ether	58
Figure 1.38 - Représentation schématique de la nanoparticule pH-sensible hybride lipide-polymère TRX/MGlu-HPG	60
Figure 1.39 - Structure chimique des agents photosensibilisants utilisés en « Photochemical Internalisation »	61
Figure 1.40 - Mécanisme de l'échappement endosomal <i>via</i> « Photochemical Internalisation »	62
Figure 1.41 - Schéma présentant le changement de conformation des lipides bascules en fonction du pH	63
Figure 1.42 - Schéma des « pinces moléculaires » pH-sensibles capables de changer de conformation à pH acide	65
Figure 1.43 - Schéma présentant le passage d'une structure de lipide bascule pH-sensible non-cationique (compound 2 – 1 ^{ère} publication) à une structure cationique permettant l'encapsulation et la délivrance de siRNA (2 ^{nde} publication)	67
Figure 2.1 - Synthesis pathway of the pH-sensitive switchable lipids	95
Figure 2.2 - Synthesis pathway of the negative control non-switchable lipid 4	98
Figure 2.3 - Synthesis pathway of the switchable lipids 5 and 6	101
Figure 2.4 - Synthesis pathway of the switchable lipid 7	102
Figure 2.5 - Synthesis pathway of octadecyl Rhodamine B (compound 19)	103

Figure 2.6 - Graphical representation of the liposomal pH-sensitive delivery system based on a conformational switch	110
Figure 2.7 - NMR titration experiments investigating the pH-dependent conformational change of the switchable lipid 2 and its non- methoxylated counterpart 4	111
Figure 2.8 - Kinetic profiles of sulforhodamine B release for the formulation incorporating the switchable lipid 2	113
Figure 2.9 - Fluorescence microscopy images of HeLa cells after incubation for 1, 2, and 4 h with the pH-sensitive formulation (switchable lipid 2, 50 mol%) loaded with sulforhodamine B	115
Figure S2.1 - Summary of the synthesized switchable lipids	120
Figure S2.2 - ^1H NMR titration experiments of the switchable lipids 3 and 7 in CD_3OD	121
Figure S2.3 - 1D-NOESY ^1H experiments on the switchable lipid 2 (CD_3OD)	122
Figure S2.4 - Physicochemical parameters of liposomal formulations used in this study	124
Figure S2.5 - Fluorescence kinetic profiles of sulforhodamine B release at pH 5 for pH-sensitive formulations incorporating increasing amounts of switchable lipid 2	126
Figure S2.6 - Sulforhodamine B leakage profile of liposomal formulations incorporating the switchable lipid 1	127
Figure S2.7 - Sulforhodamine B leakage profiles of liposomal formulations incorporating the N,N-Dimethyl-based switchable lipids with variable alkyl chains length	128
Figure S2.8 - R18 lipid-mixing assays of the N,N-Dimethyl-based switchable lipids	129
Figure S2.9 - Fluorescence microscopy imaging of sulforhodamine B delivery on HeLa cells	131
Figure S2.10 - <i>In vitro</i> cell viability and hemocompatibility assays	133
Figure S2.11 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound 1 ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$)	134
Figure S2.12 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound 2 (CDCl_3)	135
Figure S2.13 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound 3 (CDCl_3)	136
Figure S2.14 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound 4 (CDCl_3)	137

Figure S2.15 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound 5 (CDCl_3)	138
Figure S2.16 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound 6 (CDCl_3)	139
Figure S2.17 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound 7 (CDCl_3)	140
Figure 3.1 - Protonation-induced conformational change of the pH-sensitive cationic switchable lipids	143
Figure 3.2 - Synthesis pathway of the pH-sensitive cationic switchable lipids CSL1 and CSL3	145
Figure 3.3 - Synthesis pathway of the pH-sensitive cationic switchable lipid CSL2	149
Figure 3.4 - Synthesis pathway of the negative control cationic switchable lipid CSL4	153
Figure 3.5 - Overview of the chemical structures of the cationic switchable lipids and hypothetical schematic representation of lipid nanoparticle/siRNA	165
Figure 3.6 - Figure presenting the in vitro siRNA transfection efficacy of the different cationic switchable lipids and live-cell fluorescence imaging	167
Figure 3.7 - Figure presenting the live-cell fluorescence imaging with the CSL3 and CSL4 formulations and R18 lipid-mixing experiments	168
Figure 3.8 - Figure presenting the in vitro siRNA transfection experiment with Bafilomycin A1 and uptake experiments with endocytosis inhibitors	170
Figure 3.9 - Figure presenting the in vitro siRNA transfection efficacy in HeLa and Huh-7 cells, in vivo biodistribution and in vivo siRNA transfection efficacy	172
Figure S3.1 - Protonation induced conformational change of the cationic switchable lipids CSL3 and CSL4	177
Figure S3.2 - Physicochemical characterisation of LNP/siRNA complexes made by manual extrusion	178
Figure S3.3 - CSL3/siRNA-Alexa647 and free siRNA-Alexa647 delivery on HeLa cells	179
Figure S3.4 - Flow cytometry profiles of uptake studies with endocytosis inhibitors	180
Figure S3.5 - Quantification of biodistribution of siRNA-Cy5 encapsulated into CSL3 LNP	181

Figure S3.6 - siRNA sequences used in this study	182
Figure S3.7 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectrums of compound CSL1	183
Figure S3.8 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectrums of compound CSL2	184
Figure S3.9 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectrums of compound CSL3	185
Figure S3.10 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectrums of compound CSL4	186
Figure 4.1 - Structure chimique des lipides bascules 2 (non-cationique) et CSL3 (cationique)	187
Figure 4.2 - Comparaison de l'efficacité d'encapsulation de siRNA du lipide bascule non-cationique 2 et de son homologue cationique CSL3	189
Figure 4.3 - Schéma récapitulant l'influence des paramètres de formulation sur les caractéristiques et sur l'application thérapeutique des nanoparticules lipidiques	191
Figure 4.4 - Efficacité de délivrance de siRNA anti-survivin <i>in vitro</i> de la formulation lipidique CSL3 sur trois lignées cancéreuses	192
Figure 4.5 - Schéma présentant les différentes cascades de signalisation après stimulation de la cellule par du poly(I:C) nu ou encapsulé dans des liposomes	193
Figure 4.6 - Cinétique d'induction des gènes antiviraux IFN- β et IFN- λ suite à la délivrance de poly(I:C) avec les formulations liposomales CSL3 et LyoVec TM	194
Figure 4.7 - Cinétique d'internalisation des liposomes CSL3/poly(I:C) marqués sur la lignée CFBE41o- immergée	195
Figure 4.8 - Profil SAXS d'un arrangement liposomal en phases lamellaires et représentation schématique d'un profil de densité électronique de liposome	198
Figure 4.9 - Etude de l'organisations de phase des phospholipides par RMN du solide (RMN du phosphore 31)	199
Figure 4.10 - Etude par RMN du solide du deutérium des chaines alkyl d'un phospholipide deutéré formulé en liposomes multilamellaires	199
Figure 4.11 - Spectre RMN du solide (^{31}P) obtenu avec la formulation multilamellaire (non extrudée) lipide bascule 2/DMPC (50:50 mol%)	200

Figure 4.12 - Observation en microscopie électronique après cryofracture de liposomes extrudés et de liposomes multilamellaires (phase lipidique lamellaire) non extrudés	201
Figure 4.13 - Représentation schématique des deux stratégies envisagées pour délivrer des drogues anticancéreuses hydrophiles avec des nanoparticules lipidiques pH-sensibles basées sur le lipide bascule 2	203
Figure 4.14 - Schéma présentant des prodrogues hydrophobes de composés hydrophiles (cisplatine, capecitabine, gemcitabine) dans le but d'améliorer leur efficacité d'encapsulation	204
Figure 4.15 - Proposition d'une librairie de lipides bascules basés sur CSL3 ou 2 pour réaliser un <i>screening in vivo</i> de vectorisation d'ARNm	206
Figure 4.16 - Essais d'internalisation cellulaire de siRNA-Alexa488 sur cellules de rétinoblastome humain Y79 avec la formulation CSL3 et étude de distribution de la formulation (marquée au fluorophore DilC ₁₈) après injection intravitréenne chez le lapin porteur de tumeurs oculaires Y79	207

L'intégralité des figures et tableaux inclus dans ce présent document sont reproduits avec l'autorisation préalable des détenteurs du droit d'auteur.

Liste des abréviations et symboles

¹ HNMR	Résonance magnétique nucléaire du proton
¹³ CNMR	Résonance magnétique nucléaire du carbone
AAV	Virus adéno-associé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNp	ADN plasmidique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine tri-phosphate
Cas9	CRISPR associated protein 9
CPP	Cell-penetrating peptides
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats
Cryo-TEM	Cryo-microscopie électronique
CSL	Cationic switchable lipid (lipide bascule cationique)
DLS	Dynamic light scattering
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoïétine
FRET	Förster Resonance Energy Transfert
FVII	Facteur de coagulation VII
GFP	Green fluorescent protein
HPLC	High pressure liquid chromatography
IP-RPLC	Ion-pairing reversed phase liquid chromatography
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LNP	Lipid nanoparticle
MCC	Coefficient de colocalisation de Manders
miRNA	Micro RNA (micro ARN)

NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
PAMAM	Poly(amidoamine)
PCI	Photochemical internalisation
PCR	Polymerase chain reaction
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PEG	Polyéthyléneglycol
PEI	Polyéthylèneimine
PLL	Poly-lysine
Poly(I:C)	Acide polyinosinique-polycytidylque
PTD	Protein transduction domains
RISC	RNA Induced Silencing Complex
SAXS	Small-angle X-ray scattering
sgRNA	Single guide RNA (ARN simple guide)
siRNA	Small interfering RNA (ARN à simple brin interférent)
SL	Switchable lipid (lipide bascule)
SOPS	1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine

Remerciements

Je crois que le premier remerciement est tout particulièrement destiné à ma Meufi, avec qui j'ai partagé ces 4 années d'expatriation à Montréal. Merci de m'avoir supporté dans les moments difficiles (quand je rentrais le soir en disant « ça a pas marché !», de m'avoir aidé de part ta présence au quotidien et de m'avoir ramené bien souvent dans le « monde réel », qui n'est pas fait que de chimie (avec ses solvants qui dessèche les mains en hiver), de souris décapitées et de « masse qui casse ». Découvrir cette partie du monde avec toi fût un bonheur immense !

Je tiens aussi à te remercier Jeanne d'avoir accueilli dans ton lab ce qui était alors un jeune étudiant qui n'avais jamais utilisé de micropipette auparavant (eh oui) ! Merci pour tes conseils, ton dynamisme et ta disponibilité au quotidien ! Je considère qu'en terme de science pharma, de critique scientifique, de design d'expériences, de présentation des résultats et de techniques scientifiques (de la chimie orga au vivo, en passant par la culture cell et la microscopie) tout à été appris ici ! Je pense qu'aucun autre doctorat n'aurait été aussi formateur et que c'est une grande chance de faire une telle formation dans une « petite structure » comme la notre (si bien équipée par ailleurs) où l'on fait tout nous-mêmes et où l'on se doit de connaître et d'entretenir les appareils qu'on utilise au lieu de faire appel à un département dédié pour nos analyses. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite, aussi bien sur le plan personnel qu'au niveau du lab et des projets. Ravi d'avoir été ton premier doctorant ! Encore merci, vraiment !

Merci aux membres du jury de me faire l'honneur de prendre de votre temps pour évaluer cette thèse. Vos remarques, perspectives et ouvertures constructives furent les bienvenues ! Un grand merci également à tous les co-auteurs des articles qui ont participé intellectuellement ou manuellement au mérite des publications.

Je tiens aussi à remercier tous les étudiants, collègues, professeurs, agents de recherche que j'ai pu cotoyer durant ma thèse. Merci pour les conseils (Martin pour la LC-MS, les chimistes de l'IRIC), le prêt de matériel (la flash auto qui m'a réconcilié avec la chimie organique, les colonnes HPLC de la plateforme...), les réactifs (encore une fois l'IRIC et la plateforme) ou encore pour les moments du quotidien. Je ne me risque pas à citer des noms en particulier, de peur d'en oublier. Sachez tout simplement que je vous remercie tous pour ces journées passées en votre compagnie à travailler, à discuter de science ou

d'autres choses et à échanger des potins ! Porté à la fois par ce cadre et cette ambiance de travail et par mon projet de recherche que j'appréciais tant, je ne me revois pas ne serait-ce qu'une seule fois ne pas avoir envie de venir au travail le matin ! Et ça, je pense que ça me manquera...

Finalement, j'aimerais terminer en remerciant du fond du cœur toute ma famille. Cette séparation familiale fut un sacrifice affectif difficile et je compte bien rattraper le temps perdu dès mon retour. Merci d'avoir toujours cru en moi, de toujours m'avoir supporté dans tous les choix et projets que j'ai pu entreprendre. Enfin, merci de m'avoir donné un environnement si favorable pour entreprendre ces grandes études.

Chapitre 1 : Introduction

Les nanotechnologies en thérapeutique humaine permettent de résoudre de nombreux défis associés à l'utilisation de principes actifs « nus » : augmenter la faible solubilité aqueuse de certains principes actifs, améliorer le ciblage actif, abaisser la toxicité systémique, favoriser l'internalisation intracellulaire du principe actif, diminuer la dégradation enzymatique du principe actif ou encore augmenter la faible demi-vie de circulation de certains principes actifs. L'amélioration de ces propriétés permettent au final une amélioration de la biodisponibilité de l'actif thérapeutique, et généralement une baisse des effets secondaires pour le patient. La thérapie génique fait appel aux nanotechnologies afin de véhiculer, protéger et adresser le gène thérapeutique.

Cela fait maintenant un demi-siècle que les nanotechnologies ont démontré leur potentiel pour une utilisation en thérapeutique humaine. En 2015, il y avait 43 spécialités « nanopharmaceutiques » sur le marché mondial.¹ Bien que leur utilisation soit encore relativement marginale en clinique, la myriade d'essais cliniques actuels (8000 surtout aux Etats-Unis et en Europe, dont 400 en phase III ou IV)² semble indiquer que leur démocratisation arrive à grands pas. Il est estimé que le marché des nanotechnologies appliquées aux thérapies humaines pesera 500 milliards de dollars US en 2019, d'après une étude réalisée en 2015 par le cabinet BCCResearch.³

1.1 La thérapie génique : principes et état de l'art

Selon une étude publiée en 2015 par le cabinet RootsAnalysis, le marché associé aux nanotechnologies pour une utilisation en thérapie génique en thérapeutique humaine pesera 11 milliards de dollars US en 2025.⁴ A ce jour, il existe deux spécialités pharmaceutiques utilisant le principe de thérapie génique sur le marché mondial : la Gendicine[®], une spécialité pharmaceutique basée sur un vecteur adénoviral contenant le gène suppresseur de tumeur p53 et commercialisé en Chine, et le Glybera[®], lui aussi basé sur un vecteur adénoviral pour le traitement du déficit en lipoprotéine lipase.⁵

Le principe de thérapie génique fut envisagé par Friedmann et Roblin en 1972. Ils tirent l'hypothèse que l'administration d'un « brin d'ADN exogène » pourrait être utilisé pour remplacer la copie d'ADN défectueuse ou absente chez des patients atteints de pathologies génétiques.⁶ De nos jours la thérapie génique n'est plus seulement réservée à

l'ADN puisque de nombreux types d'acides nucléiques peuvent avoir un effet thérapeutique (stratégie d'interférence, édition génomique...).⁷⁻⁹

Aujourd'hui, la thérapie génique est considérée comme étant l'un des sujets de recherche les plus en vogue par les journaux scientifiques les plus influents (encore plus depuis la démocratisation en 2013 de l'édition génomique CRISPR/Cas9).^{10,11} Les investissements financiers de la part des grandes industries pharmaceutiques atteignent des sommets sans précédents. A titre d'exemple, la « biotech » Moderna TherapeuticsTM, fondée en 2011 à Cambridge (Massachusetts, USA) et spécialisée dans la délivrance de mRNA thérapeutiques, est aujourd'hui valorisée à plus de 3 milliard de dollars US (battant tous les records de rapidité de valorisation dans l'histoire de l'industrie pharmaceutique).¹²

1.1.1 Définition et essais cliniques historiques

1.1.1.1 Définition de la thérapie génique

Selon l' « American Society of Gene and Cell Therapy », l'expression « thérapie génique » rassemble sous un même terme l'ensemble des méthodes de transfert d'acides nucléiques exogènes dans la cellule ayants pour objectifs de modifier ou de contrôler l'expression protéique, dans le but d'obtenir un effet thérapeutique.¹³ Cette définition assez large permet de réunir sous un seul et même terme plusieurs stratégies diverses.

L'idée phare de la thérapie génique est d'introduire dans la cellule, à l'aide d'un vecteur, un brin d'acide nucléique exogène. La première application évidente est la « supplémentation » d'un gène défectueux, en fournissant à la machinerie cellulaire une copie fonctionnelle de ce même gène.¹⁴ Une seconde application consiste à moduler l'expression de gènes via l'administration de gènes codants pour des protéines promotrices ou inhibitrices de la synthèse de l'ADN, des facteurs de transcription de l'ADN ou encore via l'utilisation de brins d'ARN interférents capables d'empêcher l'expression d'un gène.^{15,16} Plus récemment, une troisième application basée sur le système *Clustered Regularly Interspersed Palindromic Repeats* (CRISPR) et la protéine bactérienne Cas9 permet l'édition ou la correction « réelle » du génome.¹⁷ Ceci par opposition à la délivrance d'ADN plasmidique ou d'ARN interférents qui ne modifie pas le génome en soi, mais apporte une copie d'un gène de manière transitoire dans la cellule.

1.1.1.2 Premiers essais cliniques historiques

Le premier essai clinique de thérapie génique sur l'homme fut réalisé en 1989 par l'équipe du Pr. Rosenberg sur 5 patients atteints d'un mélanome avancé.¹⁸ Aujourd'hui, 2210 protocoles d'essais cliniques de thérapie génique sont recensés, dont 79 en phase III (soit 3,6%) – **Figure 1.1.**¹⁹ Les premiers essais cliniques ont mis en exergue la faisabilité et le grand potentiel de la thérapie génique. Deux essais cliniques historiques ayant eu des conséquences dramatiques sur la santé de patients ont été recensés ont été menés dans les années 2000, mettant à jour des risques non envisagés jusque là.

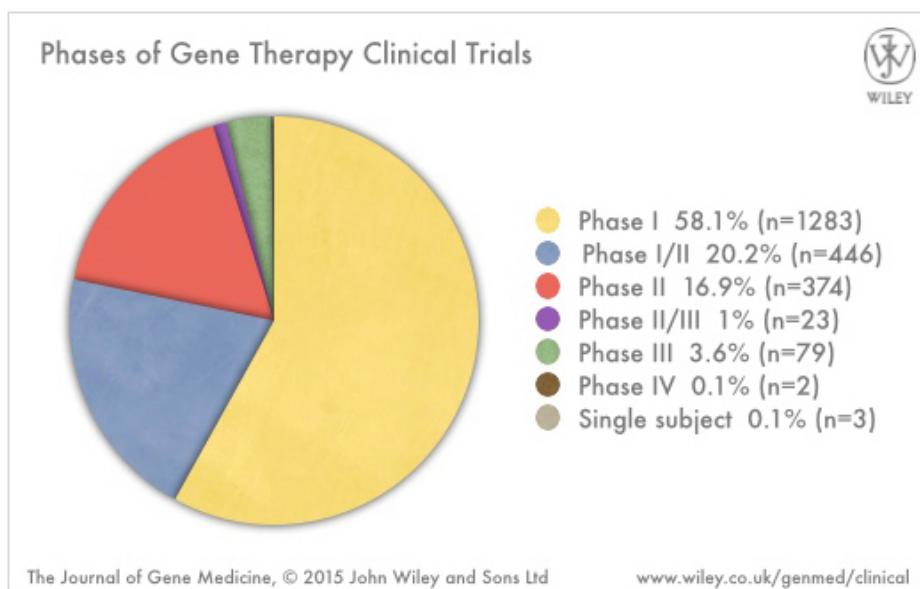


Figure 1.1 – Essais cliniques de thérapie génique recensés en 2015

Le premier de ces essais cliniques traitait le déficit en ornithine carbamyl transférase, une maladie génétique du foie provoquant notamment des hyperammoniéries sévères.²⁰ Il fut mené en 1999. Un adolescent du nom de Jesse Gelsinger fut le 18^{ème} patient de l'étude à recevoir un traitement de thérapie génique, basé sur un adénovirus atténué contenant le cDNA de l'enzyme ornithine carbamyl transférase. Il reçut la plus forte dose. Il décéda 4 jours après le traitement, d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique. Une patiente de l'étude avait reçu la même dose du traitement, sans pour autant avoir présenté de symptômes comparables. Cette expérience pointe le risque éventuel lié à la réponse immunitaire dirigée contre les vecteurs viraux mais également la grande variabilité individuelle de la réponse thérapeutique. Il est également montré la limite des études animales afin de prédire la réponse à l'administration systémique d'un vecteur viral chez l'homme.²¹

Le second essai clinique notoire fut mené en 2001 sur 10 enfants atteints du syndrome de déficit immunitaire combiné sévère, une maladie génétique liée à la déficience du gène codant pour le récepteur de la γ -cytokine, empêchant la différentiation des lymphocytes T et Natural Killer (NK).²² Le traitement consistait à réinjecter dans la moelle osseuse des lymphocytes modifiés *ex vivo* par un vecteur de type rétroviral, contenant le gène du récepteur de la γ -cytokine. Le traitement fut un succès pour 9 des 10 patients traités, qui ont retrouvé un système immunitaire fonctionnel. Mais un peu plus de 3 ans après le traitement, 5 enfants développèrent une leucémie due à l'intégration génomique anarchique du gène thérapeutique à proximité d'un promoteur oncogène.^{23,24} Cette expérience a permis de prendre en compte les risques liés à une insertion non contrôlée d'un gène thérapeutique dans le génome humain par un vecteur viral. Cet événement a en partie renforcé l'intérêt de la communauté scientifique pour l'utilisation de vecteur non viraux mais surtout pour l'utilisation de gènes thérapeutiques non intégrables au génome (ADNp, siRNA, ARNm), plus sûrs d'utilisation. Depuis 2014, la découverte et la démocratisation rapide de la technique d'édition précise du génome CRISPR/Cas9 relance de nouveau le débat éthique de l'édition génomique en thérapie génique.²⁵

1.1.2 Applications thérapeutiques

La thérapie génique peut être envisagée pour traiter un très grand nombre de pathologies, aussi bien héréditaires que acquises. Actuellement, aucune stratégie de thérapie génique (excepté CRISPR/Cas9 – voir section 1.1.3.4) ne vise à corriger de façon définitive et terminale la mutation génomique responsable de la pathologie. La thérapie génique telle que développée de nos jours est palliative et non pas curative. Il ne s'agit pour l'instant que de donner une copie « saine » du gène qui ne sera pas intégrée au génome, mais qui séjournera transitoirement dans la machinerie cellulaire pour effectuer son action thérapeutique.

La **Figure 1.2** présente les différentes indications les plus reportées lors des essais cliniques de thérapie génique.¹⁹ La part belle est faite aux maladies acquises (cancer, maladies cardiovasculaires et infectieuses, comptant pour environ 80% des études), tandis que les maladies génétiques héréditaires ne comptent que pour environ 10% des études.

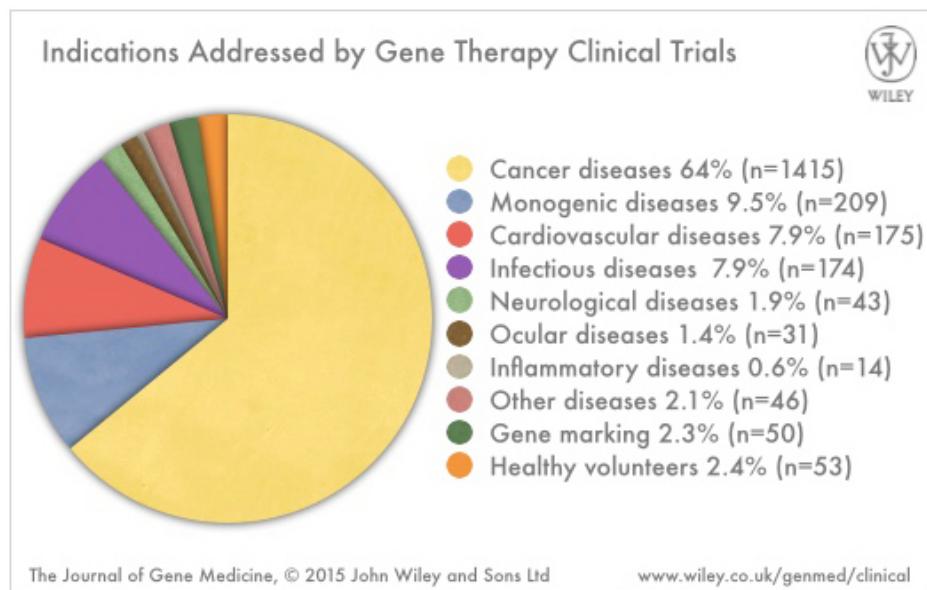


Figure 1.2 – Indications des essais cliniques de thérapie génique recensés en 2015

1.1.2.1 Les maladies génétiques héréditaires

Sur le papier, toutes les maladies génétiques héréditaires peuvent être soignées par la thérapie génique. Il suffit pour cela de fournir à la cellule une copie saine du gène défectueux, de corriger le gène défectueux par édition génomique (CRISPR/Cas9) ou d'abaisser l'expression d'un gène pathologique par stratégie d'interférence ARN. Mais cette si simple théorie est compliquée à mettre réellement et efficacement en pratique, à cause de la grande difficulté pour véhiculer et apporter aux bons tissus les fragiles gènes thérapeutiques en quantité suffisante.

Le transfert d'acides nucléiques exogènes s'inscrit dans ce contexte comme une alternative intéressante à la protéinothérapie pratiquée de nos jours, et il présente même de nombreux avantages par rapport à cette dernière :

- Une toxicité générale généralement plus faible qu'avec la protéinothérapie. A titre d'exemple, on peut citer l'utilisation de complexes GalNAc-siRNA anti-PCSK9 pour l'hypercholesterolémie familiale (actuellement en phase II chez Alnylam[®] Pharmaceuticals).²⁶ Cette stratégie est directement en concurrence avec les anticorps anti-PCSK9, dont l'Evolocumab est le tout premier représentant mis sur le marché en 2015. Les premiers essais cliniques de tolérabilité du GalNAc-siRNA reportent seulement un faible taux d'effets secondaires mineurs (seulement aux doses maximales excédant de plus de 50 fois la dose thérapeutique), une absence d'effets

secondaires majeurs et aucun changement des paramètres biochimiques.²⁷ A titre de comparaison, l’Evolocumab, lors de l’étude de tolérabilité de phase I, était responsable de quelques effets secondaires sérieux (<1% des sujets traités), de myosites courantes (inflammation des tissus musculaires) et de paramètres biochimiques augmentés.²⁸

- L’absence de formation d’anticorps anti-protéine recombinante, souvent observée après plusieurs administrations répétées de protéinothérapie.²⁹
- La possibilité de faire exprimer une protéine intracellulaire (par exemple une enzyme ou un facteur de transcription). La protéinothérapie reste en effet cantonnée à l’utilisation de protéines normalement secrétées par la cellule et qui n’ont pas vocation à y pénétrer (par exemple des cytokines, des hormones ou des anticorps).³⁰
- Une cinétique d’administration possiblement moins fréquente dans le cas de l’administration sous-cutanée de conjugués GalNAc-siRNA (voir **Tableau 1.1**) pour la délivrance aux hépatocytes. Par exemple, une injection sous cutanée est suffisante pour obtenir un relargage contrôlé et une diminution de la protéine hépatique PCSK9 pendant 6 mois. Les protéines recombinantes de la protéinothérapie disposent souvent d’une demi-vie plus courte *in vivo*, rendant impossible l’obtention d’une cinétique de relargage très prolongée.³¹

Le **Tableau 1.1** présente une liste non exhaustive des essais cliniques de thérapie génique les plus avancés pour traiter des pathologies héréditaires. Il convient de noter que la stratégie d’interférence (siRNA) visant le foie est quasi omni-présente dans cette catégorie (l’utilisation d’ADNp est obsolète pour cette application, l’utilisation d’ARNm ne permet qu’une expression transitoire de la protéine thérapeutique et la découverte de CRISPR/Cas9 est trop récente – voir section 1.1.3). Ceci est également dû à la découverte en 2014 des conjugués GalNAc-siRNA sous cutanés, capable de relâcher au foie de façon continue les siRNA thérapeutiques (une injection permet le *silencing* de gènes hépatiques pendant 6 mois).²⁶

Pathologie	Nom et stratégie	Vecteur de gène	Voie d'administration	Organe cible	Statut actuel	Ref
Hypercholesterolémie familiale	ALN-PCSsc siRNA anti-PCSK9	Conjugué GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Foie (hépatocytes)	Phase II	²⁶
Neuropathie amyloïde familiale à la transthyrétilne	Patisiran® et Revusiran® siRNA anti-transthyrétilne (TTR)	Nanoparticule lipidique (Patisiran®) et conjugué GalNAc-siRNA (Revusiran®)	Intraveineuse ou sous-cutanée	Foie (hépatocytes)	Phase III	^{32,33}
Hémophilie A	Fituziran® siRNA anti-antithrombine (AT)	Conjugué GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Foie (hépatocytes)	Phase II	³⁴
Déficit congénital en Surfactant Protein B du poumon (SP-B)	ARNm codant pour la protéine SP-B	ARNm nus modifiés	Aérosol pulmonaire	Poumon	Préclinique	³⁵

Tableau 1.1 – Liste non exhaustive d'essais cliniques de thérapie génique ciblant des pathologies héréditaires

1.1.2.2 Les maladies acquises

Les maladies acquises peuvent également être traitées par thérapie génique. Il est possible de favoriser ou inhiber l'expression d'un gène afin de moduler l'expression d'une protéine et ainsi induire une réponse thérapeutique. Dans le cas du cancer, on peut par exemple réaliser des stratégies thérapeutiques suicides pour anéantir les cellules cancéreuses, en favorisant l'expression de gènes apoptotiques ou suppresseurs de tumeurs (par exemple p53)³⁶ ou en utilisant des siRNA afin d'abaisser l'expression de gènes pro-oncogènes ou pro-angiogènes.^{37,38} Puisque les gènes thérapeutiques doivent se rendre dans le tissu cible de la maladie (notamment les organes profonds dans le cas de cancers), ces pathologies nécessitent des systèmes de nanovectorisation des oligonucléotides thérapeutiques (voir section 1.2).

Pathologie	Stratégie	Vecteur de gène	Voie d'administration	Organe cible	Statut actuel	Ref
Accidents ischémiques	VM-202 ADNp codant pour Hepatocyte Growth Factor (HGF) favorisant l'angiogénèse	ADNp nu	Injection intramusculaire locale	Organe ischémique (jambe, pieds)	Phase III	³⁹
Cancers du sein, du pancréas et ovariens	VM-206 ADNc codant pour HER2 (vaccination thérapeutique)	Adénovirus	Injection intramusculaire	Tumeurs	Phase II	⁴⁰
Cancer (tumeurs solides)	SGT-53 ADNp p53	Liposome cationique	Intraveineuse	Tumeurs solides	Phase I	³⁶
Cancer (tumeurs solides)	CALAA-01 siRNA anti-RRM2	Nanoparticule polymérique	Intraveineuse	Tumeurs solides	Phase I	⁴¹
Cancers hépatiques	ALN-VSP02 2 x siRNA (anti-VEGF et anti-KSP)	Nanoparticule lipidique	Intraveineuse	Foie	Phase I	⁴²
Cancers sanguins	<i>Ex-vivo</i> transfection des lymphocytes sanguins avec deux ARNm codants pour l'anticorps anti-CD3 et l'interleukine 2 (IL-2)	ARNm nus + électroporation	Thérapie cellulaire Transfert de ARNm <i>ex-vivo</i>	Lymphocytes sanguins	Préclinique	⁴³
Cancers prostatiques	ARNm codant pour la protéine PSA ou STEAP	Nanoparticule formée d'un complexe ARNm/protamine	Intraveineuse	Prostate	Préclinique	⁴⁴

Tableau 1.2 – Liste non exhaustive d'essais cliniques de thérapie génique ciblant des pathologies acquises

1.1.2.3 Vaccination et désensibilisation allergique

La vaccination ou la désensibilisation allergique est également possible avec la thérapie génique, via l'utilisation d'ADNp ou d'ARNm codants pour l'allergène à exprimer. L'ARNm est particulièrement adapté à la vaccination, en permettant non seulement l'expression de l'allergène mais également l'immunostimulation nécessaire au processus de

vaccination, de part son importante immunogénicité intrinsèque.⁴⁵ Il convient de noter que pour cette application, il n'est pas forcément requis d'avoir recours à une méthode de nanovectorisation de l'oligonucléotide thérapeutique, puisqu'une simple injection intradermale permet la traduction de l'allergène et l'immunisation contre celui-ci. Contrairement à une vaccination ou une désensibilisation classique, reposant sur l'administration de l'allergène sous forme protéique, la vaccination génétique prévient toute réaction secondaire (et possiblement anaphylactique) qui pourrait résulter *via* la pré-existence problématique d'IgE ciblant l'allergène. Puisque seule l'information génétique de l'allergène est ici administrée, la vaccination ARNm-médiée est plus sûre que la vaccination classique et peut être aussi efficace.⁴⁶

Pathologie	Stratégie	Vecteur de gène	Voie d'administration	Organe cible	Statut actuel	Ref
SIDA	<i>Ex-vivo</i> transfection des cellules dendritiques avec quatre ARNm codants pour Tat, Rev, Nef et Gag (protéines virales VIH)	ARNm nus + électroporation	Transfction de mRNA <i>ex-vivo</i>	Cellules dendritiques	Phase I	⁴⁷
Allergies diverses	ARNm codants pour les principaux allergènes (nourriture, pollens, animaux, champignons, latex...)	ARNm nus	Injection intradermale	Système immunitaire	Phase I/II	⁴⁸
Grippe	ARNm codants pour plusieurs antigènes grippaux	Nanocomplexe ARNm/protamine	Injection intradermale	Système immunitaire	Préclinique	⁴⁹

Tableau 1.3 – Liste non exhaustive d'essais cliniques de thérapie génique de vaccination ou désensibilisation allergique

1.1.3 Les différents types d’oligonucléotides thérapeutiques

La thérapie génique à tout d’abord été envisagée pour l’expression de protéines thérapeutiques, *via* l’utilisation d’ADNp ou de virus encapsulant de l’ADNc. Après la découverte de l’interférence ARN en 1998,⁵⁰ les chercheurs se sont tournés vers cette voie pour élaborer des stratégies thérapeutiques de thérapie génique. Plus simples à produire et exempts d’interactions avec le génome (plus sûrs), l’interférence ARN est encore aujourd’hui l’approche de thérapie génique la plus étudiée par les laboratoires académiques et la plus avancée dans les essais cliniques.⁵¹ Depuis 2008-2010 et la démocratisation des ARNm chimiquement modifiés et efficacement purifiés, un fort regain d’intérêt pour la délivrance d’ARNm est observé. Enfin, la découverte et l’adoption de la technique d’édition génomique précise CRISPR/Cas9 en 2014¹⁰ laisse enfin entrevoir une thérapie génique non plus palliative mais curative, *via* l’édition en elle-même de la mutation génomique responsable de la maladie.

1.1.3.1 ADNp

Les plasmides sont utilisés tous les jours en industrie pour la production (bactéries, levures ou cellules humaines immortelles) de protéines thérapeutiques (facteurs de coagulation, érythropoïétine...). Dans un contexte de thérapie génique, il est nécessaire de délivrer dans la machinerie cellulaire le plasmide codant pour la protéine thérapeutique, c’est à dire délivrer l’information génétique en lieu et place de la protéine en elle-même.

Structure

Un plasmide de DNA est une molécule d’ADN double brin circulaire codant pour une protéine thérapeutique donnée. Un plasmide a une taille d’environ 2 à 100 kpb (la taille varie en fonction de la taille de la protéine à exprimer).⁵² Un plasmide comporte (**Figure 1.3**) :

- Une origine bactérienne de réPLICATION, qui permet la production du plasmide dans les bactéries (« ori »)
- Une cassette d’insertion de gène, où est inseré l’ADN recombinant d’intérêt (« gfp »). Un fort promoteur viral placé avant le gène d’intérêt, permettant une expression forte de la protéine thérapeutique. Il est possible de choisir un promoteur régulable ou spécifique d’un tissu donné.

- Un gène de résistance à un antibiotique (« AmpR », qui permet la sélection des bactéries ayant intégré le plasmide avec succès. Seules les bactéries ayant intégrées le plasmide disposent de ce gène de résistance, et peuvent survivre à la sélection opérée par l'antibiotique.
- Un gène rapporteur « lacZ » qui code pour l'enzyme β -galactosidase. Ce gène est rendu inactif lorsque l'insertion du gène « thérapeutique » (ici « gfp ») dans le plasmide est un succès (coupage en deux de la séquence lacZ). Ceci permet de s'assurer que le plasmide intégré dans la colonie bactérienne comporte bien le gène d'intérêt « gfp ». On s'assure de l'absence du gène lacZ avec l'ajout du substrat de l'enzyme β -galactosidase, qui colore en bleu les colonies bactériennes qui auraient incorporé un plasmide contenant encore le gène lacZ.

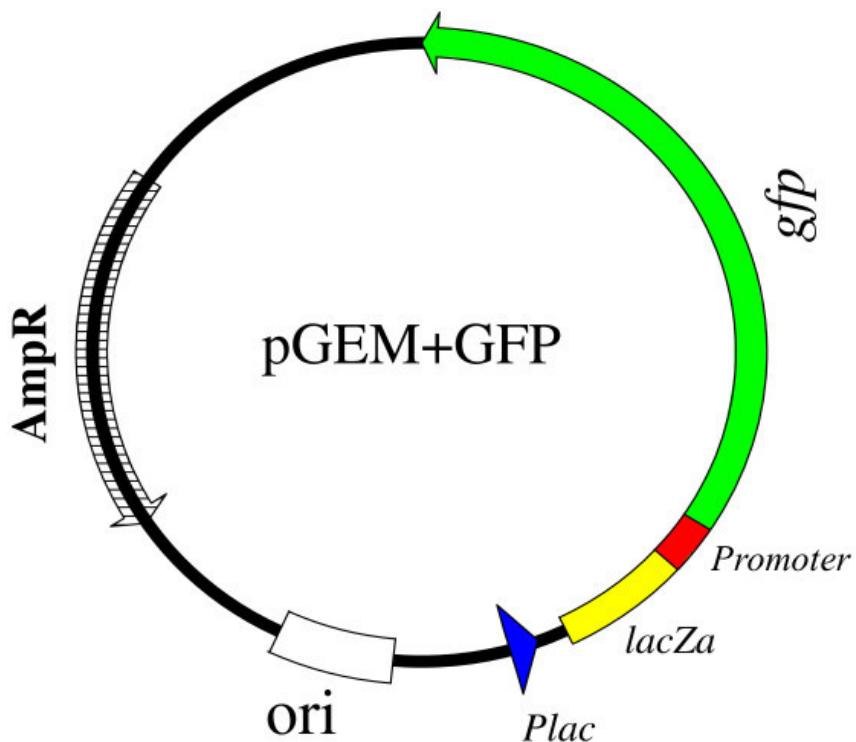


Figure 1.3 – Représentation schématique d'un plasmide codant pour la protéine GFP

Production

Les plasmides sont fabriqués en laboratoire grâce à des méthodes de biologie moléculaire. L'ADN recombinant codant pour une protéine thérapeutique donnée est tout d'abord extrait des cellules mammifères (clivé spécifiquement avec des endonucléases de restriction) puis amplifié par PCR. Cet ADN recombinant est ensuite inséré dans un plasmide bactérien (emploi d'enzymes de restrictions spécifiques et de DNA ligases), formant ainsi un plasmide recombinant. Ce plasmide recombinant est introduit dans des bactéries (le plus souvent *E. coli*). Les bactéries ayant intégré le plasmide avec succès sont sélectionnées (sélection avec un antibiotique dont la résistance est conferée par un gène présent sur le plasmide recombinant) et autorisées à se multiplier. Les plasmides sont ensuite isolés et purifiés.

Mécanisme d'action

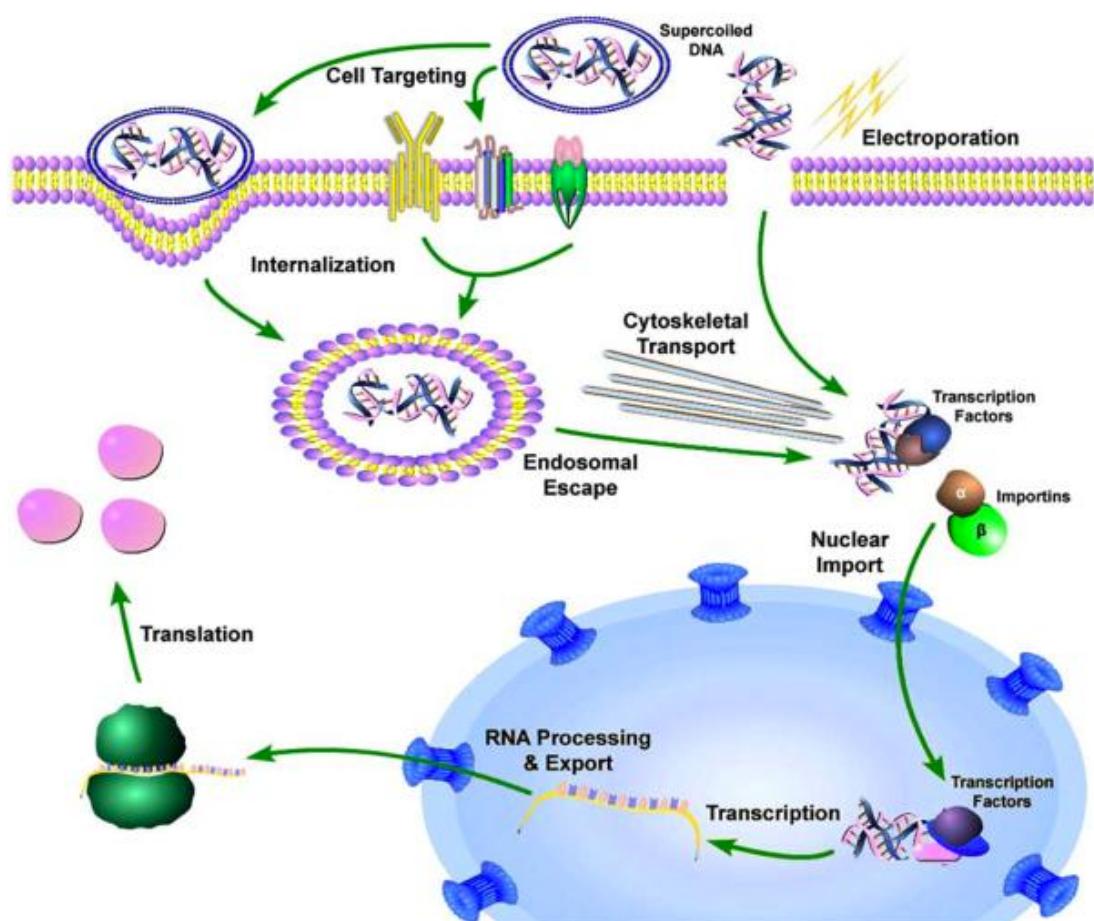


Figure 1.4 – Schéma du mécanisme d'action d'un pDNA après internalisation cellulaire⁵³

Après administration (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire), les ADNp pénètrent la cellule (souvent aidés par un nanosystème de vectorisation cationique – **Figure 1.4**). Cependant, l'injection intraveineuse hydrodynamique d'ADNp nus (sans vectorisation) peut déjà permettre une expression protéique considérable (dans le foie notamment).⁵⁴ Après être sorti de l'endosome (aidé par le nanovecteur cationique de transfection – voir section 1.2), l'ADNp emprunte le cytosquelette (réseau microtubulaire) afin de recruter par un mécanisme encore inconnu des protéines d'import nucléaire (importines).⁵⁵ Une fois dans le noyau, l'ADNp rentre dans la machinerie cellulaire de façon classique : il est tout d'abord transcrit en ARNm, qui est exporté dans le cytoplasme pour traduction de la protéine thérapeutique.

L'entrée dans le noyau est une barrière majeure pour les ADNp. Hors des phases de division cellulaire, la membrane nucléaire est imperméable aux ADNp. L'efficacité de transfection des ADNp est donc très dépendante du cycle cellulaire, et de bonnes quantités d'expressions protéiques ne sont obtenues que lorsque les cellules sont en pré-mitose (G2) ou mitose (G2-M).⁵⁶

Avantages/Inconvénients

Avantages	Inconvénients/Difficultés
Peu chers, faciles à produire à grande échelle	Molécule de grosse taille (comparé à un siRNA, un ARNm ou un sgRNA) pouvant poser des problèmes pour obtenir des nanovecteurs stables et de petite taille (< 100nm) ⁵⁷
Stabilité de la molécule (double brin de DNA circulaire relativement peu sensible aux DNaseses) ⁵⁸	Nécessité d'atteindre le noyau, l'efficacité de transfection est donc très dépendante du cycle cellulaire
Expression protéique durable possible (> 30 jours) ⁵⁹	Expression protéique tissulaire inhomogène (voir ci-dessous)
	Génotoxicité possible par insertions génomiques d'ADNp ⁶⁰
	Immunogénicité intrinsèque conférée par les séquences bactériennes nécessaire à la production du plasmide ⁶⁰

Tableau 1.4 - Avantages et inconvénients de l'emploi d'ADNp en thérapie génique

Exemple d'avancée récente

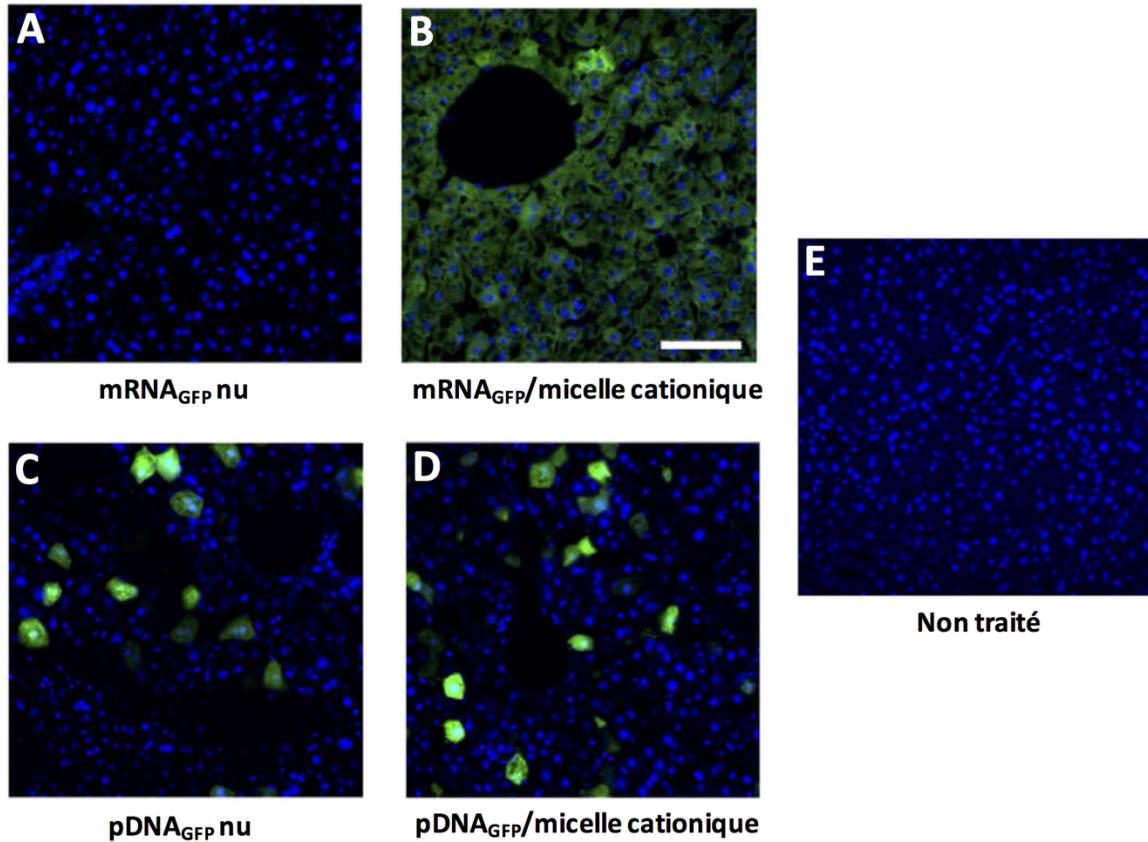


Figure 1.5 – Vectorisation d'ADNp exprimant la GFP aux hépatocytes chez la souris (ADNp nu ou nanoencapsulé dans des micelles cationiques).⁵⁷ 24h après injection intraveineuse, les coupes de foie sont imagées par microscopie confocale.

Une publication de 2015 oppose l'ADNp au ARNm pour l'expression dans le foie de la protéine modèle GFP.⁵⁷ Les oligonucléotides sont délivrés nus ou nanoencapsulés (micelles cationiques) par injection intraveineuse chez la souris. L'utilisation d'ARNm nu ne permet aucune expression protéique (**A**), comme anticipé (voir section 1.1.3.2). À l'inverse, l'emploi d'ADNp nus (**C**) permet l'obtention d'une expression protéique, mais non homogène (cellules en division cellulaires seulement). La nanovectorisation de l'ARNm permet l'obtention d'une expression protéique homogène importante (**B**), tandis que la nanovectorisation de l'ADNp n'arrive pas à rendre plus homogène l'expression protéique dans le tissu (**D**). Cette expérience montre bien les limites du pDNA pour une utilisation en

protéinothérapie par thérapie génique. L'ADNp (nanovectorisé ou non) est dépendant du cycle cellulaire pour passer la paroi nucléaire et être transcrit en ARNm.

1.1.3.2 ARNm

La première vague d'intérêt pour la délivrance thérapeutique d'ARNm à eu lieu dans les années 1980, avec l'avènement de la lipofection (transfection d'ARNm avec des liposomes cationiques tel que le Lipofectin®, inventé à cette occasion).⁶¹ Rapidement abandonnés car considérés trop fragiles (trop rapidement sujet à la dégradation par les RNases endogènes), trop coûteux à produire, trop immunogènes et occasionnant une traduction protéique trop transitoire, ils furent laissés de côté au profit de l'ADNp et des constructions virales/ADNc.⁴⁵ Ce n'est que depuis 2008-2010 et la démocratisation des modifications chimiques des nucléosides, apportant plus de stabilité et un abaissement significatif de l'immunogénicité, que l'intérêt des ARNm pour une application thérapeutique renaît.⁶² Il devient alors possible d'exprimer des concentrations thérapeutiques de protéines *in vivo*.⁵⁷ Depuis 2014 et la découverte de CRISPR/Cas9, l'utilisation d'ARNm codant pour la protéine d'édition génomique Cas9 (voir section 1.1.3.4) redonne encore un regain d'intérêt pour la délivrance d'ARNm.⁶³

Structure

Un ARNm est un long brin d'ARN de 700 à 6000 bases environ (selon la taille de la protéine à exprimer). Le 5'Cap est une séquence obligatoire afin d'engager le processus de traduction et afin de prévenir la dégradation du brin d'ARNm (**Figure 1.6**). La région non traduite 5'UTR est une région placée en amont du codon d'initiation de la traduction. Cette région permet l'attachement du ribosome ainsi que la régulation de l'expression du gène. Dans un contexte de thérapie génique, où l'on désire une expression forte de la protéine thérapeutique, on utilise en général un promoteur 5'UTR fort, tel que le promoteur bactériophage T7. L'Open Reading Frame (ORF) est la région de l'ARNm qui encode directement pour la protéine d'intérêt. Cette région commence par un codon AUG d'initiation de la traduction et se termine par un codon UAA, UAG ou UGA de fin de traduction. La région non traduite 3'UTR permet encore une fois la régulation de l'expression du gène *via* la fixation de protéines de régulation ou brins de miRNA. La queue poly-adénosine poly(A), d'une longueur de 50 à 350 résidus adénosine, à un rôle dans le transport de l'ARNm du noyau au cytoplasme, dans la protection contre la dégradation

(fixation de protéines empêchant l'accès aux exonucléases) et dans le recrutement du ribosome pour la traduction protéique. Dans un contexte de thérapie génique, il est essentiel pour obtenir une expression protéique efficace et durable d'avoir une queue poly(A) d'au moins 120-150 résidus (**Figure 1.7**).⁶⁴

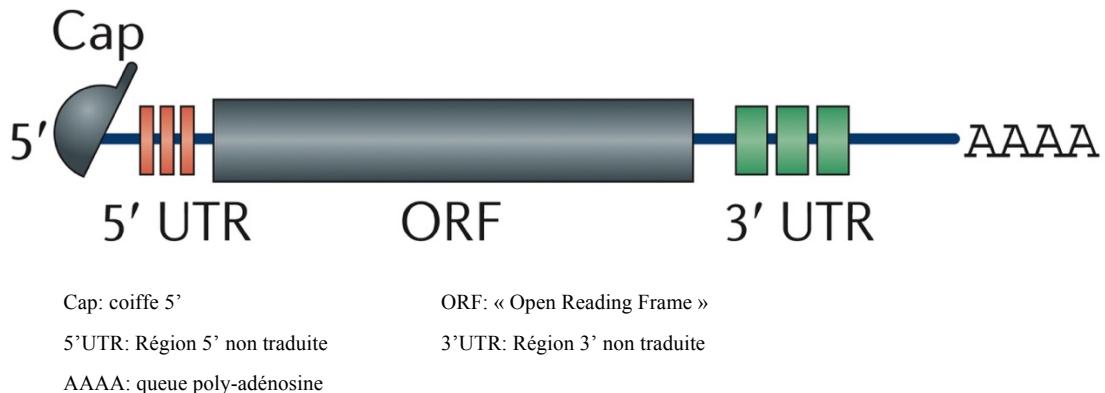


Figure 1.6 – Structure d'un ARNm thérapeutique (New England Biolabs® Inc.)

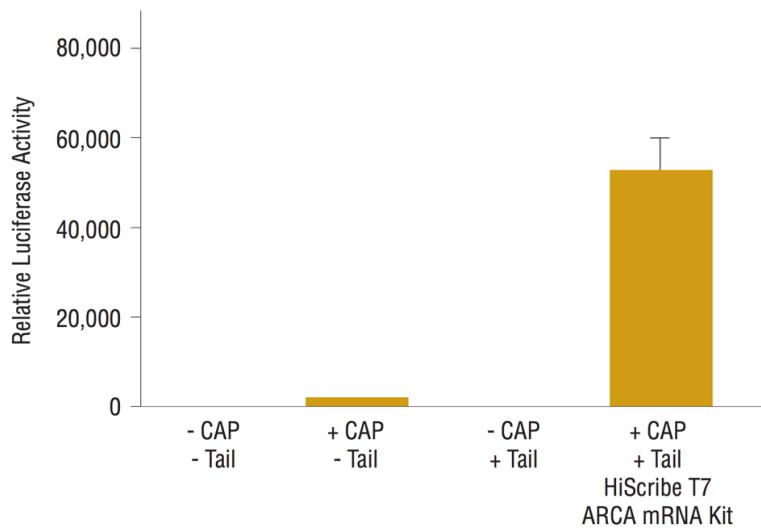


Figure 1.7 – Figure démontrant l'importance de la présence du 5'Cap (CAP), de la queue poly-A (Tail), d'un fort promoteur (T7) et d'un 5'Cap ARCA pour l'obtention d'une expression forte de la protéine d'intérêt (New England Biolabs® Inc.)

Production

Les brins d'ARNm thérapeutiques matures sont synthétisés par transcription enzymatique *in vitro* à partir d'un brin d'ADN linéaire, lui-même obtenu à partir d'un plasmide ADN circulaire sur lequel le gène codant pour la protéine d'intérêt a été inséré.

L'ARNm est ensuite produit grâce à l'utilisation d'une enzyme ARN polymérase (en général la T7 ARN polymérase) et de bases NTP's (**Figure 1.8**). Cette transcription requiert la présence en 5' d'un promoteur T7.

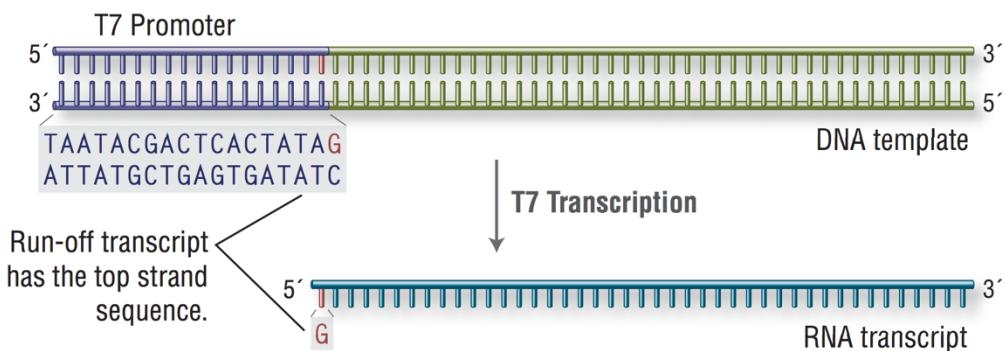


Figure 1.8 – Schéma illustrant la transcription d'ARNm à partir du *template* ADN, via l'utilisation de l'enzyme T7 ARN polymérase (New England Biolabs® Inc.)

Pendant la transcription, les brins d'ARNm obtenus sont « capés » avec un 5'Cap ARCA (voir ci-après – modifications chimiques). Une queue poly(A) est ensuite ajoutée *via* l'utilisation d'une polymérase poly(A) et d'ATP. Une étape de digestion des brins ADN initiaux est également faite (via l'utilisation d'enzymes DNases).

Les courts brins d'ARN contaminants (< 200 pb) issu de toutes les étapes de synthèse de l'ARNm mature final sont en partie responsables de l'immunogénicité autrefois imputée aux ARNm.⁶⁵ Dans un contexte de vaccination, ceci peut être désirable. Mais dans un contexte de thérapie génique visant l'expression protéique thérapeutique, ceci est néfaste. Depuis 2010 et grâce notamment aux travaux de l'équipe du Pr. K. Kariko, les ARNm thérapeutiques sont purifiés par IP-RPLC (ion pairing reversed phase liquid chromatography) sur colonnes polymériques hydrophobes à large taille de pores.⁶⁶ Cette nouvelle façon de purifier les ARNm thérapeutiques est compatible avec une production à grande échelle et est devenue le « gold-standard » de la purification finale des ARNm.⁶⁷

La production d'ARNm thérapeutiques en grande quantité est relativement peu coûteuse et maintenant bien contrôlée (grâce aux nouvelles polymérasées et à la purification finale par IP-RPLC). Des entreprises telles que Moderna TherapeuticsTM (Etats-Unis) ou CureVac (Allemagne) produisent des ARNm thérapeutiques à grande échelle pour leurs essais cliniques.

Mécanisme d'action

Dans la cellule, l'ARN pré-messager est transcrit dans le noyau cellulaire par les ARN polymérasées, à partir de l'ADN génomique (**Figure 1.9**). Après avoir subi les modifications post-transcriptionnelles (épissage, 5' Capping et 3' poly(A)), le brin d'ARNm devient mature et peut être adressé dans le cytoplasme cellulaire. Ici, il est pris en charge par le ribosome pour la traduction protéique. La durée de vie cytoplasmique du brin d'ARNm est déterminée par les séquences de régulation (5'UTR, 3'UTR et poly(A)) du brin, sur lesquelles viennent se fixer des protéines ou des oligonucléotides de régulation (microRNA ou siRNA). Le niveau et la durée d'expression de la protéine dépendra de la demi-vie de l'ARNm dans le cytoplasme.

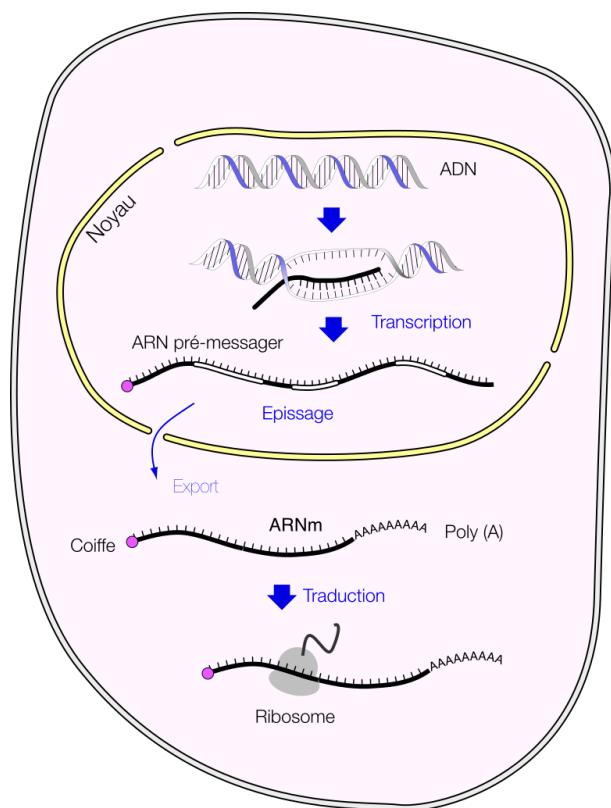


Figure 1.9 – Représentation schématique de la synthèse et de la maturation d'un ARN messager dans une cellule eucaryote

Dans un contexte de thérapie génique, des brins d'ARNm matures prêts à être traduits en protéines thérapeutiques sont délivrés. Nul besoin d'atteindre le noyau pour bénéficier d'une expression protéique puisque le mécanisme de traduction protéique se produit dans le cytoplasme (contrairement à l'utilisation d'ADNp).

Modifications chimiques

Lorsque le Cap 5' endogène « classique » (m^7 GpppG) est ajouté de façon enzymatique sur l'ARNm, une proportion significative est greffée à l'envers, rendant la lecture par le ribosome impossible.⁴⁵ L'utilisation d'un Cap ARCA (Anti Reverse Cap Analogue) $m_2^{7,3'-O}$ GpppG, qui s'introduit dans le bon sens à 100%, permet d'augmenter significativement l'efficacité de la traduction.^{68,69}

L'utilisation de bases chimiquement modifiées telles que pseudouridine et 1-methylpseudouridine permet de diminuer très fortement l'immunogénicité intrinsèque des ARNm thérapeutiques et d'augmenter leur durée de vie, avec peu d'impact sur l'efficacité de la traduction.⁷⁰

L'optimisation des régions 5'UTR et 3'UTR permet d'influer sur la demi-vie de l'ARNm. Les brins d'ARNm actuellement en essais cliniques incorporent des régions non-codantes de la β -globine, permettant assez forte expression de la protéine d'intérêt. Ces régions non codantes ne sont pas encore entièrement comprises par les scientifiques et des études d'optimisation de ces séquences sont en cours afin d'augmenter encore la traduction protéique ou de modifier la cinétique de la traduction.⁷¹

De nombreuses optimisations de la séquence codante peuvent être faites pour augmenter l'expression de la protéine thérapeutique. Par exemple, il est possible de remplacer les codons rarement utilisés par des codons plus courants, ce qui induit un meilleur recrutement de l'ARNt par le ribosome. L'on peut également modifier les codons pour éviter l'obtention de structures secondaires néfastes à la traduction. A titre d'exemple, la société CureVac a breveté le remplacement des bases U en troisième position de codon par les bases G ou C. Ceci permet une traduction protéique jusqu'à 5 fois plus élevée *in vivo*.⁷¹

Avantages/Inconvénients

Avantages	Inconvénients/Difficultées
Pas de risques d'intégration au génome (plus sûr d'utilisation qu'un ADNp)	Immunogénicité intrinsèque (avantage dans le cas de la vaccination)
Permet l'expression protéique dans toutes les cellules (mitotiques ou non, contrairement aux ADNp) ⁴⁵	Plus compliqué à produire qu'un siRNA ou un ADNp
Expression protéique transitoire. Avantage pour l'édition génomique (expression de la protéine d'édition génomique Cas9, voir section 1.1.3.4). Inconvénient pour expression protéique prolongée (environ 48h en injection sous-cutanée, jusqu'à 7 jours en intramusculaire) ⁷²	
Possibilité de jouer sur la cinétique d'expression protéique en optimisant la séquence ou le mode/lieu d'injection ⁷²	Pas encore optimisé pour une utilisation autre qu'immunostimulation-dépendante tel que la vaccination (ARNm en proie aux nombreuses RNases extracellulaires, difficulté d'adressage du gène aux tissus cibles)
Possibilité d'expression paracrine de la protéine d'intérêt, permettant d'atteindre le cœur du tissus normalement non-atteignable par le brin ARNm lui-même (tumeurs) ^{45,57}	Requiert un système de nanovectorisation pour une indication autre que la vaccination (voir section ADNp 1.1.3.1)

Tableau 1.5 – Avantages et inconvénients de l’emploi d’ARNm en thérapie génique

Exemples d'avancées récentes

En 2016, le groupe de recherche du Pr. D.G. Anderson (Massachusetts Institute of Technology) à mis au point un lipidoïde cationique (OF-02) qui permet d'obtenir le nanosystème lipidique de délivrance d'ARNm le plus efficace à ce jour *in vivo* (**Figure 1.10**). Une seule injection d'ARNm (0,75 mg/kg) permet l'obtention des concentrations sanguines massives d'érythropoïétine (EPO), bien supérieures aux concentrations thérapeutiques qui seraient nécessaires pour faire du remplacement protéique.⁷³

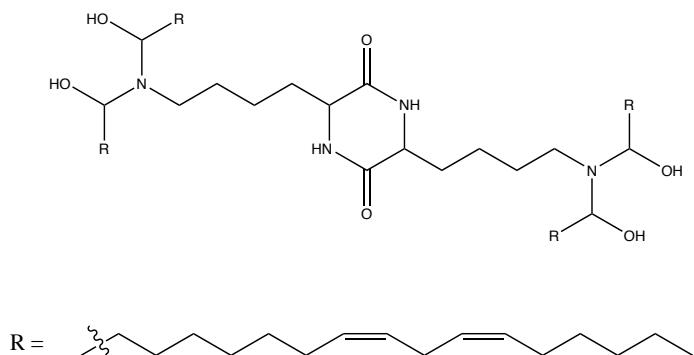
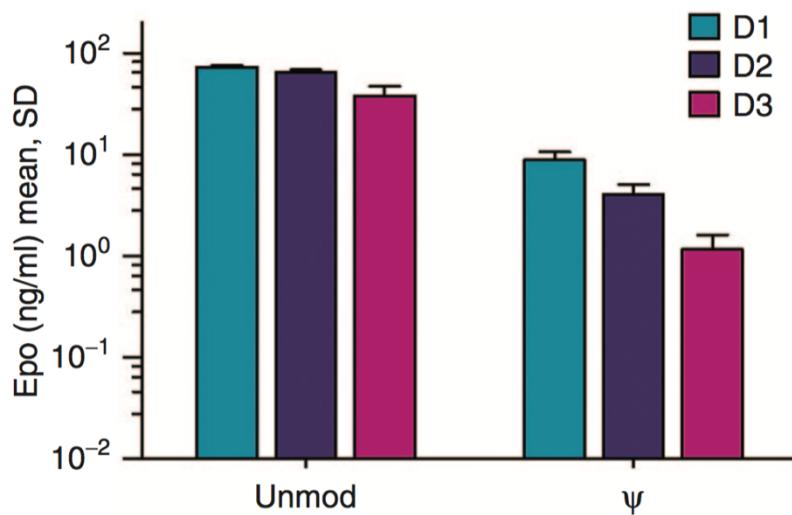


Figure 1.10 – Structure chimique du lipidoïde OF-02⁷³

En 2015, il a été montré qu'une « simple » optimisation de séquence du brin d'ARNm peut permettre d'obtenir une expression protéique (EPO) plus forte qu'avec l'emploi de bases chimiquement modifiées (pseudouridine et 1-methylpseudouridine), tout en gardant le caractère non-immunogène que confèrent habituellement ces modifications chimiques des bases (**Figure 1.11**).⁶⁴ Ce travail démontre à quel point l'optimisation de séquence des ARNm thérapeutiques est importante et est un domaine de recherche à part entière.



Unmod = ARNm dont la séquence a été optimisée mais sans bases chimiquement modifiées

ψ = ARNm de même séquence optimisée, incorporant des bases pseudouridine conférant habituellement un niveau d'expression protéique et une stabilité supérieur

D1, D2, D3 = jour 1, jour 2, jour 3

Figure 1.11 – Expression plasmatique de la protéine EPO chez la souris après délivrance (nanovectorisation lipidique) d'ARNm dont la séquence a été optimisée

1.1.3.3 siRNA

L'interférence ARN permet d'élaborer des stratégies thérapeutiques *via* la diminution de l'expression d'une cible protéique thérapeutique. Ce terme recouvre l'utilisation de siRNA (petit ARN interférent) et de miRNA (micro ARN interférents). C'est à ce jour le sous-domaine de thérapie génique le plus étudié et le plus avancé cliniquement.^{37,74} La stratégie repose sur l'administration thérapeutique d'un petit (< 30 nucléotides) d'ARN, capable de reconnaître et de s'hybrider spécifiquement avec les ARNm codant pour la protéine à éteindre. Il est important de préciser que le mécanisme d'interférence ARN est déjà présent de façon endogène dans les cellules eucaryotes

(miRNA).⁷⁵ Nous ne développerons dans cette sous-partie que l'emploi de siRNA, qui sont les plus utilisés en recherche et en clinique. Il convient juste de comprendre qu'il n'existe pas de grandes différences fondamentales dans l'emploi d'un siRNA exogène ou un miRNA endogène pour éteindre l'expression d'une protéine donnée.⁷⁶

Les siRNA sont généralement considérés comme non immunogènes (comparé à un ADNp, un ARNm ou même un miRNA).^{77,78} Cette affirmation commence cependant à être discutée.⁷⁹

Structure

Un siRNA est un duplexe de deux brins d'ARN (Figure 1.12) de longueur comprise entre 19 et 25 nt (le plus souvent 21 nt). Le double brin obtenu est plus résistant aux RNases qu'un ARN simple brin (type ARNm).

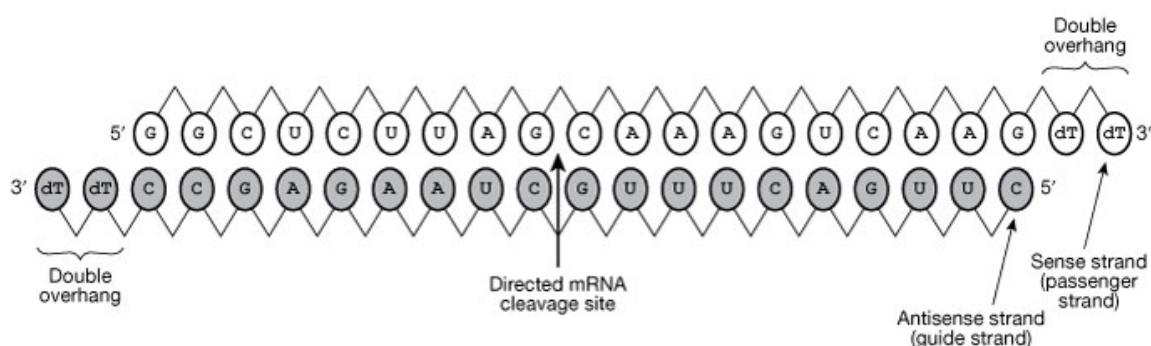


Figure 1.12 – Structure schématique d'un siRNA

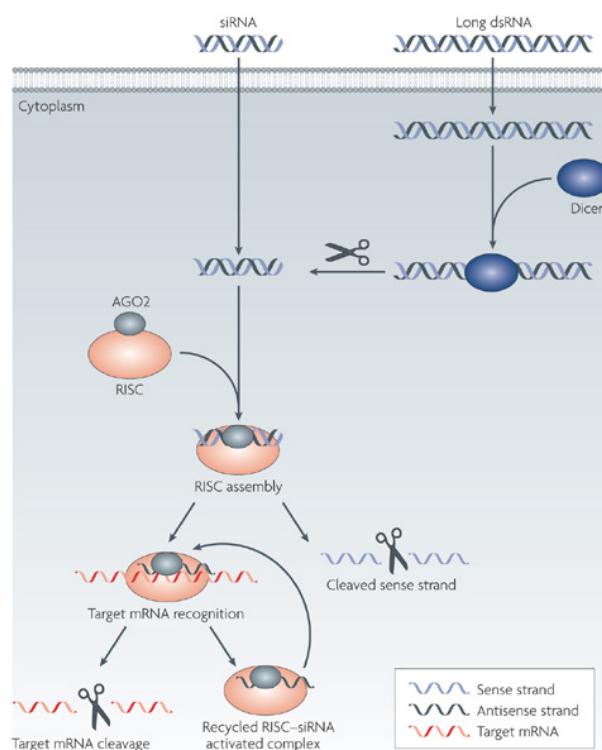
Production

Contrairement à la production dd'ADNp ou d'ARNm qui font appel à des techniques enzymatiques ou à une production bactérienne, la production de siRNA est en général réalisée par synthèse chimique. Cette synthèse est réalisée par un synthétiseur d'oligonucléotides, sur un support solide. Chaque brin (21 nt) d'ARN est synthétisé séparemment. 21 bases phosphoramidites sont ajoutée une à une jusqu'à l'obtention du brin final. Celui-ci est chimiquement déprotégé et détaché de son support solide. Chaque brin est purifié par IP-RPLC (ion pairing reversed phase liquid chromatography). Les deux brins sont hybridés dans un tampon aqueux (mélange équimolaire chauffé puis refroidi) pour obtenir le produit final.

La synthèse chimique de siRNA permet d'incorporer facilement sur le siRNA des marqueurs fluorescents, un cholestérol ou un ligands conjugués (type GalNAc – voir ci-après).²⁶ La production chimique de siRNA est faisable à grande échelle, et de nombreux laboratoires (tels que Alnylam® Pharmaceuticals, Cambridge, USA) produisent déjà des siRNA pour leurs essais cliniques.

Mécanisme d'action

Après internalisation cellulaire, le double brin de siRNA se retrouve dans le cytoplasme (**Figure 1.13**). Ici, le siRNA est capté par le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) qui clive le brin sens du siRNA (*via* le recrutement de la sous-unité AGO2). Le complexe RISC/ARN_{guide} ainsi formé circule alors dans le cytoplasme, se lie aux ARNm de séquence complémentaire et provoque l'interférence (*silencing*) du gène par clivage de l'ARNm. Il est à noter que le complexe RISC/ARN_{guide} peut cliver de nombreux ARNm dans la cellule (le complexe est recyclé). Le siRNA n'a donc pas besoin de traverser la paroi nucléaire pour exercer son effet.



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 1.13 – Mécanisme d'action d'un siRNA dans la cellule eucaryote¹⁶

La durée de vie du complexe RISC/ARN_{guide} présent dans la cellule permet d'obtenir un effet thérapeutique durant 3 à 7 jours dans une lignée qui se divise rapidement, et plusieurs semaines chez des cellules qui ne sont pas en division.⁸⁰ Après un certain temps, les complexes RISC/ARN_{guide} sont dégradés et suffisamment dilués pour être en dessous de la dose thérapeutique : une ré-administration est nécessaire.

Les siRNA peuvent générer des effets « off-target » qui sont compliqués à détecter. Il est possible que le complexe RISC/ARN_{guide} s'apparie de façon non spécifique avec certains motifs des régions 3'UTR d'ARNm non-cibles, entraînant ainsi leur dégradation.⁸¹ Des régions complémentaires courtes sont suffisantes pour obtenir ces appariements, et de nombreux transcrits non-spécifiques peuvent donc être affectés. Également, d'autres effets « off-target » peuvent résulter de la réponse immunitaire innée induite par la présence du vecteur ou du siRNA lui-même.⁸²

Modifications chimiques

De nombreuses modifications chimiques peuvent être faites sur les nucléotides des siRNA. L'optimisation des séquences et des modifications chimiques des siRNA sont un domaine d'étude à part entière (comme pour les ARNm thérapeutiques – voir section 1.1.3.2).⁸³

L'utilisation de bases 2'OMe ou 2'F est courante pour conférer une résistance aux RNases endogènes (augmentation de la demi-vie plasmatique et intracellulaire du siRNA – **Figure 1.14 et Figure 1.15**). On peut utiliser des liens phosphorothioates (au lieu des liens phosphodiester classiques) pour augmenter la stabilité des brins vis à vis des RNases.⁸⁴

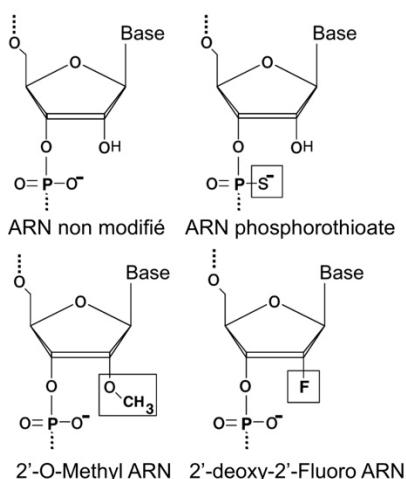


Figure 1.14 – Schéma présentant les modifications chimiques des siRNA les plus souvent rencontrées⁸⁴

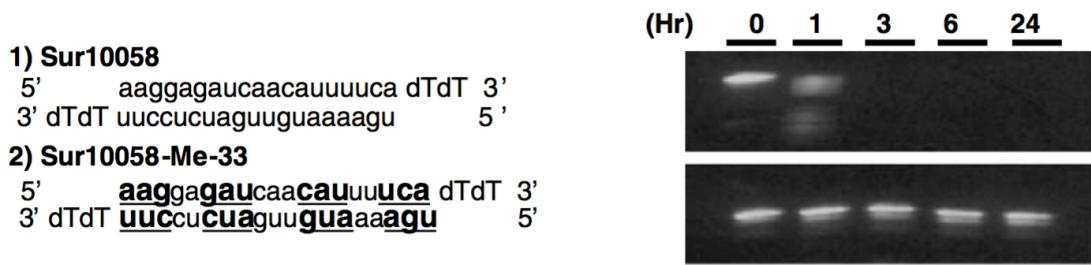


Figure 1.15 – Migration électrophorétique de siRNA après incubation dans du plasma de souris. Illustration de la rapide dégradation des siRNA non modifiés chimiquement (ligne 1) par les RNAses plasmatiques (siRNA dégradé en moins de 3 heures). Le siRNA incorporant des bases 2'OMe (en gras souligné, ligne 2) permet une stabilité plasmatique de plus de 24 heures.⁸⁴

On ajoute en général une base adénine (A) ou uracil (U) en 5' du brin guide, pour augmenter l'efficacité du complexe RISC/ARN_{guide}. On évite l'utilisation de séquences riches en GU, qui sont responsables d'immunostimulation.⁸³

Avantages/Inconvénients

Avantages	Inconvénients/Difficultées
Facilité de production et de purification à grande échelle	Lorsque non modifié, sensible aux RNAses endogènes
Pas de recours à la production bactérienne, cellulaire ou enzymatique pour la production	« Off-target » possible si optimisation de séquence non réalisée ^{85,86}
Non immunogènes (comparé à un ADNp ou un ARNm)	Non immunogénicité commence à être contestée ^{79,81}
Nul besoin d'atteindre le noyau, pas d'interaction avec le génome	
Petits oligonucléotides permettant l'obtention de nanovecteurs de taille inférieure à 100nm	
Durée d'action relativement longue (< 10 jours) ou très longue (6 mois) dans le cas de conjugués-siRNA sous-cutanés ²⁶	

Tableau 1.6 – Avantages et inconvénients de l'emploi de siRNA en thérapie génique

Exemples d'avancées récentes

En 2014, le groupe de recherche du Pr. D.G. Anderson à mis au point le nanovecteur lipidique de vectorisation de siRNA le plus efficace à ce jour *in vivo* (lipidoïde cationique cKK-E12 – **Figure 1.16**). La dose-efficace médiane (ED_{50}) de cette formulation dans le modèle siRNA-FVII chez la souris (extinction du facteur de coagulation hépatique VII) est de 0,002 mg/kg, soit une efficacité extrêmement élevée pour la vectorisation de siRNA au foie. La dose toxique de ce nanovecteur lipidique est plus de 100 fois plus forte que la dose thérapeutique.⁷

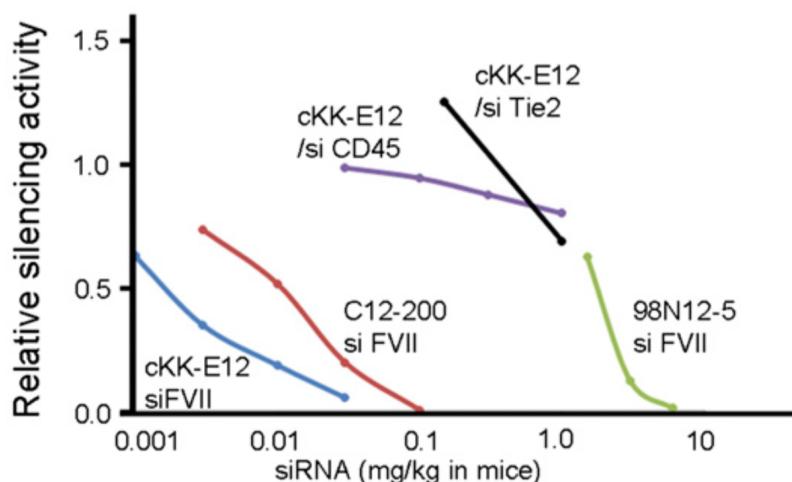


Figure 1.16 – Courbe dose réponse du *silencing* du gène hépatique FVII chez la souris mediée par les nanoparticules lipidiques 98N12-5 (1^{ère} génération 1), C12-200 (2^{ème} génération) et cKK-E12 (3^{ème} génération). La concentration en FVII circulant est déterminée par essai colorimétrique 48h après injection intraveineuse.⁸⁷

En 2014, la compagnie Alnylam® Pharmaceuticals a développé le conjugué GalNAc-siRNA (**Figure 1.17**).²⁶ Ce conjugué se compose d'un siRNA chimiquement modifié ciblant par exemple le gène hépatocytaire PCSK9 (traitement de l'hypercholestérolémie) couplé de façon covalente à un ligand de ciblage des hépatocytes : GalNAc, cible des récepteurs asialoglycoprotéine des hépatocytes. L'ajout de cet agent de ciblage est compatible avec la synthèse chimique sur résine des brins de siRNA, donc facile à réaliser à grande échelle.

Injecté en sous-cutané, ces conjugués sont capables d'éteindre n'importe quel gène hépatocytaire pour des durées approchant les 6 mois.⁸⁸ Leur facilité de production, leur mode d'administration, leur très faible toxicité et leur longue durée d'action sont autant de facteurs qui laissent supposer que cette spécialité (ALN-PCSsc) pourrait être la première spécialité

pharmaceutique d’interférence ARN sur le marché (actuellement en Phase II).⁸⁹ La seconde génération de conjugués GalNAc-siRNA, encore plus efficaces, vient d’être reportée dans la littérature.⁹⁰

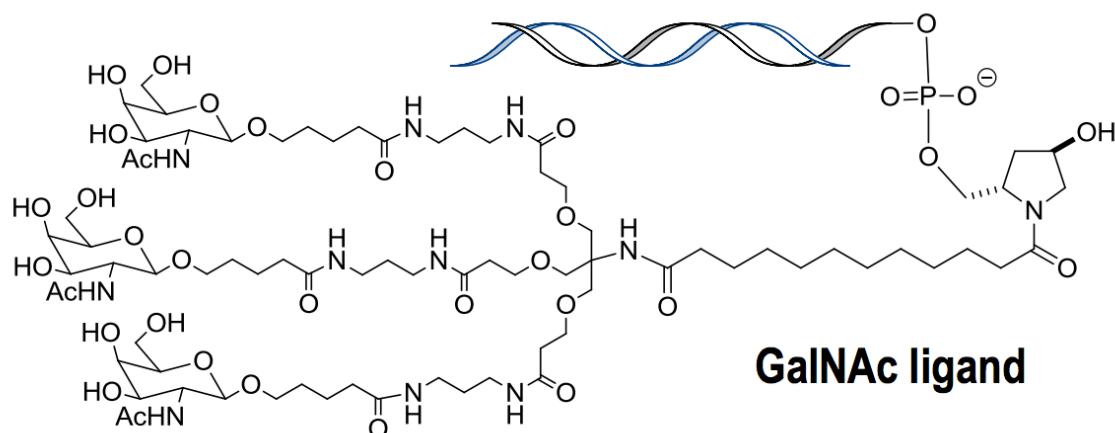


Figure 1.17 – Structure du conjugué GalNAc-siRNA de la société Alnylam® Pharmaceuticals.²⁶

1.1.3.4 CRISPR/Cas9

Le système d’édition génomique CRISPR/Cas9 est plus compliqué à appréhender qu’une « simple » administration d’un seul oligonucléotide (comme pour l’ADNp, l’ARNm ou siRNA). Cependant, il s’inscrit tout à fait dans le domaine de la « thérapie génique » puisqu’il y a administration d’un ou plusieurs oligonucléotides (voir ci-dessous) et qu’il y a édition du génome (donc du support génétique).⁹¹

Il est possible de réaliser 3 types d’éditions génomiques (**Figure 1.18**) avec le système CRISPR/Cas9 : la délétion, la modification d’un gène ou une insertion d’une séquence ADN exogène (ADN *correcteur* – voir ci-après).

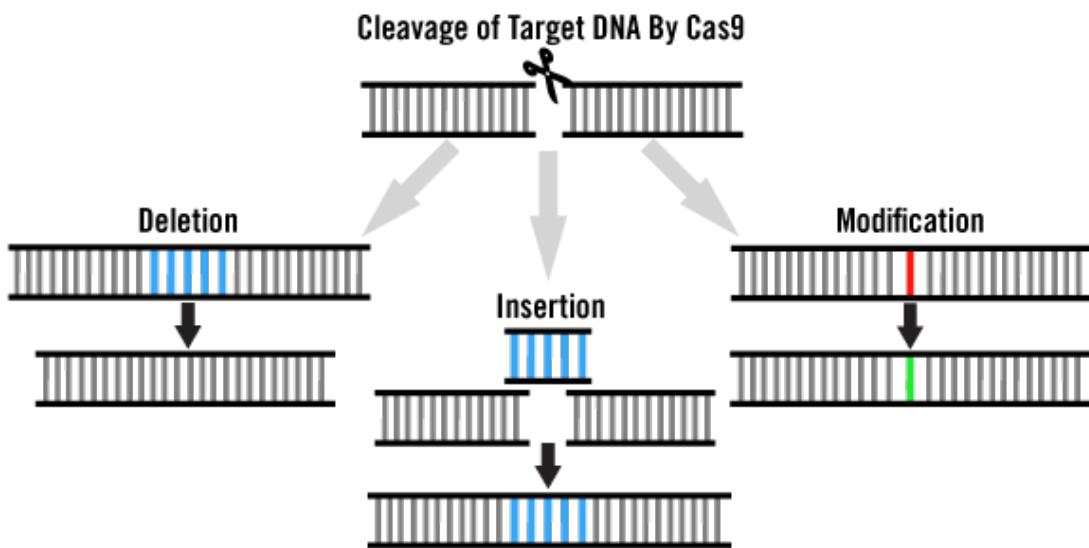


Figure 1.18 – Les 3 éditions génomiques réalisables avec la technique CRISPR/Cas9 (Schéma Mirus® Bio LLC)

Le système d'édition CRISPR/Cas9 est avant tout un outil de recherche *in vitro* permettant l'édition rapide et précise des génomes de lignées cellulaires, plantes, bactéries...⁹² Cependant, les travaux visant à utiliser cette technique pour une visée thérapeutique (traitement des maladies génétiques héréditaires ou maladies acquises tel que le cancer) commencent à arriver dans la littérature, avec des stratégies thérapeutiques très différentes (méthode de vectorisation, choix de l'édition génomique... – voir section « exemple d'avancées récentes » ci-après).

Le système CRISPR/Cas9 est considéré comme étant la plus grosse révolution en biotechnologie depuis la PCR.⁹³ Les grandes espérances thérapeutiques et les énormes retombées financières possibles avec cette technologie font qu'une intense guerre de brevets oppose actuellement le MIT (Massachusetts, USA) et l'université de Berkeley (Californie, USA) pour savoir qui récoltera les fruits de l'invention.⁹⁴

Composants du système CRISPR/Cas9

Pour réaliser une édition génétique, il convient de délivrer dans la cellule i) l'endonucléase « RNA-guidée » Cas9 et ii) l'oligonucléotide guide sgRNA (« single guide RNA », environ 100 nt de long). Eventuellement, un oligonucléotide ADN *correcteur* peut également être livré, si l'on veut insérer sa séquence dans le génome (mécanisme « HDR », voir ci-après).

Pour une utilisation thérapeutique, il convient d'abord de choisir une méthode d'administration de la protéine Cas9. On peut soit administrer la protéine elle même par injection intraveineuse, soit véhiculer l'ADNp ou l'ARNm codant pour la protéine (**Figure 1.19**). Ensuite, il convient de délivrer l'ARN guide (sgRNA) et l'ADN *correcteur* en cas d'insertion génomique, via l'utilisation de nanovecteurs vitaux ou non vitaux.

Cas9 Delivery Methods			
	pDNA	mRNA	Protein
High Efficiency	++++	++++	++++
Low Cost	++++	++++	++++
Specificity	++++	++++	++++

Figure 1.19 – Présentation des 3 stratégies possibles pour délivrer l'endonucléase d'édition génomique Cas9 (Schéma Mirus® Bio LLC)

De nombreuses stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées avec le système CRISPR/Cas9, et certaines pourraient se montrer plus avantageuses que d'autres en fonction du type d'édition que l'on souhaite, de la pathologie à traiter ou du tissu à cibler.⁹⁵ On peut par exemple choisir une stratégie entièrement basé sur la thérapie génique, avec une administration d'un ou de plusieurs nanovecteur(s) chimique(s) et/ou viral/viraux encapsulant l'ARNm ou ADNp Cas9 ainsi que le sgRNA. On peut également administrer la protéine recombinante Cas9 elle même, puis les oligonucléotides sgRNA/ADN *correcteur* avec un nanovecteur viral et/ou non viral.⁹⁶

Pour une utilisation d'édition génomique thérapeutique, la stratégie qui semble émerger repose sur l'utilisation d'ARNm codant pour la protéine Cas9. Cette stratégie à pour intérêt majeur une expression rapide et transitoire (48h) de la protéine d'édition génomique, prévenant ainsi la présence trop longue de l'endonucléase et les effets « off-target ».⁹⁷

Enfin, il est possible de réaliser l'édition génomique *in vivo* (administration intraveineuse des composants CRISPR/Cas9) ou *ex-vivo* (prélèvement des cellules du patient, édition génomique *in vitro* et ré-administration – **Figure 1.20**).

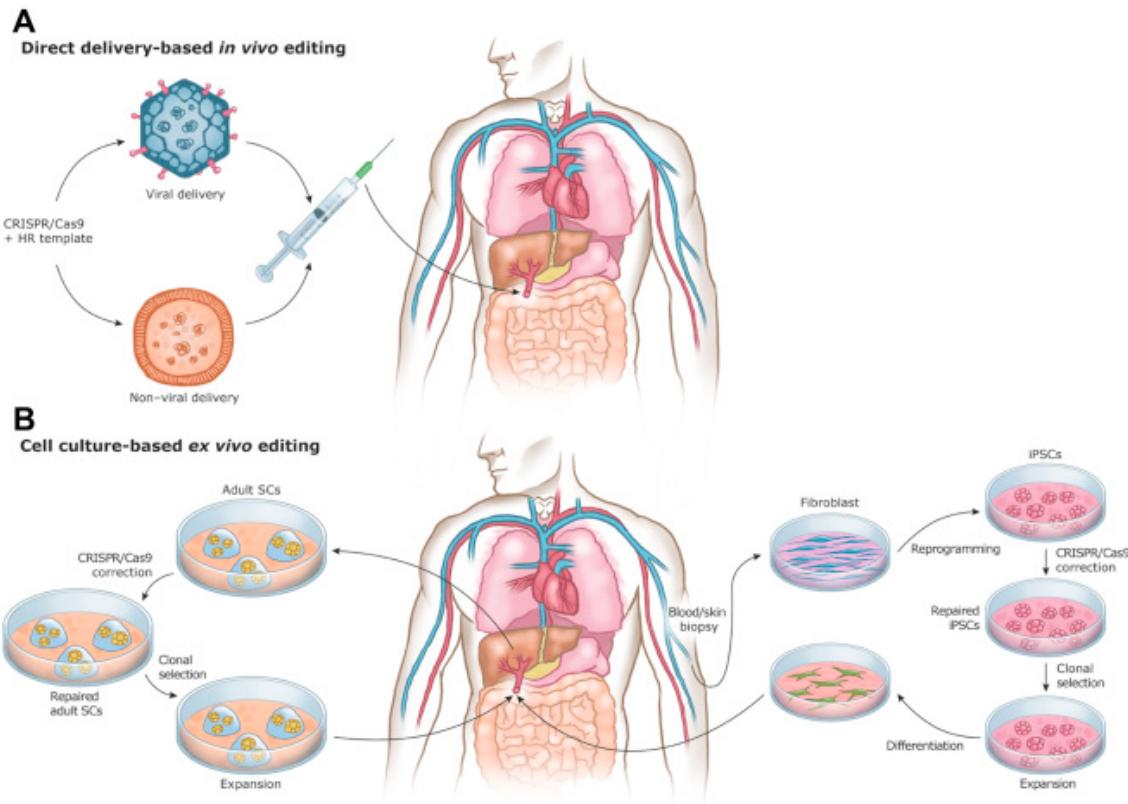


Figure 1.20 – Deux stratégies thérapeutiques d'édition génomique sont possibles : *in vivo* ou *ex-vivo*⁹⁶

Production

Aucune barrière technique ne s'oppose à la production industrielle à grande échelle des composants de CRISPR/Cas9, toutes les techniques ayant déjà été développées pour la délivrance d'ADNp, d'ARNm ou de siRNA thérapeutiques (voir sections ci-avant). La production des sgRNA et de l'ADN *correcteur* (dans le cas d'une insertion) fait appel aux mêmes techniques de production que les siRNA (synthèse chimique d'oligonucléotides sur support solide). La production de la protéine recombinante Cas9 fait appel à des techniques de production protéique classique (expression et production dans des bactéries, levures ou lignées humaines immortelle) déjà utilisé par l'industrie pharmaceutique.

A ce jour, les deux barrières majeures à l'utilisation en clinique du système CRISPR/Cas9 sont les considérations éthiques qu'apporte une édition du génome humain ainsi que le manque de recul sur la technique.⁹⁸ Le problème des éditions génomiques « off-

target » qui peuvent survenir avec la nucléase originale SpCas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9) vient d'être en grande partie résolus par la découverte des variants eSpCas9 et SpCas9-HF1, qui ne provoquent plus aucun effets « off-targets » détectables.^{99,100}

Mécanisme d'action

La protéine Cas9 (délivrée sous sa forme protéique ou exprimée *via* l'utilisation d'un nanovecteur/ADNp ou ARNm) et le sgRNA doivent être tous les deux présents dans le cytoplasme cellulaire. La protéine Cas9 se lie alors au sgRNA et devient alors active pour aller cliver de façon spécifique l'ADN génomique (à l'endroit où la séquence du génome est complémentaire avec celle du sgRNA). Deux mécanismes sont alors possibles (**Figure 1.21**) :

- En absence de brins ADN homologues, la coupure de l'ADN génomique est réparée par le mécanisme NHEJ (« nonhomologous end joining »), qui est un mécanisme de réparation génomique prône à l'erreur et qui cause des petites insertions ou déletions (« indel ») pouvant être délétères pour le gène en question. Dans le cadre de la thérapie génique, il est intéressant d'ainsi « inactiver » un gène. Le mécanisme est alors analogue à une interférence ARN, sauf que cette inactivation est cette fois ancrée de façon définitive dans le génome de l'hôte, et sera transmise aux cellules filles lors des divisions cellulaires.
- En présence d'un brin ADN *correcteur*, le mécanisme de réparation HDR (« homology-directed repair ») peut être mis en jeu, et permet l'introduction précise de la séquence ADN correctrice dans le génome. D'un point de vue thérapie génique, ceci permet par exemple de corriger précisément une mutation génétique héréditaire pathologique.

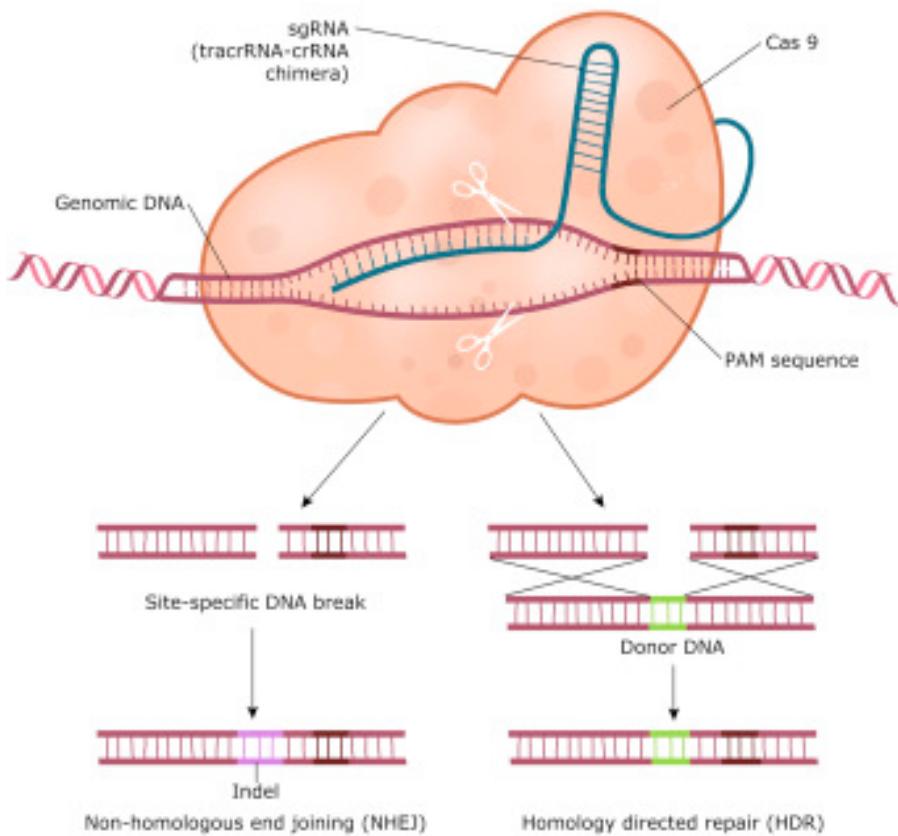


Figure 1.21 – Schéma du mécanisme d'action du système CRISPR/Cas9, illustrant les deux mécanismes de réparation de l'ADN génomique possible (NHEJ et HDR)

Modifications chimiques

Il est possible de modifier chimiquement le sgRNA en utilisant les méthodes couramment utilisées en interférence ARN (voir section 1.1.3.3). A la clé, une augmentation des performances de l'éditions génomique (augmentation de la durée de vie du sgRNA) et une baisse des effets « off-target ».¹⁰¹

La protéine endonucléase Cas9 peut également être modifiée. Cas9 étant une grosse protéine de 160 kDa,¹⁰² des variants de plus faible poids moléculaire ont été créés afin d'autoriser la construction de vecteurs viraux capables d'encapsuler la construction génétique dans son entiereté. Egalement, de nombreuses optimisations de la protéine ont été reportées, afin de réduire au maximum les éditions génomiques « off-target » (variants eSpCas9 et SpCas9-HF1, tout deux découvert en 2016).^{99,100}

Une alternative à l'emploi de la protéine Cas9 serait l'utilisation de l'endonucléase analogue Cpf1, découverte en 2015.¹⁰³ La protéine Cpf1 est plus petite que Cas9, possiblement plus efficace pour une insertion génomique *via* le mécanisme HDR (grâce à une coupure de l'ADN génomique cohésive et non pas franche comme Cas9) et ne requiert qu'un sgRNA de 40 nt de long (contre 100 nt de long pour Cas9).¹⁰⁴

Avantages/Inconvénients

Avantages	Inconvénients/Difficultées
Stratégie enfin curative et non plus palliative (contrairement à l'utilisation d'ADNp, de siRNA, d'ARNm...)	Considérations éthiques ⁹⁸
Edition contrôlée et précise du génome, possiblement sans éditions « off-target » avec la découverte des nouveaux variants de SpCas9 ^{99,100}	Détection des éditions « off-target » difficile
Permet toutes les stratégies de thérapie génique (expression génique ainsi qu'interférence)	Plus compliquée à délivrer qu'une stratégie siRNA, pDNA ou mRNA
De nombreuses approches/stratégies possibles pour la délivrance des composants du système CRISPR/Cas9	
Les outils de production (à échelle industrielle) et de nanovectorisation sont disponibles car ont déjà été développés pour la délivrance de siRNA/ARNm	

Tableau 1.7 - Avantages et inconvénients de l'emploi de CRISPR/Cas9 en thérapie génique

Exemple d'avancées récentes

En 2015, Ann Ran *et al.* ont utilisé un nanovecteur AAV (adéno-associated virus) empaquetant la séquence codante de la protéine Cas9 ainsi que le sgRNA pour réaliser l'inactivation génétique *in vivo* au foie du gène pro-cholesterol PCSK9 (chez la souris).¹⁰⁵ Une semaine après une seule injection intraveineuse, plus de 40% des hépatocytes voient leur génome édité (gène PCSK9 inactivé), le taux de protéine PCSK9 sanguin diminue de plus de 90% et le taux de cholestérol total sanguin diminue de 40% (**Figure 1.22**)

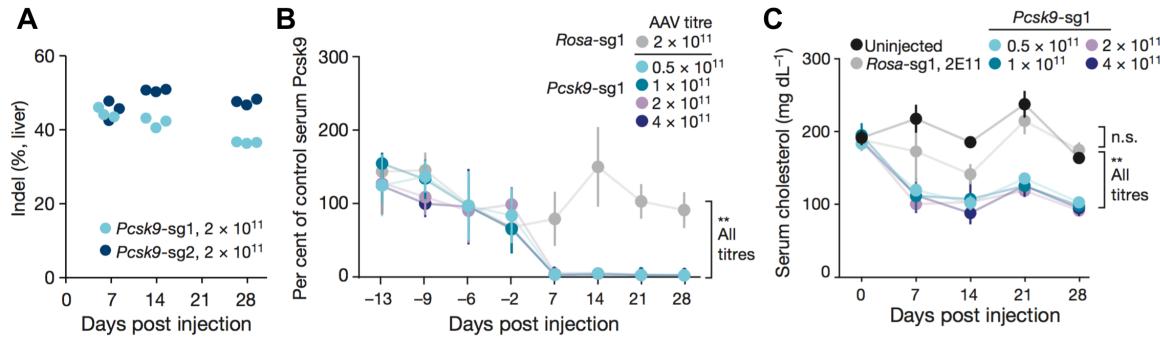


Figure 1.22 – Suppression du gène PCSK9 des hépatocytes de souris *in vivo* avec la technique CRISPR/Cas9.¹⁰⁵ (A) Pourcentage des hépatocytes édités avec succès (Indel = « insertion/deletion ») après injection intraveineuse du virus AAV. (B) Suivi des concentrations plasmatiques en protéine PCSK9. (C) Suivi des concentrations plasmatiques en cholestérol total.

En 2016, Yin *et al.* ont utilisé une stratégie CRISPR/Cas9 hybride *in vivo* : nanoparticule lipidique pour véhiculer l’ARNm codant pour Cas9 et un AAV pour véhiculer le sgRNA et un ADN *correcteur*.¹⁰⁶ Il s’agissait ici de réaliser une correction du génome hépatocytaire pour traiter la tyrosinémie (maladie héréditaire causée par une mutation de l’enzyme fumarylacétoacétate hydrolase) dans un modèle murin. Après une seule injection intraveineuse, environ 6% des hépatocytes retrouvent une activité fumarylacétoacétate hydrolase restaurée et les souris survivent malgré le retrait dans leur nourriture du traitement de la tyrosinémie héréditaire (prise orale quotidienne de nitisinone – **Figure 1.23**).

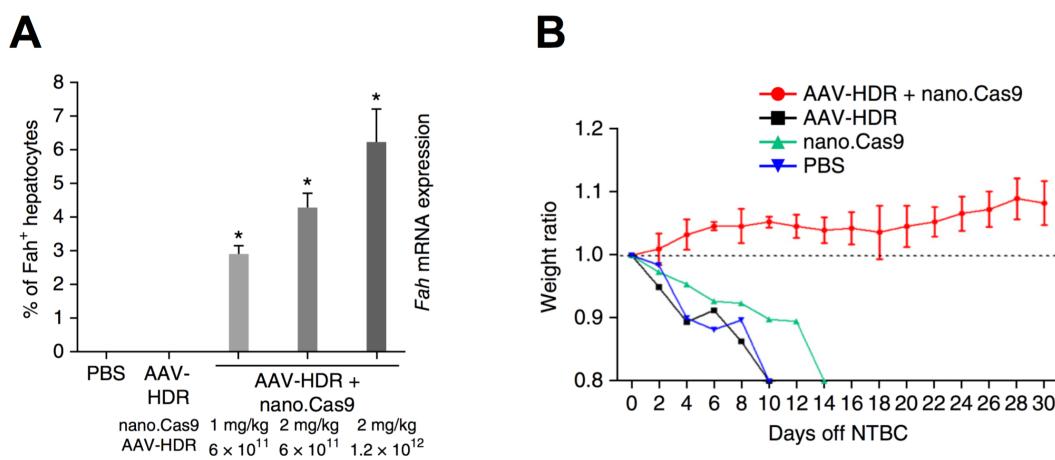


Figure 1.23 – Traitement de la tyrosinémie chez la souris par insertion génomique d’un ADN *correcteur* via une méthode CRISPR/Cas9 hybride (nanoparticule lipidique et AAV).¹⁰⁶ (A) Pourcentage des hépatocytes édités avec succès 48h après injection. (B) Suivi du poids de souris suite à l’injection, traduisant la guérison des animaux qui retrouvent une activité fumarylacétoacétate hydrolase partielle.

1.1.4 Les principales barrières physiologiques

Pour délivrer les oligonucléotides thérapeutiques (ADNp, ARNm, siRNA, sgRNA, ADN *correcteur*) dans la machinerie cellulaire, le nanovecteur doit franchir de nombreuses barrières physiologiques. De nombreuses stratégies de nanovectorisation ont été élaborées afin d'augmenter la biodisponibilité et l'efficacité de transfection (voir section 1.2). Un schéma récapitulatif présentant les barrières extracellulaires et intracellulaires est présenté en **Figure 1.24**.¹⁰⁷

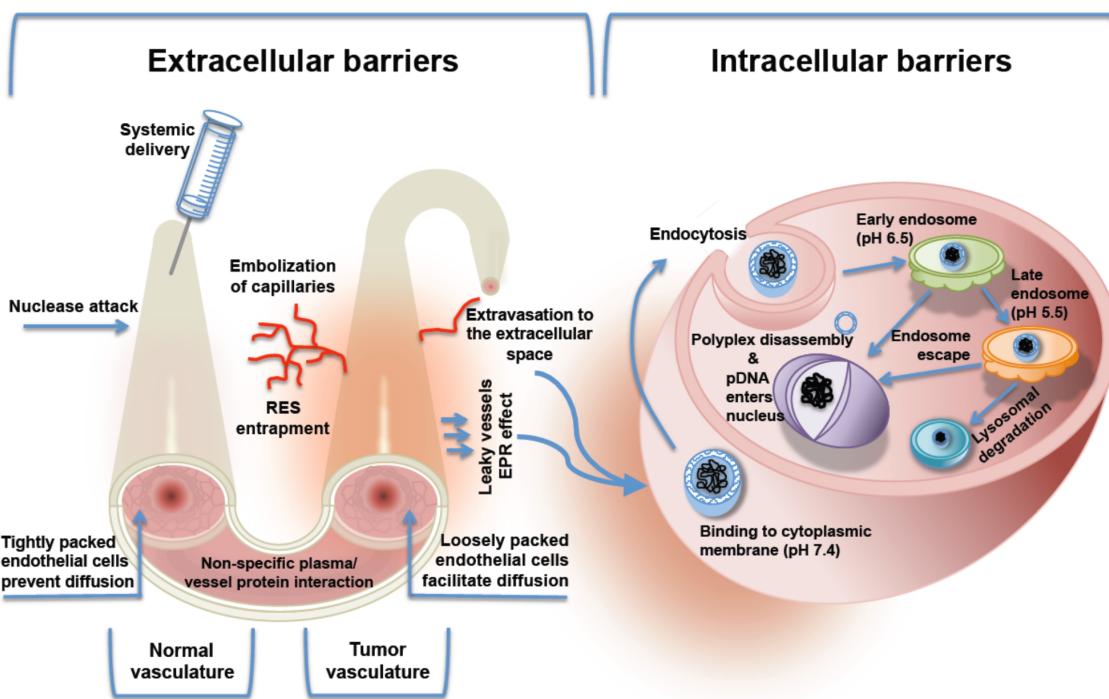


Figure 1.24 – Représentation schématique des différentes barrières s'opposant à la délivrance d'ADNp thérapeutique *in vivo*.¹⁰⁷

1.1.4.1 Les barrières extracellulaires

- Une fois injectés, les nanovecteurs doivent éviter la **filtration rénale**, la **phagocytose mononucléaire**, l'**agrégation aux protéines plasmatiques** et la **dégradation plasmatique**. La demi-vie de circulation et donc la biodisponibilité du vecteur dépendent majoritairement de ces facteurs.^{16,108} Une des stratégies élaborées pour augmenter le temps de circulation des vecteurs synthétiques est de recouvrir leur surface de polyéthylène-glycol

(PEG) afin d’empêcher l’adhésion aux protéines plasmatiques et de diminuer la reconnaissance et l’opsonisation par les cellules du système immunitaire.¹⁰⁹ Il est essentiel d’adapter sa stratégie en fonction du tissu à cibler. Par exemple, il n’est pas nécessaire de PEGyler massivement les nanovecteurs pour réaliser une délivrance de gènes au foie, puisque le tropisme des nanoparticules entre 60 et 120 nm de diamètre est suffisant pour cibler l’organe. De plus, la PEGylation s’oppose à l’efficacité de transfection intrinsèque du vecteur, par inhibition de l’échappement endosomal (voir section 1.3.1).¹¹⁰ A l’inverse, si l’on souhaite atteindre une tumeur, il est nécessaire d’avoir la durée de vie de circulation plasmatique la plus élevée possible, afin de favoriser l’accumulation passive (il faudra pour cela un vecteur plus fortement PEGylé).³⁸

La taille des nanovecteurs est également importante. Pour éviter la filtration rénale, il faut éviter l’utilisation de nanovecteurs < 10 nm, car ceux-ci sont massivement excrétés par le rein.¹¹¹ Pour cibler le poumon, on peut par exemple élaborer des vecteurs > 2000 nm, qui ont tendance à s’accumuler dans les capillaires pulmonaires (**Figure 1.25**).¹¹² La taille optimale pour la délivrance aux tumeurs solides est le plus souvent comprise entre 40 et 60 nm.^{113,114} Cette taille est optimale pour favoriser la rétention tumorale, une pénétration tumorale profonde, une internalisation cellulaire efficace et une clairance tumorale faible. Il faut cependant bien noter que ces observations sont le plus souvent tirées de modèles animaux porteurs de tumeurs modèles (xénogreffes primaires et métastatiques), dont le développement structurel tumoral n’est pas forcément analogue à celui des tumeurs humaines réelles.^{115,116}

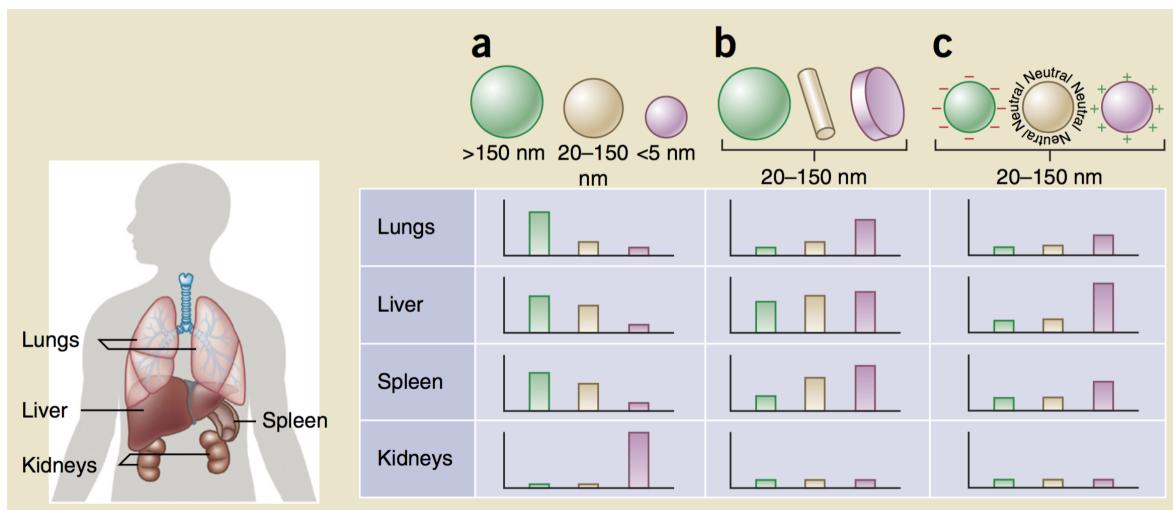


Figure 1.25 – La taille, la forme et la charge de surface des nanovecteurs dicte leur demie-vie de circulation plasmatique et leur biodistribution.¹⁰⁸

La charge apparente du nanovecteur (cationique, neutre ou anionique) ainsi que sa nature (lipidique, polymérique, hybride) influe également sur sa distribution. Les nanovecteurs cationiques (utilisés en thérapie génique pour complexer les oligonucléotides thérapeutiques anioniques) sont par exemple en proie à l’opsonisation par les macrophages des poumons, du foie et de la rate, ce qui peut être un avantage ou un désavantage selon l’organe à cibler.¹⁰⁸ Les nanoparticules présentant une charge de surface neutre ou anionique adsorbent moins en leur surface les protéines plasmatiques que leurs homologues cationiques (**Figure 1.25**). Ceci leur confère une meilleure furtivité, et donc une demi-vie de circulation plus élevée.¹¹⁷ La PEGylation est un moyen simple de masquer les charges de surface (voir ci-avant).¹⁰⁹

L’emploi d’agents de ciblage en surface de nanoparticules (transferrine, anticorps, peptides, aptamères...) permet de cibler plus spécifiquement certains organes et d’augmenter la fraction de la dose délivrée avec succès à la tumeur.¹¹⁸

- Le nanovecteur doit ensuite **traverser la matrice extracellulaire**. Ici encore, le dense maillage de polysaccharides et de protéines fibreuses ainsi que la présence de cellules du système immunitaire s’opposent au déplacement du nanovecteur vers la cellule.¹¹⁹ La pression intratumorale résultant de la

vasculature interrompue, de la croissance cellulaire aggressive, de la fibrose, de la dense matrice extracellulaire et de la circulation lymphatique perturbée s'oppose également à l'accumulation de nanovecteurs dans les tumeurs.¹⁰⁸

- Après extravasation à travers la matrice extracellulaire, les nanovecteurs doivent être **internalisés par la cellule**. Les nanovecteurs cationiques sont mieux endocytés que leurs homologues neutres ou anioniques, de part leur interaction avec les charges anioniques présentes en surface des cellules (protéoglycans extracellulaires).¹²⁰ Cette observation a donné lieu à l'élaboration de nanovecteurs sensibles au pH capables de se protoner dans un environnement tumoral légèrement acide (pH ~ 6,8) pour favoriser l'interaction avec les protéoglycans.^{121,122} L'emploi d'agents de ciblage en surface des nanovecteurs (transferrine, acide folique, peptides d'internalisation...) permet également d'augmenter l'internalisation cellulaire.^{108,118}

Il est en général constaté que l'endocytose cellulaire des nanovecteurs est médiée par les mécanismes de clathrin, caveolae et macropinocytose.^{123,124} Ces voies d'internalisation mènent en général à la dégradation endosomale (voir section suivante 1.1.4.2).^{125,126}

1.1.4.2 Les barrières intracellulaires

- Après internalisation cellulaire, le nanovecteur se retrouve dans l'endosome et subit le processus de dégradation et d'acidification endosomale.¹⁰⁸ Le vecteur doit donc être **capable de s'échapper de l'endosome**, sous peine de voir le fragile matériel thérapeutique dégradé rapidement par les protéases et l'acidification (voir section 1.3.1).¹⁶ En thérapie génique, il est généralement considéré que la séquestration endosomale est la principale barrière à la délivrance efficace d'oligonucléotides thérapeutiques.¹²⁷ La stratégie la plus employée pour favoriser l'échappement endosomal est l'élaboration de formulations de nanovecteurs « pH-sensibles », qui profitent de l'acidification pour déstabiliser ou fusionner avec l'endosome (voir section 1.3).^{128,129} Cette problématique est celle qui sera la plus majoritairement

abordée dans cette thèse, lors de l’élaboration de notre nanovecteur lipidique pH-sensible. La PEGylation des nanovecteurs, nécessaire pour augmenter la demi-vie de circulation et stabiliser les nanoparticules (voir section 1.1.4.1), s’oppose drastiquement à l’échappement endosomal et donc à l’efficacité de transfection. Ceci est dû à l’encombrement stérique diminuant les interactions entre les nanoparticules et la paroi endosomale, prévenant ainsi les interactions de fusions nécessaires à l’échappement endosomal.¹³⁰

- Dans le cytoplasme, le nanovecteur doit enfin **décomplexer et relarguer les oligonucléotides** afin que ceux ci se rendent dans la machinerie cellulaire.¹³¹ Les nanovecteurs cationiques utilisés en thérapie génique disposent d’une forte affinité avec les oligonucléotides anioniques. Un excès de charges cationiques ou l’utilisation de groupements trop cationiques (ammonium quaternaires ou amines primaires par exemple) peut mener à une innéficacité de la dissociation vecteur-oligonucléotide, et à une baisse de l’efficacité de transfection.¹³² Notons que les ADNp doivent encore se rendre dans le noyau (passage de la membrane nucléaire, possible seulement lorsque la cellule est en mitose – voir section 1.1.3.1).¹³³

1.2 La vectorisation des oligonucléotides thérapeutiques

Comme nous l'avons vu précédemment, la thérapie génique repose sur l'adressage intracellulaire d'un oligonucléotide thérapeutique exogène. Ces oligonucléotides sont par nature des macromolécules sensibles à la dégradation et hautement hydrophiles. Leur incapacité à traverser les membranes lipidiques cellulaires les rends incapables de pénétrer la cellule ou de s'échapper de l'endosome seuls.¹³⁴ La thérapie génique est donc dépendante de l'utilisation de nanovecteur capables de contenir, protéger, véhiculer et relarguer les oligonucléotides dans la machinerie cellulaire. Par souci de concision, cette présente thèse ne traitera que des nanovecteurs chimiques de thérapie génique.

Un nanovecteur idéal doit présenter les caractéristiques suivantes^{16,42,108,134} :

- Être obtenu par un procédé reproductible, peu coûteux et produit en quantité suffisante.
- Être stable pendant le stockage (forme liquide ou lyophilisée).
- Être en mesure de protéger, transporter et livrer au bon tissu une grande quantité d'oligonucléotides thérapeutiques.
- Être en mesure de délivrer les oligonucléotides de façon homogène dans le tissu ciblé.
- Être capable de livrer des quantités thérapeutiques d'oligonucléotides dans le cytosol ou le noyau cellulaire (selon la stratégie thérapeutique employée).
- Être en mesure d'entrainer une cinétique de production protéique (ou d'interférence protéique) en accord avec la stratégie thérapeutique (expression protéique longue avec un ADNp *versus* expression protéique transitoire avec un ARNm par exemple).
- Être peu immunogène afin de permettre des administrations répétées.
- Être spécifique d'un tissu, d'un organe, d'un type de cellule donné afin de limiter la délivrance non spécifique, la toxicité et les effets « off-target ».

Sur le plan médical, il existe deux approches différentes pour l'administration de gènes (**Figure 1.26**).¹²⁹ La première est la méthode de transfert de gène *ex vivo*. Les cellules

malades du patient sont prélevées, transfectées avec le gène thérapeutique, éventuellement multipliées *in vitro* puis ré-implantées chez l'individu. Cette approche est coûteuse, nécessite du personnel et du matériel spécialisé et ne s'applique qu'aux tissus malades dont les cellules sont prélevables (moelle osseuse, lymphocytes, cellules souches). La seconde approche d'administration est un transfert de gène *in vivo*. Dans ce cas le gène thérapeutique et son nanovecteur sont administrés directement chez le patient (injection intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire, locale, administration pulmonaire...). Aucune intervention chirurgicale n'est nécessaire.

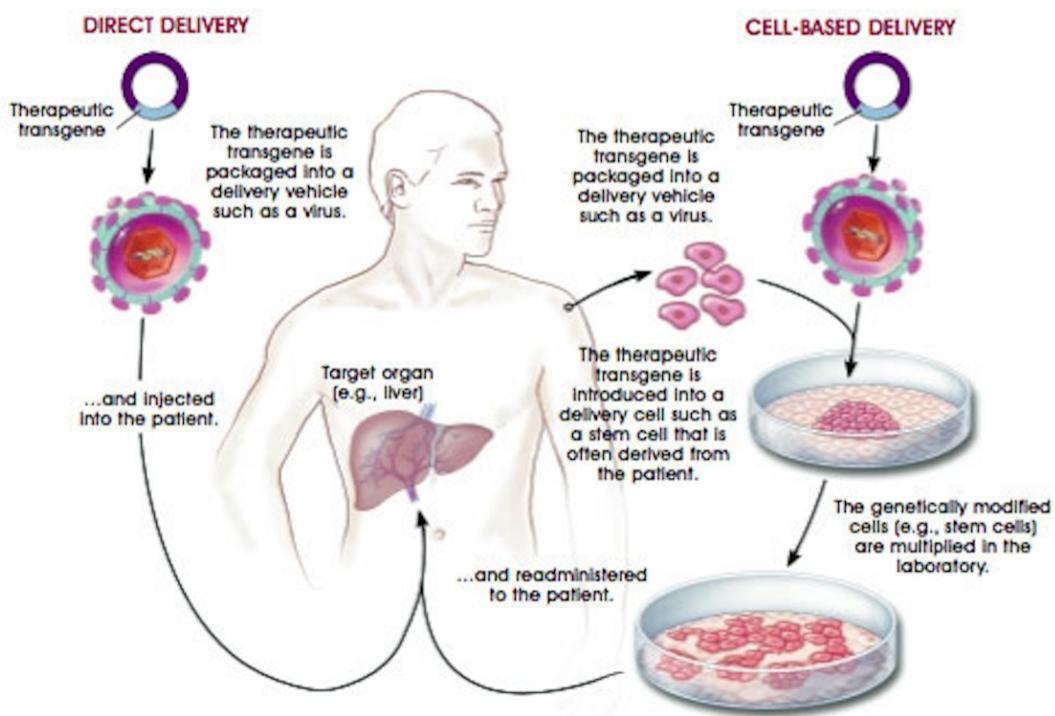


Figure 1.26 – Modes d’administration de gènes thérapeutiques : *in vivo* (direct delivery) et *ex vivo* (cell-based delivery) – © Terese Winslow

Les plus grandes difficultés rencontrées en thérapie génique actuellement sont :

- L'homogénéité de transfection du tissu cible n'est pas optimale (par exemple l'ADNp qui ne transfec^{te efficacement que les cellules en mitose⁵⁷ ou encore la faible pénétration des tumeurs non-vascularisées et non-fenestrées)⁴⁵}
- La séquestration endosomal qui survient après internalisation cellulaire est encore de nos jours une barrière qui s'oppose drastiquement à l'efficacité de transfection.^{16,124,127}

- Réussir à cibler un autre organe que le foie, la rate ou les reins. Les nanoparticules cationiques utilisées en thérapie génique ont un tropisme pour le foie et la rate (nanoparticules 60-140 nm) ou le rein (micelles polymériques < 20 nm) – voir section 1.1.4.1. Ceci est du au fait que ces organes sont responsables de la clairance sanguine.¹⁰⁸ Cibler d'autres organes tels que la prostate, le pancréas, le cerveau ou les tumeurs et leurs métastases est particulièrement difficile.¹³⁵ Il est possible d'utiliser des agents de ciblage actif spécifique d'un tissu donné en surface du nanovecteur pour essayer d'augmenter l'accumulation dans l'organe cible.^{118,135,136}
- Réussir à obtenir une durée de circulation plasmatique suffisamment longue pour permettre une accumulation passive dans les tumeurs et métastases. Les nanovecteurs de thérapie génique (notamment lipidiques) sont trop cationiques et insuffisamment PEGylés pour circuler efficacement plus d'une heure dans la circulation sanguine (ils sont phagocytés par les monocytes ou accumulés dans le foie).^{110,137} Des durées de circulation plus longues et une bonne accumulation tumorale commencent à être obtenues avec l'utilisation de nanosystèmes polymériques ou hybrides lipide-polymère.^{38,122}

1.2.1 Les vecteurs lipidiques

Si l'on excepte les vecteurs viraux, les vecteurs lipidiques sont les nanovecteurs de thérapie génique les plus utilisés en essais cliniques à l'heure actuelle.^{19,37} Ces derniers sont l'objet de cette thèse, et seront plus détaillés ci-après (section 1.3.2). Les nanovecteurs lipidiques de thérapie génique utilisés de nos jours sont relativement peu toxiques et peu immunogènes.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Pour la délivrance de siRNA au foie chez la souris, les doses toxiques les plus faibles sont entre 20 et 100 fois supérieures à la dose thérapeutique efficace.^{7,141} La même chose est en général observée pour l'édition génomique CRISPR/Cas9 au foie (coupes histologiques, cytokines et enzymes hépatiques inchangées).¹⁰⁶

Les nanovecteurs lipidiques sont constitués d'un assemblage supramoléculaire de lipides cationiques et co-lipides (non-toxiques car déjà présent de façon endogène, par exemple DOPE, DSPC, cholesterol) capables d'être facilement déstabilisé ou désolidarisé. Les lipides utilisés sont métabolisables et sont en général peu ou pas bioaccumulables.^{142,143}

Très peu de nanovecteurs lipidiques cationiques de thérapie génique sont à ce jour capables de circuler longtemps dans la circulation sanguine (demie-vie > 2 heures), afin de bénéficier d'une importante accumulation tumorale passive. Seuls certains systèmes hautement post-PEGylés (incubation des nanoparticules avec de fortes concentrations de lipide-PEG) sont reportés comme étant circulants, mais leur efficacité de transfection *in vivo* est plutôt faible à cause des fortes concentrations de PEG utilisées.^{144,145} Certains systèmes polymériques (voir section 1.2.2) et hybrides lipides-polymère (voir section 1.2.3) sont quand à eux capables d'avoir une demie-vie plasmatique supérieure à 2 heures.

Les nanoparticules lipidiques regroupent sous un seul et même terme les « liposomes » (formulés par sonication ou extrusion, et présentant un cœur aqueux hydrophile) et les plus récentes nanoparticules lipidiques solides (*lipid nanoparticles* – LNP). Ces dernières sont formulées par mixage microfluidique et n'ont pas de cœur aqueux (**Figure 1.27**). De nos jours en thérapie génique *in vivo*, les liposomes ont laissé leur place aux nanoparticules lipidiques solides fabriquées par microfluidique. Cette nouvelle approche permet la fabrication reproductible de nanoparticules lipidiques plus petite (< 100 nm, quand les liposomes cationiques ont souvent une taille supérieure à 200 nm), dotées de bonnes capacités de complexation des oligonucléotides thérapeutiques et dotées d'efficacités de transfection supérieures *in vivo*.^{146–148}

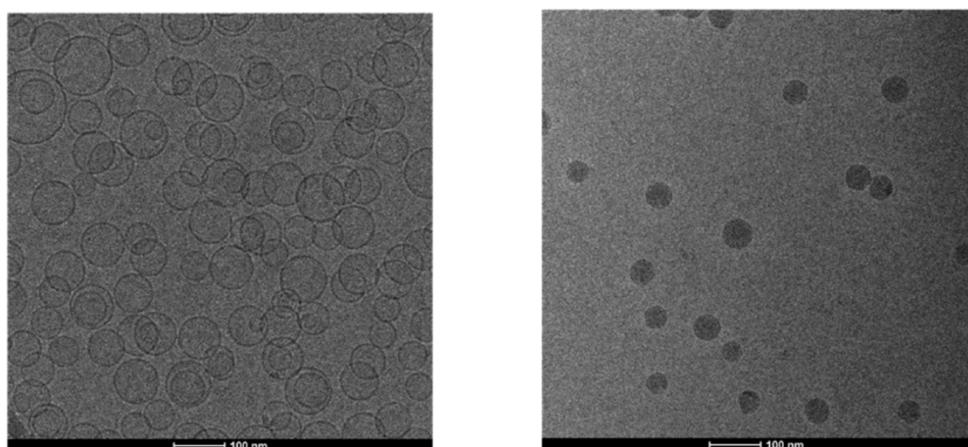


Figure 1.27 – Observation en Cryo-TEM de liposomes classiques (POPC/Cholestérol) fabriqués par extrusion (gauche) et de LNP cationiques DLinKC2-DMA/DSPC/Cholestérol/PEG-DMG fabriquées par microfluidique (droite). On distingue la bicouche externe lipidique et le cœur aqueux des liposomes, tandis que les LNP apparaissent solides et pleines.¹⁴⁹

1.2.2 Les vecteurs polymériques

Les nanovecteurs polymériques amphiphiles sont également très utilisés en thérapie génique. L'avantage des vecteurs polymériques est la relative facilité d'obtention de nanoparticules de taille inférieure à 100 nm et la possibilité d'intégrer de multiples fonctionnalités dans une seule molécule.¹⁵⁰ Au début des années 2000, il fut considéré l'utilisation de poly-L-lysine (PLL) et de polyéthylèniminé (PEI) pour délivrer des oligonucléotides thérapeutiques *in vivo*.¹⁵¹ Ces polymères encapsulent efficacement les oligonucléotides et disposent de capacités d'échappement endosomal notables. Ces polymères hautement cationiques sont également connus pour être toxiques, incapables de circuler longtemps dans le sang pour s'accumuler de façon préférentielle aux tumeurs (même lorsque copolymérisés avec du PEG) et dotés de capacités de transfections parfaitibles *in vivo*.¹⁵²

De nos jours, les nanovecteurs polymériques utilisent des copolymères plus avancés pour réaliser la délivrance et la transfection efficace des gènes thérapeutiques. Ils sont en général composés de :

- Un block polymérique cationique (PEI, PAMAM) permettant la complexation avec les oligonucléotides anioniques.
- Un block polymérique hydrophile (PEG) permettant la stabilisation colloïdale du nanovecteur ainsi que l'augmentation de la demi-vie de circulation sanguine.
- Une composante hydrophobe (PLGA, PDPA, chaînes alkyl) pour obtenir l'amphiphilicité globale nécessaire pour l'obtention d'une nanoparticule polymérique à cœur hydrophobe.

A titre d'illustration, le plus récent polymère PEG-*b*-P(DPA-*co*-GMA-TEPA-C14) développé par le laboratoire du Pr. Farokhzad pour la délivrance de siRNA pour le traitement du cancer (longue circulation plasmatique et taille < 100 nm requise) dispose de la structure suivante (**Figure 1.28**) : un block PEG hydrophile (bleu) couplé à un block hydrophobe cationique composé de poly(2-(diisopropylamino) ethylmethacrylate (PDPA - vert) et tetraéthylènepentamine (TEPA) – C14 (rouge).¹⁵³ Ce polymère à la particularité de voir sa composante cationique (TEPA-C14) intégrée au sein de la partie centrale hydrophobe ainsi

que d'avoir un comportement pH-sensible (la protonation de l'unité PDPA à pH endosomal provoque la dissociation des nanoparticules).

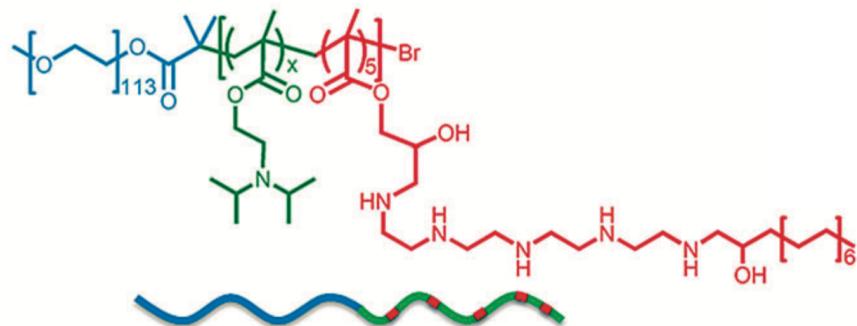


Figure 1.28 – Structure du polymère PEG-*b*-P(DPA-*co*-GMA-TEPA-C14) pour la délivrance de siRNA *in vivo*¹⁵³

De multiples caractéristiques chimiques peuvent être incorporées aux polymères. On peut citer l'emploi de liaisons ester clivables ou de ponts disulfures réductibles, permettant d'augmenter la biodégradabilité des polymères et de conférer un comportement pH-sensible.^{154,155} Il est également possible de faire varier l'architecture polymérique (**Figure 1.29**), ceci pouvant fortement influer sur la toxicité, la demi-vie de circulation et l'efficacité de transfection.^{156–158}

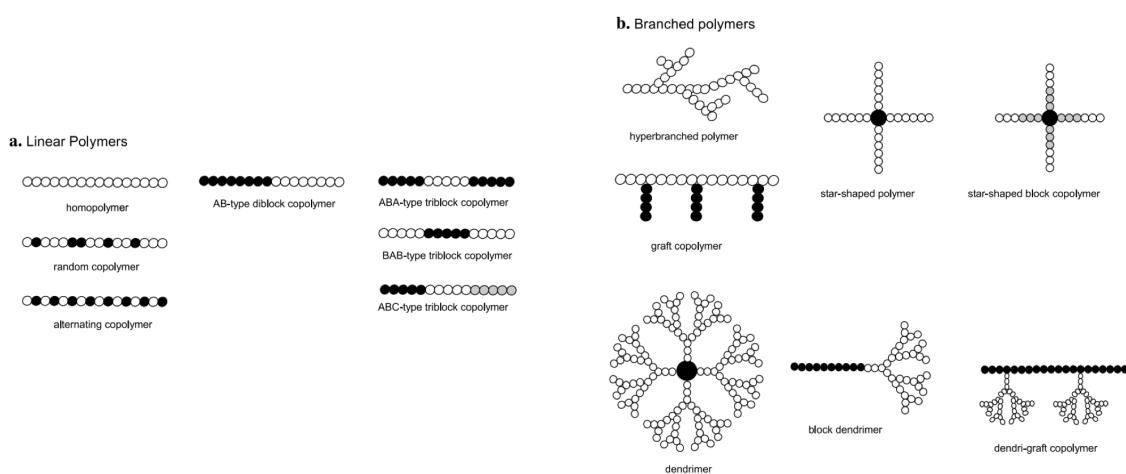


Figure 1.29 – Représentation schématique des différentes architectures polymériques pouvant être utilisées en thérapie génique.¹⁵⁹

1.2.3 Les nanosystèmes hybrides lipide-polymère

Ces dix dernières années, les nanovecteurs hybrides lipide-polymère ont fait leur apparition en thérapie génique. Ces nanosystèmes sont les plus prometteurs si l'on considère la balance efficacité de transfection/temps de circulation sanguine.¹⁶⁰ Ils exploitent d'une part les excellentes capacités de transfection et la faible toxicité des nanoparticules lipidiques et d'autre part la stabilité colloïdale, l'efficace complexation et la bonne durée de circulation sanguine des architectures polymériques.^{161,162}

La principale stratégie est d'utiliser une technique de formulation de nanovecteurs par couches successives. Le cœur hydrophobe de la nanoparticule est formé en premier (lipidoïde cationique + oligonucléotides thérapeutiques). Ce cœur est ensuite mixé avec un polymère hydrophobe (par exemple PLGA) pour conférer une forte solidité à la nanoparticule, empêcher la déstabilisation des lipides et enfermer les oligonucléotides dans le cœur hydrophobe du vecteur. Enfin, une couche externe composée de phospholipides et de lipides-PEG est ajoutée en surface, garantissant une charge externe apparente quasi-nulle (masquage des charges cationiques internes) et une longue durée de vie de circulation. Le défi majeur à relever lors de la préparation de ces nanoparticules est de réussir à obtenir une taille finale de particule inférieure à 100 nm.³⁸ A titre d'illustration, le nanovecteur de ce type développé par Shi *et al.* en 2011 est présenté en **Figure 1.30**.

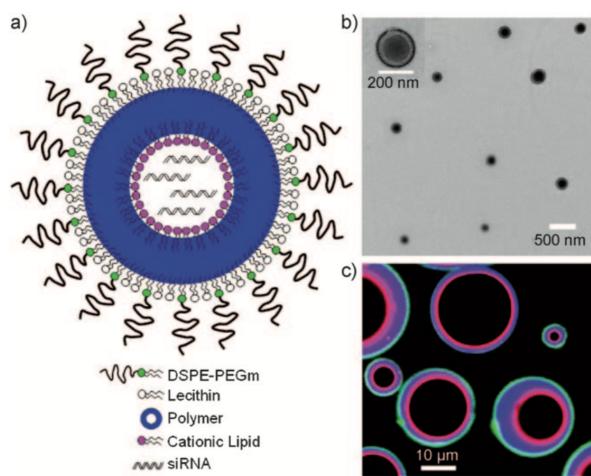


Figure 1.30 – Représentation d'un nanovecteur hybride lipide-polymère à longue durée de circulation sanguine pour la délivrance de siRNA.¹⁶³ En c) sont présentées des microvésicules modèles présentant les différentes couches formant le nanovecteur, observées par microscopie de fluorescence (rouge = lipide cationique ; bleu = polymère PLGA ; vert = lipide-PEG).

Cette première génération de système hybride lipide-polymère mesurait 200 nm.¹⁶³ La seconde génération reprend le même principe mais l'utilisation d'un nouveau lipide cationique permettant une meilleure complexation dans le cœur de la nanoparticule permet l'obtention d'une taille finale inférieure à 100 nm.³⁸ Cette seconde génération dispose d'une demi-vie de circulation d'environ 8h, ce qui est très élevé lorsque l'on sait que les nanovecteurs (lipidiques et polymériques) cationiques PEGylés disposent d'une demi-vie de circulation en dessous de 2h.^{38,110,117}

Un autre exemple récent de système hybride lipide-polymère est l'utilisation de dendrimères biodégradables cationiques et leur formulation avec des co-lipides commerciaux (DSPC, cholesterol et DMG-PEG₂₀₀₀) par mixage microfluidique.¹⁶⁴ Dans la librairie de dendrimères utilisée dans cette étude, certains sont très toxiques *in vivo* (formulation 6A3-SC12) tandis que d'autres (formulation 5A2-SC8) se sont montrés moins toxiques (aucune toxicité détectée *in vivo* à 75 mg/kg) que les meilleurs lipidoïdes cationiques actuels utilisés pour la délivrance de siRNA au foie (C12-200, cKK-E12 – voir **Figure 1.16**). Dans cette étude, seule la meilleure formulation 5A2-SC8 (efficace et non-toxique) fut capable d'augmenter la survie des souris dans un modèle de carcinome hépatocellulaire (cancer aggressif où le foie est très fragilisé et où l'utilisation de nanovecteurs cationiques « classiques » aggrave significativement la maladie – **Figure 1.31**)¹⁶⁴.

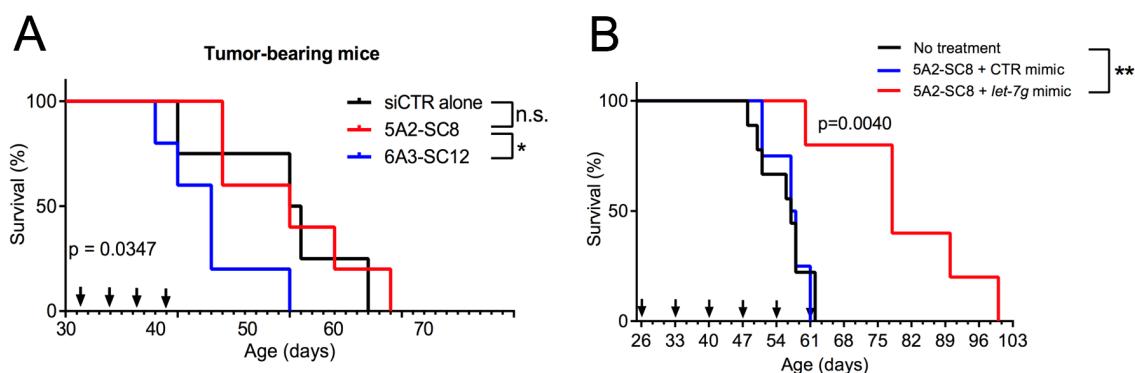


Figure 1.31 – (A) Comparaison des courbes de survies des souris traitées avec 2 formulations lipide-dendrimère différentes (siRNA contrôle négatif 3 mg/kg ; dendrimère 75 mg/kg). Seule la formulation 5A2-SC8 n'impacte pas la survie des souris grâce à sa non-toxicité. (B) Le traitement des souris porteuses de tumeurs avec un miRNA (mimic *let-7g*) encapsulé dans la formulation non-toxique 5A2-SC8 permet d'augmenter significativement la survie des souris.

1.2.4 Les exosomes

Les exosomes sont des vésicules lipidiques de diamètre 20-100 nm qui sont produites et excrétées par les cellules et présents dans tous les milieux biologiques (sang, urine, milieux de cultures cellulaires...).¹⁶⁵ Ces exosomes contiennent des protéines (récepteurs transmembranaires et cytoplasmiques), des ARN (ARNm, miARN) et des débris cellulaires. Bien qu'encore assez peu étudiés, ils semblent jouer un rôle dans la transmission de signaux biologiques et dans le transfert d'oligonucléotides entre les cellules, afin de réguler des processus biologiques.¹⁶⁶ Il a été montré que les exosomes utilisent un mécanisme similaire à celui des virus pour pénétrer dans la cellule. Grâce à leurs excellentes capacités d'adressage, de pénétration cellulaire et de stabilité plasmatique, les exosomes sont par définition d'excellents « nanovecteurs de transfection naturels », et ont été exploités pour la délivrance d'oligonucléotides thérapeutiques.¹⁶⁷ Les exosomes sont tout d'abord isolés (par ultracentrifugation) à partir de sérum animal ou de milieux de cultures. Ils sont ensuite purifiés, éventuellement modifiés (ajouts d'agents de ciblages) et chargés avec des oligonucléotides thérapeutiques (ADNp, siRNA, miRNA).¹⁶⁸ Les exosomes ont pour avantages majeurs d'avoir une clairance (hépatique, splénique et rénale) et une toxicité plus faible que les nanovecteurs chimiques lipidiques ou polymériques.¹⁶⁹

A titre d'illustration, l'équipe du Pr Wood a isolé des exosomes produits par des cellules de moelle osseuse de souris pour délivrer des siRNA au cerveau (**Figure 1.32a**).¹⁷⁰ Après prélèvement, les cellules sont transfectées *in vitro* afin de permettre l'expression de la protéine exosomale Lamp2b fusionnée avec le peptide d'adressage neuronal RVG.¹⁷¹ Après injection intraveineuse, ces exosomes sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique pour éteindre efficacement le gène BACE1 (traitement maladie d'Alzheimer) au niveau central *in vivo*. La spécificité de la transfection au cerveau démontrée par l'absence de *silencing* du gène GAPDH dans les tissus autres que le cerveau est remarquable (**Figure 1.32b**).

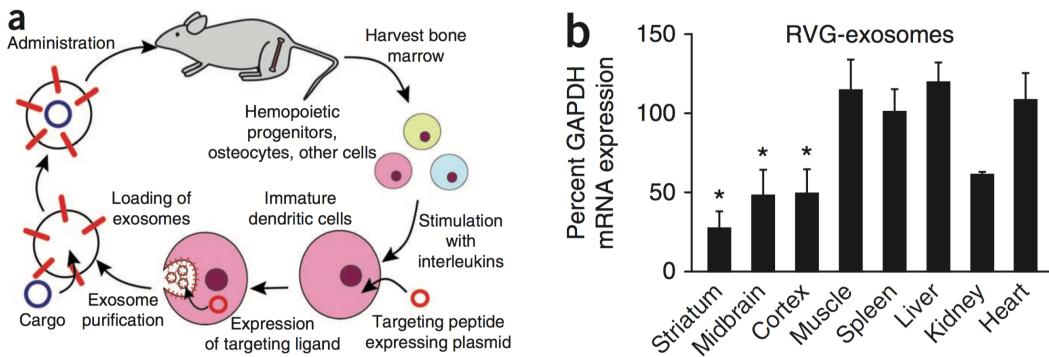


Figure 1.32 – (a) Schéma présentant la stratégie thérapeutique utilisée pour la délivrance de siRNA au niveau central par des exosomes ciblés (ciblage actif RVG). **(b)** Mesure par *q*PCR de l'expression du gène ubiquitaire GAPDH 48h après injection intraveineuse. On note la spécificité de la délivrance de siRNA anti-GAPDH (forte transfection au cerveau et absence de transfection dans les autres tissus, excepté les reins).¹⁷⁰

1.2.5 Les systèmes conjugués

De nombreux systèmes conjugués de délivrance de siRNA sont reportés dans la littérature.⁷⁴ Ces systèmes sont formés d'un oligonucléotide thérapeutique (très souvent un siRNA, pour raisons de facilité de synthèse, de purification et de coût) greffé de façon covalente à une autre entité tel qu'un cholestérol, une molécule lipidique¹⁷², un polymère¹⁷³, un peptide¹⁷⁴, un anticorps¹⁷⁵, un aptamère¹⁷⁶ ou une petite molécule de ciblage.²⁶ Puisque ces systèmes n'offrent pas directement de protection physique de l'oligonucléotide contre les RNAses endogènes, ils ont majoritairement pu émerger grâce à l'utilisation des modifications chimiques des bases (amélioration de la résistance à la dégradation *in vivo* – voir section 1.1.3.3).

Les premiers systèmes conjugués « simples » de type siRNA-cholestérol ou siRNA-lipide, bien qu'étudiés depuis le début des années 2000, n'ont pas vraiment rencontré leur succès. Leur efficacité de transfection *in vivo* est bien souvent surplante par les nanovecteurs lipidiques ou polymériques.⁴² D'autres systèmes conjugués plus perfectionnés sont par contre très efficaces *in vivo*, et font déjà l'objet d'essais cliniques très prometteurs. Le système conjugué GalNAc-siRNA de la compagnie Alnylam[®] Pharmaceuticals (déjà présenté en section 1.1.3.3) en est la parfaite illustration.²⁶

La compagnie Arrowhead Pharmaceuticals a dans son pipeline 3 candidats pour la délivrance de siRNA, basés sur le système « Dynamic PolyConjugates », qui est un conjugué siRNA-polymère (**Figure 1.33**).¹⁷³ Le siRNA est conjugué par un groupement disulfure

(permet la libération du siRNA une fois dans le cytosol) à un polymère cationique doté de capacités déstabilisatrices de membranes (favorise l'échappement endosomal – voir section 1.3.1). Ce polymère cationique est lui même greffé à du PEG et à un agent de ciblage actif (GalNAc pour la délivrance hépatique et anticorps anti- α V β 3 pour le cancer colorectal¹⁷⁷) par des groupements pH-sensibles (clivés à pH endosomal pour permettre l'échappement endosomal du duo siRNA-polymère cationique).

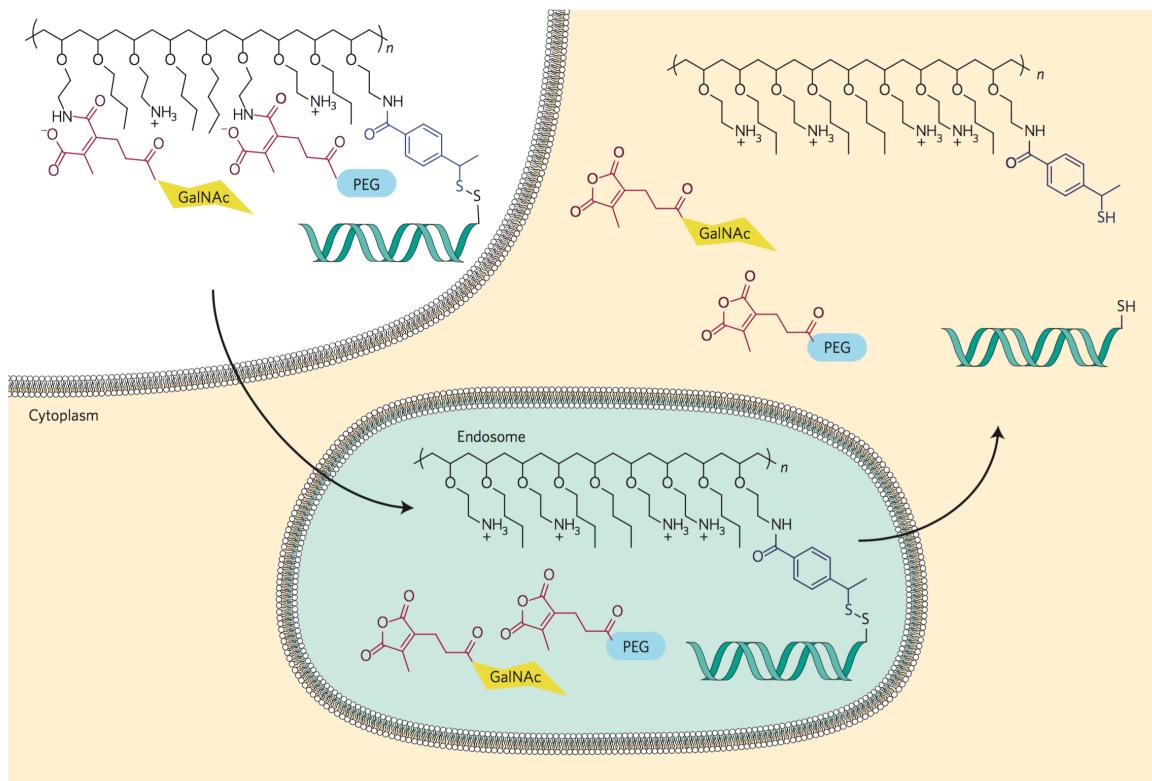


Figure 1.33 – Schéma du mécanisme d'action des conjugués « Dynamic PolyConjugates ».^{42,173} Le complexe « siRNA-polymère cationique-PEG-ligand de ciblage » est tout d'abord endocyté. Dans l'endosome, les liens clivables pH-sensibles (en rouge) libèrent les composants PEG et ligands de ciblage. Ceci permet au duo polymère cationique-siRNA de s'échapper de l'endosome. Une fois dans le cytosol, le lien chimique disulfure sensible au milieu réducteur (en bleu) libère pour de bon le siRNA thérapeutique.

1.3 Les nanovecteurs lipidiques pH-sensibles en thérapie génique

1.3.1 L'échappement endosomal

Une des problématiques principales à surmonter pour la délivrance d'acides nucléiques thérapeutiques est la rapide dégradation endosomale qui survient après internalisation cellulaire du nanovecteur (voir section 1.1.4.2). Alors que de nombreux virus ont développé des systèmes d'échappement endosomaux très efficaces, la situation est différente pour les vecteurs chimiques qui manquent par défaut de stratégies d'échappement.¹⁷⁸ Par exemple, les adénovirus disposent de nombreuses protéines pH-sensibles permettant la fusion avec l'endosome ou la destruction de sa membrane.¹⁷⁹ Ceci montre bien que d'importants effets bénéfiques sur l'efficacité de transfection peuvent être attendus si cette barrière physiologique est surmontée, et qu'il est important d'anticiper cette problématique lors de l'élaboration d'un vecteur de thérapie génique.

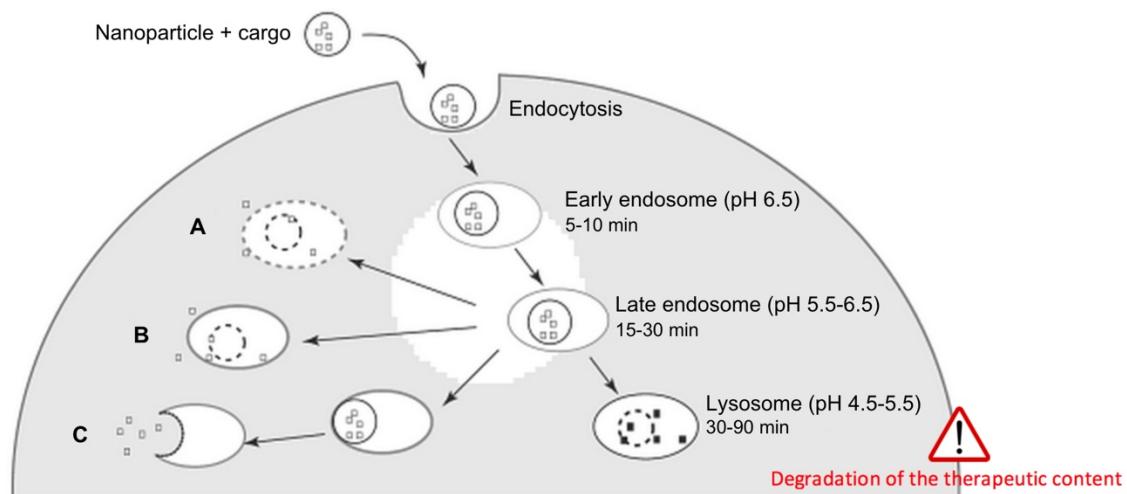


Figure 1.34 – Représentation schématique du chemin endosomal parcouru par le nanovecteur de thérapie génique après endocytose cellulaire (adapté de Andrianov et al.)¹⁸⁰

Après internalisation cellulaire, les nanoparticules (et l'oligonucléotide thérapeutique) se retrouvent dans les endosomes précoce, qui sont des vacuoles intracellulaires ayant un pH interne ≈ 6,5-6,8 (**Figure 1.34**). Par maturation, ces endosomes s'acidifient et deviennent des endosomes tardifs ayant un pH interne ≈ 5,5-6,5. Ensuite,

l'endosome fusionne avec les lysosomes, sortes d'organelles intracellulaires tardives ayant un pH interne $\approx 4,5\text{--}5,5$, et qui contient de nombreuses enzymes digestives (protéases, DNases, RNases...).¹⁷⁸ C'est à ce niveau qu'intervient la dégradation très rapide (moins de deux heures) des brins d'acides nucléiques thérapeutiques.¹⁸⁰ Ceci indique que toute stratégie d'échappement de la voie endosomale doit pouvoir être déclenchée et agir assez rapidement pour empêcher au maximum la destruction du matériel thérapeutique.

Il est reporté dans la littérature trois principaux mécanismes d'échappement endosomaux :

- **Mécanisme fusion-indépendant (Figure 1.34A)** : la déstabilisation du nanovecteur induit le transfert de peptides dans la paroi endosomale, entraînant sa déstabilisation par agglomération peptidique ou rupture de phase lipidique (« carpet mechanism ») ou *via* la formation de pores peptidiques (« barrel stave mechanism »). Ces mécanismes sont par exemple utilisés par les virus non-enveloppés.¹⁸¹
- **Mécanisme de diffusion passive du contenu thérapeutique (Figure 1.34B)** : la déstabilisation du nanovecteur permet le déversement de son contenu thérapeutique (principe actif) dans l'endosome. Seule une diffusion passive à travers la paroi endosomale permet ensuite d'atteindre le cytosol. Ce mécanisme d'échappement endosomal n'est pas adapté à la thérapie génique et aux drogues polaires hydrophiles, puisqu'ils sont incapables de traverser la paroi endosomale lipidique seuls.¹⁸²
- **Mécanisme fusion-dépendant (Figure 1.34C)** : la déstabilisation du nanovecteur provoque la fusion avec la paroi lipidique de l'endosome et provoque le relargage du contenu thérapeutique dans le cytosol. Ce mécanisme est par exemple utilisé par les virus enveloppés, dotés de protéines de fusion (hémagglutinine, GP2, TM).¹⁸¹ Les lipides capables de changement de phases à pH acide (DOPE, voir section 1.3.2) utilisent aussi ce mécanisme d'échappement endosomal par fusion.¹⁸²

La variation de pH (passage de pH sanguin = 7,4 à un pH ≈ 5) qui survient pendant le chemin endosomal est donc l'élément qui déclenche la stratégie d'échappement. De

nombreuses stratégies d’élaboration de nanovecteurs chimiques (lipidiques, polymériques, hybrides) de thérapie génique pH-sensibles, capables d’être déstabilisés et/ou de fusionner avec la paroi endosomale de manière spécifique à pH endosomal (\approx 5-6), ont été reportées ces deux dernières décennies.^{153,183,184} Une rapide vue d’ensemble de ces stratégies est présentée ci-après. Seules les stratégies d’échappement endosomal pH-sensible de vecteurs lipidiques ou hybrides lipide-polymères seront présentées.

1.3.2 Les différents mécanismes de pH-sensibilité des nanovecteurs lipidiques en thérapie génique

Il est bien établi que l’échappement endosomal est l’une des sinon la majeure barrière à franchir pour une délivrance de gènes efficace.¹⁶ Il a par exemple été montré que seulement ~ 1-2% des siRNA délivrés par nanoparticule lipidique ou polymérique sont capables d’être délivrés de l’endosome au cytosol cellulaire.^{185,186} Dans un contexte de thérapie génique, il est relativement aisé d’apprécier la résultante d’un échappement endosomal « réussi » (microscopie de fluorescence ou mesure de l’efficacité de transfection finale) mais il est plus compliqué d’étudier, d’observer et de comprendre l’intimité du mécanisme mis en jeu.^{124,187} Des études de microscopie confocale mettant en jeu des marqueurs FRET peuvent donner des informations quant au désassemblage intracellulaire de la nanoparticule, mais ne peuvent pas être appliquées à haut débit.^{187,188} Jusqu’à maintenant les approches empiriques, essai-erreur et combinatoires⁸⁷ (relation structure / efficacité de transfection *in vitro* ou *in vivo*) ont dominé ce champ d’étude.¹⁸⁶ Peu de travaux récents traitent de la mécanistique de l’échappement endosomal, et les préceptes découverts avant les années 2000 (par exemple le « proton sponge effect » du polymère PEI)¹⁸⁹ sont fortement discutés ou révèlent de nombreuses inconsistances expérimentales.^{190,191}

Dans cette section seront présentés les différents mécanismes de pH-sensibilité visant à promouvoir l’échappement endosomal des nanovecteurs lipidiques en thérapie génique.

1.3.2.1 Les lipides ionisables

L’une des premières approches utilisées pour l’élaboration de liposomes pH-sensibles fut l’utilisation de lipides (ou d’association de lipides) capables de changement de phases lipidiques à pH acide. Le passage d’une phase lamellaire liposomale à une phase hexagonale H_{II} est capable de favoriser la fusion avec la paroi endosomale.¹⁹² Ce mécanisme n’est pas seulement réservé au phospholipide neutre DOPE mais également à l’utilisation

d'associations de lipides cationique/anionique (DODAC/CHEMS, DOTMA/DOPS) ou l'utilisation du cholestérol comme co-lipide.¹⁹³ L'utilisation de ces lipides en thérapie génique *in vivo* n'est plus d'actualité, excepté la ré-utilisation récente de la DOPE pour la délivrance d'ARNm au foie (augmentation drastique de l'efficacité de transfection)^{73,194} et l'utilisation du cholestérol dans pratiquement toutes les formulations lipidiques pour la délivrance de siRNA, ARNm ou encore sgRNA.¹⁹⁵ De nouveaux lipides ionisables plus efficaces ont été découverts ces dernières années, grâce à des approches combinatoires (**Figure 1.35**).^{7,87,127} Ces lipides ionisables disposent tous d'amines tertiaires conférant à la nanoparticule lipidique un pK_a apparent ~6,4. Il a été montré que cette caractéristique moléculaire est un pré-requis obligatoire pour favoriser l'échappement endosomal et permettre la transfection efficace de siRNA *in vivo*.¹²⁷

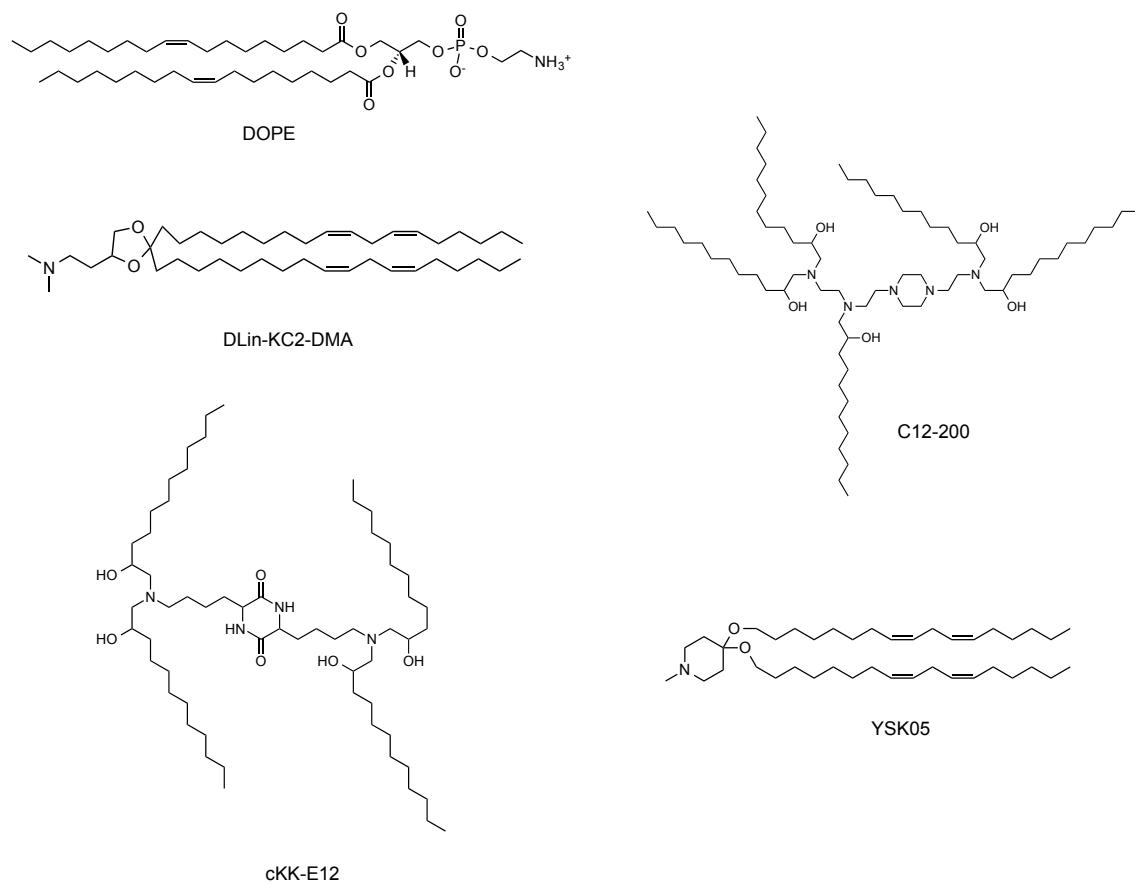


Figure 1.35 – Structure de la DOPE et des lipides ionisables récemment découverts, ayant une valeur de pK_a apparent ~6,4.^{7,127,141,196}

1.3.2.2 Les lipides clivables

Une seconde approche pour l'élaboration de nanovecteurs pH-sensibles est l'utilisation de lipides clivables *via* hydrolyse acide. A pH endosomal, ces lipides sont

hydrolysés et les parties hydrophiles et hydrophobes de la molécule sont séparées, provoquant ainsi la déstabilisation des liposomes ainsi que la fusion avec la paroi endosomale.¹⁹⁷ Dans certains cas, c'est la tête hydrophile du lipide qui est clivée (**Figure 1.36**)¹⁹⁸ tandis que dans d'autres cas, la partie hydrophile clivable est composée d'une chaîne de PEG linéaire (**Figure 1.37**).¹⁹⁹ Bien que permettant d'augmenter considérablement le temps de circulation du vecteur, la couronne de PEG en surface du nanovecteur est néfaste à l'échappement endosomal, à cause de la gène stérique qu'elle provoque.²⁰⁰ Le fait de lier le lipide au PEG par une liaison clivable en milieu acide permet donc de profiter de la présence du PEG dans la circulation sanguine et de s'en séparer dans l'endosome, afin de permettre la fusion du nanovecteur lipidique avec la paroi endosomale.

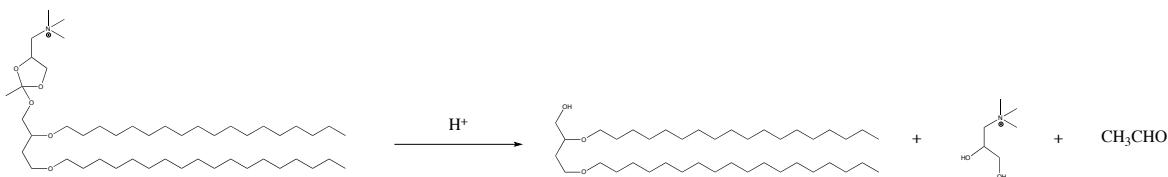


Figure 1.36 – Hydrolyse acide d'un lipide cationique pH-sensible (lien orthoester), libérant la partie hydrophobe et la tête cationique hydrophile et provoquant ainsi la déstabilisation du nanovecteur dans l'endosome.²⁰¹

Dans tous les cas, la liaison chimique clivable du lipide doit être soigneusement élaborée afin d'être stable à pH sanguin et fortement hydrolysée à pH endosomal.²⁰² Un des principaux inconvénients inhérents à cette approche est que la cinétique d'hydrolyse acide est souvent assez lente (> 8 heures)^{199,203}, n'étant ainsi pas favorable à un rapide échappement endosomal nécessaire pour éviter la dégradation du fragile matériel thérapeutique (voir section 1.3.1). Également, il existe très souvent une faible hydrolyse résiduelle du lipide à pH 7,4, provoquant des problèmes de stabilité des formulations.^{203,204}

Précisons que l'emploi de lipides clivables pour la thérapie génique n'est pas seulement réservé à l'hydrolyse acide visant à améliorer l'échappement endosomal. Des groupements réductibles (disulfure)^{205,206} ou clivable par hydrolyse enzymatique²⁰³ peuvent également être intégrés dans la structure des lipides, favorisant ainsi une bonne déstabilisation du nanovecteur une fois dans le milieu réducteur du cytoplasme (meilleure dissociation de l'oligonucléotide thérapeutique et meilleure métabolisation du nanovecteur).^{164,206}

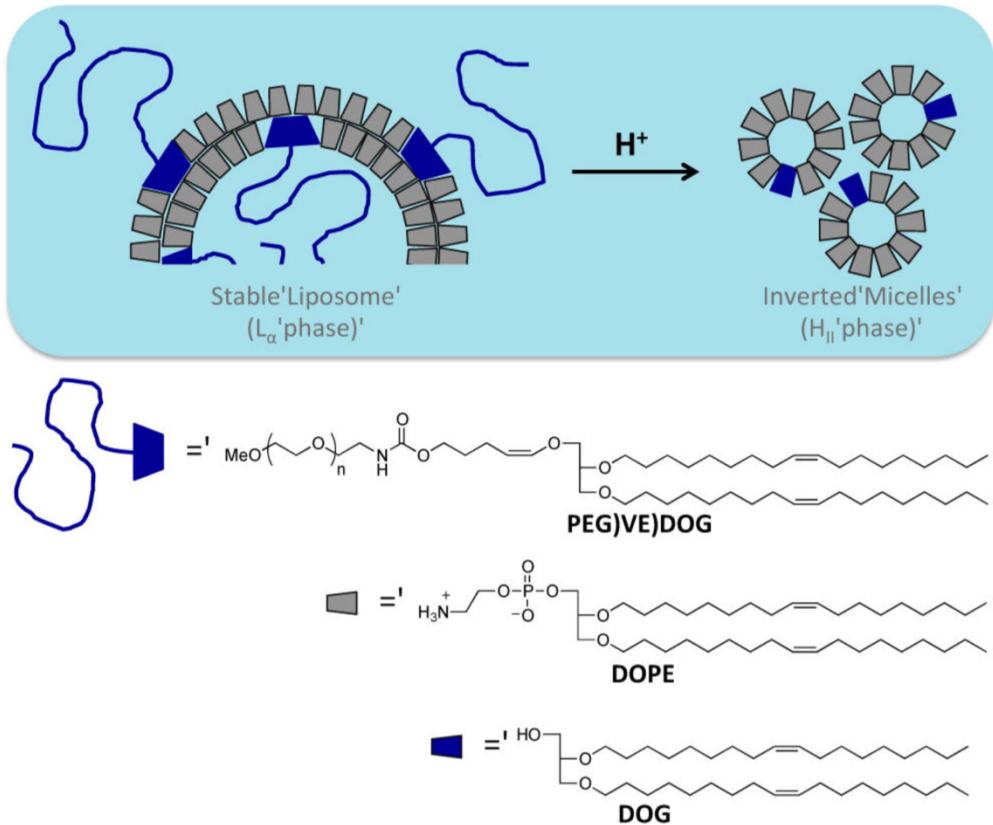


Figure 1.37 – Schéma illustrant l'utilisation d'un lipide-PEG clivable *via* utilisation d'un lien vinyl ether. Ce lipide résiste environ 2 jours à pH 7.4 et est clivé en environ 12 heures à pH 4,5.²⁰¹

1.3.2.3 – Utilisation de peptides fusogènes pH-sensibles

Les peptides fusogènes pH-sensibles – aussi appelés « Cell-Penetrating Peptides » (CPP) ou « Protein Transduction Domains » (PTD's) – sont de courtes séquences d'acides aminés cationiques (10-30 AA) capables de faciliter le transport de macromolécules à travers les membranes lipidiques cellulaires.^{207,208} Les CPP's sont originellement les protéines virales que les virus utilisent pour s'échapper de l'endosome. Le peptide TAT fut le premier CPP isolé à partir du virus HIV-1²⁰⁹, et de nombreux analogues synthétiques ont depuis été développés (**Tableau 1.8**).^{210,211} Ces dernières années, de nombreuses études ont rapporté l'utilisation de CPP pour la vectorisation d'oligonucléotides, de nanoparticules polymériques et lipidiques ou de drogues hydrophiles.²¹¹

Plusieurs théories s'affrontent quand à l'efficacité qu'ont les CPP à s'échapper de l'endosome. Certains groupes mettent en avant le fait que des interactions hydrophobes et électrostatiques ont lieu entre la membrane endosomale et le CPP, provoquant la

déstabilisation de l'endosome.²⁰⁷ D'autres groupes avancent l'hypothèse de la pompe à proton, c'est à dire l'hypothèse de la rupture de l'endosome suite à une augmentation de pression osmotique liée au pouvoir tampon des charges cationiques des CPP.¹⁵⁸

A titre d'exemple, la sous-unité HA-2 de l'hémagglutinine du virus *influenza* est un CPP capable de réaliser un changement conformationnel à pH acide, dans le but d'exposer en surface sa région N-terminale contenant une séquence d'acide aminés hydrophobes. Ceci déclenche la fusion de la membrane virale avec la paroi endosomale, permettant le relargage du contenu viral dans le cytosol cellulaire.²¹² Cette sous-unité HA-2 a donné naissance à un CPP synthétique nommé GALA, capable de passer d'une conformation « pelote aléatoire » à une conformation « hélice- α amphiphile » quand le pH passe de 7 à 5, favorisant ainsi l'échappement endosomal.²¹³ Ce CPP a été intégré dans des nanoparticules lipidiques pour la délivrance de siRNA, où il améliore l'efficacité de transfection par une meilleure internalisation cellulaire et un meilleur échappement endosomal.²¹⁴

Dans les nanoparticules lipidiques, l'intégration de CPP dans de faibles proportions molaires (< 2 mol%) est suffisant pour favoriser l'échappement endosomal.²⁰⁷ Le principal inconvénient à l'emploi des CPP est leur coût à cause de la synthèse peptidique. Également, il convient de noter que les CPP's sont en réalité plus couramment utilisés pour augmenter la pénétration cellulaire d'un nanovecteur que de manière pH-sensible pour l'échappement endosomal.^{207,215}

Peptides	Origin	Sequences	Cargo types
Peptides deriving from protein transduction domains			
Tat	HIV-Tat protein	PGRKKRRQRRPPQ	Protein/peptide/siRNA/liposome/nanoparticle
Penetratin	Homeodomain	RQIKIWFQNRRMKWKK	peptide/siRNA/liposome
Transportan	Galannin-mastoparan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	Protein/PNA/siRNA
VP-22	HSV-1 structural protein	DAATATRGRSAASRPTERPRAPAR-SASRPRRPVD	Protein
Amphiphatic peptides			
MPG	HIV Gp41-SV40 NLS	GALFLGFLGAAGGSTMGAWSQPKKKRKV	siRNA/ODN/plasmid
Pep-1	Trp-rich motif-SV40 NLS	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	Protein/peptide
MAP	Chimeric	KALAKALAKALA	Small molecule/plasmid
SAP	Proline-rich motif	VRLPPPVRLLPPLPP	protein/peptide
PTG1	Chimeric	GLFRALLRLLRSVLWRLLLRA	Plasmid
Other cell-penetrating peptides: cationic peptides			
Oligoarginine	Chimeric	Agr8 or Arg9	Protein/peptide/siRNA/ODN
hCT (9-32)	Human calcitonin	LGTYTQDFNKTFPQTAIGVGAP	Protein/plasmid DNA
SynB	Protegrin	RGGRLLSYSRRRFSTSTGR	Doxorubicin
Pvec	Murine VE-cadherin	LIIILRRRIRKQAHAAHSK	Protein/peptide

Tableau 1.8 – Présentation des principaux CPP utilisés dans les nanoparticules lipidiques et polymériques en thérapie génique.²¹¹

1.3.2.4 Hybride lipide - polymère de surface pH-sensible

Il est possible d'utiliser une couronne polymérique pH-sensible pour conférer un caractère pH-sensible à une nanoparticule hybride lipide-polymère. A pH endosomal, la couronne polymérique en surface est déstabilisée et induit la déstabilisation de la nanoparticule et la fusion avec l'endosome.²¹⁶ Les hypothèses mécanistiques globalement reportées dans les différentes études sont un processus de protonation, de « gonflement », de dégradation ou de réarrangement conformationnel du polymère.^{183,217}

A titre d'illustration, Kono *et al.* ont récemment décrit l'utilisation de deux polymères MGlu-HPG¹⁸³ (**Figure 1.38**) et MGlu-Dex²¹⁸ qui, une fois greffés en surface de liposomes composés d'un lipide cationique « TRX », confèrent des capacités de déstabilisation, de fusion et de relargage du contenu polaire dans le cytosol cellulaire. Bien que peu élucidé, le mécanisme de pH-sensibilité est rapide (moins de 30 min), permettant en théorie d'éviter la dégradation lysosomale des brins d'acides nucléiques thérapeutiques. Il est à noter que ce groupe de recherche a pour l'instant réalisé la vectorisation de protéines polaires (ovalbumine) avec ces nanovecteurs liposomaux, mais qu'ils envisagent dans un futur proche de réaliser des essais de délivrance de siRNA.

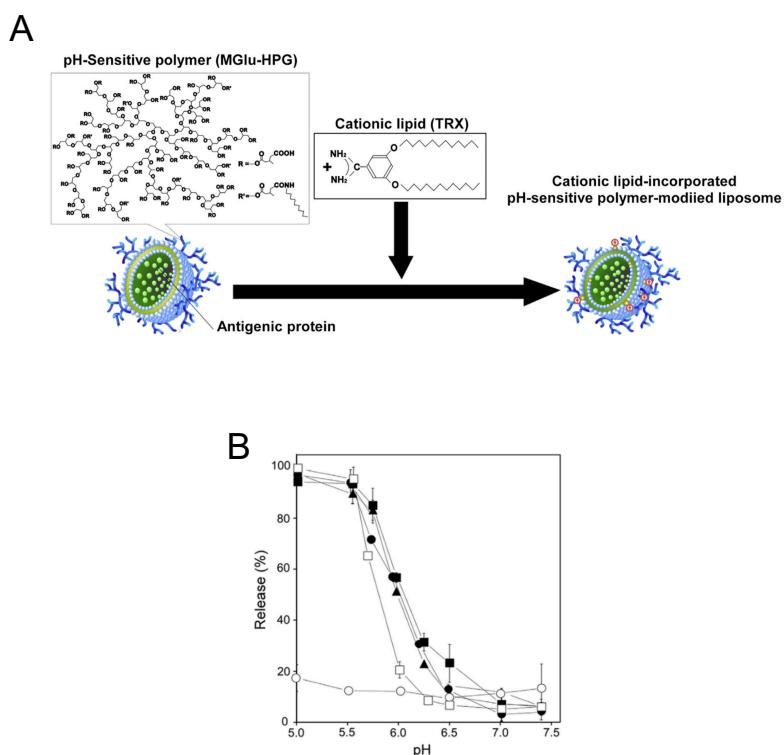


Figure 1.38 – (A) Représentation schématique de la nanoparticule pH-sensible hybride lipide-polymère TRX/MGlu-HPG. Le polymère 3-methylglutarylated hyperbranched poly(glycidol) (MGlu-HPG) est

complexé avec le lipide cationique TRX. (B) Présentation du relargage d'un fluorophore hydrophile pyranine encapsulé dans la nanoparticule en fonction du pH (score de « leakage » après 20 min à différents pH). Le mécanisme pH-sensible fonctionne avec 0 mol% (carrés blancs), 10 mol% (triangles noirs), 20 mol% (ronds noirs) ou 30 mol% (carrés noirs) de lipide cationique TRX. Les liposomes contrôle négatifs sans polymère MGlu-HPG pH-sensible ne sont pas pH-sensibles (ronds blancs).

1.3.2.5 Autres approches d'échappement endosomal

La méthode de « Photochemical Internalisation » (PCI) est une approche qui utilise un faisceau proche infrarouge et des molécules photosensibles (TPPS_{2a} et AlPcS_{2a} – **Figure 1.39**) qui présentent un tropisme pour les membranes plasmatiques et endosomales. Après internalisation, les nanoparticules lipidiques sont confinées dans les endosomes sans possibilité d'échappement, jusqu'à l'application du faisceau lumineux sur la cellule. Ceci provoque l'activation des molécules photosensibles et la formation de dérivés réactifs de l'oxygène, capables de briser les membranes endosomales et ainsi permettre le relargage des brins d'acides nucléiques thérapeutiques dans le cytosol (**Figure 1.40**).²¹⁹ Les inconvénients de cette méthode sont les effets secondaires des dérivés réactifs de l'oxygène qui sont formés (effets mutagènes sur l'ADN génomique de la cellule) et l'impossibilité d'application du faisceau lumineux dans les tissus profonds.²²⁰ Le point fort de cette approche est la possibilité de cibler spécifiquement un tissu grâce à l'irradiation spécifique du tissu à traiter.

Il est à noter qu'il n'y a pas de mécanisme pH-sensible à proprement parler avec cette technique, puisque le stimulus favorisant l'échappement endosomal est l'application du faisceau lumineux. Les nanoparticules ne sont pas intrinsèquement pH-sensibles.

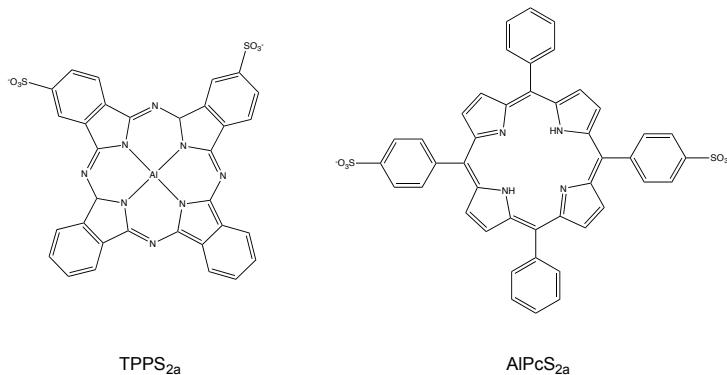
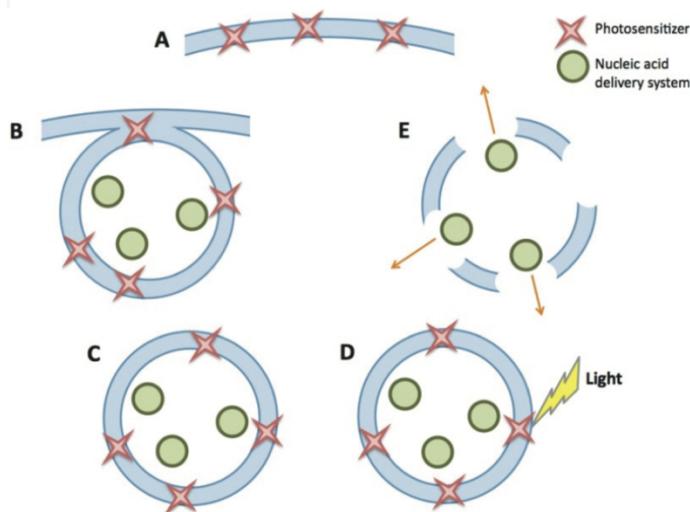


Figure 1.39 – Structure chimique des agents photosensibilisants utilisés en « Photochemical Internalisation ».



- A - L'agent photosensible a un tropisme pour les membranes plasmatiques cellulaires
- B - L'agent photosensible est transporté dans la membrane de l'endosome avec le nanovecteur suite à l'endocytose cellulaire
- C - L'agent photosensible reste dans la membrane de l'endosome et est inactif sans irradiation lumineuse
- D - L'irradiation lumineuse active l'agent photosensible et provoque la formation de dérivés actifs de l'oxygène, provoquant la lyse de l'endosome
- E - Le nanovecteur est libéré dans le cytosol cellulaire

Figure 1.40 – Mécanisme de l'échappement endosomal via « Photochemical Internalisation ».²²⁰

1.4 Présentation du projet

1.4.1 Hypothèses de recherche

L'objectif de ce projet est le développement de nouveaux nanovecteurs lipidiques cationiques pH-sensibles pour la vectorisation de siRNA. Ces formulations reposent sur un mécanisme novateur de pH-sensibilité, à savoir sur l'utilisation d'un lipide bascule cationique synthétique capable de changer de conformation à pH-endosomal (**Figure 1.41**). La protonation du noyau pyridine central du lipide bascule (en rouge) qui intervient à pH endosomal autorise la formation de liaisons hydrogènes avec les deux fonctions méthoxy. Il en résulte un basculement (changement de conformation) de la molécule, provoquant au passage la déstabilisation ou le réarrangement de la bicouche lipidique du liposome et un processus d'échappement endosomal fusion-médié.

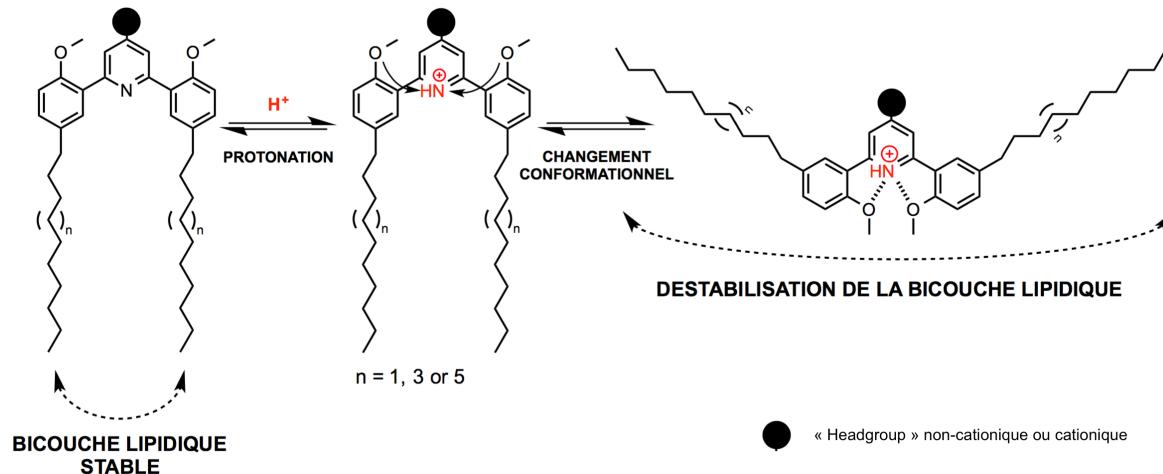


Figure 1.41 – Schéma présentant le changement de conformation des lipides bascules en fonction du pH (protonation du noyau pyridine central).

Nous formulons les hypothèses suivantes :

- Un lipide incorporant une bascule pH-sensible est capable de changer de conformation à pH acide
- Un tel changement de conformation est capable de déstabiliser une nanoparticule lipidique par la perturbation de l'arrangement lipidique et

d’induire un potentiel fusogène avec les membranes endosomales à pH acide afin de favoriser l’échappement endosomal

- Un tel mécanisme de changement de conformation du lipide bascule est supposé instantané et donc compatible avec un échappement rapide de l’endosome (prévenant ainsi la dégradation des oligonucléotides thérapeutiques qui intervient rapidement après internalisation cellulaire – voir section 1.3.1)
- Une telle nanoparticule pH-sensible serait dotée de capacités de transfections efficaces et présenterait une bonne biocompatibilité

1.4.2 Objectifs spécifiques du projet

Les différents objectifs chronologiques de ce projet de recherche s’établissent de la façon suivante :

1. Synthèse et caractérisation de deux librairies de lipides bascules non-cationiques et cationiques
2. Validation du changement de conformation des lipides en fonction du pH par RMN
3. Formulation de nanoparticules lipidiques incluant les lipides bascules et encapsulant un traceur hydrophile modèle ou des siRNA, par extrusion manuelle et mixage microfluidique
4. Vérification du comportement pH-sensible et de la livraison intracytoplasmique de composés polaires (traceur hydrophile et siRNA) *in vitro* par spectroscopie de fluorescence et microscopie de fluorescence sur cellules HeLa
5. Evaluation de l’efficacité de transfection de siRNA *in vitro* sur lignées HeLa et Huh7
6. Evaluation de la toxicité *in vitro* (cytotoxicité sur cellules HeLa, hémostabilité sur globules rouges humains)

- Evaluation de la biodistribution par imagerie de fluorescence et de l'efficacité de transfection de siRNA *in vivo* dans le modèle murin du facteur de coagulation VII

1.4.3 Présentation des lipides bascules pH-sensibles

La structure des lipides bascules élaborés dans cette thèse est inspirée des « pinces moléculaires » reportées en 2010 par Leblond *et al.* (**Figure 1.42**).²²¹ Dans cette étude, les auteurs utilisent une structure tri-cyclique pH-sensible (en noir) capable de changer de conformation à pH acide. A pH neutre, les deux fonctions naphtalènes (en vert) sont capables de lier une drogue hydrophobe (par interaction aromatique π - π) tandis qu'à pH acide, le changement de conformation provoque une levée de ces interactions et un relargage de la drogue. Dans cette étude, les « pinces moléculaires » sont couplées sur un squelette polymérique de PEG (en bleu).

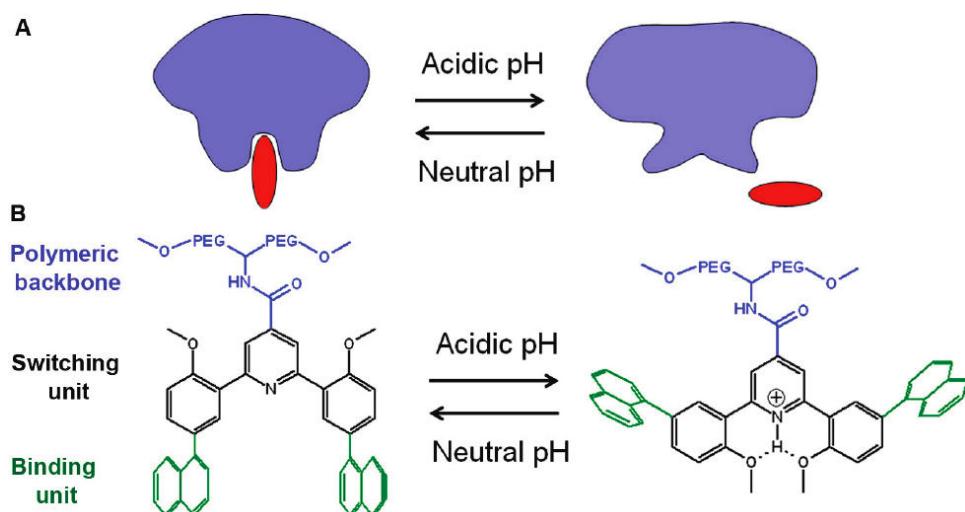


Figure 1.42 – Schéma des « pinces moléculaires » pH-sensibles capables de changer de conformation à pH acide.²²¹

1.4.3.1 Lipides bascules non-cationiques (1^{ère} publication)

Dans cette publication, les lipides pH-sensibles ne seront pas directement destinés à la délivrance de siRNA (absence de groupements cationiques permettant leur encapsulation) mais à la délivrance de drogues pharmaceutiques hydrophiles ou lipophiles dites « classiques ». Ce travail tiendra lieu de preuve de concept pour un lipide bascule capable de changer de conformation à pH endosomal et capable de favoriser la délivrance

intracytoplasmique d'un composé hautement hydrophile (par un processus d'échappement endosomal). Ce lipide sera basé sur la structure tri-cyclique pH-sensible présentée ci-dessus (**Figure 1.42**). Deux chaines lipidiques alkyl seront greffées en lieu et place des groupements naphtalènes et différents groupements de tête en 4' du cycle pyridine central seront étudiés. Cette étude montrera la faisabilité d'un tel lipide et son incorporation dans des nanoparticules liposomales stables à pH sanguin et déstabilisées à pH endosomal. Il sera présenté la synthèse de la librairie de lipides bascules non-cationiques, la validation du changement de conformation en fonction du pH par RMN, la formulation de liposomes pH-sensibles encapsulant de la sulforhodamine B par extrusion manuelle, la validation du caractère pH-sensible instantané des formulations et la délivrance intracytoplasmique de sulforhodamine B *in vitro* sur cellules HeLa.

1.4.3.2 Lipides bascules cationiques (2^{nde} publication)

Dans une seconde étude sera présenté l'utilisation de lipides bascules cationiques pour la délivrance de siRNA. Cette étude exploitera les conclusions relatives aux relations structures-activité des composés de la première étude pour présenter de nouvelles structures chimiques cationiques, basées sur le lipide bascule le plus performant (compound 2 - voir **Figure 1.43**). Il sera présenté la synthèse d'une librairie de lipides bascules cationiques, la formulation de nanoparticules lipidiques encapsulant des siRNA par extrusion manuelle et mixage microfluidique, l'évaluation de l'efficacité de transfection de siRNA *in vitro* sur cellules HeLa et Huh7, l'évaluation de la délivrance intracytoplasmique de siRNA *in vitro* sur cellules HeLa et l'évaluation de la biodistribution et de l'efficacité de transfection *in vivo* dans le modèle murin du facteur de coagulation VII.

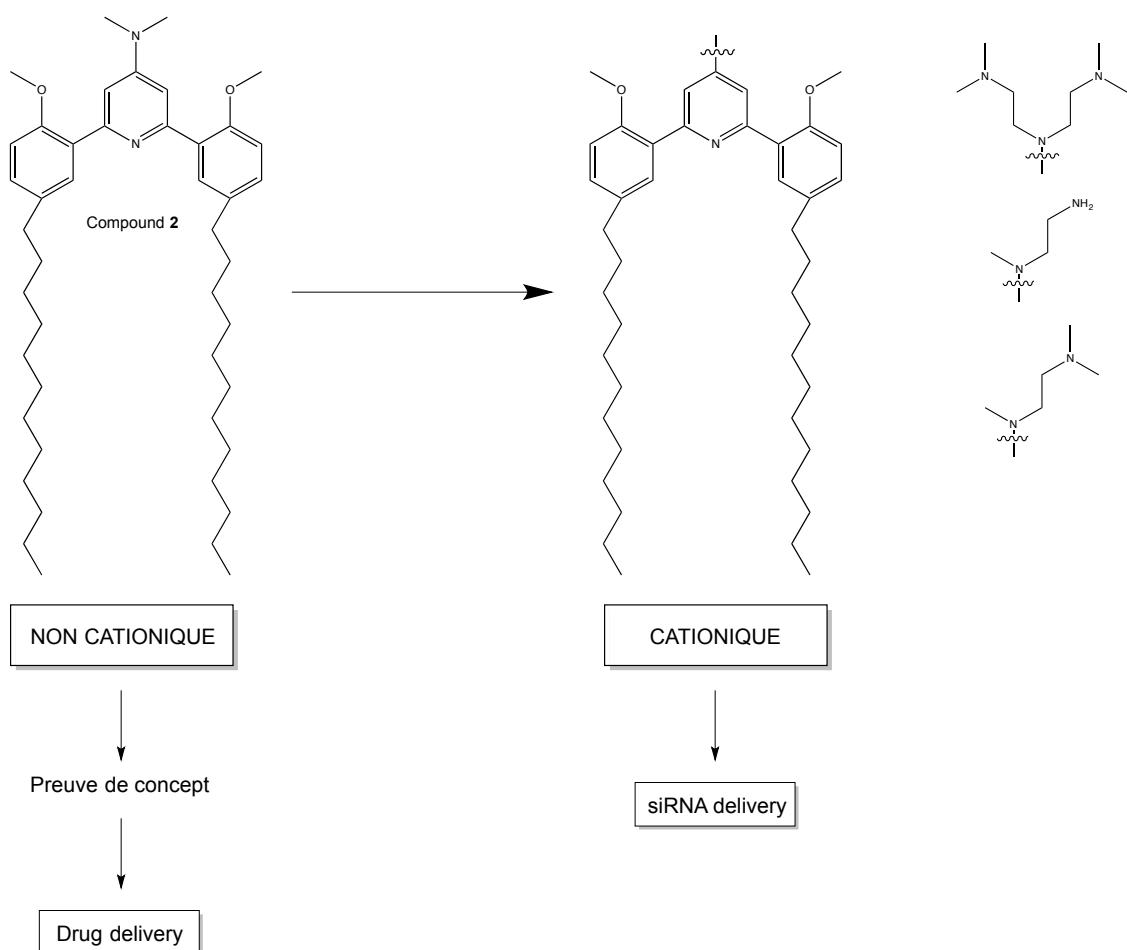


Figure 1.43 – Schéma présentant le passage d'une structure de lipide bascule pH-sensible non-cationique (compound 2 – 1^{ère} publication) à une structure cationique permettant l'encapsulation et la délivrance de siRNA (2^{nde} publication).

1.5 Références

- (1) Weissig, V.; Pettinger, T. K.; Murdock, N. Nanopharmaceuticals (part 1): Products on the Market. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 4357–4373.
- (2) ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/home> (accessed May 4, 2016).
- (3) Nanotechnology in Medical Applications: The Global Market - HLC069C <http://www.bccresearch.com/market-research/healthcare/nanotechnology-medical-applications-market-hlc069c.html> (accessed May 4, 2016).
- (4) Gene Therapy Market, 2015 – 2025 https://www.rootsanalysis.com/reports/view_document/gene-therapy-market-2015-2025/85.html (accessed May 4, 2016).
- (5) Ylä-Herttula, S. Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 1831–1832.
- (6) Friedmann, T.; Roblin, R. Gene Therapy for Human Genetic Disease? *Science* **1972**, *175*, 949–955.
- (7) Dong, Y.; Love, K. T.; Dorkin, J. R.; Sirirungruang, S.; Zhang, Y.; Chen, D.; Bogorad, R. L.; Yin, H.; Chen, Y.; Vegas, A. J.; et al. Lipopeptide Nanoparticles for Potent and Selective siRNA Delivery in Rodents and Nonhuman Primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 3955–3960.
- (8) Kauffman, K. J.; Dorkin, J. R.; Yang, J. H.; Heartlein, M. W.; DeRosa, F.; Mir, F. F.; Fenton, O. S.; Anderson, D. G. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 7300–7306.
- (9) Zuris, J. A.; Thompson, D. B.; Shu, Y.; Guilinger, J. P.; Bessen, J. L.; Hu, J. H.; Maeder, M. L.; Joung, J. K.; Chen, Z.-Y.; Liu, D. R. Cationic Lipid-Mediated Delivery of Proteins Enables Efficient Protein-Based Genome Editing in Vitro and in Vivo. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 73–80.
- (10) Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J. A.; Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **2012**, *337*, 816–821.

- (11) Naldini, L. Gene Therapy Returns to Centre Stage. *Nature* **2015**, *526*, 351–360.
- (12) Dolgin, E. Business: The Billion-Dollar Biotech. *Nature* **2015**, *522*, 26–28.
- (13) American Society of Gene & Cell Therapy. Gene Therapy Defined. *ASGCT's Official Journal*.
- (14) Weissman, D.; Karikó, K. mRNA: Fulfilling the Promise of Gene Therapy. *Mol. Ther.* **2015**, *23*, 1416–1417.
- (15) Davidson, B. L.; McCray, P. B. Current Prospects for RNA Interference-Based Therapies. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 329–340.
- (16) Whitehead, K. A.; Langer, R.; Anderson, D. G. Knocking down Barriers: Advances in siRNA Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 129–138.
- (17) Kirchner, M.; Schneider, S. CRISPR-Cas: From the Bacterial Adaptive Immune System to a Versatile Tool for Genome Engineering. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13508–13514.
- (18) Rosenberg, S. A.; Aebersold, P.; Cornetta, K.; Kasid, A.; Morgan, R. A.; Moen, R.; Karson, E. M.; Lotze, M. T.; Yang, J. C.; Topalian, S. L. Gene Transfer into Humans--Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *N. Engl. J. Med.* **1990**, *323*, 570–578.
- (19) Edelstein, M. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. *J. Gene Med.* **2015**.
- (20) Raper, S. E.; Chirmule, N.; Lee, F. S.; Wivel, N. A.; Bagg, A.; Gao, G.; Wilson, J. M.; Batshaw, M. L. Fatal Systemic Inflammatory Response Syndrome in a Ornithine Transcarbamylase Deficient Patient Following Adenoviral Gene Transfer. *Mol. Genet. Metab.* **2003**, *80*, 148–158.
- (21) Nunes, F. A.; Furth, E. E.; Wilson, J. M.; Raper, S. E. Gene Transfer into the Liver of Nonhuman Primates with E1-Deleted Recombinant Adenoviral Vectors: Safety of Readministration. *Hum. Gene Ther.* **1999**, *10*, 2515–2526.
- (22) Cavazzana-Calvo, M.; Hacein-Bey, S.; Basile, G. de S.; Gross, F.; Yvon, E.; Nusbaum, P.; Selz, F.; Hue, C.; Certain, S.; Casanova, J.-L.; et al. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science* **2000**, *288*, 669–672.

- (23) Hacein-Bey-Abina, S.; Kalle, C. V.; Schmidt, M.; McCormack, M. P.; Wulffraat, N.; Leboulch, P.; Lim, A.; Osborne, C. S.; Pawliuk, R.; Morillon, E.; *et al.* LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science* **2003**, *302*, 415–419.
- (24) Kaiser, J. Panel Urges Limits on X-SCID Trials. *Science* **2005**, *307*, 1544–1545.
- (25) Doudna, J. Genome-Editing Revolution: My Whirlwind Year with CRISPR. *Nature* **2015**, *528*, 469–471.
- (26) Nair, J. K.; Willoughby, J. L. S.; Chan, A.; Charisse, K.; Alam, M. R.; Wang, Q.; Hoekstra, M.; Kandasamy, P.; Kel'in, A. V.; Milstein, S.; *et al.* Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16958–16961.
- (27) Alnylam Pharmaceuticals. Initial ALN-PCSsc Phase 1 Study Results.
- (28) Cicero, A. F.; Tartagni, E.; Ertek, S. Efficacy and Safety Profile of Evolocumab (AMG145), an Injectable Inhibitor of the Proprotein Convertase Subtilisin/kexin Type 9: The Available Clinical Evidence. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2014**, *14*, 863–868.
- (29) Nayak, S.; Sarkar, D.; Perrin, G. Q.; Moghimi, B.; Hoffman, B. E.; Zhou, S.; Byrne, B. J.; Herzog, R. W. Prevention and Reversal of Antibody Responses Against Factor IX in Gene Therapy for Hemophilia B. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 244.
- (30) Gaide, O. Gene Therapy and Protein Therapy of Ectodermal Dysplasias: A Perspective. *Am. J. Med. Genet. A.* **2009**, *149A*, 2042–2044.
- (31) Wu, F.; Jin, T. Polymer-Based Sustained-Release Dosage Forms for Protein Drugs, Challenges, and Recent Advances. *AAPS PharmSciTech* **2008**, *9*, 1218–1229.
- (32) Suhr, O. B.; Coelho, T.; Buades, J.; Pouget, J.; Conceicao, I.; Berk, J.; Schmidt, H.; Waddington-Cruz, M.; Campistol, J. M.; Bettencourt, B. R.; *et al.* Efficacy and Safety of Patisiran for Familial Amyloidotic Polyneuropathy: A Phase II Multi-Dose Study. *Orphanet J. Rare Dis.* **2015**, *10*, 109.
- (33) Hawkins, P. N.; Ando, Y.; Dispenser, A.; Gonzalez-Duarte, A.; Adams, D.; Suhr, O. B. Evolving Landscape in the Management of Transthyretin Amyloidosis. *Ann. Med.* **2015**, *47*, 625–638.

- (34) Sehgal, A.; Barros, S.; Ivanciu, L.; Cooley, B.; Qin, J.; Racie, T.; Hettinger, J.; Carioto, M.; Jiang, Y.; Brodsky, J.; *et al.* An RNAi Therapeutic Targeting Antithrombin to Rebalance the Coagulation System and Promote Hemostasis in Hemophilia. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 492–497.
- (35) Kormann, M. S. D.; Hasenpusch, G.; Aneja, M. K.; Nica, G.; Flemmer, A. W.; Herber-Jonat, S.; Huppmann, M.; Mays, L. E.; Illenyi, M.; Schams, A.; *et al.* Expression of Therapeutic Proteins after Delivery of Chemically Modified mRNA in Mice. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 154–157.
- (36) Senzer, N.; Nemunaitis, J.; Nemunaitis, D.; Bedell, C.; Edelman, G.; Barve, M.; Nunan, R.; Pirollo, K. F.; Rait, A.; Chang, E. H. Phase I Study of a Systemically Delivered p53 Nanoparticle in Advanced Solid Tumors. *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 1096–1103.
- (37) Zuckerman, J. E.; Davis, M. E. Clinical Experiences with Systemically Administered siRNA-Based Therapeutics in Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 843–856.
- (38) Zhu, X.; Xu, Y.; Solis, L. M.; Tao, W.; Wang, L.; Behrens, C.; Xu, X.; Zhao, L.; Liu, D.; Wu, J.; *et al.* Long-Circulating siRNA Nanoparticles for Validating Prohibitin1-Targeted Non-Small Cell Lung Cancer Treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 7779–7784.
- (39) Shigematsu, H.; Yasuda, K.; Iwai, T.; Sasajima, T.; Ishimaru, S.; Ohashi, Y.; Yamaguchi, T.; Ogihara, T.; Morishita, R. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial of Hepatocyte Growth Factor Plasmid for Critical Limb Ischemia. *Gene Ther.* **2010**, *17*, 1152–1161.
- (40) Ko, H.-J.; Kim, Y.-J.; Kim, Y.-S.; Kim, J.-M.; Ho, S.-H.; Jeong, J.-G.; Oh, S.-M.; Chae, J.-A.; Kim, C.-Y.; Lee, P.-S.; *et al.* Immunogenicity and Safety Profiles of Genetic Vaccines against Human Her-2/neu in Cynomolgus Monkeys. *Gene Ther.* **2008**, *15*, 1351–1360.
- (41) Zuckerman, J. E.; Gritli, I.; Tolcher, A.; Heidel, J. D.; Lim, D.; Morgan, R.; Chmielowski, B.; Ribas, A.; Davis, M. E.; Yen, Y. Correlating Animal and Human Phase Ia/Ib Clinical Data with CALAA-01, a Targeted, Polymer-Based Nanoparticle Containing siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 11449–11454.
- (42) Kanasty, R.; Dorkin, J. R.; Vegas, A.; Anderson, D. Delivery Materials for siRNA Therapeutics. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 967–977.

- (43) Yoon, S. H.; Lee, J. M.; Cho, H. I.; Kim, E. K.; Kim, H. S.; Park, M. Y.; Kim, T. G. Adoptive Immunotherapy Using Human Peripheral Blood Lymphocytes Transferred with RNA Encoding Her-2/neu-Specific Chimeric Immune Receptor in Ovarian Cancer Xenograft Model. *Cancer Gene Ther.* **2008**, *16*, 489–497.
- (44) Fotin-Mleczek, M.; Duchardt, K. M.; Lorenz, C.; Pfeiffer, R.; Ojkić-Zrna, S.; Probst, J.; Kallen, K.-J. Messenger RNA-Based Vaccines With Dual Activity Induce Balanced TLR-7 Dependent Adaptive Immune Responses and Provide Antitumor Activity: *J. Immunother.* **2011**, *34*, 1–15.
- (45) Sahin, U.; Karikó, K.; Türeci, Ö. mRNA-Based Therapeutics — Developing a New Class of Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 759–780.
- (46) Roesler, E.; Weiss, R.; Weinberger, E. E.; Fruehwirth, A.; Stoecklinger, A.; Mostböck, S.; Ferreira, F.; Thalhamer, J.; Scheiblhofer, S. Immunize and disappear—Safety-Optimized mRNA Vaccination with a Panel of 29 Allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *124*, 1070–1077.e11.
- (47) Van Gulck, E.; Vlieghe, E.; Vekemans, M.; Van Tendeloo, V. F. I.; Van De Velde, A.; Smits, E.; Anguille, S.; Cools, N.; Goossens, H.; Mertens, L.; *et al.* mRNA-Based Dendritic Cell Vaccination Induces Potent Antiviral T-Cell Responses in HIV-1-Infected Patients: *AIDS* **2012**, *26*, F1–F12.
- (48) Hattinger, E.; Scheiblhofer, S.; Roesler, E.; Thalhamer, T.; Thalhamer, J.; Weiss, R.; Hattinger, E.; Scheiblhofer, S.; Roesler, E.; Thalhamer, T.; *et al.* Prophylactic mRNA Vaccination against Allergy Confers Long-Term Memory Responses and Persistent Protection in Mice, Prophylactic mRNA Vaccination against Allergy Confers Long-Term Memory Responses and Persistent Protection in Mice. *J. Immunol. Res. J. Immunol. Res.* **2015**, *2015*, e797421.
- (49) Petsch, B.; Schnee, M.; Vogel, A. B.; Lange, E.; Hoffmann, B.; Voss, D.; Schlake, T.; Thess, A.; Kallen, K.-J.; Stitz, L.; *et al.* Protective Efficacy of in Vitro Synthesized, Specific mRNA Vaccines against Influenza A Virus Infection. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 1210–1216.
- (50) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* **1998**, *391*, 806–811.

- (51) Ozcan, G.; Ozpolat, B.; Coleman, R. L.; Sood, A. K.; Lopez-Berestein, G. Preclinical and Clinical Development of siRNA-Based Therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *87*, 108–119.
- (52) Thomas, C. M.; Summers, D. Bacterial Plasmids. In *eLS*; John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- (53) Vaughan, E. E.; DeGiulio, J. V.; Dean, D. A. Intracellular Trafficking of Plasmids for Gene Therapy: Mechanisms of Cytoplasmic Movement and Nuclear Import. *Curr. Gene Ther.* **2006**, *6*, 671–681.
- (54) Herweijer, H.; Wolff, J. A. Progress and Prospects: Naked DNA Gene Transfer and Therapy. *Gene Ther.* **2003**, *10*, 453–458.
- (55) Mesika, A.; Kiss, V.; Brumfeld, V.; Ghosh, G.; Reich, Z. Enhanced Intracellular Mobility and Nuclear Accumulation of DNA Plasmids Associated with a Karyophilic Protein. *Hum. Gene Ther.* **2005**, *16*, 200–208.
- (56) Cell Cycle Dependence of Gene Transfer by Lipoplex, Polyplex and Recombinant Adenovirus. *Publ. Online 24 Febr. 2000 Doi101038sjgt3301102* **2000**, *7*.
- (57) Matsui, A.; Uchida, S.; Ishii, T.; Itaka, K.; Kataoka, K. Messenger RNA-Based Therapeutics for the Treatment of Apoptosis-Associated Diseases. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15810.
- (58) Scholz, C.; Wagner, E. Therapeutic Plasmid DNA versus siRNA Delivery: Common and Different Tasks for Synthetic Carriers. *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 554–565.
- (59) Hughes, T. S.; Langer, S. J.; Johnson, K. W.; Chavez, R. A.; Watkins, L. R.; Milligan, E. D.; Leinwand, L. A. Intrathecal Injection of Naked Plasmid DNA Provides Long-Term Expression of Secreted Proteins. *Mol. Ther.* **2008**, *17*, 88–94.
- (60) Nafissi, N.; Alqawlaq, S.; Lee, E. A.; Foldvari, M.; Spagnuolo, P. A.; Slavcev, R. A. DNA Ministrings: Highly Safe and Effective Gene Delivery Vectors. *Mol. Ther. — Nucleic Acids* **2014**, *3*, e165.
- (61) Malone, R. W.; Felgner, P. L.; Verma, I. M. Cationic Liposome-Mediated RNA Transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 6077–6081.
- (62) Karikó, K.; Buckstein, M.; Ni, H.; Weissman, D. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity* **2005**, *23*, 165–175.

- (63) Liang, X.; Potter, J.; Kumar, S.; Zou, Y.; Quintanilla, R.; Sridharan, M.; Carte, J.; Chen, W.; Roark, N.; Ranganathan, S.; *et al.* Rapid and Highly Efficient Mammalian Cell Engineering via Cas9 Protein Transfection. *J. Biotechnol.* **2015**, *208*, 44–53.
- (64) Thess, A.; Grund, S.; Mui, B. L.; Hope, M. J.; Baumhof, P.; Fotin-Mleczek, M.; Schlake, T. Sequence-Engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals. *Mol. Ther.* **2015**, *23*, 1456–1464.
- (65) Arnaud-Barbe, N.; Cheynet-Sauvion, V.; Oriol, G.; Mandrand, B.; Mallet, F. Transcription of RNA Templates by T7 RNA Polymerase. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3550–3554.
- (66) Karikó, K.; Muramatsu, H.; Ludwig, J.; Weissman, D. Generating the Optimal mRNA for Therapy: HPLC Purification Eliminates Immune Activation and Improves Translation of Nucleoside-Modified, Protein-Encoding mRNA. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, e142–e142.
- (67) Azarani, A.; Hecker, K. H. RNA Analysis by Ion-Pair Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e7.
- (68) Jemielity, J.; Fowler, T.; Zuberek, J.; Stepinski, J.; Lewdorowicz, M.; Niedzwiecka, A.; Stolarski, R.; Darzynkiewicz, E.; Rhoads, R. E. Novel “anti-Reverse” Cap Analogs with Superior Translational Properties. *RNA* **2003**, *9*, 1108–1122.
- (69) Grudzien-Nogalska, E.; Jemielity, J.; Kowalska, J.; Darzynkiewicz, E.; Rhoads, R. E. Phosphorothioate Cap Analogs Stabilize mRNA and Increase Translational Efficiency in Mammalian Cells. *RNA* **2007**, *13*, 1745–1755.
- (70) Karikó, K.; Muramatsu, H.; Welsh, F. A.; Ludwig, J.; Kato, H.; Akira, S.; Weissman, D. Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 1833–1840.
- (71) Weissman, D. mRNA Transcript Therapy. *Expert Rev. Vaccines* **2015**, *14*, 265–281.
- (72) Pardi, N.; Tuyishime, S.; Muramatsu, H.; Kariko, K.; Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Madden, T. D.; Hope, M. J.; Weissman, D. Expression Kinetics of Nucleoside-Modified mRNA Delivered in Lipid Nanoparticles to Mice by Various Routes. *J. Controlled Release* **2015**, *217*, 345–351.

- (73) Fenton, O. S.; Kauffman, K. J.; McClellan, R. L.; Appel, E. A.; Dorkin, J. R.; Tibbitt, M. W.; Heartlein, M. W.; DeRosa, F.; Langer, R.; Anderson, D. G. Bioinspired Alkenyl Amino Alcohol Ionizable Lipid Materials for Highly Potent In Vivo mRNA Delivery. *Adv. Mater.* **2016**, n/a – n/a.
- (74) Lee, S. H.; Kang, Y. Y.; Jang, H.-E.; Mok, H. Current Preclinical Small Interfering RNA (siRNA)-Based Conjugate Systems for RNA Therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*
- (75) de Fougerolles, A.; Vornlocher, H.-P.; Maraganore, J.; Lieberman, J. Interfering with Disease: A Progress Report on siRNA-Based Therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 443–453.
- (76) Hsu, S.; Yu, B.; Wang, X.; Lu, Y.; Schmidt, C. R.; Lee, R. J.; Lee, L. J.; Jacob, S. T.; Ghoshal, K. Cationic Lipid Nanoparticles for Therapeutic Delivery of siRNA and miRNA to Murine Liver Tumor. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, *9*, 1169–1180.
- (77) Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
- (78) Xia, H.; Mao, Q.; Paulson, H. L.; Davidson, B. L. siRNA-Mediated Gene Silencing in Vitro and in Vivo. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1006–1010.
- (79) Whitehead, K. A.; Dahlman, J. E.; Langer, R. S.; Anderson, D. G. Silencing or Stimulation? siRNA Delivery and the Immune System. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, *2*, 77–96.
- (80) Bartlett, D. W.; Davis, M. E. Insights into the Kinetics of siRNA-Mediated Gene Silencing from Live-Cell and Live-Animal Bioluminescent Imaging. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 322–333.
- (81) Jackson, A. L.; Linsley, P. S. Recognizing and Avoiding siRNA off-Target Effects for Target Identification and Therapeutic Application. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 57–67.
- (82) Judge, A. D.; Sood, V.; Shaw, J. R.; Fang, D.; McClintock, K.; MacLachlan, I. Sequence-Dependent Stimulation of the Mammalian Innate Immune Response by Synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 457–462.

- (83) Peacock, H.; Kannan, A.; Beal, P. A.; Burrows, C. J. Chemical Modification of siRNA Bases To Probe and Enhance RNA Interference. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7295–7300.
- (84) Choung, S.; Kim, Y. J.; Kim, S.; Park, H.-O.; Choi, Y.-C. Chemical Modification of siRNAs to Improve Serum Stability without Loss of Efficacy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *342*, 919–927.
- (85) Hannus, M.; Beitzinger, M.; Engelmann, J. C.; Weickert, M.-T.; Spang, R.; Hannus, S.; Meister, G. siPools: Highly Complex but Accurately Defined siRNA Pools Eliminate off-Target Effects. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 8049–8061.
- (86) Fakhr, E.; Zare, F.; Teimoori-Toolabi, L. Precise and Efficient siRNA Design: A Key Point in Competent Gene Silencing. *Cancer Gene Ther.* **2016**, *23*, 73–82.
- (87) Akinc, A.; Zumbuehl, A.; Goldberg, M.; Leshchiner, E. S.; Busini, V.; Hossain, N.; Bacallado, S. A.; Nguyen, D. N.; Fuller, J.; Alvarez, R.; *et al.* A Combinatorial Library of Lipid-like Materials for Delivery of RNAi Therapeutics. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 561–569.
- (88) Hypercholesterolemia – Alnylam.
- (89) Taylor, P. Alnylam predicts big things for its PCSK9 inhibitor ALN-PCS http://www.pmlive.com/pharma_news/alnylam_predicts_big_things_for_its_pcsk9_inhibitor_aln-pcs_810709 (accessed May 13, 2016).
- (90) Parmar, R.; Willoughby, J. L. S.; Liu, J.; Foster, D. J.; Brigham, B.; Theile, C. S.; Charisse, K.; Akinc, A.; Guidry, E.; Pei, Y.; *et al.* 5'-(E)-Vinylphosphonate: A Stable Phosphate Mimic Can Improve the RNAi Activity of siRNA–GalNAc Conjugates. *ChemBioChem* **2016**, n/a – n/a.
- (91) Sander, J. D.; Joung, J. K. CRISPR-Cas Systems for Editing, Regulating and Targeting Genomes. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 347–355.
- (92) Liu, Y.; Tao, W.; Wen, S.; Li, Z.; Yang, A.; Deng, Z.; Sun, Y. In Vitro CRISPR/Cas9 System for Efficient Targeted DNA Editing. *mBio* **2015**, *6*, e01714–e01715.
- (93) Ledford, H. CRISPR, the Disruptor. *Nature* **2015**, *522*, 20–24.
- (94) Ledford, H. Bitter Fight over CRISPR Patent Heats up. *Nature* **2016**, *529*, 265–265.

- (95) Wen, W.-S.; Yuan, Z.-M.; Ma, S.-J.; Xu, J.; Yuan, D.-T. CRISPR-Cas9 Systems: Versatile Cancer Modelling Platforms and Promising Therapeutic Strategies. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 1328–1336.
- (96) Savić, N.; Schwank, G. Advances in Therapeutic CRISPR/Cas9 Genome Editing. *Transl. Res.* **2016**, *168*, 15–21.
- (97) Zhang, X.-H.; Tee, L. Y.; Wang, X.-G.; Huang, Q.-S.; Yang, S.-H. Off-Target Effects in CRISPR/Cas9-Mediated Genome Engineering. *Mol. Ther. — Nucleic Acids* **2015**, *4*, e264.
- (98) Evitt, N. H.; Mascharak, S.; Altman, R. B. Human Germline CRISPR-Cas Modification: Toward a Regulatory Framework. *Am. J. Bioeth.* **2015**, *15*, 25–29.
- (99) Kleinstiver, B. P.; Pattanayak, V.; Prew, M. S.; Tsai, S. Q.; Nguyen, N. T.; Zheng, Z.; Joung, J. K. High-Fidelity CRISPR–Cas9 Nucleases with No Detectable Genome-Wide off-Target Effects. *Nature* **2016**, *529*, 490–495.
- (100) Slaymaker, I. M.; Gao, L.; Zetsche, B.; Scott, D. A.; Yan, W. X.; Zhang, F. Rationally Engineered Cas9 Nucleases with Improved Specificity. *Science* **2016**, *351*, 84–88.
- (101) Latorre, A.; Latorre, A.; Somoza, Á. Modified RNAs in CRISPR/Cas9: An Old Trick Works Again. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3548–3550.
- (102) Josephs, E. A.; Kocak, D. D.; Fitzgibbon, C. J.; McMenemy, J.; Gersbach, C. A.; Marszalek, P. E. Structure and Specificity of the RNA-Guided Endonuclease Cas9 during DNA Interrogation, Target Binding and Cleavage. *Nucleic Acids Res.* **2015**, gkv892.
- (103) Zetsche, B.; Gootenberg, J. S.; Abudayyeh, O. O.; Slaymaker, I. M.; Makarova, K. S.; Essletzbichler, P.; Volz, S. E.; Joung, J.; van der Oost, J.; Regev, A.; *et al.* Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* **2015**, *163*, 759–771.
- (104) Ledford, H. Alternative CRISPR System Could Improve Genome Editing. *Nature* **2015**, *526*, 17–17.
- (105) Ran, F. A.; Cong, L.; Yan, W. X.; Scott, D. A.; Gootenberg, J. S.; Kriz, A. J.; Zetsche, B.; Shalem, O.; Wu, X.; Makarova, K. S.; *et al.* In Vivo Genome Editing Using Staphylococcus Aureus Cas9. *Nature* **2015**, *520*, 186–191.

- (106) Yin, H.; Song, C.-Q.; Dorkin, J. R.; Zhu, L. J.; Li, Y.; Wu, Q.; Park, A.; Yang, J.; Suresh, S.; Bizhanova, A.; *et al.* Therapeutic Genome Editing by Combined Viral and Non-Viral Delivery of CRISPR System Components in Vivo. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 328–333.
- (107) M., C.; O., H. Cancer Gene Therapy – Key Biological Concepts in the Design of Multifunctional Non-Viral Delivery Systems. In *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*; Martin, F., Ed.; InTech, 2013.
- (108) Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 941–951.
- (109) Harris, J. M.; Chess, R. B. Effect of Pegylation on Pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 214–221.
- (110) Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Jayaraman, M.; Ansell, S. M.; Du, X.; Tam, Y. Y. C.; Lin, P. J.; Chen, S.; Narayananair, J. K.; Rajeev, K. G.; *et al.* Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles. *Mol. Ther. — Nucleic Acids* **2013**, *2*, e139.
- (111) Longmire, M.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Clearance Properties of Nano-Sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats. *Nanomed.* **2008**, *3*, 703–717.
- (112) Minami, K.; Okamoto, K.; Doi, K.; Harano, K.; Noiri, E.; Nakamura, E. siRNA Delivery Targeting to the Lung via Agglutination-Induced Accumulation and Clearance of Cationic Tetraamino Fullerene. *Sci. Rep.* **2014**, *4*.
- (113) Sykes, E. A.; Chen, J.; Zheng, G.; Chan, W. C. W. Investigating the Impact of Nanoparticle Size on Active and Passive Tumor Targeting Efficiency. *ACS Nano* **2014**, *8*, 5696–5706.
- (114) Tang, L.; Yang, X.; Yin, Q.; Cai, K.; Wang, H.; Chaudhury, I.; Yao, C.; Zhou, Q.; Kwon, M.; Hartman, J. A.; *et al.* Investigating the Optimal Size of Anticancer Nanomedicine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 15344–15349.
- (115) Richmond, A.; Su, Y. Mouse Xenograft Models vs GEM Models for Human Cancer Therapeutics. *Dis. Model. Mech.* **2008**, *1*, 78–82.

- (116) Liu, H.; Patel, M. R.; Prescher, J. A.; Patsialou, A.; Qian, D.; Lin, J.; Wen, S.; Chang, Y.-F.; Bachmann, M. H.; Shimono, Y.; *et al.* Cancer Stem Cells from Human Breast Tumors Are Involved in Spontaneous Metastases in Orthotopic Mouse Models. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 18115–18120.
- (117) Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 505–515.
- (118) Bertrand, N.; Wu, J.; Xu, X.; Kamaly, N.; Farokhzad, O. C. Cancer Nanotechnology: The Impact of Passive and Active Targeting in the Era of Modern Cancer Biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 2–25.
- (119) Barua, S.; Mitragotri, S. Challenges Associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects. *Nano Today* **2014**, *9*, 223–243.
- (120) Fröhlich, E. The Role of Surface Charge in Cellular Uptake and Cytotoxicity of Medical Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 5577–5591.
- (121) Yuan, Y.-Y.; Mao, C.-Q.; Du, X.-J.; Du, J.-Z.; Wang, F.; Wang, J. Surface Charge Switchable Nanoparticles Based on Zwitterionic Polymer for Enhanced Drug Delivery to Tumor. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 5476–5480.
- (122) Li, J.; Yu, X.; Wang, Y.; Yuan, Y.; Xiao, H.; Cheng, D.; Shuai, X. A Reduction and pH Dual-Sensitive Polymeric Vector for Long-Circulating and Tumor-Targeted siRNA Delivery. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 8217–8224.
- (123) Le Roy, C.; Wrana, J. L. Clathrin- and Non-Clathrin-Mediated Endocytic Regulation of Cell Signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 112–126.
- (124) Gilleron, J.; Querbes, W.; Zeigerer, A.; Borodovsky, A.; Marsico, G.; Schubert, U.; Manygoats, K.; Seifert, S.; Andree, C.; Stöter, M.; *et al.* Image-Based Analysis of Lipid Nanoparticle-Mediated siRNA Delivery, Intracellular Trafficking and Endosomal Escape. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 638–646.
- (125) Sahay, G.; Alakhova, D. Y.; Kabanov, A. V. Endocytosis of Nanomedicines. *J. Controlled Release* **2010**, *145*, 182–195.
- (126) Bareford, L. M.; Swaan, P. W. Endocytic Mechanisms for Targeted Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 748–758.

- (127) Jayaraman, M.; Ansell, S. M.; Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Chen, J.; Du, X.; Butler, D.; Eltepu, L.; Matsuda, S.; Narayananair, J. K.; *et al.* Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8529–8533.
- (128) Paliwal, S. R.; Paliwal, R.; Vyas, S. P. A Review of Mechanistic Insight and Application of pH-Sensitive Liposomes in Drug Delivery. *Drug Deliv.* **2014**, 1–12.
- (129) Zhang, Y.; Satterlee, A.; Huang, L. In Vivo Gene Delivery by Nonviral Vectors: Overcoming Hurdles? *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 1298–1304.
- (130) Hatakeyama, H.; Akita, H.; Harashima, H. The Polyethyleneglycol Dilemma: Advantage and Disadvantage of PEGylation of Liposomes for Systemic Genes and Nucleic Acids Delivery to Tumors. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 892–899.
- (131) Kwon, Y. J. Before and after Endosomal Escape: Roles of Stimuli-Converting siRNA/Polymer Interactions in Determining Gene Silencing Efficiency. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1077–1088.
- (132) Semple, S. C.; Akinc, A.; Chen, J.; Sandhu, A. P.; Mui, B. L.; Cho, C. K.; Sah, D. W. Y.; Stebbing, D.; Crosley, E. J.; Yaworski, E.; *et al.* Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 172–176.
- (133) Hu, Y.; Haynes, M. T.; Wang, Y.; Liu, F.; Huang, L. A Highly Efficient Synthetic Vector: Nonhydrodynamic Delivery of DNA to Hepatocyte Nuclei in Vivo. *ACS Nano* **2013**, *7*, 5376–5384.
- (134) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 36–48.
- (135) Ku, S. H.; Kim, K.; Choi, K.; Kim, S. H.; Kwon, I. C. Tumor-Targeting Multifunctional Nanoparticles for siRNA Delivery: Recent Advances in Cancer Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3*, 1182–1193.
- (136) Bazak, R.; Houri, M.; Achy, S. E.; Kamel, S.; Refaat, T. Cancer Active Targeting by Nanoparticles: A Comprehensive Review of Literature. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2014**, *141*, 769–784.
- (137) Ho, E. A.; Osooly, M.; Strutt, D.; Masin, D.; Yang, Y.; Yan, H.; Bally, M. Characterization of Long-Circulating Cationic Nanoparticle Formulations Consisting of a

Two-Stage PEGylation Step for the Delivery of siRNA in a Breast Cancer Tumor Model. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 227–236.

- (138) Zhang, Y.; Pelet, J. M.; Heller, D. A.; Dong, Y.; Chen, D.; Gu, Z.; Joseph, B. J.; Wallas, J.; Anderson, D. G. Lipid-Modified Aminoglycoside Derivatives for In Vivo siRNA Delivery. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 4641–4645.
- (139) Chen, W. C.; May, J. P.; Li, S.-D. Immune Responses of Therapeutic Lipid Nanoparticles. *Nanotechnol. Rev.* **2013**, *2*, 201–213.
- (140) Knudsen, K. B.; Northeved, H.; Kumar EK, P.; Permin, A.; Gjetting, T.; Andresen, T. L.; Larsen, S.; Wegener, K. M.; Lykkesfeldt, J.; Jantzen, K.; *et al.* In Vivo Toxicity of Cationic Micelles and Liposomes. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2015**, *11*, 467–477.
- (141) Love, K. T.; Mahon, K. P.; Levins, C. G.; Whitehead, K. A.; Querbes, W.; Dorkin, J. R.; Qin, J.; Cantley, W.; Qin, L. L.; Racie, T.; *et al.* Lipid-like Materials for Low-Dose, in Vivo Gene Silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 1864–1869.
- (142) Maier, M. A.; Jayaraman, M.; Matsuda, S.; Liu, J.; Barros, S.; Querbes, W.; Tam, Y. K.; Ansell, S. M.; Kumar, V.; Qin, J.; *et al.* Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 1570–1578.
- (143) Whitehead, K. A.; Dorkin, J. R.; Vegas, A. J.; Chang, P. H.; Veiseh, O.; Matthews, J.; Fenton, O. S.; Zhang, Y.; Olejnik, K. T.; Yesilyurt, V.; *et al.* Degradable Lipid Nanoparticles with Predictable in Vivo siRNA Delivery Activity. *Nat. Commun.* **2014**, *5*.
- (144) Morille, M.; Montier, T.; Legras, P.; Carmoy, N.; Brodin, P.; Pitard, B.; Benoît, J.-P.; Passirani, C. Long-Circulating DNA Lipid Nanocapsules as New Vector for Passive Tumor Targeting. *Biomaterials* **2010**, *31*, 321–329.
- (145) Yagi, N.; Manabe, I.; Tottori, T.; Ishihara, A.; Ogata, F.; Kim, J. H.; Nishimura, S.; Fujiu, K.; Oishi, Y.; Itaka, K.; *et al.* A Nanoparticle System Specifically Designed to Deliver Short Interfering RNA Inhibits Tumor Growth In Vivo. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 6531–6538.
- (146) Belliveau, N. M.; Huft, J.; Lin, P. J.; Chen, S.; Leung, A. K.; Leaver, T. J.; Wild, A. W.; Lee, J. B.; Taylor, R. J.; Tam, Y. K.; *et al.* Microfluidic Synthesis of Highly Potent

Limit-Size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of siRNA. *Mol. Ther. — Nucleic Acids* **2012**, *1*, e37.

- (147) Chen, D.; Love, K. T.; Chen, Y.; Eltoukhy, A. A.; Kastrup, C.; Sahay, G.; Jeon, A.; Dong, Y.; Whitehead, K. A.; Anderson, D. G. Rapid Discovery of Potent siRNA-Containing Lipid Nanoparticles Enabled by Controlled Microfluidic Formulation. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6948–6951.
- (148) Walsh, C.; Ou, K.; Belliveau, N.; Leaver, T.; Wild, A.; Huft, J.; Lin, P.; Chen, S.; Leung, A.; Lee, J.; *et al.* Microfluidic-Based Manufacture of siRNA-Lipid Nanoparticles for Therapeutic Applications. In *Drug Delivery System*; Jain, K. K., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York, 2014; pp. 109–120.
- (149) Leung, A. K. K.; Hafez, I. M.; Baoukina, S.; Belliveau, N. M.; Zhigaltsev, I. V.; Afshinmanesh, E.; Tielemans, D. P.; Hansen, C. L.; Hope, M. J.; Cullis, P. R. Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 18440–18450.
- (150) Kundu, P. P.; Sharma, V. Synthetic Polymeric Vectors in Gene Therapy. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2008**, *12*, 89–102.
- (151) Wiseman, J. W.; Goddard, C. A.; McLelland, D.; Colledge, W. H. A Comparison of Linear and Branched Polyethylenimine (PEI) with DCChol/DOPE Liposomes for Gene Delivery to Epithelial Cells in Vitro and in Vivo. *Gene Ther.* **2003**, *10*, 1654–1662.
- (152) Yin, H.; Kanasty, R. L.; Eltoukhy, A. A.; Vegas, A. J.; Dorkin, J. R.; Anderson, D. G. Non-Viral Vectors for Gene-Based Therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 541–555.
- (153) Xu, X.; Wu, J.; Liu, Y.; Yu, M.; Zhao, L.; Zhu, X.; Bhasin, S.; Li, Q.; Ha, E.; Shi, J.; *et al.* Ultra-pH-Responsive and Tumor-Penetrating Nanoplatform for Targeted siRNA Delivery with Robust Anti-Cancer Efficacy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, n/a – n/a.
- (154) Hong, B. J.; Chipre, A. J.; Nguyen, S. T. Acid-Degradable Polymer-Caged Lipoplex (PCL) Platform for siRNA Delivery: Facile Cellular Triggered Release of siRNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 17655–17658.
- (155) Hao, J.; Kos, P.; Zhou, K.; Miller, J. B.; Xue, L.; Yan, Y.; Xiong, H.; Elkassih, S.; Siegwart, D. J. Rapid Synthesis of a Lipocationic Polyester Library via Ring-Opening

Polymerization of Functional Valerolactones for Efficacious siRNA Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9206–9209.

- (156) Tzeng, S. Y.; Green, J. J. Subtle Changes to Polymer Structure and Degradation Mechanism Enable Highly Effective Nanoparticles for siRNA and DNA Delivery to Human Brain Cancer. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 468–480.
- (157) Christie, R. J.; Miyata, K.; Matsumoto, Y.; Nomoto, T.; Menasco, D.; Lai, T. C.; Pennisi, M.; Osada, K.; Fukushima, S.; Nishiyama, N.; *et al.* Effect of Polymer Structure on Micelles Formed between siRNA and Cationic Block Copolymer Comprising Thiols and Amidines. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3174–3185.
- (158) Pack, D. W.; Hoffman, A. S.; Pun, S.; Stayton, P. S. Design and Development of Polymers for Gene Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 581–593.
- (159) Qiu, L. Y.; Bae, Y. H. Polymer Architecture and Drug Delivery. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 1–30.
- (160) Kamaly, N.; Xiao, Z.; Valencia, P. M.; Radovic-Moreno, A. F.; Farokhzad, O. C. Targeted Polymeric Therapeutic Nanoparticles: Design, Development and Clinical Translation. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2971–3010.
- (161) Hadinoto, K.; Sundaresan, A.; Cheow, W. S. Lipid–polymer Hybrid Nanoparticles as a New Generation Therapeutic Delivery Platform: A Review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 427–443.
- (162) Zhang, L.; Chan, J. M.; Gu, F. X.; Rhee, J.-W.; Wang, A. Z.; Radovic-Moreno, A. F.; Alexis, F.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Self-Assembled Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform. *ACS Nano* **2008**, *2*, 1696–1702.
- (163) Shi, J.; Xiao, Z.; Votruba, A. R.; Vilos, C.; Farokhzad, O. C. Differentially Charged Hollow Core/Shell Lipid–Polymer–Lipid Hybrid Nanoparticles for Small Interfering RNA Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7027–7031.
- (164) Zhou, K.; Nguyen, L. H.; Miller, J. B.; Yan, Y.; Kos, P.; Xiong, H.; Li, L.; Hao, J.; Minnig, J. T.; Zhu, H.; *et al.* Modular Degradable Dendrimers Enable Small RNAs to Extend Survival in an Aggressive Liver Cancer Model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 520–525.
- (165) Tan, A.; Rajadas, J.; Seifalian, A. M. Exosomes as Nano-Theranostic Delivery Platforms for Gene Therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 357–367.

- (166) EL Andaloussi, S.; Mäger, I.; Breakefield, X. O.; Wood, M. J. A. Extracellular Vesicles: Biology and Emerging Therapeutic Opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 347–357.
- (167) EL Andaloussi, S.; Lakhal, S.; Mäger, I.; Wood, M. J. A. Exosomes for Targeted siRNA Delivery across Biological Barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 391–397.
- (168) El-Andaloussi, S.; Lee, Y.; Lakhal-Littleton, S.; Li, J.; Seow, Y.; Gardiner, C.; Alvarez-Erviti, L.; Sargent, I. L.; Wood, M. J. A. Exosome-Mediated Delivery of siRNA in Vitro and in Vivo. *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 2112–2126.
- (169) Liu, Y.; Li, D.; Liu, Z.; Zhou, Y.; Chu, D.; Li, X.; Jiang, X.; Hou, D.; Chen, X.; Chen, Y.; *et al.* Targeted Exosome-Mediated Delivery of Opioid Receptor Mu siRNA for the Treatment of Morphine Relapse. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17543.
- (170) Alvarez-Erviti, L.; Seow, Y.; Yin, H.; Betts, C.; Lakhal, S.; Wood, M. J. A. Delivery of siRNA to the Mouse Brain by Systemic Injection of Targeted Exosomes. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 341–345.
- (171) Gao, Y.; Wang, Z.-Y.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Huo, H.; Wang, T.; Jiang, T.; Wang, S. RVG-Peptide-Linked Trimethylated Chitosan for Delivery of siRNA to the Brain. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1010–1018.
- (172) Wolfrum, C.; Shi, S.; Jayaprakash, K. N.; Jayaraman, M.; Wang, G.; Pandey, R. K.; Rajeev, K. G.; Nakayama, T.; Charrise, K.; Ndungo, E. M.; *et al.* Mechanisms and Optimization of in Vivo Delivery of Lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1149–1157.
- (173) Rozema, D. B.; Lewis, D. L.; Wakefield, D. H.; Wong, S. C.; Klein, J. J.; Roesch, P. L.; Bertin, S. L.; Reppen, T. W.; Chu, Q.; Blokhin, A. V.; *et al.* Dynamic PolyConjugates for Targeted in Vivo Delivery of siRNA to Hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 12982–12987.
- (174) Järver, P.; Coursindel, T.; Andaloussi, S. E.; Godfrey, C.; Wood, M. J.; Gait, M. J. Peptide-Mediated Cell and In Vivo Delivery of Antisense Oligonucleotides and siRNA. *Mol. Ther. — Nucleic Acids* **2012**, *1*, e27.

- (175) Lu, H.; Wang, D.; Kazane, S.; Javahishvili, T.; Tian, F.; Song, F.; Sellers, A.; Barnett, B.; Schultz, P. G. Site-Specific Antibody–Polymer Conjugates for siRNA Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13885–13891.
- (176) Chu, T. C.; Twu, K. Y.; Ellington, A. D.; Levy, M. Aptamer Mediated siRNA Delivery. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e73–e73.
- (177) Schneider, B.; Grote, M.; John, M.; Haas, A.; Bramlage, B.; Ickenstein, L. M.; Jahn-Hofmann, K.; Bauss, F.; Cheng, W.; Croasdale, R.; *et al.* Targeted siRNA Delivery and mRNA Knockdown Mediated by Bispecific Digoxigenin-Binding Antibodies. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2012**, *1*, e46.
- (178) Varkouhi, A. K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H. J. Endosomal Escape Pathways for Delivery of Biologicals. *J. Controlled Release* **2011**, *151*, 220–228.
- (179) Lin, A. E.-J.; Guttmann, J. A. Hijacking the Endocytic Machinery by Microbial Pathogens. *Protoplasma* **2010**, *244*, 75–90.
- (180) Andrianov, A. K. *Polyphosphazenes for Biomedical Applications*; John Wiley & Sons, 2009.
- (181) Mudhakir, D.; Harashima, H. Learning from the Viral Journey: How to Enter Cells and How to Overcome Intracellular Barriers to Reach the Nucleus. *AAPS J.* **2009**, *11*.
- (182) Drummond, D. C.; Zignani, M.; Leroux, J.-C. Current Status of pH-Sensitive Liposomes in Drug Delivery. *Prog. Lipid Res.* **2000**, *39*, 409–460.
- (183) Yoshizaki, Y.; Yuba, E.; Sakaguchi, N.; Koiwai, K.; Harada, A.; Kono, K. Potentiation of pH-Sensitive Polymer-Modified Liposomes with Cationic Lipid Inclusion as Antigen Delivery Carriers for Cancer Immunotherapy. *Biomaterials* **2014**, *35*, 8186–8196.
- (184) Jiang, T.; Zhang, Z.; Zhang, Y.; Lv, H.; Zhou, J.; Li, C.; Hou, L.; Zhang, Q. Dual-Functional Liposomes Based on pH-Responsive Cell-Penetrating Peptide and Hyaluronic Acid for Tumor-Targeted Anticancer Drug Delivery. *Biomaterials* **2012**, *33*, 9246–9258.
- (185) Sahay, G.; Querbes, W.; Alabi, C.; Eltoukhy, A.; Sarkar, S.; Zurenko, C.; Karagiannis, E.; Love, K.; Chen, D.; Zoncu, R.; *et al.* Efficiency of siRNA Delivery by Lipid Nanoparticles Is Limited by Endocytic Recycling. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 653–658.

- (186) Stewart, M. P.; Lorenz, A.; Dahlman, J.; Sahay, G. Challenges in Carrier-Mediated Intracellular Delivery: Moving beyond Endosomal Barriers. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2016**, *8*, 465–478.
- (187) Wittrup, A.; Ai, A.; Liu, X.; Hamar, P.; Trifonova, R.; Charisse, K.; Manoharan, M.; Kirchhausen, T.; Lieberman, J. Visualizing Lipid-Formulated siRNA Release from Endosomes and Target Gene Knockdown. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 870–876.
- (188) Alabi, C. A.; Love, K. T.; Sahay, G.; Stutzman, T.; Young, W. T.; Langer, R.; Anderson, D. G. FRET-Labeled siRNA Probes for Tracking Assembly and Disassembly of siRNA Nanocomplexes. *ACS Nano* **2012**, *6*, 6133–6141.
- (189) Akinc, A.; Thomas, M.; Klibanov, A. M.; Langer, R. Exploring Polyethylenimine-Mediated DNA Transfection and the Proton Sponge Hypothesis. *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 657–663.
- (190) Benjaminsen, R. V.; Mattebjerg, M. A.; Henriksen, J. R.; Moghimi, S. M.; Andresen, T. L. The Possible “Proton Sponge” Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal pH. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2012**.
- (191) Rehman, Z. ur; Hoekstra, D.; Zuhorn, I. S. Mechanism of Polyplex- and Lipoplex-Mediated Delivery of Nucleic Acids: Real-Time Visualization of Transient Membrane Destabilization without Endosomal Lysis. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3767–3777.
- (192) Mochizuki, S.; Kanegae, N.; Nishina, K.; Kamikawa, Y.; Koiwai, K.; Masunaga, H.; Sakurai, K. The Role of the Helper Lipid Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) for DNA Transfection Cooperating with a Cationic Lipid Bearing Ethylenediamine. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**.
- (193) On the Mechanism Whereby Cationic Lipids Promote Intracellular Delivery of Polynucleic Acids. *Gene Ther.* **2001**, *8*.
- (194) Li, B.; Luo, X.; Deng, B.; Wang, J.; McComb, D. W.; Shi, Y.; Gaensler, K. M. L.; Tan, X.; Dunn, A. L.; Kerlin, B. A.; *et al.* An Orthogonal Array Optimization of Lipid-like Nanoparticles for mRNA Delivery in Vivo. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 8099–8107.
- (195) Dong, Y.; Eltoukhy, A. A.; Alabi, C. A.; Khan, O. F.; Veiseh, O.; Dorkin, J. R.; Sirirunguang, S.; Yin, H.; Tang, B. C.; Pelet, J. M.; *et al.* Lipid-Like Nanomaterials for

Simultaneous Gene Expression and Silencing In Vivo. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3*, 1392–1397.

- (196) Sato, Y.; Hatakeyama, H.; Sakurai, Y.; Hyodo, M.; Akita, H.; Harashima, H. A pH-Sensitive Cationic Lipid Facilitates the Delivery of Liposomal siRNA and Gene Silencing Activity in Vitro and in Vivo. *J. Controlled Release* **2012**, *163*, 267–276.
- (197) Shin, J.; Shum, P.; Grey, J.; Fujiwara, S.-I.; Malhotra, G. S.; González-Bonet, A.; Hyun, S.-H.; Moase, E.; Allen, T. M.; Thompson, D. H. Acid-Labile mPEG-Vinyl Ether-1,2-Dioleylglycerol Lipids with Tunable pH Sensitivity: Synthesis and Structural Effects on Hydrolysis Rates, DOPE Liposome Release Performance, and Pharmacokinetics. *Mol. Pharm.* **2012**.
- (198) Chen, H.; Zhang, H.; Thor, D.; Rahimian, R.; Guo, X. Novel pH-Sensitive Cationic Lipids with Linear Ortho Ester Linkers for Gene Delivery. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *52*, 159–172.
- (199) Kim, H.-K.; Van den Bossche, J.; Hyun, S.-H.; Thompson, D. H. Acid-Triggered Release via dePEGylation of Fusogenic Liposomes Mediated by Heterobifunctional Phenyl-Substituted Vinyl Ethers with Tunable pH-Sensitivity. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 2071–2077.
- (200) Hatakeyama, H.; Akita, H.; Harashima, H. A Multifunctional Envelope Type Nano Device (MEND) for Gene Delivery to Tumours Based on the EPR Effect: A Strategy for Overcoming the PEG Dilemma. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 152–160.
- (201) Shin, J.; Shum, P.; Grey, J.; Fujiwara, S.; Malhotra, G. S.; González-Bonet, A.; Hyun, S.-H.; Moase, E.; Allen, T. M.; Thompson, D. H. Acid-Labile mPEG–Vinyl Ether–1,2-Dioleylglycerol Lipids with Tunable pH Sensitivity: Synthesis and Structural Effects on Hydrolysis Rates, DOPE Liposome Release Performance, and Pharmacokinetics. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 3266–3276.
- (202) Gao, W.; Chan, J. M.; Farokhzad, O. C. pH-Responsive Nanoparticles for Drug Delivery. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 1913–1920.
- (203) Choy, C. J.; Geruntho, J. J.; Davis, A. L.; Berkman, C. E. Tunable pH-Sensitive Linker for Controlled Release. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 824–830.

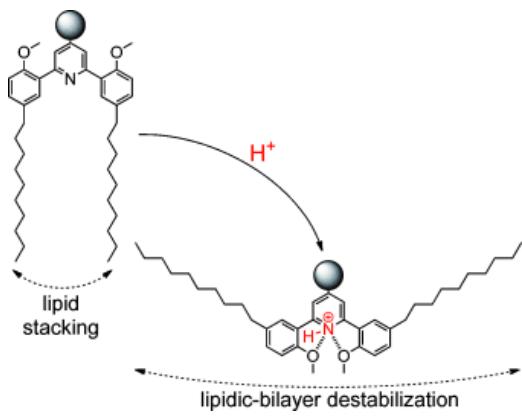
- (204) Huang, Z.; Guo, X.; Li, W.; MacKay, J. A.; Szoka, F. C. Acid-Triggered Transformation of Diortho Ester Phosphocholine Liposome. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 60–61.
- (205) Oumzil, K.; Khiati, S.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. Reduction-Triggered Delivery Using Nucleoside-Lipid Based Carriers Possessing a Cleavable PEG Coating. *J. Controlled Release* **2011**, *151*, 123–130.
- (206) Akita, H.; Noguchi, Y.; Hatakeyama, H.; Sato, Y.; Tange, K.; Nakai, Y.; Harashima, H. Molecular Tuning of a Vitamin E-Scaffold pH-Sensitive and Reductive Cleavable Lipid-like Material for Accelerated in Vivo Hepatic siRNA Delivery. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, *1*, 834–844.
- (207) Copolovici, D. M.; Langel, K.; Eriste, E.; Langel, Ü. Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications. *ACS Nano* **2014**, *8*, 1972–1994.
- (208) Li, M.; Tao, Y.; Shu, Y.; LaRochelle, J. R.; Steinauer, A.; Thompson, D.; Schepartz, A.; Chen, Z.-Y.; Liu, D. R. Discovery and Characterization of a Peptide That Enhances Endosomal Escape of Delivered Proteins in Vitro and in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14084–14093.
- (209) Brooks, H.; Lebleu, B.; Vivès, E. Tat Peptide-Mediated Cellular Delivery: Back to Basics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 559–577.
- (210) Torchilin, V. P. Tat Peptide-Mediated Intracellular Delivery of Pharmaceutical Nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 548–558.
- (211) Heitz, F.; Morris, M. C.; Divita, G. Twenty Years of Cell-Penetrating Peptides: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 195–206.
- (212) Stegmann, T. Membrane Fusion Mechanisms: The Influenza Hemagglutinin Paradigm and Its Implications for Intracellular Fusion. *Traffic* **2000**, *1*, 598–604.
- (213) Li, W.; Nicol, F.; Szoka Jr., F. C. GALA: A Designed Synthetic pH-Responsive Amphipathic Peptide with Applications in Drug and Gene Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 967–985.
- (214) Hatakeyama, H.; Ito, E.; Akita, H.; Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Futaki, S.; Harashima, H. A pH-Sensitive Fusogenic Peptide Facilitates Endosomal Escape and Greatly Enhances

the Gene Silencing of siRNA-Containing Nanoparticles in Vitro and in Vivo. *J. Controlled Release* **2009**, *139*, 127–132.

- (215) Torchilin, V. P. Cell Penetrating Peptide-Modified Pharmaceutical Nanocarriers for Intracellular Drug and Gene Delivery. *Pept. Sci.* **2008**, *90*, 604–610.
- (216) Yuba, E.; Harada, A.; Sakanishi, Y.; Kono, K. Carboxylated Hyperbranched Poly(glycidol)s for Preparation of pH-Sensitive Liposomes. *J. Controlled Release* **2011**, *149*, 72–80.
- (217) Doura, T.; Yamada, M.; Teranishi, R.; Yamamoto, Y.; Sugimoto, T.; Yuba, E.; Harada, A.; Kono, K. PAMAM Dendron Lipid Assemblies That Undergo Structural Transition in Response to Weakly Acidic pH and Their Cytoplasmic Delivery Capability. *Langmuir* **2015**, *31*, 5105–5114.
- (218) Yuba, E.; Tajima, N.; Yoshizaki, Y.; Harada, A.; Hayashi, H.; Kono, K. Dextran Derivative-Based pH-Sensitive Liposomes for Cancer Immunotherapy. *Biomaterials* **2014**, *35*, 3091–3101.
- (219) Selbo, P. K.; Weyergang, A.; Høgset, A.; Norum, O.-J.; Berstad, M. B.; Vikdal, M.; Berg, K. Photochemical Internalization Provides Time- and Space-Controlled Endolysosomal Escape of Therapeutic Molecules. *J. Controlled Release* **2010**, *148*, 2–12.
- (220) Oliveira, S.; Hogset, A.; Storm, G. Delivery of siRNA to the Target Cell Cytoplasm: Photochemical Internalization Facilitates Endosomal Escape and Improves Silencing Efficiency, In Vitro and In Vivo. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 3686–3697.
- (221) Leblond, J.; Gao, H.; Petitjean, A.; Leroux, J.-C. pH-Responsive Molecular Tweezers. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8544–8545.
- (222) Lee, R. J.; Wang, S.; Turk, M. J.; Low, P. S. The Effects of pH and Intraliposomal Buffer Strength on the Rate of Liposome Content Release and Intracellular Drug Delivery. *Biosci. Rep.* **1998**, *18*, 69–78.

Chapitre 2 : Lipides Bascules : d'un Changement Conformationnel à la Délivrance Intracytoplasmique pH-sensible de Composés Hydrophiles

« *Switchable Lipids: Conformational Change for Fast pH-Triggered Cytoplasmic Delivery* »



Switch it on! The integration of pH-sensitive switchable lipids (see picture) into poly(ethylene glycol)-coated liposome formulations enabled the efficient cytoplasmic delivery of polar compounds through an endosomal-escape mechanism. The liposome formulations containing the switchable lipids were stable at pH 7.4 and upon storage but instantly destabilized at endosomal pH values (pH 5–5.5).

Abstract : We report the use of switchable lipids to improve the endosomal escape and cytosolic delivery of cell-impermeable compounds. The system is based on a conformational reorganization of the lipid structure upon acidification, as demonstrated by NMR spectroscopic studies. When incorporated in a liposome formulation, the switchable lipids triggered bilayer destabilization through fusion even in the presence of poly(ethylene glycol). We observed 88 % release of sulforhodamine B in 15 min at pH 5, and the liposome formulations demonstrated high stability at pH 7.4 for several months. By using sulforhodamine B as a model of a highly polar drug, we demonstrated fast cytosolic delivery mediated by endosomal escape in HeLa cells, and no toxicity.

Publié comme article en Juillet 2015 : W. Viricel, A. Mbarek, J. Leblond, *Switchable Lipids: Conformational Change for Fast pH-Triggered Cytoplasmic Delivery*, Angew. Chem. Int. Ed. 54 (2015) 12743–12747. Reproduit avec la permission de John Wiley & Sons.

A Journal of the Gesellschaft Deutscher Chemiker

Angewandte

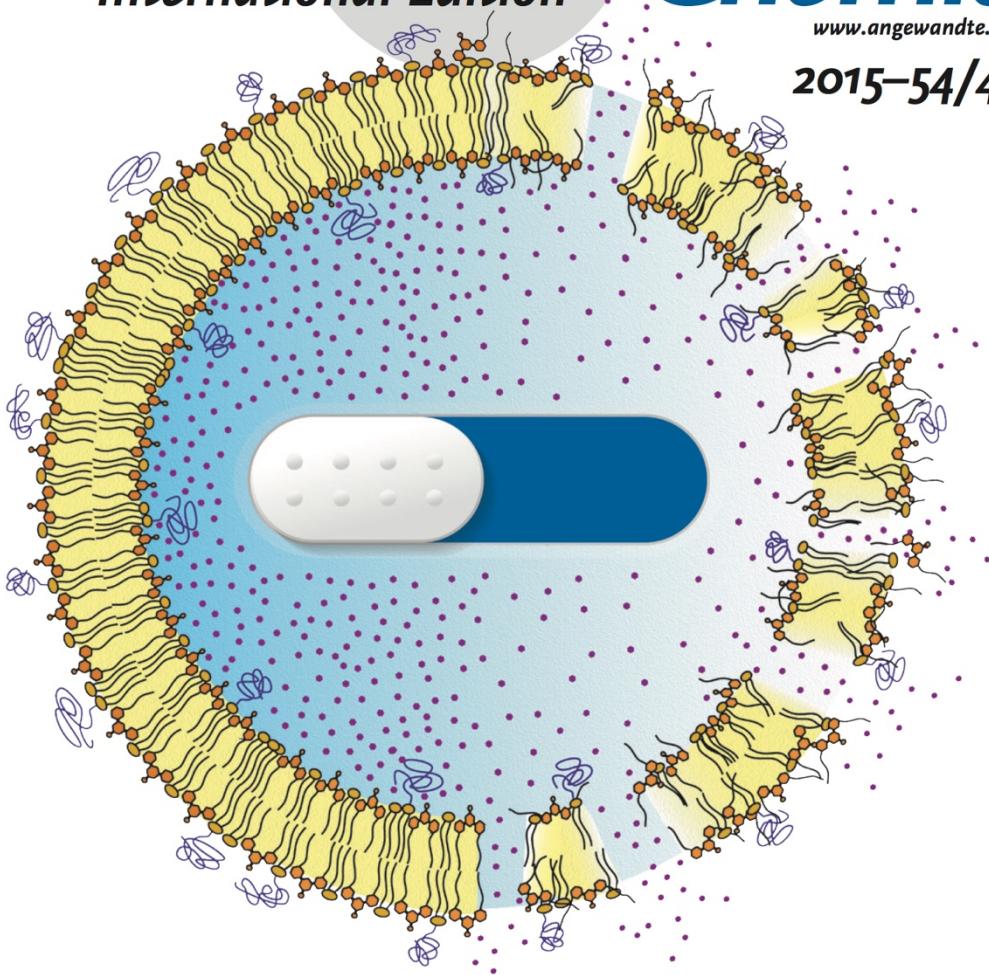
GDCh

Chemie

International Edition

[www.angewandte.org](http://www angewandte org)

2015-54/43



Printable Bioelectronics

Review by L. Torsi et al.

Metalloenzyme-Like Zeolites

Minireview by Y. Román-Leshkov and S. Van de Vyver

Natural 1,3-Dipolar Cycloadditions

Highlight by C. Hertweck and M. Baunach

ACIEFS 54 (43) 12517–12824 (2015) · ISSN 1433-7851 · Vol. 54 · No. 43

WILEY-VCH

2.1 Introduction

Precise intracellular delivery is essential for the bioactivity of many classes of bioactive macromolecules, for example, anticancer drugs that must overcome cancer resistance mechanisms or siRNA that must reach the cytosol of target cells.^[1] Smart delivery systems capitalize on local changes in the physiological environment to provide stimuli-responsive properties and targeted drug delivery.^[2] In particular, pH-sensitive liposomes improve the cytosolic delivery of drugs by supporting endosomal escape after endocytosis,^[3] which to date remains an obstacle to DNA delivery.^[4]

It is possible to introduce pH sensitivity by including hydrolyzable linkages within the lipid structure.^[5] The main difficulty with this strategy is to achieve degradation within the time scale of endosomal maturation, which is under 1 h.^[3c, 6] Over the past decade, this issue has fostered the development of fast-response escape strategies, including the addition of fusogenic peptides,^[7] titratable polyanions,^[8] or charge-switching lipids^[9] to liposomes. Unfortunately, such strategies often fail in the presence of poly(ethylene glycol) (PEG), which is necessary to improve circulation times.^[2b, 10] Limited approaches consolidate fast-responding pH sensitivity and PEGylation^[8c, 11] and thus show much promise for translation to the clinic.^[12]

2.2 Experimental section

2.2.1 Materials and general methods

All solvents and reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada) and Oakwood Chemical (West Columbia, SC, USA). Anhydrous tetrahydrofuran (THF) and dimethylformamide (DMF) were obtained from a Pure Solv PS-400-6 System (Innovative Technology, Amesbury, MA, USA). DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) were supplied by Avanti® Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). DSPE-PEG₂₀₀₀ (N-(carbonylmethoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, sodium salt) was supplied by NOF America Corporation (White Plains, NY, USA). Sephadex G-50 (Medium) was purchased from GE Healthcare (Baie d'Urfe, QC, Canada). All solvents and reagents were of analytical grade and were used as received. All liquid nuclear magnetic resonance spectra were recorded on a Varian 400 WB spectrometer, using residual solvent peak for calibration. High-resolution mass spectroscopy analysis has been performed by the Regional Center for Mass Spectrometry of the University of Montréal. Column chromatography was performed on SiliaFlash F60 40-63 µm (230-400 mesh) silica gel (Silicycle, Quebec City, QC, Canada). Reactions were monitored by thin-layer chromatography using precoated silica gel or LC-MS (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada). All buffer preparations were prepared using the Buffer Calculator designed by Rob Beynon (available online at <http://www.liv.ac.uk/buffers>). All pH adjustments were made using a 9110DJWP double junction microelectrode (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and a pH-211 pH-meter (Hanaa®, Woonsocket, RI, USA). Human Red Blood Cells (HRBC) were obtained from Innovative Research™ (Novi, MI, USA). HeLa cells (ATCC® CCL-2™) were kindly provided by Pr. Marc Servant (University of Montréal) and were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC® 30-2003™) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 100 units/mL Penicillin-Streptomycin (Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Cells were incubated at 37°C under a water-saturated atmosphere supplemented with 5% CO₂.

2.2.2 Synthesis of the pH-sensitive switchable lipids

2.2.2.1 Synthesis of compound 11

In a 50 mL round-bottom flask was dissolved 2,6-dibromo-4-(methoxycarbonyl)pyridine (996 mg / 3.38 mmol) and 5-bromo-2-methoxyphenylboronic acid

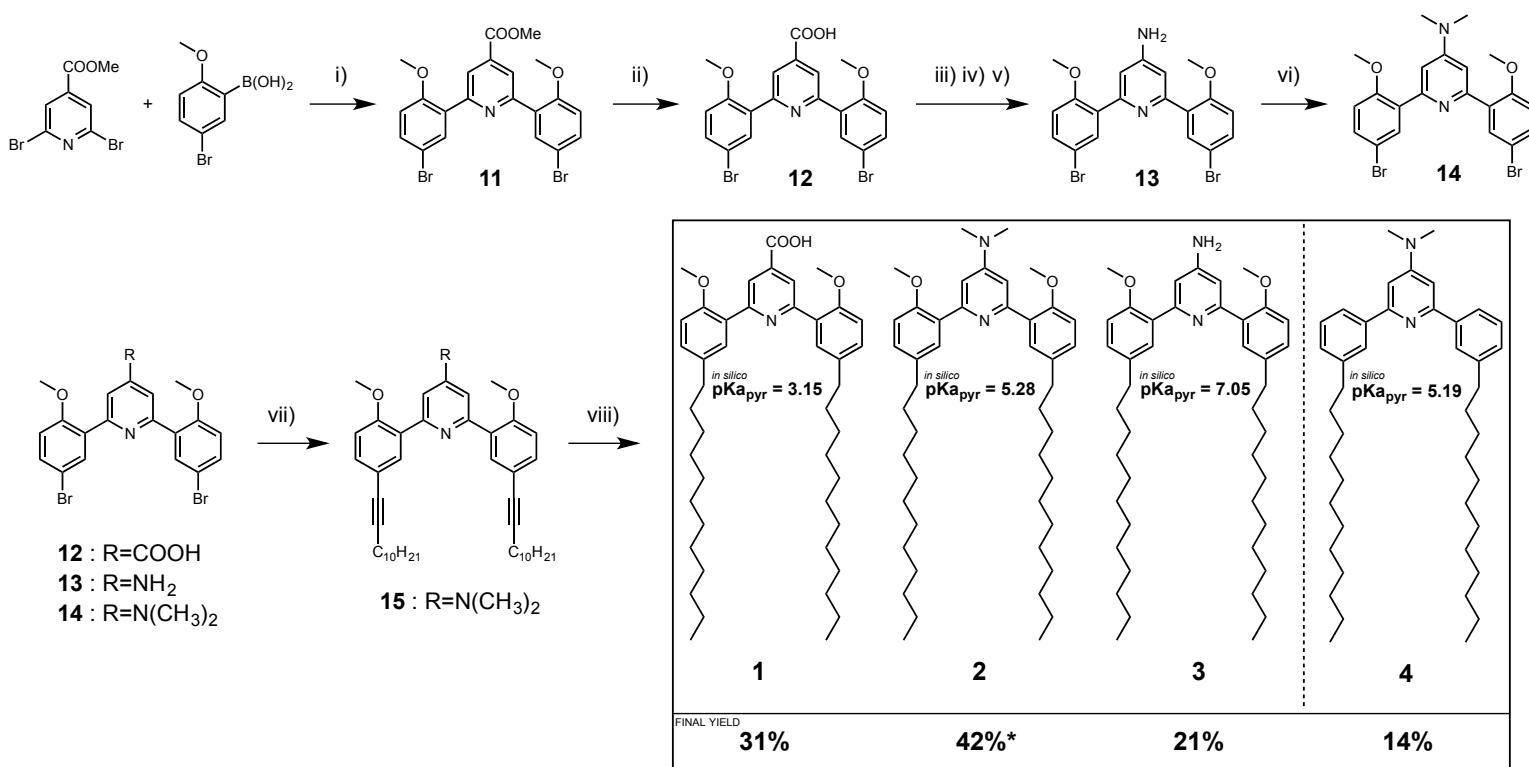
(1638 mg / 7.09 mmol) in 12 mL of THF. Na₂CO₃ (1074 mg / 10.13 mmol), previously dissolved in 6 mL of distilled water, was added and the flask was purged three times with argon. Pd(PPh₃)₄ (23.4 mg / 0.02 mmol) was added and the flask was purged three times again. The mixture was stirred 72 hours at 60°C. The reaction was monitored by LC-MS until entire consumption of the starting materials. The mixture was then diluted with water and extracted 3 times with dichloromethane (DCM). The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. Trituration with 10 mL of ethanol/DCM (9:1) afforded compound **11** as a white solid (1040 mg / 61 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.89 (s, 6H), 3.99 (s, 3H), 6.90 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.48 (dd, J₁ = 9.0 Hz, J₂ = 2.7 Hz, 2H), 8.00 (dd, J₁ = 2.7 Hz, J₂ = 1.2 Hz, 2H), 8.30 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 53.51, 56.78, 114.06, 114.35, 123.64, 131.15, 133.66, 134.69, 155.93, 157.15. Calc [M+H] = 505.95971 ; Exp [M+H] = 505.95922 ; Error = - 0.96 ppm.

2.2.2.2 Synthesis of compound **12**

Compound **11** (405 mg / 0.80 mmol) was dissolved in THF (30 mL) in a 100 mL round-bottom flask. LiOH (134 mg / 3.19 mmol) previously dissolved in 20 mL of distilled water was added and the mixture was stirred 2 hours at room temperature. THF was then removed under vacuum and the mixture was diluted in water, neutralized with HCl 1N and extracted 3 times with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to give compound **12** as a yellow solid (410 mg / quantitative yield). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 3.87 (s, 6H), 7.18 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.61 (dd, J₁ = 8.9 Hz, J₂ = 2.6 Hz, 2H), 7.93 (s, 2H), 8.23 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 56.64, 112.82, 115.07, 122.95, 129.93, 133.24, 133.44, 154.73, 156.69, 166.66. Calc [M+H] = 491.94406 ; Exp [M+H] = 491.94403 ; Error = - 0.06 ppm.

2.2.2.3 Synthesis of compound **13**

Compound **12** (832 mg / 1.69 mmol) was weighted in a 100 mL round-bottom flask purged with argon. 5 mL of anhydrous THF, 20 mL of SOCl₂ and 1 drop of DMF (catalytic) were added, and the mixture was stirred 2 hours at 80°C under reflux. Afterwards, the mixture was evaporated under vacuum to obtain an oily orange crude. 80 mL of a cold saturated solution of NaN₃ in water/acetone (1:1) was added in the flask and the mixture was vigorously stirred 3 hours at room temperature. The mixture was then diluted with water and extracted 3 times with DCM. The slightly yellow organic phase was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum



to obtain the acyl azide intermediate as a waxy yellow crude. 80 mL of toluene was added and the solution was refluxed 1 hour at 120°C to induce the Curtius rearrangement. Then, 20 mL of distilled water and 1 mL of hydrochloric acid 37 % were added and the mixture was refluxed at 65°C overnight. The mixture was evaporated under vacuum, slowly diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and evaporated under high vacuum to afford **13** as a brown solid (640 mg / 81 %). The product was used in the next step without further purification since the purity of the product observed by LC-MS was 90%. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 3.83 (s, 6H), 6.86 (s, 2H), 7.00 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.66 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 54.98, 109.03, 112.23, 113.21, 121.92, 133.00, 154.26, 155.18, 156.26. Calc [M+H] = 462.96513 ; Exp [M+H] = 462.96513 ; Error = 1.85 ppm.

2.2.2.4 Synthesis of compound **14**

Compound **13** (155 mg / 0.33 mmol) was weighted in a 100 mL round-bottom flask and dissolved in 30 mL of anhydrous THF/DMF (1:1). The flask was purged 3 times with argon and cooled with an ice bath. Sodium hydride (60 % dispersion in mineral oil, un-rinsed) was added (60 mg / 1.67 mmol) and the mixture was allowed to stir 10 minutes at 0°C. Iodomethane (237 mg / 1.67 mmol) was added and the mixture was allowed to stir for 10 more minutes at 0°C. The mixture was then refluxed 2 hours at 80°C. The mixture was carefully diluted with water/saturated Na₂CO₃ (1:1) and extracted 5 times with hexane. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (hexane/DCM/AcOEt, slow gradient from 100:0:0 to 20:40:40) to get **14** as a yellow solid (130 mg / 79 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.07 (s, 6H), 3.84 (s, 6H), 6.86 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.93 (s, 2H), 7.42 (dd, J₁ = 8.8 Hz, J₂ = 2.6 Hz, 2H), 7.87 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 39.42, 56.05, 106.83, 113.31, 131.93, 133.87, 154.18, 154.51, 156.11. Calc [M+H] = 490.99643 ; Exp [M+H] = 490.99596 ; Error = 0.96 ppm.

2.2.2.5 Synthesis of compound **15**

Compound **14** (539 mg / 1.09 mmol) was weighted in a 20 mL microwave reaction vial. 1-dodecyne (546 mg / 3.28 mmol) and triphenylphosphine (86 mg / 0.33 mmol) were added. Dried tetra-n-butylammonium fluoride (TBAF) (2004 mg / 7.67 mmol) was added (previously dried under high vacuum from 1.0 M TBAF solution in THF), followed by 3 mL of anhydrous DMF and 3 mL of diisopropylamine (DIPA). The reaction vial was purged 3 times with argon.

PdCl₂(PPh₃)₂ was added (69 mg / 0.10 mmol), the vial was purged 3 times with argon and sealed. The mixture was stirred 16 hours at 80°C. The mixture was then diluted with water and extracted 3 times with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (hexane/AcOEt, gradient from 95:5 to 50:50) to get **15** as a brown oil (550 mg / 76 %). Purity of the product observed in LC-MS was higher than 90%. The product was engaged in the catalytic hydrogenation step without further purification or characterization.

2.2.2.6 Synthesis of compound 2

Compound **15** (550 mg / 0.83 mmol) was dissolved in 50 mL of THF, and the round-bottom flask was purged 3 times with argon. Palladium (10 wt % Pd basis) on activated charcoal (44 mg) was added and the flask was purged 3 times with hydrogen. The mixture was stirred overnight at room temperature under a 1 atm hydrogen pressure. The mixture was then evaporated under vacuum and purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 95:5) to get **2** as a slightly yellow wax (540 mg / 90 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 6H), 1.18-1.37 (m, 36H), 1.62 (quin, J = 7.6 Hz, 4H), 2.60 (t, J = 7.8 Hz, 4H), 3.05 (s, 6H), 3.84 (s, 6H), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.99 (s, 2H), 7.13 (dd, J₁ = 8.5 Hz, J₂ = 2.3 Hz, 2H), 7.62 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 14.11, 22.69, 29.36, 29.63, 31.62, 31.92, 35.12, 39.38, 56.01, 106.65, 111.61, 128.81, 130.59, 131.41, 135.25, 154.31, 155.03, 155.83. Calc [M+H] = 671.55101 ; Exp [M+H] = 671.55061 ; Error = 0.59 ppm.

2.2.2.7 Synthesis of compound 1

Compound **1** was synthesized from compound **12**, following the procedures previously described in sections 1.5 and 1.6. The final product obtained after column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 80:20) was a white solid (108 mg / 50 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD 1:1) δ (ppm) 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 6H), 1.17-1.36 (m, 36H), 1.67 (quin, J = 7.5 Hz, 4H), 2.65 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 3.91 (s, 6H), 7.05 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.26 (dd, J₁ = 8.5 Hz, J₂ = 2.3 Hz, 2H), 7.66 (s, 2H), 8.31 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD 1:1) δ (ppm) 13.34, 22.43, 29.01, 29.40, 31.38, 31.74, 34.76, 55.22, 111.46, 122.73, 130.60, 130.80, 135.25, 155.38, 167.42. Calc [M+H] = 672.49864 ; Exp [M+H] = 672.49646 ; Error = - 3.24 ppm.

2.2.2.8 Synthesis of compound 3

Compound 3 was synthesized from compound 13, following the procedures previously described in sections 1.5 and 1.6. The final product obtained after column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 80:20) was a white solid (140 mg / 42 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 6H), 1.18-1.37 (m, 36H), 1.63 (quin, J = 7.5 Hz, 4H), 2.60 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 3.84 (s, 6H), 6.90 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.04 (s, 2H), 7.14 (dd, J₁ = 8.4 Hz, J₂ = 1.6 Hz, 2H), 7.69 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 14.12, 22.69, 29.43, 29.65, 31.63, 31.93, 35.12, 55.93, 109.44, 111.54, 129.18, 131.28, 135.35, 155.09. Calc [M+H] = 643.51971 ; Exp [M+H] = 643.51923 ; Error = 0.74 ppm.

2.2.2.9 Final purification

Each switchable lipid was purified using a UV/MS Waters Autopurification System before being used in formulation. The preparative column was a Waters SunFireTM C8 19x100 mm (5 μm particle size). Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH/THF 80:20 + 0.1% formic acid. The flow rate was 25 mL/min. Sample solvent was MeOH/THF 90:10. The mobile phase gradient was: 0 min – 15 % B ; 8 min – 95 % B ; 12 min - 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. The final degree of purity of the recovered product after evaporation and freeze-drying was ≥ 98 % by LC-UV/MS.

2.2.3 Synthesis of the negative control switchable lipid (compound 4)

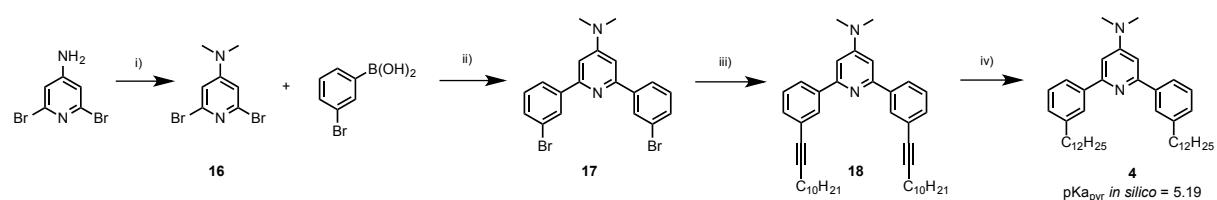


Figure 2.2 - Synthesis pathway of the negative control non-switchable lipid (compound 4)

ICH₃, NaH, DMF/THF 1:1, 80°C, 3h ; ii) Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, THF/H₂O, 65°C, 96h ; iii) 1-dodecyne, PdCl₂(PPh₃)₂, triphenylphosphine, TBAF, DMF/DIPA, 80°C, 16h ; iv) Pd/C, THF, room temperature, overnight.

2.2.3.1 Synthesis of compound 16

2,6-dibromopyridin-4-amine (2.4 g / 9.53 mmol) was weighted in a 500 mL round-bottom flask and dissolved in 200 mL of anhydrous THF/DMF (1:1). The flask was purged 3 times with argon and cooled with an ice bath. Sodium hydride (60 % dispersion in mineral oil, un-rinsed) was slowly added (1.14 g / 47.6 mmol) and the mixture was allowed to stir 10

minutes at 0°C. Iodomethane (6.76 g / 47.6 mmol) was added and the mixture was allowed to stir for 10 more minutes at 0°C. The mixture was then refluxed 3 hours at 80°C. The mixture was carefully diluted with ~ 100 mL of water saturated with Na₂CO₃ (1:1) and extracted 5 times with hexane. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum and high vacuum overnight to yield **16** as a yellow solid (2.7 g / quantitative yield). Purity of the product observed in LC-MS was higher than 95%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.98 (s, 6H), 6.59 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 39.46, 108.91, 140.77, 156.64. Calc [M+H] = 280.91067 ; Exp [M+H] = 280.91178 ; Error = 3.97 ppm.

2.2.3.2 Synthesis of compound **17**

In a 100 mL round-bottom flask was dissolved compound **16** (1166 mg / 4.17 mmol) and 3-bromophenylboronic acid (1673 mg / 8.33 mmol) in 12 mL of THF. Na₂CO₃ (1766 mg / 16.7 mmol), previously dissolved in 8 mL of distilled water was added, and the flask was purged three times with argon. Pd(PPh₃)₄ (28.9 mg / 0.025 mmol) was added and the flask was purged three times again. The mixture was stirred for 4 days at 65°C. The reaction was monitored by LC-MS to confirm entire consumption of the starting materials. The mixture was then diluted with water and extracted 3 times with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude product was dissolved in 4 mL of MeOH/THF 80:20 and kept at room temperature overnight to allow recrystallization of the product of interest. The white solid thus formed was filtered under vacuum to get **17** as a white solid (798 mg / 44 %). Purity of the product observed in LC-MS was ~ 85%. The product was engaged in the next step without further purification. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.30 (s, 6H), 6.73 (s, 2H), 7.34 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.80 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.87 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 40.35, 104.98, 122.75, 127.43, 130.40, 131.03, 134.04, 152.27, 157.09. Calc [M+H] = 430.97530 ; Exp [M+H] = 430.97608 ; Error = 1.82 ppm.

2.2.3.3 Synthesis of compound **18**

Compound **17** (165 mg / 0.38 mmol) was weighted in a 20 mL microwave reaction vial. 1-dodecyne (191 mg / 1.15 mmol) and triphenylphosphine (30 mg / 0.115 mmol) were added. Dried tetra-n-butylammonium fluoride (700 mg / 2.67 mmol) was added (1.0 M TBAF solution in THF, dried under high vacuum), followed by 2 mL of anhydrous DMF and 2 mL of diisopropylamine. The reaction vial was purged 3 times with argon. PdCl₂(PPh₃)₂ was added (24.1 mg / 0.034 mmol), the vial was purged 3 times with argon and sealed. The mixture was

stirred 16 hours at 80°C. The mixture was then diluted with water and extracted 3 times with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (hexane/AcOEt, gradient from 100:0 to 80:20) to get **18** as a brown oil (99 mg / 43 %). The product was engaged in the catalytic hydrogenation step without further purification or characterization.

2.2.3.4 Synthesis of compound 4

Compound **17** (99 mg / 0.164 mmol) was dissolved in 50 mL of anhydrous THF, and the round-bottom flask was purged 3 times with argon. Palladium on activated charcoal 10% wt (30 mg / 0.027 mmol) was added and the flask was purged 3 times with hydrogen. The mixture was stirred overnight at room temperature under a 1 atm hydrogen pressure. The mixture was evaporated under vacuum and the crude was passed through a short silica gel column to remove the Pd/C (hexane/AcOEt 60:40). After evaporation of the solvents, the product was purified by preparative HPLC on a Waters SunFireTM C8 19x100 mm (5 µm particle size) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1 % formic acid and mobile phase B was composed of MeOH/THF 80:20 + 0.1 % formic acid. The flow rate was 25 mL/min. Sample solvent was MeOH/THF 80:20. The mobile phase gradient was: 0 min – 30 % B ; 7 min – 95 % B ; 10 min - 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. After evaporation and freeze-drying of the collected fractions, the final product **4** was obtained as a slightly yellow solid (87 mg / 87 %). The degree of purity of the product was ≥ 98 % by LC-UV/MS. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.89 (t, J = 7.0 Hz, 6H), 1.17-1.36 (m, 36H), 1.69 (quin, J = 7.4 Hz, 4H), 2.71 (t, J = 7.8 Hz, 4H), 3.13 (s, 6H), 6.91 (s, 2H), 7.22 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.38 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.90 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 14.12, 22.69, 29.36, 29.65, 31.61, 31.93, 36.14, 39.52, 102.41, 124.60, 127.36, 128.30, 128.59, 140.84, 143.10, 155.84, 157.88. Calc [M+H] = 611.52988 ; Exp [M+H] = 611.53054 ; Error = 1.08 ppm.

2.2.4 Synthesis of the switchable lipids 5 and 6

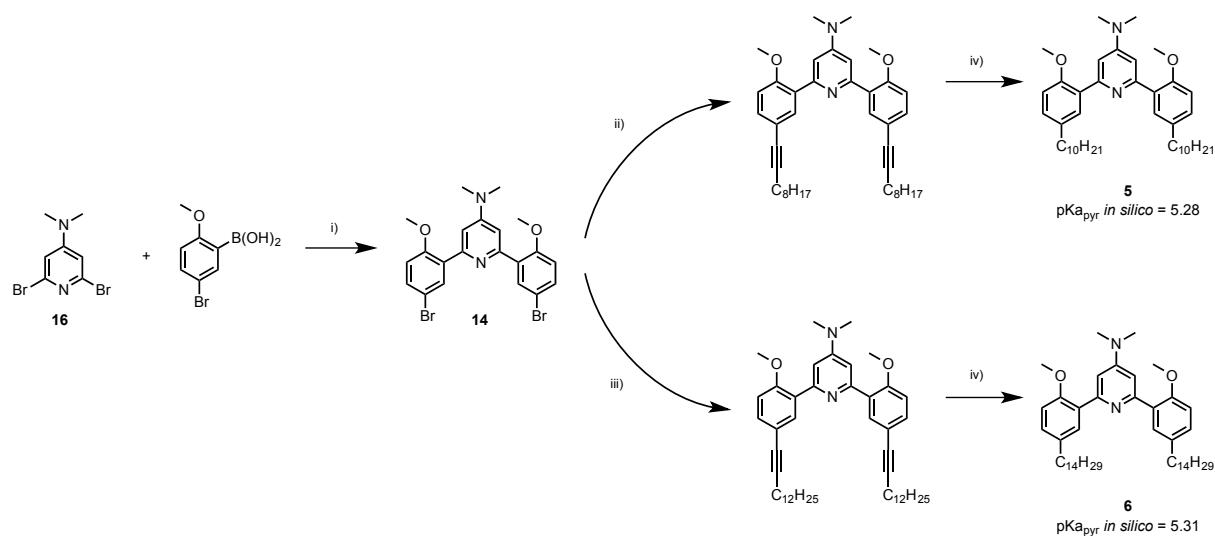


Figure 2.3 - Synthesis pathway of the switchable lipids 5 and 6

i) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Na_2CO_3 , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, 60°C , 72h ; ii) 1-decyne, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, triphenylphosphine, TBAF, DMF/DIPA, 80°C , 16h ; iii) 1-tetradecyne, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, triphenylphosphine, TBAF, DMF/DIPA, 80°C , 16h ; iv) Pd/C , THF, room temperature, overnight.

Compound 16 was synthesized as described above. Compound 14 was synthesized as described in the above sections, and was purified by column chromatography on silica gel (hexane/DCM/AcOEt, slow gradient from 100:0:0 to 20:40:40) to yield a yellow solid (56 %).

Compound 5 and 6 were synthesized following the procedures described in the above sections, replacing the 1-dodecyne reagent with 1-decyne or 1-tetradecyne, respectively.

The final compound 5 obtained after column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 95:5) was a slightly yellow wax solid. The overall yield of this two-step synthesis was 80 %. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H), 1.18-1.36 (m, 28H), 1.62 (quin, $J = 7.4$ Hz, 4H), 2.60 (t, $J = 7.7$ Hz, 4H), 3.07 (s, 6H), 3.84 (s, 6H), 6.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.97 (s, 2H), 7.13 (dd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz, 2H), 7.61 (s, $J = 2.3$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 14.10, 22.68, 29.33, 29.35, 29.57, 29.64, 31.60, 31.90, 35.10, 39.46, 56.03, 106.56, 111.64, 129.07, 131.35, 135.32, 154.50, 155.02. Calc [M+H] = 615.48841 ; Exp [M+H] = 615.48800 ; Error = - 0.65 ppm.

The final compound 6 obtained after column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 95:5) was a slightly yellow wax solid. The overall yield of this two-step synthesis was 65 %. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0.86 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H), 1.18-1.37 (m, 44H), 1.63 (quin, $J = 7.5$ Hz, 4H), 2.64 (t, 4H, $J = 7.8$ Hz), 3.39 (s, 6H), 3.94

(s, 6H), 6.92 (s, 2H), 7.01 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.32 (dd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, 2H), 7.51 (s, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 14.09, 22.66, 29.33, 29.52, 29.63, 29.67, 31.59, 31.89, 34.91, 40.73, 56.40, 104.98, 112.19, 130.36, 132.90, 136.58, 154.98, 157.47. Calc [M+H] = 727.61361 ; Exp [M+H] = 727.61489 ; Error = 1.77 ppm.

2.2.5 Synthesis of the switchable lipid 7

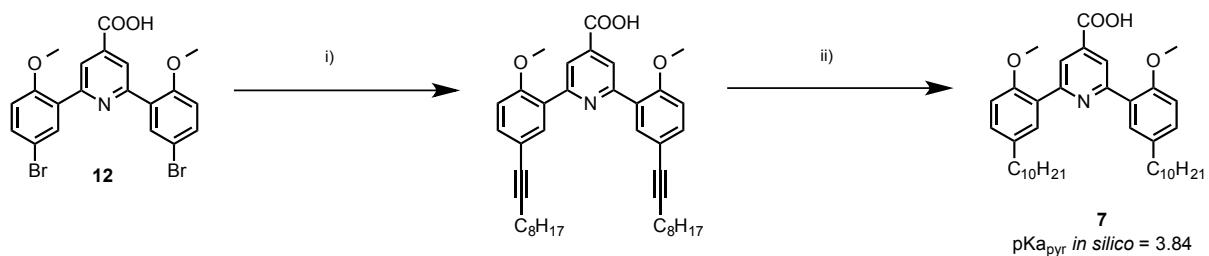


Figure 2.4 - Synthesis pathway of the switchable lipid 7

i) 1-decyne, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, triphenylphosphine, TBAF, DMF/DIPA, 80°C , 16h ; ii) Pd/C , THF, room temperature, overnight.

Compound **12** was synthesized as described in the above sections. Compound **7** was synthesized following the procedures described in the sections 1.5 and 1.6 of the above supplementary materials, replacing the 1-dodecyne reagent with 1-decyne. The final product **7** obtained after column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 80:20) was a white solid. The overall yield of this two-step synthesis was 56 %. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H), 1.18-1.37 (m, 28H), 1.63 (quin, $J = 7.5$ Hz, 4H), 2.62 (t, $J = 7.7$ Hz, 4H), 3.90 (s, 6H), 6.95 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.21 (dd, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.1$ Hz, 2H), 7.77 (s, $J = 2.0$ Hz, 2H), 8.41 (s, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 14.09, 22.67, 29.33, 29.37, 29.55, 29.63, 31.64, 31.90, 35.10, 55.84, 111.45, 122.69, 131.29, 135.53, 155.33. Calc [M+H] = 616.43604 ; Exp [M+H] = 616.43650 ; Error = 0.75 ppm.

2.2.6 Synthesis of octadecyl Rhodamine B (compound 19)

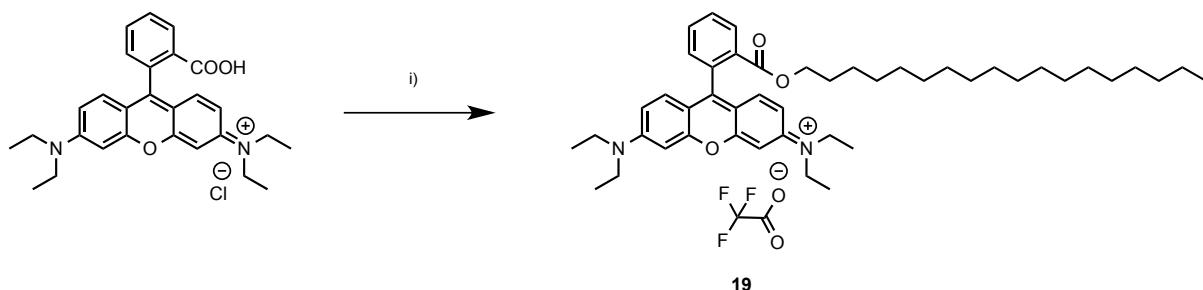


Figure 2.5 - Synthesis pathway of octadecyl Rhodamine B (compound 19)

i) 1-bromooctadecane, Cs_2CO_3 , DMF, 60°C, 20h.

Rhodamine B (400 mg / 0.84 mmol) was weighted in a 20 mL reaction vial. 1-bromooctadecane (556 mg / 1.67 mmol) was added, followed by Cs_2CO_3 (544 mg / 1.67 mmol). 2 mL of DMF was added and the vial was sealed. The mixture was stirred 20 hours at 60°C. The crude was then passed through a short silica gel column to remove the Cs_2CO_3 salt (DCM/MeOH 95:5). The product was then purified on an Agilent 1260 preparative HPLC-UV. The preparative column was an Agilent Zorbax SB-C18 21.2x100 mm (5 μm particle size). Mobile phase A was composed of water + 0.05 % trifluoroacetic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.05 % trifluoroacetic acid. The flow rate was 20 mL/min. Sample solvent was MeOH. The mobile phase gradient was: 0 min – 30 % B ; 10 min – 95 % B ; 15 min 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. After evaporation and freeze-drying of the collected fractions, the compound **19** (70 mg / 0.10 mmol) was obtained as a dark purple solid (trifluoroacetate salt). The overall yield of the reaction is estimated to be 14 % by HPLC-UV (220 nm). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.11-1.28 (m, 30H), 1.32 (t, $J = 7.0$ Hz, 12H), 1.40 (quin, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.60 (q, $J = 7.3$ Hz, 8H), 3.99 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 6.79 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.81-6.84 (m, 3H), 7.06 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.32 (dd, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 0.9$ Hz, 1H), 7.76 (dt, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz, 2H), 8.28 (dd, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.1$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 12.50, 14.09, 22.67, 25.79, 28.29, 29.18, 29.34, 29.44, 29.58, 31.90, 46.00, 65.79, 96.47, 113.58, 113.94, 130.27, 131.23, 132.92, 133.38, 155.53, 157.80, 159.05, 160.44, 165.24. Calc [M+H] = 695.51462 ; Exp [M+H] = 695.51665 ; Error = - 2.92 ppm.

2.2.7 NMR analysis of the pH-dependent conformational equilibrium

The pH-triggered conformational change of the switchable lipids **2**, **3**, **7** and **4** in a protic organic medium (methanol-d₄) was investigated by ^1H NMR spectroscopy. Modifications of

the ^1H NMR spectrum (400 MHz) of each switchable lipid was monitored during titration of the solution with *d*-trifluoroacetic acid (*d*-TFA) or with the base 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU). Each lipid was dissolved (5 mM) in 600 μL of CD_3OD in two NMR tubes. One tube was used for acidic titration with *d*-TFA and the other one for basic titration with DBU. Small amounts (2-20 μL) of acid or base (50 mM in CD_3OD) were added into the solution and the pH was adjusted in a 2 mL vial with a Thermo-Fisher 9110DJWP double junction microelectrode. The pH meter usually gave a stable pH value within less than 1 minute. A ^1H NMR spectrum was acquired, the solution was transferred back in a 2 mL vial and the pH was adjusted again for another NMR data acquisition. All spectra were processed and aligned using the Bruker TopspinTM software. Spectra were calibrated on the methanol residual peak.

For 1D-NOESY experiments, the switchable lipid **2** was dissolved (22 mM) in either 800 μL of CD_3OD ($\text{pH} = 7.6$) or in 650 μL of $\text{CD}_3\text{OD} + 150 \mu\text{L}$ of *d*-TFA 1M in CD_3OD ($\text{pH} < 3$). 768 scans were acquired (400 MHz) for each tube, irradiating the $\text{H}_{3\text{py}}$ proton of the pyridine ring, using a generic relaxation time of 500 milliseconds.

2.2.8 Liposome preparation

Liposomes were prepared using freeze-thawing cycles, based on the procedure of Monnard *et al.* Stock solutions (10-20 mg/mL) of pH-sensitive lipids and commercial lipids were prepared in chloroform and stored at -80°C before use. The lipid stock solutions were combined in a round-bottom microwave vial at the desired ratio (10 μmol total lipid) and the chloroform was removed under reduced pressure. The lipidic film thus obtained was dried overnight under high vacuum to remove any residual solvent. The lipidic film was hydrated on a vortex mixer with 1 mL of a 30 mM sulforhodamine B solution, buffered at pH 7.4 (5 mM HEPES with ionic strength adjusted to 150 mM with NaCl) unless indicated otherwise. The lipid suspension was then frozen into acetone/dry ice and melted in a water bath during 1 minute at 65°C. This freeze-thawing cycle was repeated 10 times, and the liposome solution thus obtained was extruded 11 times through a 200 nm polycarbonate membrane using a LiposoFast manual extruder (Avestin Inc., Ottawa, ON, Canada) heated at 65°C. The liposome solution was passed through a 1 x 20 cm Sephadex G-50 (Medium) column equilibrated in a pH 7.4 buffer (5 mM HEPES with ionic strength adjusted to 150 mM with NaCl) to remove any unencapsulated sulforhodamine B. Liposome preparations (total final volume ~ 2 mL) were stored in darkness at 4°C in 5 mL glass vials.

2.2.9 Physicochemical characterization of liposomes

Total phospholipid concentration of each liposome formulation (post Sephadex G-50 column) was determined by a phosphorous content assay, based on the procedure of Bartlett. The amount of switchable lipid incorporated in each formulation was quantified by HPLC-UV (1260 Infinity, Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada), against a calibration curve of switchable lipid (10-50 µg/mL; from chloroform stock solution). Liposome hydrodynamic diameter and ζ -potential were measured at 25°C using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK) using the automatic algorithm mode. Size measurements (reported in intensity) were performed in a pH 7.4 buffer (5 mM HEPES with ionic strength adjusted to 150 mM with NaCl). ζ -potential measurements were done using the Smoluchowski model in a pH 7.4 buffer (5 mM HEPES and 5 mM NaCl), using a 0.4 mM total lipid concentration in the cuvette. Experiments were run in triplicate or more.

2.2.10 Sulforhodamine B leakage assay

The release from liposomes was monitored by the increasing fluorescence of the sulforhodamine B ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 550/600, slits 5 nm) using a F-2710 Spectrophotometer (Hitachi High Technologies America Inc., Schaumburg, IL, USA) equipped with a water circulated cell holder with stirring. This fluorescent dye is self-quenched at high concentrations (> 20 mM), exhibits a stable fluorescent behaviour over the pH range 3-10 and has already been used for leakage assays from liposomes. Experiments were performed in a series of buffers with pH 9.5, 8.5, 7.4, 6.5 and 6.0 (5 mM HEPES with ionic strength adjusted to 150 mM with NaCl) and 5.5, 5.0, 4.5, 4.0 and 3.5 (50 mM acetic buffer with ionic strength adjusted to 150 mM with NaCl). In magnetically stirred quartz cuvette containing the buffer was added a small aliquot of the liposome preparation (< 60 µL) for a total volume of 3000 µL and a total lipid concentration of 0.05 mM in the cuvette. The fluorescence was monitored during 15 minutes and the liposomes were permeated with 1.3 µL of pure octaethylene glycol monododecyl ether ($C_{12}E_8$) detergent (0.8 mM final concentration in the cuvette) to obtain the 100% leakage fluorescent intensity. Raw data were recorded continuously during the experiment. The percentage of leakage at a given time t was defined as:

$$\% \text{ leakage}_t = \left(\frac{I_t - I_o}{I_{100\%} - I_o} \right) \times 100$$

where I_o is the initial residual fluorescence intensity observed at pH = 9.5 when no leakage occurs ; $I_{100\%}$ is the maximal fluorescence intensity value obtained after addition of

detergent C₁₂E₈ and I_t is the fluorescence intensity value measured at a given time t . All experiments were performed at 37°C under medium stirring.

2.2.11 Lipid-mixing assay

The fusogenic potential of the liposomes was evaluated with an octadecyl Rhodamine B (R18) lipid-mixing assay. R18 was incorporated into lipid membranes of pH-sensitive liposomes at a self-quenched concentration of 6% mol. R18 labeled liposomes and unlabeled POPC vesicles were prepared in a pH 7.4 buffer (HEPES 5 mM with ionic strength adjusted to 150 mM with NaCl) according to the procedure previously described. R18 labeled liposomes incorporating the switchable lipid **5**, **2**, **6**, **4** or no pH-sensitive lipid were mixed with unlabeled 130 nm POPC vesicles, in a buffer at pH 7.4 (5 mM HEPES with ionic strength adjusted to 150 mM with NaCl) or at pH 5 (50 mM acetic buffer with ionic strength adjusted to 150 mM with NaCl). In 3 mL of buffer containing unlabeled POPC vesicles (0.10 mM in the cuvette) were added the labeled liposomes (0.01 mM in the cuvette). The increasing fluorescence of R18 was monitored ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 556/590, slits 5 nm) using a Hitachi F-2710 Spectrophotometer equipped with a water circulated cell holder with stirring. All experiments were performed at 22°C under medium stirring. After 15 minutes, 1.3 μ L of pure octaethylene glycol monododecyl ether (C₁₂E₈) detergent (0.8 mM final concentration in the cuvette) was added to obtain the 100% dequenched fluorescence intensity. Raw data were recorded continuously during the experiment. The percentage of membrane fusion activity at a given time t was defined as:

$$\% \text{ fusion}_t = \left(\frac{I_t - I_o}{I_{100\%} - I_o} \right) \times 100$$

where I_o is the initial fluorescence intensity observed immediately after addition of labeled liposomes ; $I_{100\%}$ is the maximal fluorescence intensity value obtained after addition of detergent C₁₂E₈ and I_t is the fluorescence intensity value measured at a given time t . Other molar ratios of labeled/unlabeled liposomes were also studied.

2.2.12 Fluorescence microscopy imaging

Liposomal formulations loaded with sulforhodamine B used for microscopy experiments were prepared as described above. Sulforhodamine B content of each formulation was assayed against a sulforhodamine B calibration curve using a Hitachi F-2710 spectrophotometer.

HeLa cells were routinely incubated 24 hours before imaging in 35 mm poly-d-lysine coated glass dishes (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) at a density of 30 000 cells/dish. Cells were then rinsed twice with Opti-MEM® and incubated 1, 2 or 4 hours with liposomal formulations (diluted in Opti-MEM®/FBS 90:10). The total final concentration of entrapped sulforhodamine B (in case of liposomal formulations) or free sulforhodamine B (negative control) in the dish was 900 nM. Following incubation, cells were rinsed three times with Opti-MEM® and stained 30 minutes at 37°C with a 100 nM Lysotracker® Blue DND-22 solution (Life Technologies) to allow observation of the late endosomal/lysosomal compartments. Cells were then rinsed three times (Opti-MEM®) and immediately imaged in a phenol red-free culture media (Opti-MEM® and FBS 90:10).

Imaging of HeLa cells was performed using an Olympus IX81 microscope equipped with a Plan Apo N 60× 1.42 NA silicone objective (Olympus Canada Inc., Toronto, ON, Canada) and a 12 bits Retiga-2000R CCD Camera (QImaging, Surrey, BC, Canada), using MetaMorph Advanced software 7.8.9 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Lysotracker® Blue DND-22 was imaged using the DAPI channel ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 372/456 – 300 ms exposure time) and sulforhodamine B was observed using the TRITC channel ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 541/572 – 200 ms exposure time). All fluorescence images were carefully exported with constant scaling and range of greylevel for all experiments.

Colocalization quantification was performed using Fiji software (Ver. 2.0.0), equipped with Coloc 2 plugin. The program was used to calculate Manders' colocalization coefficients (MCC). The results displayed are an average of 3 different pictures, containing at least 4 cells each.

2.2.13 *In vitro* cytotoxicity and hemocompatibility studies

For cytotoxicity and hemocompatibility assays, blank liposomal preparations were formulated in PBS pH 7.4 (Gibco® #10010-023), following the above-mentioned procedures. Cytotoxicity was assessed using a resazurin-based cell viability test. HeLa cells were plated at a density of 5000 cells/well in 96-well culture plates. After 24 hours of incubation, liposomal formulations diluted in culture medium were added to obtain a final lipidic concentration ranging from 0.01 to 500 µM. Cells were allowed to grow for an additional 48 hours. Cells were then washed twice with Eagle's minimal Essential Medium (EMEM), and 200 µL of fresh culture medium were added in the wells. 20 µL of a freshly prepared resazurin solution (440 µM in PBS) were then added, and cells were incubated for 2 more hours. The absorbance of

each well was measured at 570 and 600 nm using a Safire microplate reader (Tecan, Seestrasse, Switzerland). Cellular viability was normalized relative to the negative control (cells treated with PBS). Experiments were run in sixplicata.

In vitro hemolysis assay was performed to assess hemocompatibility of the same liposomal formulations. Human red blood cells (HRBC) were rinsed twice with PBS and diluted 1:20 in PBS 7.4 (Gibco[®] #10010-023). 450 µL of HRBC suspension was incubated with 50 µL of the liposomal formulation (appropriately diluted in PBS 7.4 for a final lipidic concentration ranging from 1 to 1000 µM) during 45 minutes at 37°C in a Labnet VortempTM 56 (800 rpm). Tubes were then centrifuged at 6000g during 5 minutes and absorbance of each test sample was measured at 540 nm (Varian Cary 100 Bio, Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) in order to determine the amount of hemoglobin released from the HRBC. Intrinsic absorbances of liposomal formulations at the same concentration as tested were subtracted. Results were expressed as a percentage of the positive control hemolysis (HRBC incubated in Milli-Q[®] water). Negative control consisted of incubation of HRBC with PBS 7.4. Experiments were run in triplicate.

2.3 Results & Discussion

The switchable lipids reported herein function on the basis of a molecular switch. Molecular switches are dynamic devices designed to change conformation in response to stimuli, such as certain pH values, light, or ions.^[13] Such systems have been largely explored in sensing, but have only recently been considered for biological applications.^[14] We previously reported a pH-responsive molecular tweezer able to bind and release a substrate in a pH-dependent fashion.^[15] In this study, we constructed lipidlike switches that can integrate into the structure of liposomes (**Figure 2.6A**). It was hypothesized that, upon protonation, hydrogen-bonding opportunities would favor a change in the relative orientation of the hydrocarbon chains of the switchable lipids, which would disturb the lipid packing of the liposomes, provoke the release of their cargo, and confer endosomal-escape properties (**Figure 2.6B**). The aim of this study was to optimize a PEGylated liposomal preparation to have fast-responding (< 30 min) lipidic-bilayer-destabilization properties and endosomal-escape capabilities at acidic pH values (5–5.5)^[16] while remaining stable at the blood pH value of 7.4.

We introduced two alkyl chains on a di(methoxyphenyl)-pyridine pH-switchable unit and added a polar headgroup at the para position to the pyridine N atom to obtain lipidlike switches (see **Figures 2.1 to 2.4** for structures and synthetic details and **Table S2.1** for an overview of the synthesized structures). In silico predictions indicated that the pKa value of the pyridine ring was strongly dependent on the nature of the headgroup (**Figure 2.6A**). Three headgroups were selected to cover a wide range of pKa_{pyr} values.

The conformational change of lipid **2** was examined by ¹H NMR titration (**Figure 2.7**). Lipid **4**, a non-methoxylated derivative of lipid **2** that is unable to switch and lock its conformation at acidic pH values, was also subjected to ¹H NMR titration. In both cases, protonation of the pyridine ring affected the H_{3py} atom, which was drastically deshielded when the pH value decreased. Similar behavior was also observed for switchable lipids **3** and its analogue with a COOH headgroup and C₁₀H₂₁ alkyl groups (see **Figure S2.2**), and had been observed for the previously reported molecular tweezer.^[15]

More notable is the behavior of the H_o atom. For the non- methoxylated lipid **4**, the H_o atom facing the pyridine nitrogen atom became shielded upon protonation of this nitrogen

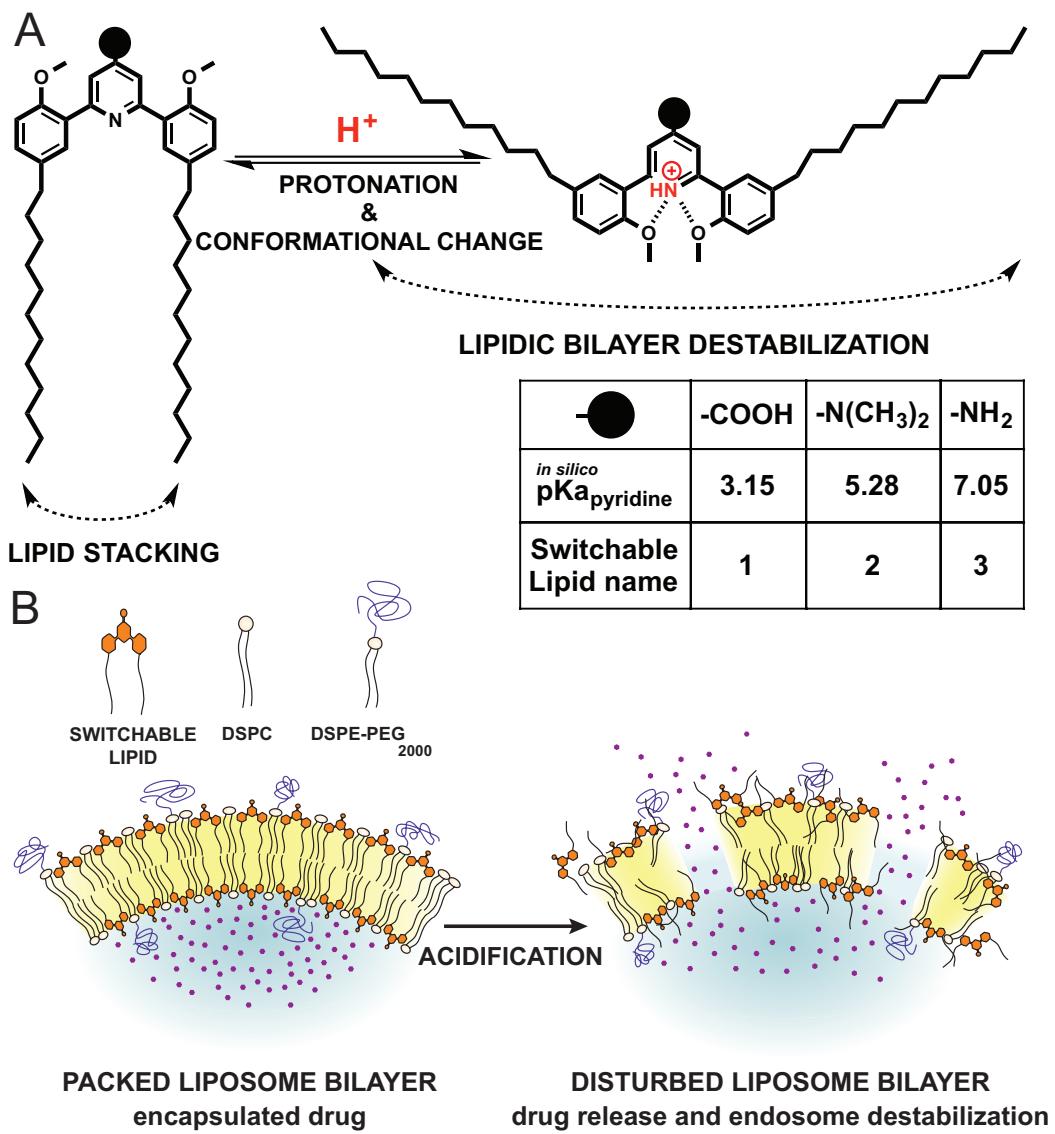


Figure 2.6 - Graphical representation of the liposomal pH-sensitive delivery system based on a conformational switch. A) Protonation-induced conformational change of the pH-sensitive switchable lipids. B) Disruption of the lipidic bilayer of the liposome upon acidification, leading to drug release and endosome destabilization. DSPC = 1,2-dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPE-PEG₂₀₀₀ = N-(carbonylmethoxypolyethylenegly-col 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine.

atom (**Figure 2.7B**). Interestingly, this effect was not observed for the switchable lipid **2** (**Figure 2.7A**), thus suggesting that rotation about the C_{pyridine}–C_{phenyl} bond occurred to move the H_o atom away from the NH⁺ group and counterbalance the shielding effect. The

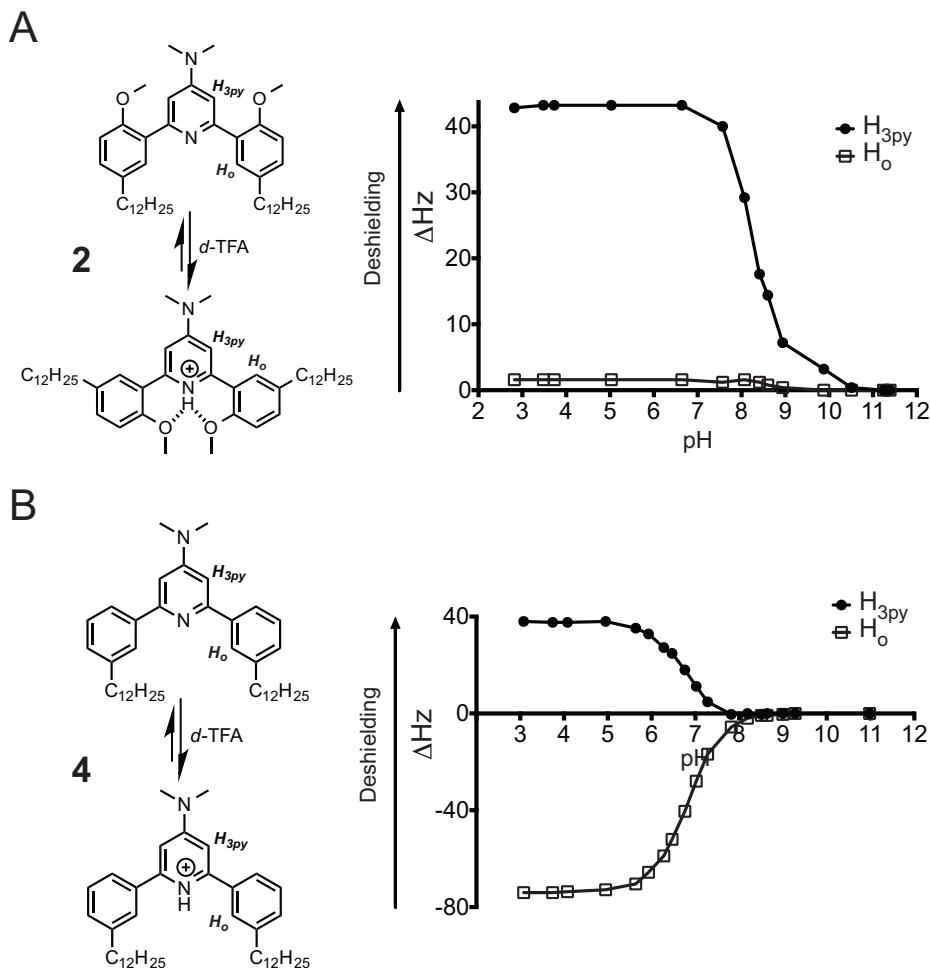


Figure 2.7 - NMR titration experiments investigating the pH-dependent conformational change of A) the switchable lipid **2** and B) its non- methoxylated counterpart **4**.

conformational change of switchable lipid **2** was further confirmed by nuclear Overhauser cross-relaxation spectroscopy (see **Figure S2.3**).

The switchable lipids **1–4** and two others with the headgroup $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ and either $\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ or $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ chains were incorporated in liposomal preparations at 25, 50, or 75 mol % along with the colipids DSPE and DSPE-PEG₂₀₀₀ (5 mol %). All liposome formulations exhibited a hydrodynamic diameter below 200 nm. HPLC analysis of purified liposomes confirmed the integration of 75–95 % of the switchable lipids into the liposome membrane (see **Table S2.4**). With the exception of lipid **3**, whose $\text{pK}_{\text{a,pyr}}$ value is close to pH 7.4, all preparations were stable for over 3 months when stored at 4°C.

The disturbance properties of the switchable lipids were studied by monitoring the pH-triggered release of the encapsulated sulforhodamine B dye. Total release was observed within 5 min at pH 4.5 with 75 mol % of **2** (**Figure 2.8A**). The rate of release increased as the pH value decreased and as the content of the switchable lipid in the formulation increased (**Figure 2.8A and 2.8B**; see also **Figure S2.5**). These fast kinetic results are common to other systems based on a conformational change, such as carboxylated polymers and pH-sensitive peptides,^[8c, 17] but contrast with those observed for hydrolyzable linkages, which require hours to release their content.^[6c, 18] The contribution of the conformational change to the destabilization of the liposomal bilayer was further confirmed by the removal of **2** from the preparation or its replacement with **4**, which abolished the release of sulforhodamine B (**Figure 2.8B**).

Responsive release from liposomes incorporating **2** took place from pH 6.5 and was observable over about 2 pH units (**Figure 2.8C**). Sigmoidal fitting of the pH-dependent leakage profile allowed the estimation of a $pK_{a_{pyr}}$ value of 5.50, in agreement with the in silico prediction of 5.28.

Structure–activity relationships revealed that other headgroups were less suitable for endosomal escape: liposomes with lipid **1** (COOH headgroup) were unable to destabilize the liposome bilayer even at pH 3.5 (see **Figure S2.6**), whereas liposomes with lipid **3** (NH₂ headgroup) were unstable at pH 7.4 (see **Table S2.4**). Furthermore, no impact of the alkyl chain was evidenced, since all preparations incorporating N,N-dimethyl-based switchable lipids (C₁₀H₂₁ alkyl groups; C₁₂H₂₅ alkyl groups (lipid **2**); C₁₄H₂₉ alkyl groups) exhibited similarly efficient and quick pH-triggered release (see **Figure S2.7**). These experiments confirm the in silico predictions and suggest that the pK_a value of the system can be tuned by the nature of the headgroup, but not by the chain length.

The fusogenic properties of liposomes are usually restricted by the presence of PEG.^[10a,b,19] In the present study, pH-triggered release occurred in the presence of DSPE–PEG₂₀₀₀ (5 mol %). To better understand the release mechanism at play, we conducted lipid-mixing assays with pH-sensitive liposomes containing the switchable lipid **2** labeled with octadecyl rhodamine B (R18) and model unlabeled phospholipid vesicles (**Figure 2.8D**).^[17, 20] Dequenching, which is indicative of lipid mixing, occurred within minutes under acidic conditions in the presence of lipid **2**. In contrast, only limited dequenching was observed at

pH 7.4 or when lipid **2** was removed or replaced with lipid **4**. An increase in the ratio of unlabeled liposomes favored interliposomal fusion and resulted in increased lipid mixing (see **Figure S2.8**). These results confirm the fusogenic properties of switchable lipids and their compatibility with PEG shielding, thus highlighting their high *in vivo* potential.

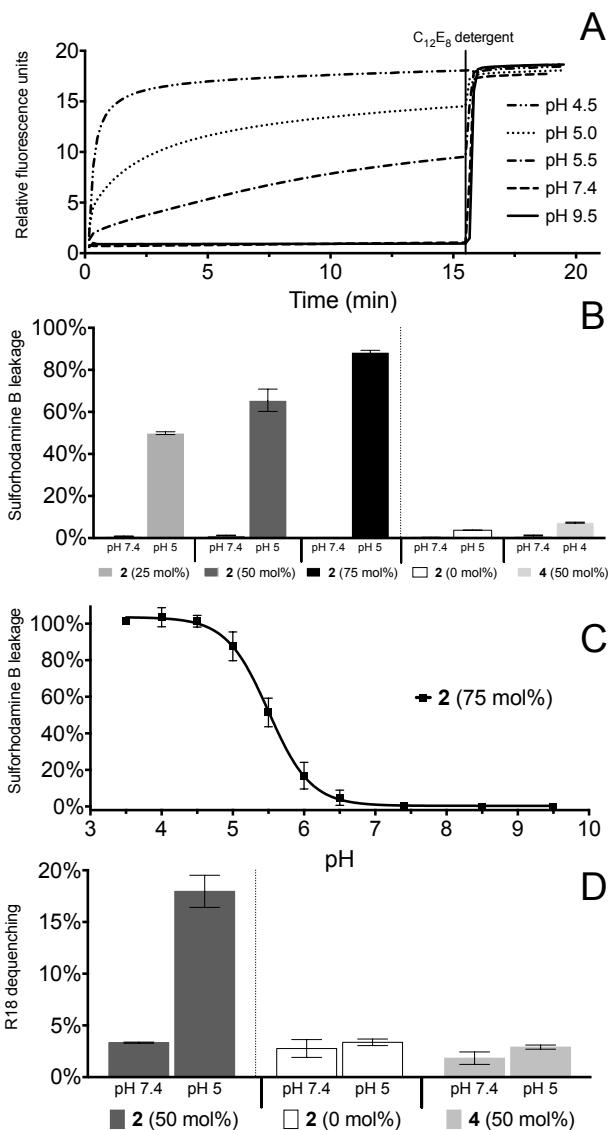


Figure 2.8 - A) Kinetic profiles of sulforhodamine B release for the formulation incorporating the switchable lipid **2** (75 mol %). B) Sulforhodamine B leakage from liposome preparations incorporating the switchable lipid **2** (25–75 mol %), no switchable lipid, or the non-methoxylated switchable lipid **4** (50 mol %) after incubation for 15 min under neutral or acidic conditions. C) Leakage from the liposomal formulation incorporating the switchable lipid **2** (75 mol %) after incubation for 15 min at various pH values. D) R18 lipid-mixing experiments with liposomal formulations incorporating the switchable lipid **2** (50 mol %), no switchable lipid, or the non-methoxylated switchable lipid **4** (50 mol %) after incubation for 15 min under neutral or acidic conditions.

To verify our hypothesis of endosomal escape and cytosolic delivery, we used fluorescence microscopy to investigate the intracellular trafficking observed with the pH-sensitive delivery system. Sulforhodamine B was chosen as a hydrophilic model drug because it retains its charges at endosomal pH values and is therefore unable to cross the cytoplasmic and endosomal membranes on its own.^[21] HeLa cells were incubated for 1, 2, and 4 h with liposomes incorporating the switchable lipid **2** (50 mol %) and loaded with sulforhodamine B (**Figure 2.9**). After 1 h, a strong punctate colocalization of sulforhodamine B and LysoTracker showed that the liposomes were internalized through the endosomal pathway. A Manders colocalization coefficient (MCC) of 0.80 confirmed this observation. After 2 and 4 h, cells showed both punctate and diffuse red fluorescence throughout their cytoplasm, as evidenced by the significant drop in the MCC value (to 0.28 and 0.29, respectively). As a control, liposomes without **2** were unable to escape the endosomal pathway, as the MCC value remained unchanged at the end of the 4 h incubation period (see **Figure S2.9B**). Unsurprisingly, the incubation of cells with free sulforhodamine B for 4 h resulted in the absence of red fluorescence (see **Figure S2.9C**): a reminder of the critical need for active delivery for hydrophilic drugs. Altogether, these results confirm that our delivery system based on a pH-triggered conformational change enables fast and efficient endosomal escape.

In parallel, we examined the cytotoxicity of the pH-sensitive liposome formulation on HeLa cells and its hemolytic activity on human red blood cells (see **Figure S2.10**). No toxicity or hemolytic activity were observed up to a concentration of 500 µM, thus hinting at the safety of this system for systemic injection.

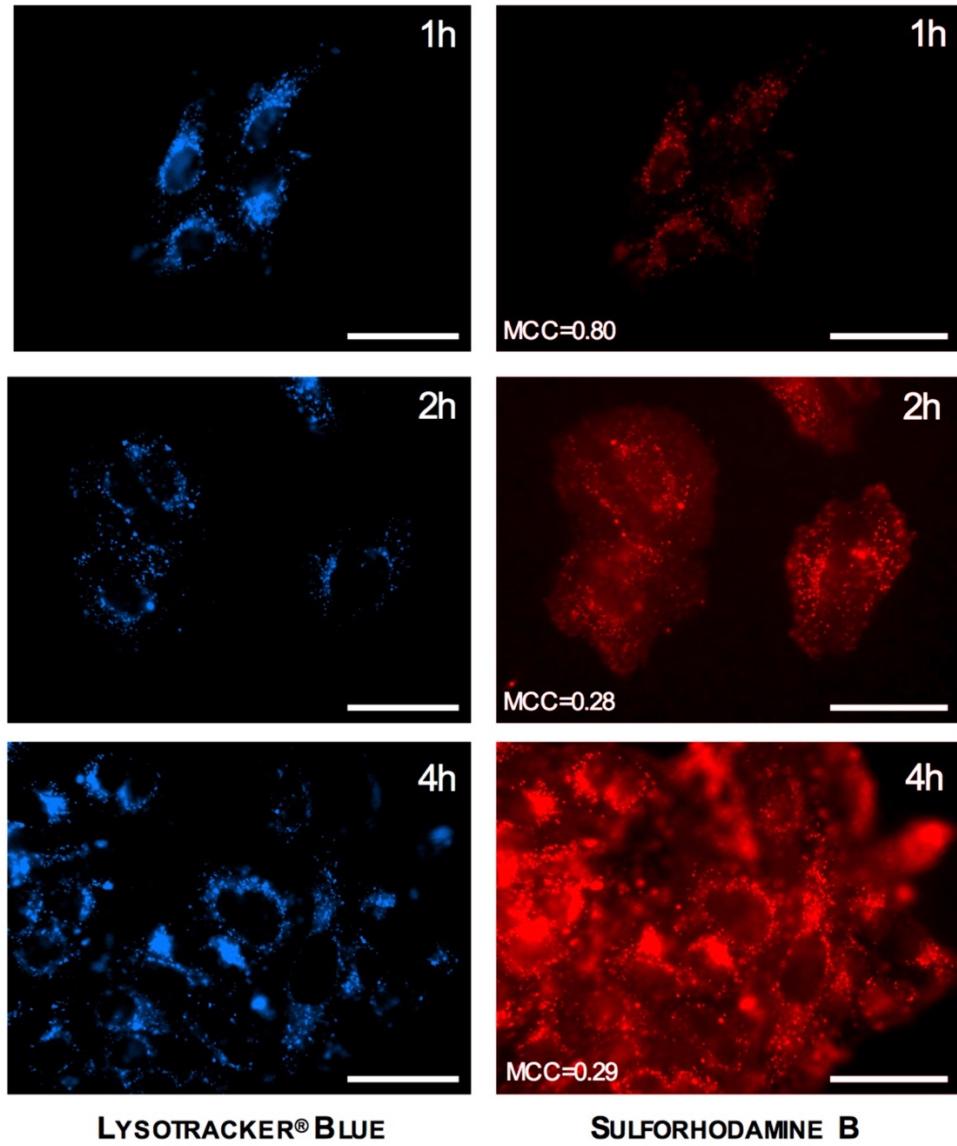


Figure 2.9 - Fluorescence microscopy images of HeLa cells after incubation for 1, 2, and 4 h with the pH-sensitive formulation (switchable lipid 2, 50 mol%) loaded with sulforhodamine B. Scale bar: 20 μ m.

2.4 Conclusion

In summary, a new pH-sensitive liposomal delivery system was developed by the use of switchable lipids that change conformation upon endosomal acidification. The liposomes quickly delivered a highly polar compound to the cytosol through efficient endosomal escape and remained effective despite the presence of a PEG corona at their surface. Such lipids can readily be included in existing liposomal formulations to enhance the intracytosolic bioavailability of hydrophilic drugs and nucleic acids.

2.5 Acknowledgment

The National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) is acknowledged for financial support. We thank Aline Mesnier and Hanaa Taleb for their contribution and Prof. Marc Servant (University of Montreal) for insightful discussions.

2.6 References

- [1] a) O. C. Farokhzad, R. Langer, ACS Nano 2009, 3, 16 – 20 ; b) T. Sun, Y. S. Zhang, B. Pang, D. C. Hyun, M. Yang, Y. Xia, Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 12320 – 12364 ; Angew. Chem. 2014, 126, 12520 – 12568 ; c) Q. Yin, J. Shen, Z. Zhang, H. Yu, Y. Li, Adv. Drug Delivery Rev. 2013, 65, 1699–1715; d)R. Kanasty, J.R. Dorkin, A. Vegas, D. Anderson, Nat. Mater. 2013, 12, 967 – 977.
- [2] a) V. P. Torchilin, Nat. Rev. Drug Discovery 2014, 13, 813 – 827; b) T. Nakamura, H. Akita, Y. Yamada, H. Hatakeyama, H. Harashima, Acc. Chem. Res. 2012, 45, 1113 – 1121; c) S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Nat. Mater. 2013, 12, 991–1003; d)R. Lehner, X. Wang, M. Wolf, P. Hunziker, J. Controlled Release 2012, 161, 307 – 316.
- [3] a) W. Gao, J. M. Chan, O. C. Farokhzad, Mol. Pharm. 2010, 7, 1913 – 1920 ; b) T. M. Allen, P. R. Cullis, Adv. Drug Delivery Rev. 2013, 65, 36 – 48 ; c) S. Simoes, J. N. Moreira, C. Fonseca, N. Duzgunes , M.C. PedrosodeLima, Adv. Drug Delivery Rev. 2004, 56, 947 – 965.
- [4] a) C. Marchini, D. Pozzi, M. Montani, C. Alfonsi, A. Amici, S. Candeloro De Sanctis, M. A. Digman, S. Sanchez, E. Gratton, H. Amenitsch, A. Fabbretti, C. O. Gualerzi, G. Caracciolo, Cancer Gene Ther. 2011, 18, 543–552; b)S.R. Paliwal, R. Paliwal, S. P. Vyas, Drug Delivery 2015, 22, 231 – 242.
- [5] a) A. G. Kohli, P. H. Kierstead, V. J. Venditto, C. L. Walsh, F. C. Szoka, J. Controlled Release 2014, 190, 274 – 287; b) X.-X. Zhang, T.J. McIntosh, M.W. Grinstaff, Biochimie 2012, 94, 42–58; c)P.T. Wong, S.K. Choi, Chem. Rev. 2015, 115, 3388–3432; d) C. L. Chan, R. N. Majzoub, R. S. Shirazi, K. K. Evert, K. S. Liang, C. R. Safinya, Biomaterials 2012, 33, 4928 – 4935.
- [6] a) R. Tachibana, H. Harashima, M. Shono, M. Azumano, M. Niwa, S. Futaki, H. Kiwada, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998, 251, 538–544; b)T. Yoshimura, M. Shono, K. Imai, K. Hong, J. Biochem. 1995, 117, 34 – 41; c) J. Shin, P. Shum, J. Grey, S. Fujiwara, G. S. Malhotra, A. Gonzulez-Bonet, S.-H. Hyun, E. Moase, T. M. Allen, D. H. Thompson, Mol. Pharm. 2012, 9, 3266 – 3276.
- [7] a) R.Mo,T.Jiang,Z.Gu,Angew.Chem.Int.Ed.2014,53,5815– 5820; Angew. Chem. 2014, 126, 5925–5930; b)J.O. Onyango, M. S. Chung, C.-H. Eng, L. M. Klees, R. Langenbacher,

L. Yao, M. An, Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 3658–3663; Angew. Chem. 2015, 127, 3729 – 3734 ; c) J. P. M. Motion, J. Nguyen, F. C. Szoka, Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 9047–9051; Angew. Chem. 2012, 124, 9181 – 9185 ; d) L. D. Field, J. B. Delehanty, Y. Chen, I. L. Medintz, Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1380 – 1390 ; e) K. Boeneman, J. B. Delehanty, J. B. Blanco-Canosa, K. Susumu, M. H. Stewart, E. Oh, A. L. Huston, G. Dawson, S. Ingale, R. Walters, M. Domowicz, J. R. Deschamps, W. R. Algar, S. DiMaggio, J. Manono, C. M. Spillmann, D. Thompson, T. L. Jennings, P. E. Dawson, I. L. Medintz, ACS Nano 2013, 7, 3778 – 3796.

[8] a) M. A. Quadir, S. W. Morton, Z. J. Deng, K. E. Shopsowitz, R. P. Murphy, T. H. Epps, P. T. Hammond, Mol. Pharm. 2014, 11, 2420 – 2430 ; b) E. Yuba, A. Harada, Y. Sakanishi, K. Kono, J. ControlledRelease2011,149,72–80; c)E.Yuba,N.Tajima,Y. Yoshizaki, A. Harada, H. Hayashi, K. Kono, Biomaterials 2014, 35, 3091 – 3101; d) A. E. Felber, M.-H. Dufresne, J.-C. Leroux, Adv. Drug Delivery Rev. 2012, 64, 979 – 992.

[9] a) X.-X. Zhang, C. A. H. Prata, J. A. Berlin, T. J. McIntosh, P. Barthelemy, M. W. Grinstaff, Bioconjugate Chem. 2011, 22, 690 – 699 ; b) S. C. Semple et al. , Nat. Biotechnol. 2010, 28, 172 – 176 ; c)T. Gjetting, R.I. Jølck, T.L. Andresen, Adv. Healthcare Mater. 2014, 3, 1107 – 1118.

[10] a) S. Mishra, P. Webster, M. E. Davis, Eur. J. Cell Biol. 2004, 83, 97 – 111; b) K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schu- bert, Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 6288 – 6308 ; Angew. Chem. 2010, 122, 6430 – 6452 ; c) H. Xu, J. W. Paxton, Z. Wu, Pharm. Res. 2015, 32, 2428 – 2438.

[11] a)X.Liu,Y.Zheng,N.M.Samoshina,A.H.Franz,X.Guo,V.V. Samoshin, J. Liposome Res. 2012, 22, 319–328; b)E. Mama- sheva, C. O Donnell, A. Bandekar, S. Sofou, Mol. Pharm. 2011, 8, 2224 – 2232.

[12] a) Y. Dong et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2014, 111, 3955 – 3960; b) B. Schultheis, D. Strumberg, A. Santel, C. Vank, F. Gebhardt, O. Keil, C. Lange, K. Giese, J. Kaufmann, M. Khan, J. Drevs, J. Clin. Oncol. 2014, 32, 4141 – 4148.

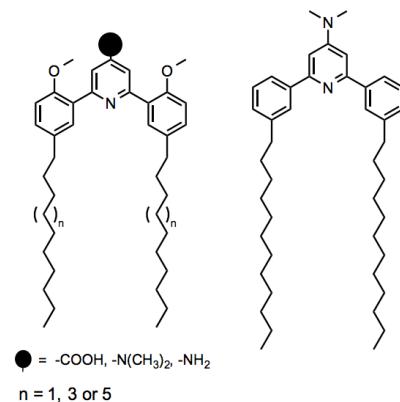
[13] a) J. Leblond, A. Petitjean, ChemPhysChem 2011, 12, 1043– 1051; b) M. Hardouin – Lerouge, P. Hudhomme, M. Sally, Chem. Soc. Rev. 2010, 40, 30 – 43.

- [14] a) D. Bier, R. Rose, K. Bravo-Rodriguez, M. Bartel, J. M. Ramirez-Anguita, S. Dutt, C. Wilch, F.-G. Klöorner, E. Sanchez- Garcia, T. Schrader, C. Ottmann, *Nat. Chem.* 2013, 5, 234 – 239 ; b) V. V. Samoshin, *Biomol. Concepts* 2014, 5, 131 – 141.
- [15] J. Leblond, H. Gao, A. Petitjean, J.-C. Leroux, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 8544 – 8545.
- [16] J. R. Casey, S. Grinstein, J. Orlowski, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010, 11, 50 – 61.
- [17] L. Yao, J. Daniels, D. Wijesinghe, O. A. Andreev, Reshetnyak, *J. Controlled Release* 2013, 167, 228 – 237.
- [18] a) H.-K. Kim, J. Van den Bossche, S.-H. Hyun, D. H. Thompson, *Bioconjugate Chem.* 2012, 23, 2071 – 2077; b) H. Chen, H. Zhang, D. Thor, R. Rahimian, X. Guo, *Eur. J. Med. Chem.* 2012, 52, 159 – 172; c) W. Chen, F. Meng, R. Cheng, Z. Zhong, *J. Controlled Release* 2010, 142, 40 – 46.
- [19] a) I. Tomatsu, H. R. Marsden, M. Rabe, F. Versluis, T. Zheng, H. Zope, A. Kros, *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 18927 – 18933 ; b) Z. Vanic, S. Barnert, R. Süss, R. Schubert, *J. Liposome Res.* 2011, 22, 148 – 157.
- [20] a) M. Musial-Siwek, A. Karabadzhak, O. A. Andreev, Y. K. Reshetnyak, D. M. Engelman, *Biochim. Biophys. Acta Bio-membr.* 2010, 1798, 1041 – 1046 ; b) J. Fendos, F. N. Barrera, D. M. Engelman, *Biochemistry* 2013, 52, 4595 – 4604.
- [21] R. J. Lee, S. Wang, M. J. Turk, P. S. Low, *Biosci. Rep.* 1998, 18, 69–78.

2.7 Supporting Information

Table S2.1 - Summary of the synthesized switchable lipids

Name	Headgroup	Alkyl chains length	Methoxy moieties	Predicted pKa _{pyr} ^a	Comment
1	COOH	C12	Yes	3.15	Headgroup variation (affecting the pKa _{pyr})
2	N,N-Dimethyl	C12	Yes	5.28	
3	NH ₂	C12	Yes	7.05	
4	N,N-Dimethyl	C12	No	5.19	Negative control lipid, unable to perform conformational change
5	N,N-Dimethyl	C10	Yes	5.28	
6	N,N-Dimethyl	C14	Yes	5.31	Alkyl chain length variation, fixed N,N-Dimethyl headgroup
7	COOH	C10	Yes	3.84	Used for NMR studies



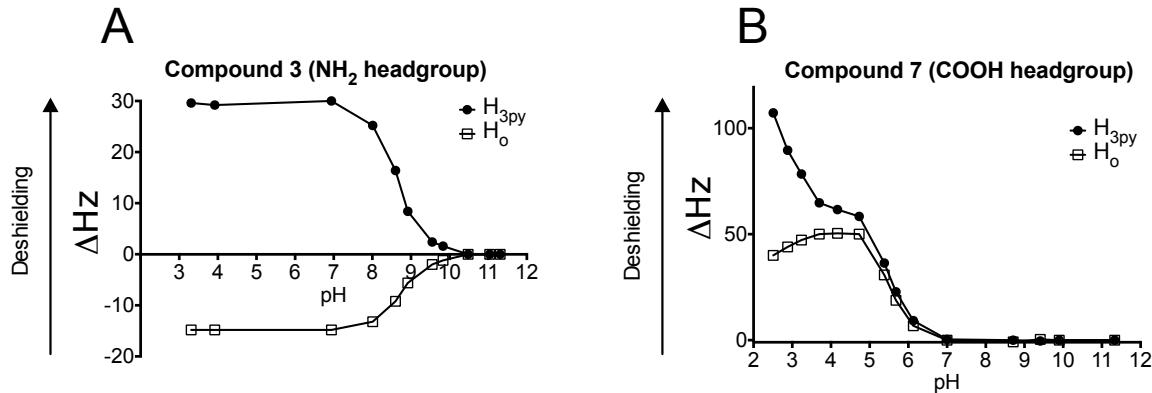
(a) pKa value of the central pyridine ring, predicted with the CS^{PK}a™ software from ChemSilico LLC.

1-3; 5-7

4

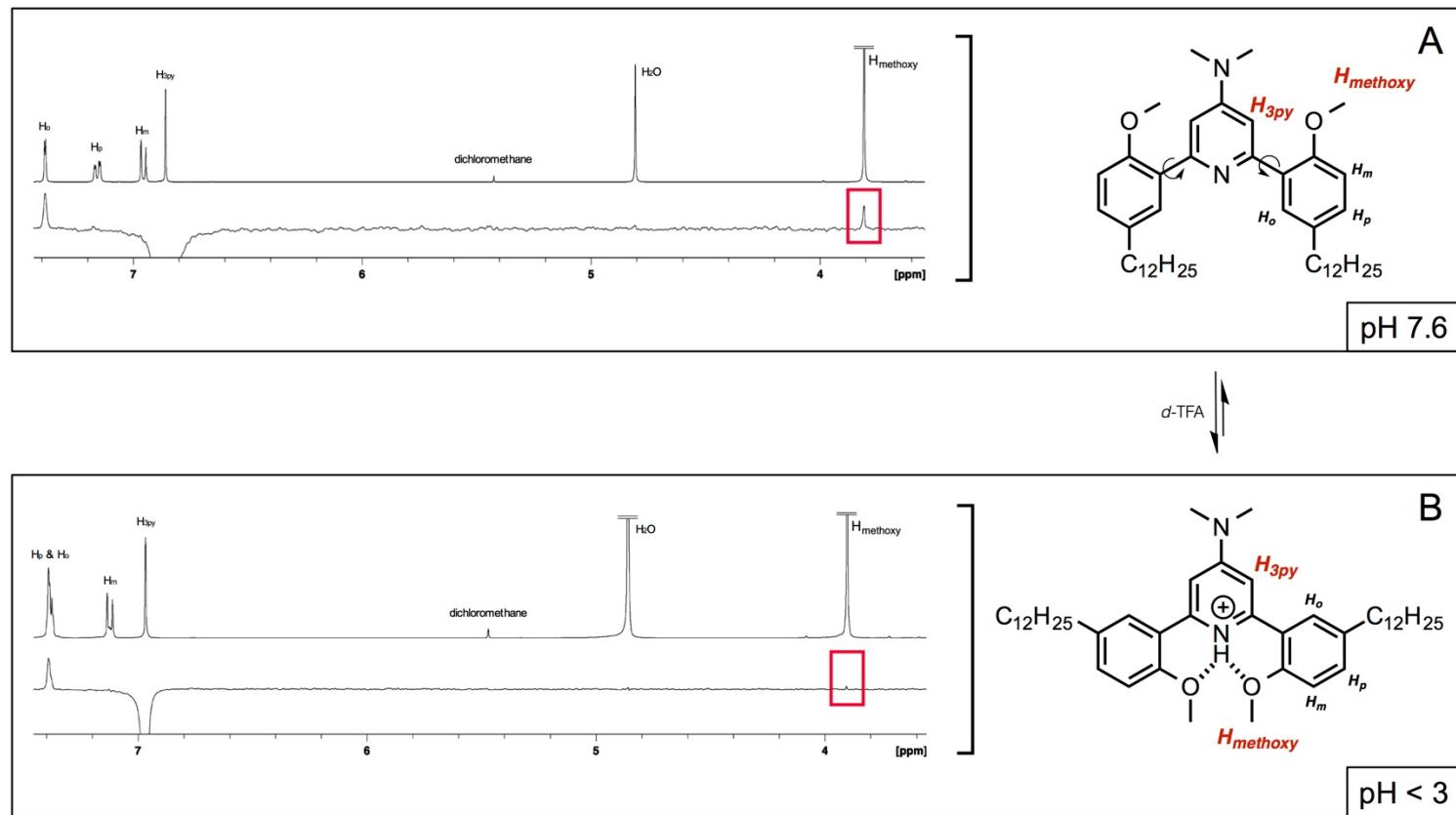
Seven lipids were synthesized, bearing various headgroups and chain lengths, to investigate structure-activity relationships. Compounds **1-3** presented carboxylic acid, N,N-dimethylamine and primary amine headgroups respectively, in order to tune the in silico predicted $pK_{a_{\text{pyr}}}$ value of the central pyridine ring. This protonation triggers the conformational change of the switchable lipids. Compound **4** is a non-switchable negative control lipid. It is unable to perform conformational change because of the removal of the two methoxy moieties. Compounds **5, 2** and **6** share the same N,N-Dimethyl headgroup, but differ in their alkyl chains length (respectively 10, 12 and 14 carbons). The compound **7**, bearing 10 carbons in its alkyl chain, has better solubility in CD_3OD than compound **1**, bearing 12 carbons in its alkyl chain, and was therefore preferred for NMR studies.

Figure S2.2 - ^1H NMR titration experiments of the switchable lipids **3** (A) and **7** (B) in CD_3OD upon incremental additions of either acid or base (d-TFA or DBU)



In panel A, ^1H NMR titration of the switchable lipid **3**, bearing NH_2 headgroup shows that the $\text{H}_{3\text{py}}$ proton is deshielded in a sigmoidal fashion upon acidification. This was attributed to the protonation of the pyridine, which moved electronic density away from the aromatic ring. This observation is in accordance with our previously reported molecular tweezer NMR studies. The jump of chemical shift took place over ~ 2 units of pH, which is consistent with a protonation-induced conformational equilibrium. Performing sigmoidal curve fitting, the $\text{pK}_{\text{a}_{\text{pyr}}}$ value of the compound **3** is estimated to be 8.64. Nevertheless, pH measurements were made in CD_3OD , and may not corroborate with pH values measured in aqueous medium. Panel B shows the ^1H NMR analysis of the pH-dependent conformational change of the switchable lipid **7**, bearing COOH as headgroup. For this experiment, the compound **7** (10 carbons alkyl chains) was used in place of the compound **1** (12 carbons alkyl chains) because of solubility issues in CD_3OD . The first jump in chemical shift between pH 7 and 5 was attributed to the protonation of the carboxyl group. The protonation of the pyridine occurred below pH 3.5, which was unsuitable for endosomal delivery. Although no real distinction can be done between the $\text{pK}_{\text{a}_{\text{pyr}}}$ values of **3** and **2**, these results tend to confirm the overall ranking of $\text{pK}_{\text{a}_{\text{pyr}}}$ values predicted in silico (see Table S2.1).

Figure S2.3 - 1D-NOESY ^1H experiments on the switchable lipid **2** (CD_3OD)



The $\text{H}_{3\text{py}}$ proton of the switchable lipid **2** was irradiated to investigate its spatial proximity with other protons ($\text{H}_{\text{methoxy}}$ and H_o). At pH 7.6 (Figure S2.3A), both $\text{H}_{\text{methoxy}}$ and H_o protons gave rise to a nuclear overhauser effect, meaning both protons could be in the close proximity

of H_{3py} proton. This suggested that free rotation around the aromatic bond allowed a dynamic equilibrium between the two conformations (H_{methoxy} and H_o in *cis* or *trans* conformation). Below pH 3 (Figure S2.3B), the nuclear overhauser effect between H_{3py} and H_{methoxy} disappeared, suggesting that only the *cis* conformation was observed. Logically, the nuclear overhauser effect between H_{3py} and H_o remains observable, as they are still in close spatial proximity when the conformation is frozen at acidic pH. Rather than a conformational switch, this experiment showed that the tricyclic structure allowed dynamic equilibrium between both conformations in methanol at pH 7.6, but froze its conformation upon protonation of the pyridine. These observations were consistent with previous NMR studies of the tricyclic structure, showing the *cis* conformation was prevalent when pyridine was protonated.

Figure S2.4 - Physicochemical parameters of liposomal formulations used in this study

Liposome formulation	Feeding Molar Ratio (%)	Quantified amount of switchable lipid ^b (%)	Upon preparation			After storage 3 months at 4°C	
			Diameter (nm)	PdI	Zeta potential (mV)	Diameter (nm)	PdI
2/DSPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀	25:70:5	23.4	124 ± 1	0.22 ± 0.01	-5.8 ± 1	127 ± 2	0.22 ± 0.01
2/DSPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀	50:45:5	42.9	181 ± 6	0.15 ± 0.02	-13.8 ± 2	174 ± 2	0.11 ± 0.01
2/DSPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀	75:20:5	55.5	169 ± 18	0.11 ± 0.03	-11.4 ± 2	145 ± 3	0.20 ± 0.02
5/DSPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀	75:20:5	64.4	187 ± 2	0.03 ± 0.02	-12.6 ± 1	180 ± 2	0.04 ± 0.02
6/DSPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀	75:20:5	57.9	148 ± 14	0.20 ± 0.02	-8.4 ± 1	139 ± 2	0.15 ± 0.02
1/DSPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀	75:20:5	54.0	156 ± 6	0.09 ± 0.01	-16.1 ± 1	164 ± 2	0.09 ± 0.02
3/DSPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀	75:20:5	Not done	124 ± 1 ^a	0.15 ± 0.01 ^a	-10.4 ± 2 ^a	Unstable	Unstable
4/DSPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀	50:45:5	42.6	180 ± 4	0.12 ± 0.02	-16.9 ± 2	179 ± 3	0.14 ± 0.02
DSPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀	95:5	N/A	109 ± 2	0.21 ± 0.02	-8.3 ± 1	110 ± 1	0.19 ± 0.02

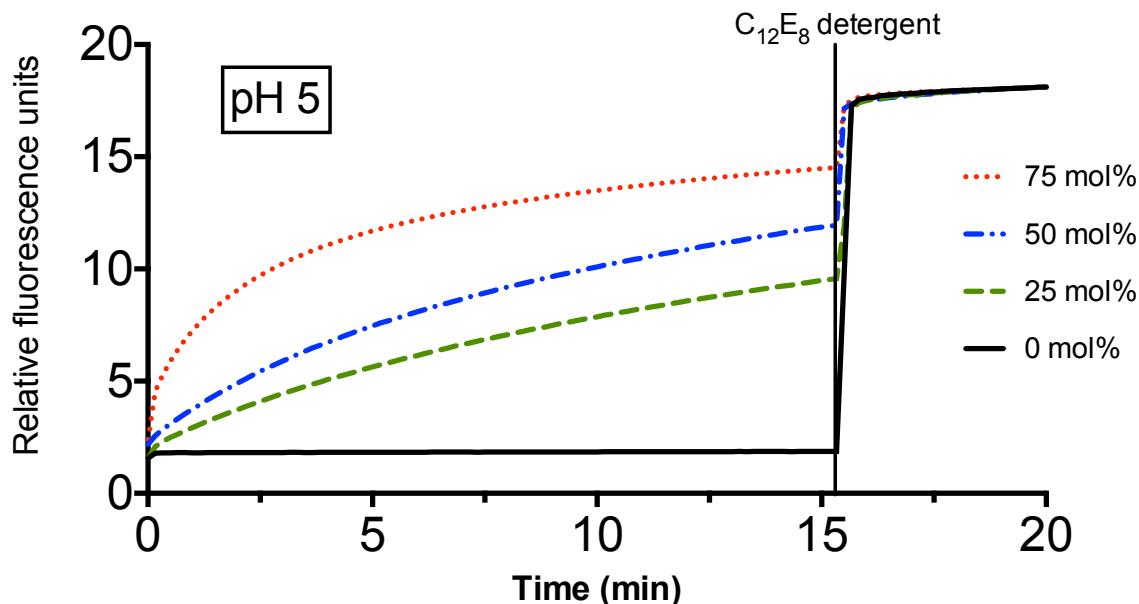
(a) Liposome formulations containing the switchable lipid **3** (NH₂ headgroup) aggregated and spontaneously released the loaded sulforhodamine B in less than one week of storage. (b) Quantification by HPLC-UV of the amount of switchable lipid successfully incorporated in the formulations.

Quantification of the switchable lipid incorporated into the liposome preparation revealed that not all the starting material was successfully combined with the lipidic bilayers during formulation, especially with an initial loading ratio of 75 mol%. For the switchable lipid **2** (N,N-Dimethyl headgroup), a feeding ratio of 25, 50 and 75 mol% yielded a final molar ratio of 23.4, 42.9 and 55.5 respectively. This observation is also true for the other switchable lipids, including the non-switchable lipid **4**. This suggests that the switchable lipids may be too hydrophobic to be entirely incorporated at molar ratios above 50 mol%, using DSPC and DSPE-PEG₂₀₀₀ (5 mol%) as co-lipids.

All liposome formulations exhibited a hydrodynamic diameter below 200 nm and a slightly negative zeta potential. Stability experiments realized over 3 months of storage at 4°C revealed no noticeable change of hydrodynamic diameter and polydispersity index for all formulations except for liposomes prepared with the switchable lipid **3** (NH₂ headgroup). This formulation spontaneously aggregated and released all the encapsulated sulforhodamine B in less than one week of storage at pH 7.4. This observation is consistent with the predicted pK_a_{pyr} value of 7.05

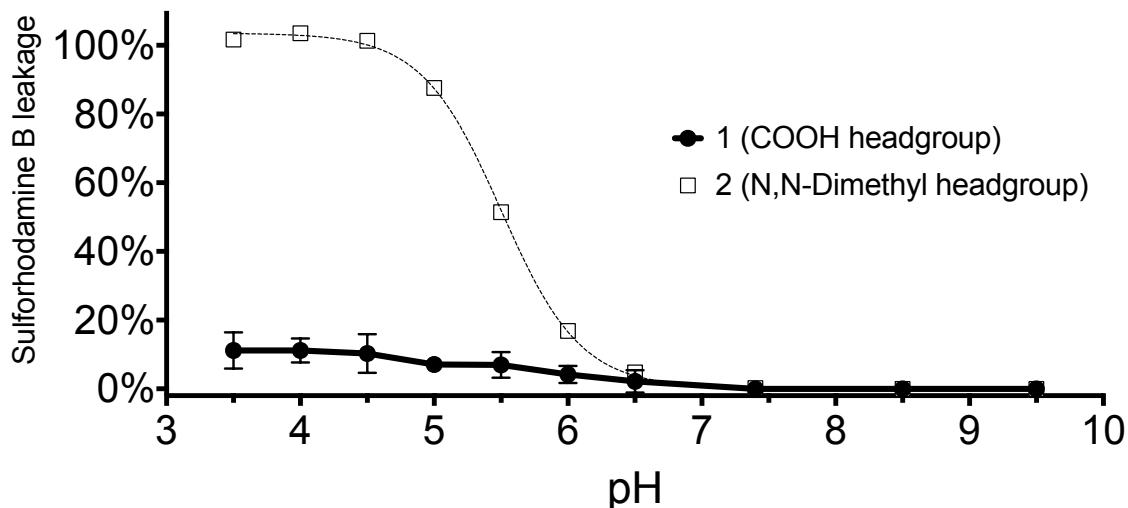
for this lipid and with its direct implication in the destabilization of the liposome and release of the entrapped content. All the other liposome formulations were able to keep the sulforhodamine B dye encapsulated for at least 3 months.

Figure S2.5 - Fluorescence kinetic profiles of sulforhodamine B release at pH 5 for pH-sensitive formulations incorporating increasing amounts of switchable lipid **2** (N,N-Dimethyl headgroup)



This figure shows the kinetic profiles of sulforhodamine B release from the liposomal formulations incorporating 0, 25, 50 or 75 mol% of the switchable lipid **2** (N,N-Dimethyl headgroup) at pH 5 (co-lipid is DSPC and 5 mol% of DSPE-PEG₂₀₀₀ is included in all preparations). t = 0 min corresponds to the addition of the liposome aliquot into the cuvette. Curves were aligned with the I_{100%} intensity value at t = 19 min. t = 15 min corresponds to the addition of C₁₂E₈ detergent in the cuvette to release all the fluorescence. These results show higher and faster release when the percentage of the switchable lipid **2** in the formulation increases.

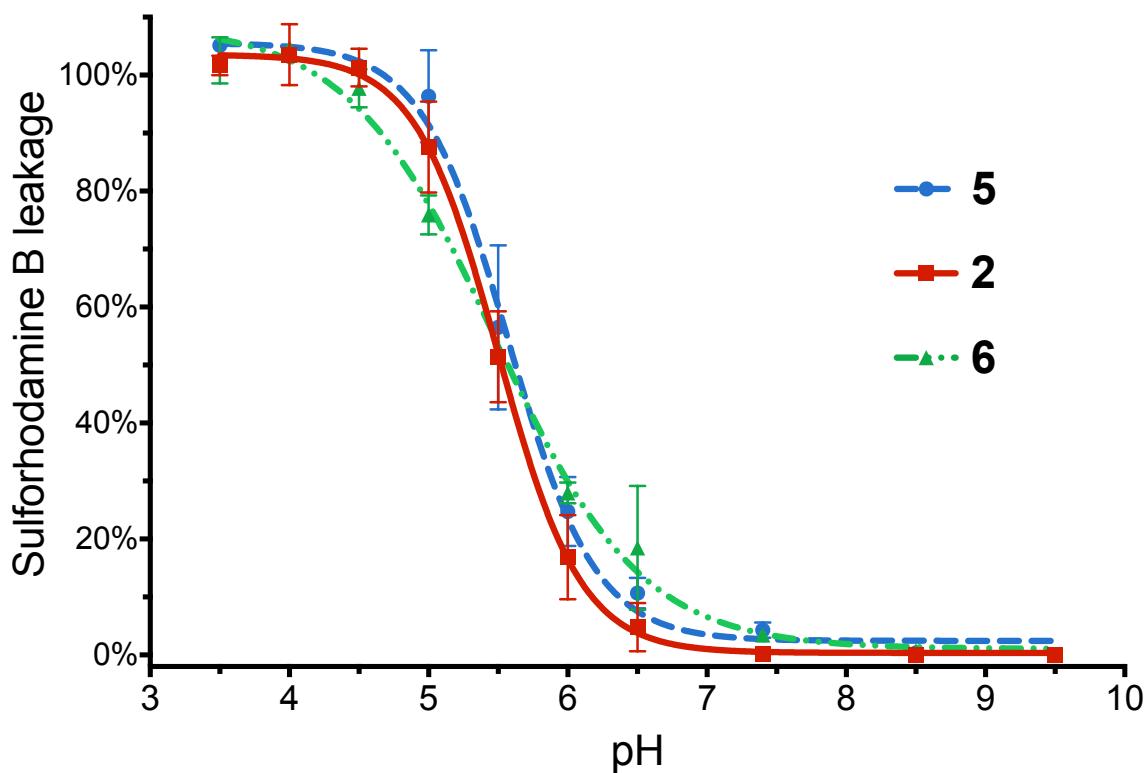
Figure S2.6 - Sulforhodamine B leakage profile of liposomal formulations incorporating the switchable lipid **1** (COOH headgroup)



This figure presents the leakage as function of pH for the liposome preparations incorporating 75 mol% of the switchable lipid **1** (COOH headgroup – black line) or **2** (N,N-Dimethyl headgroup – dotted line). Co-lipids are DSPC (20 mol%) and DSPE-PEG₂₀₀₀ (5 mol%). Percentages of leakage are obtained after a 15-minute incubation in buffers at different pH values. Data points represent mean \pm SD. Experiments were run in triplicate. Adjusted $r^2 > 0.995$ for all non-linear sigmoidal fittings.

As anticipated from the in silico predictions ($pK_{a\text{pyr}} = 3.15$ – Table S2.1) and NMR titration experiments (Figure S2.2B), the liposome formulation incorporating 75 mol% of the switchable lipid **1** (COOH headgroup) did not show any significant pH-dependent release properties. Even at pH 3.5, only 11% of the content was released, suggesting that the switchable lipid **1** remains unprotonated and is therefore unable to destabilize the liposome bilayer. On the contrary, the liposome formulation incorporating 75 mol% of the switchable lipid **2** (N,N-Dimethyl headgroup – $pK_{a\text{pyr}} = 5.28$) showed strong pH-dependent release properties.

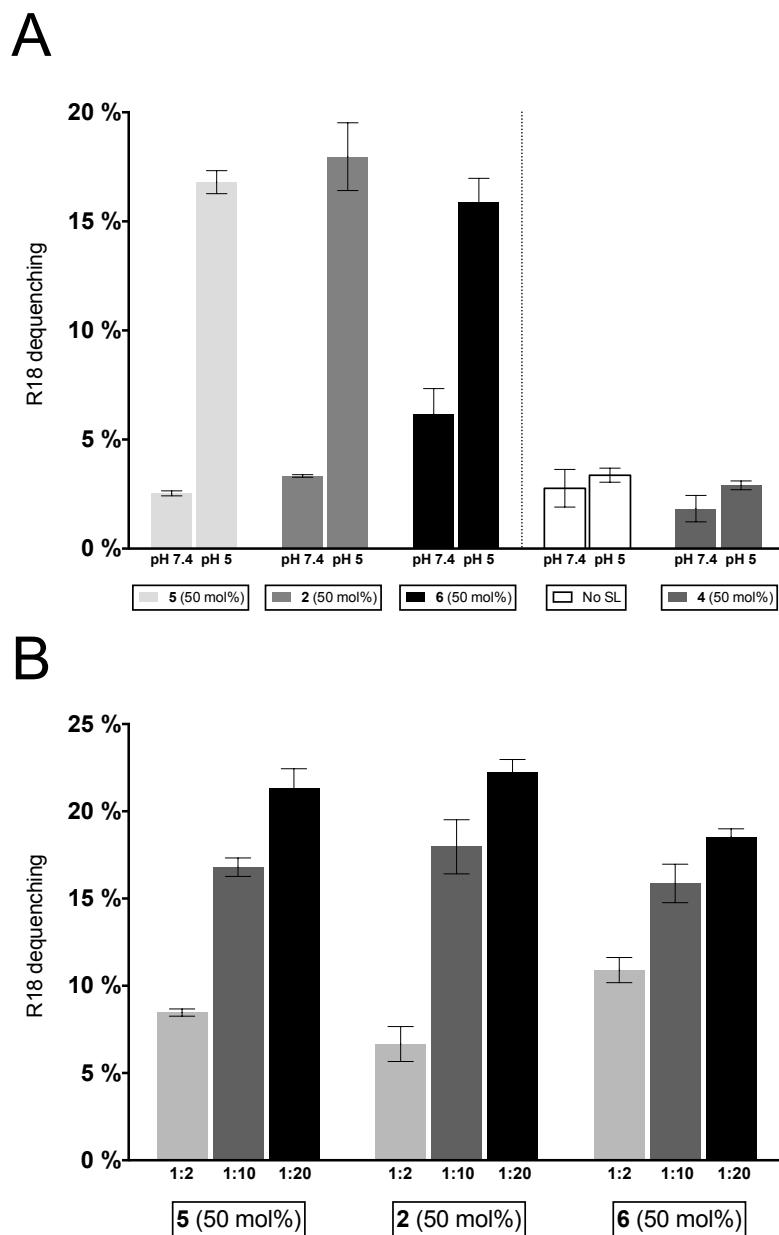
Figure S2.7 - Sulforhodamine B leakage profiles of liposomal formulations incorporating the N,N-Dimethyl-based switchable lipids with variable alkyl chains length



This figure presents the leakage as function of pH for liposome preparations incorporating 75 mol% of either the switchable lipid **5** (10 carbons alkyl chains), **2** (12 carbons alkyl chains) and **6** (14 carbons alkyl chains). Co-lipids are DSPC (20 mol%) and DSPE-PEG₂₀₀₀ (5 mol%). Percentages of leakage are obtained after a 15-minute incubation in buffers at different pH values. Data points represent mean \pm SD. Experiments were run in triplicate. Adjusted $r^2 > 0.995$ for all non-linear sigmoidal fittings.

All N,N-Dimethyl-based switchable lipids (**5**, **2** and **6**) were able to trigger a complete and pH-responsive release, meaning there is no significant influence of the chain length on the pH-sensitive properties. This experiment confirms that the $pK_{a,pyr}$ of the switchable lipids is tuned by the nature of the headgroup rather than the chains length, in accordance with in silico predictions (Table S2.1). Also, this experiment shows that the tricyclic switchable unit is able to overcome the strong hydrophobic interactions between the alkyl chains and the octadecyl-based co-lipids. The length of the alkyl chains does not impair the conformational switch.

Figure S2.8 - R18 lipid-mixing assays of the N,N-Dimethyl-based switchable lipids



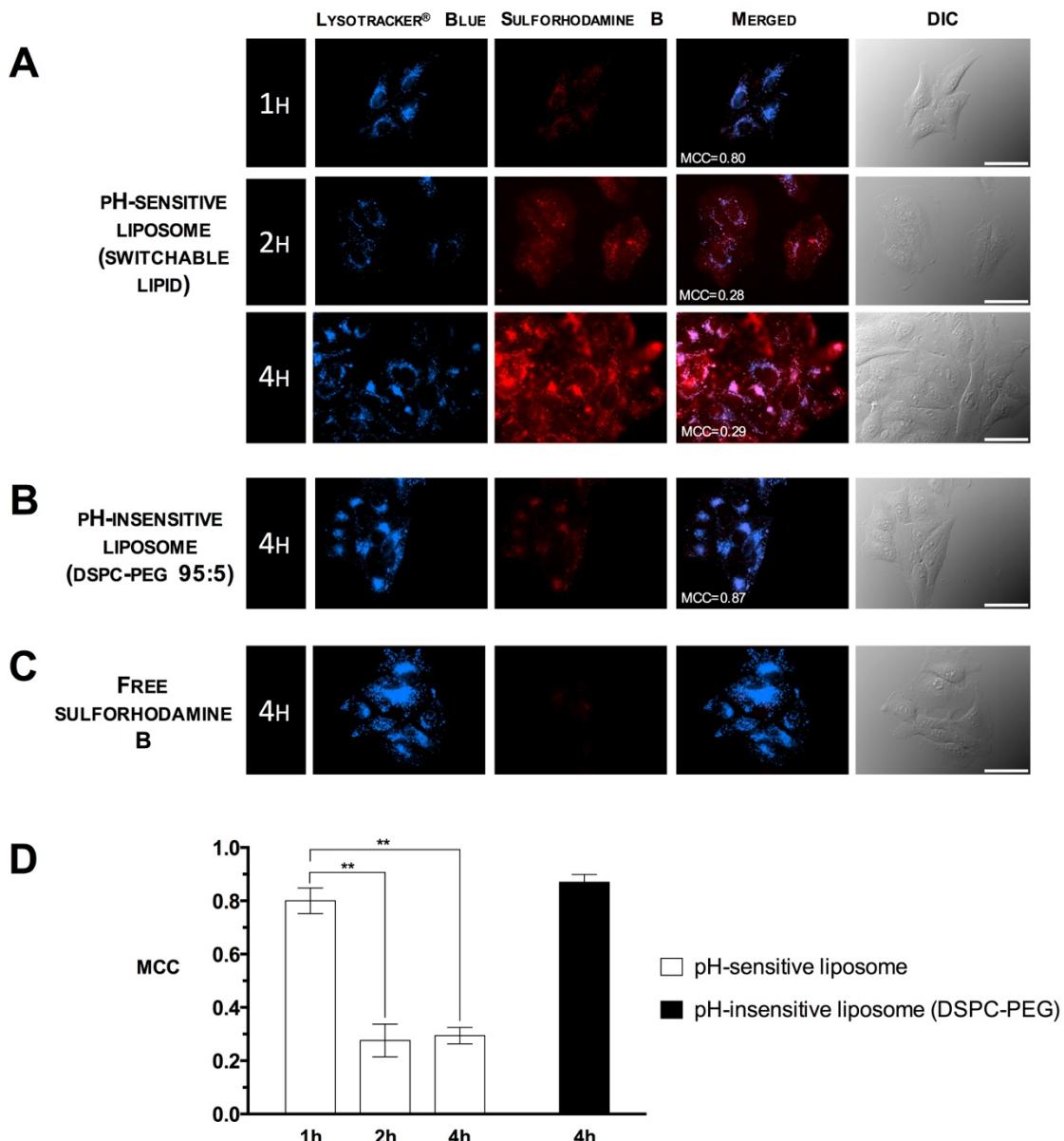
This figure shows (A) R18 lipid-mixing assays at pH 7.4 and 5. Labeled liposomes were made of switchable lipid/DSPC/R18/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:39:6:5 mol%. The switchable lipids used in this experiment are N,Ndimethyl-based and the impact of their alkyl chains length is studied (C10; C12; C14, respectively compound **5**, **2** and **6**). “No SL” represents the negative control formulation without switchable lipid (DSPC/R18/DSPEPEG₂₀₀₀ 89:6:5). Unlabeled liposomes were made of POPC 100 mol%. The molar ratio of labeled/unlabeled liposomes was 1:10. All percentages of dequenching were calculated at t

= 15 min after incubation. Bar charts are represented as the mean \pm SD. Experiments were run in triplicate.

Panel (B) shows the influence of the molar ratio of labeled/unlabeled liposomes on the lipid-mixing assay. The ratios studied were 1:2, 1:10 and 1:20 (0.01 mM of labeled liposomes for 0.02, 0.10 or 0.20 mM of unlabeled liposomes in the cuvette).

Incubation of the pH-sensitive formulations based on the switchable lipids **5**, **2** and **6** with empty POPC vesicles led to a 5- to 6- fold increase in fluorescence after 15 minutes under weakly acidic conditions compared to the residual dequenching observed at pH 7.4 (Figure S2.8A). This fusion ability at acidic pH was attributed to the presence of switchable lipids, since lipid mixing of two negative control formulations (no switchable lipid or non-switchable lipid **4**) generated less than 4% dequenching at either pH 7.4 or 5. Varying the chain length of the switchable lipids did not change the general trend, as previously observed during the leakage assays. Mixing labeled liposomes containing switchable lipids with increasing concentrations of unlabeled POPC vesicles led to an enhancement of the R18 dequenching fluorescence (Figure S2.8B). This result is consistent with an interliposomal fusion mechanism, as more dequenching occurs when more unlabeled liposomes are available for mixing.

Figure S2.9 - Fluorescence microscopy imaging of sulforhodamine B delivery on HeLa cells



(A) 1, 2 and 4-hour incubations of HeLa cells with the pH-sensitive liposomal formulation 2/DSPC/DSPEPEG₂₀₀₀ (50:45:5). (B) 4-hour incubation of HeLa cells with the pH-insensitive negative control formulation without switchable lipid (DSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5). (C) 4-hour incubation of HeLa cells with free sulforhodamine B. (D) Colocalization quantification between the LysoTracker® Blue and the sulforhodamine B channels, using the Manders' colocalization coefficient (MCC). HeLa cells were stained with LysoTracker® Blue DND-22 (100 nM) during 30 minutes just before imaging. The incubation medium was Opti-MEM®/FBS 90:10. The final concentration of sulforhodamine B in the dish was 900

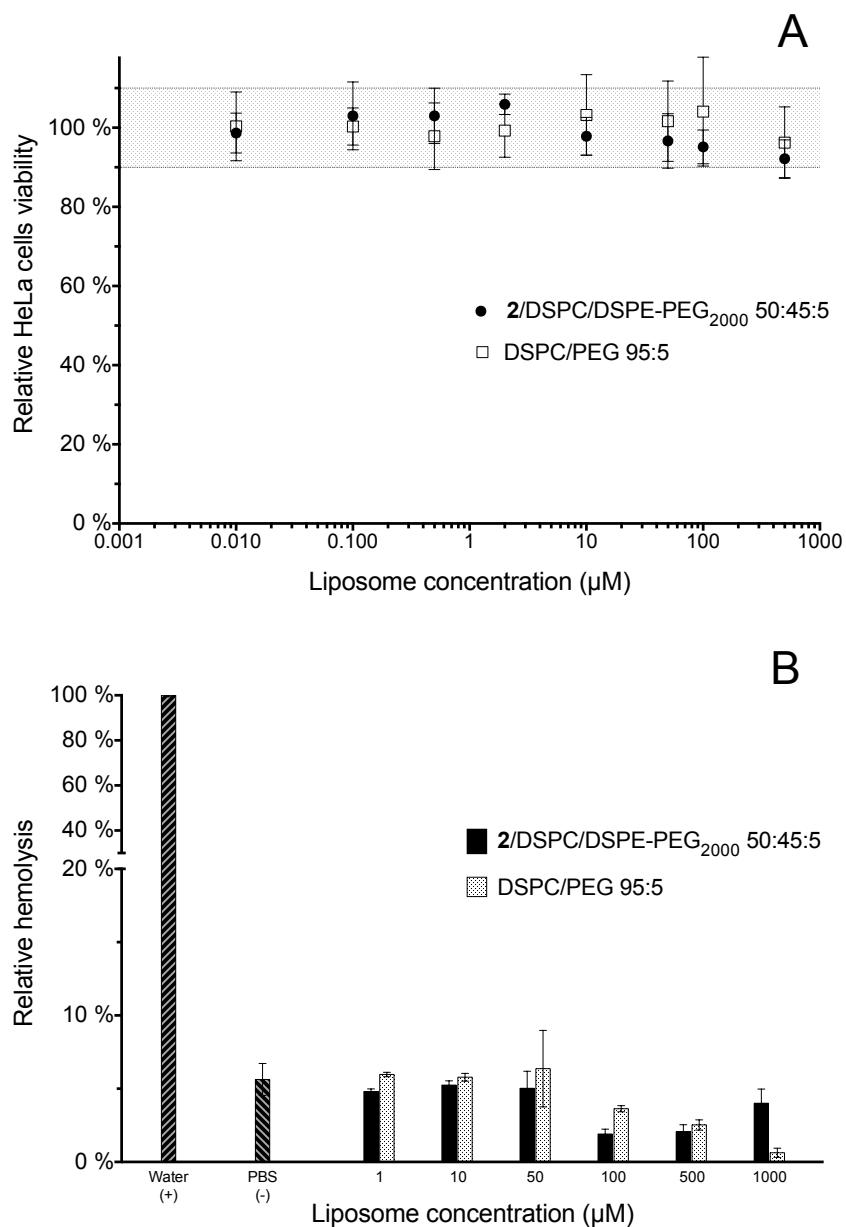
nM (encapsulated content). Bar = 20 μ m. Bar charts are represented as the mean \pm SD of an average of 3 different pictures, containing at least 4 cells each. ** = p<0.01 using a Student *t* test.

After a 1-hour incubation, the pH-sensitive liposomes are immediately taken up via the endosomal pathway, as shown by the visible punctate colocalization and a MCC value of 0.80 between the LysoTracker[®] Blue and the sulforhodamine B channels (Figure S2.9A and S2.9D). 2 and 4-hour incubation period with the same pH-sensitive formulation led to an efficient endosomal escape and cytoplasmic delivery of sulforhodamine B, as evidenced by the significant drop of MCC value (0.28 and 0.29 respectively) and diffuse red fluorescence in the cytosol.

4-hour incubation of HeLa cells with the pH-insensitive negative control DSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5 liposomal preparation showed a strong punctate colocalization between the sulforhodamine B and the acidic compartments and a MCC value of 0.87, confirming the lack of endosomal escape capabilities of this formulation (Figure S2.9B and S2.9D).

4-hour incubation of HeLa cells with free sulforhodamine B resulted in the absence of red fluorescence in both the endosomal pathway and cytoplasm, confirming the inability of the sulforhodamine B to cross the cytoplasmic and endosomal membranes on its own (Figure S2.9C).

Figure S2.10 - *In vitro* cell viability and hemocompatibility assays



(A) Resazurin-based *in vitro* cell viability assay on HeLa cells. (B) *In vitro* hemocompatibility assay performed on human red blood cells. Plain liposomes exhibited no toxicity up to 500 μM , similarly to DSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5) liposomes. No hemolytic activity was detected at the same concentrations, ensuring the safety of a systemic injection of the formulation.

Figure S2.11 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound **1** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$)

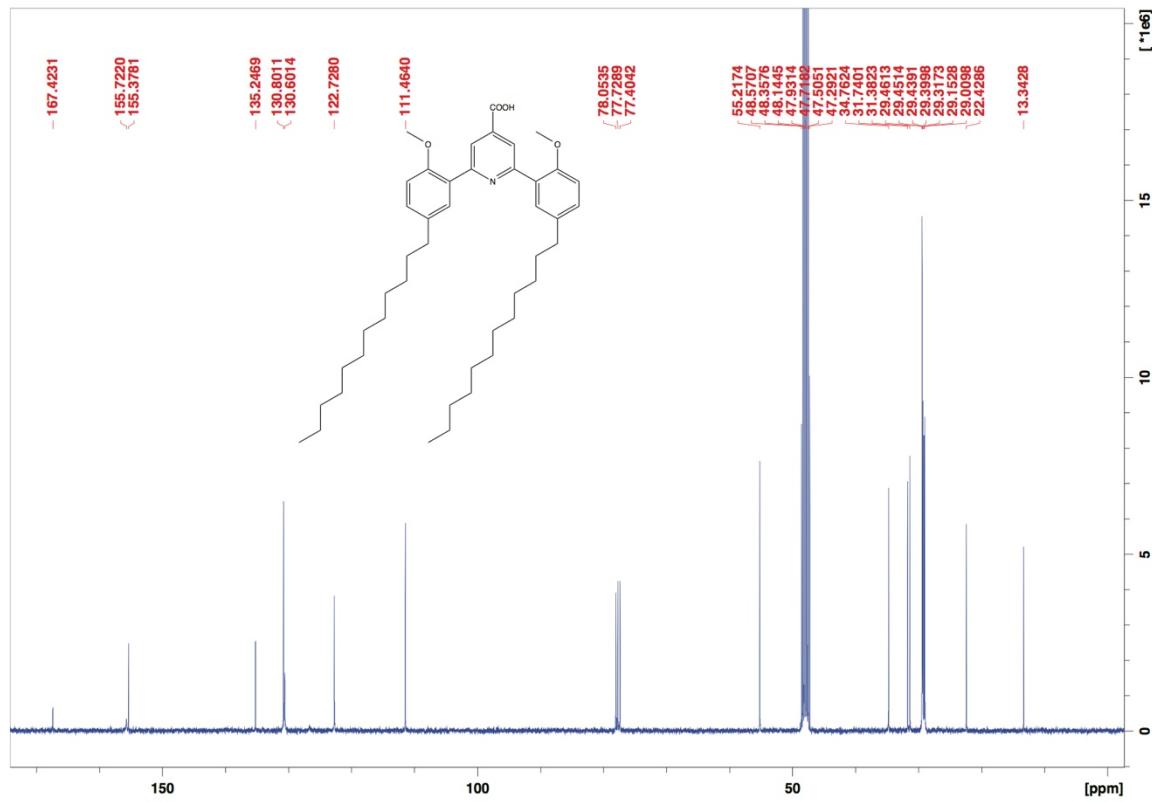
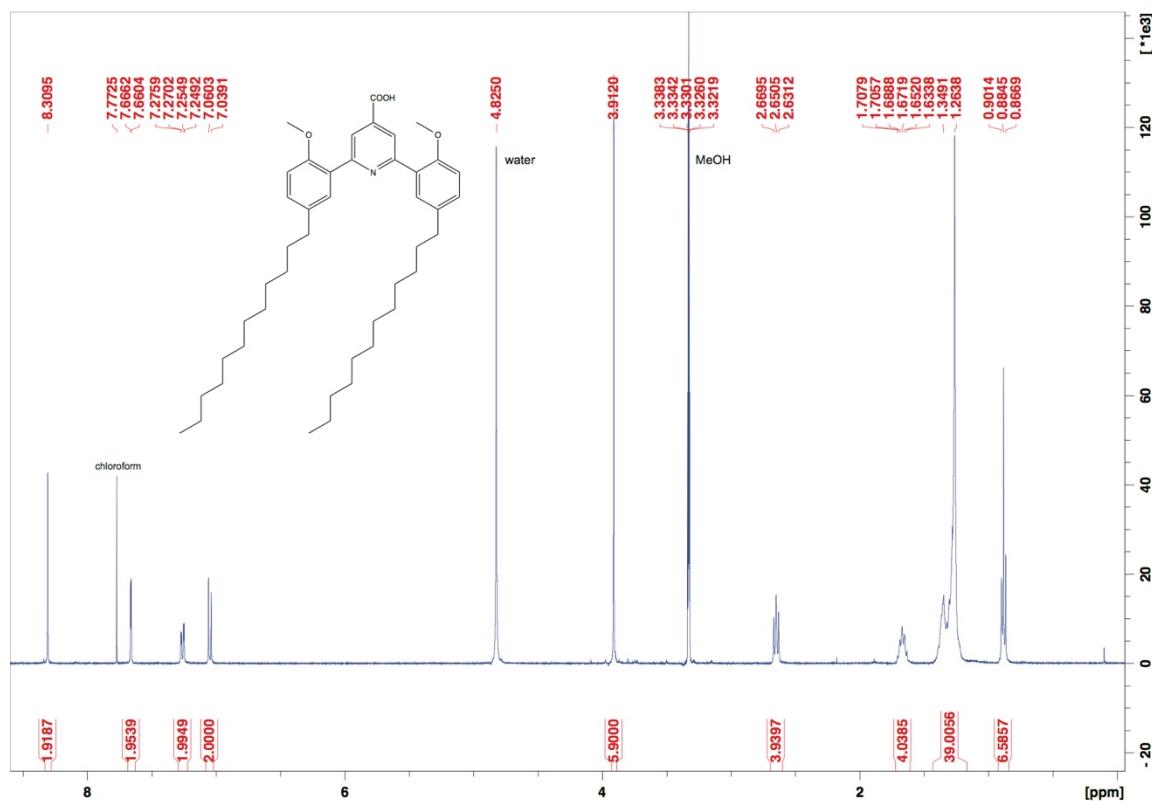


Figure S2.12 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound **2** (CDCl_3)

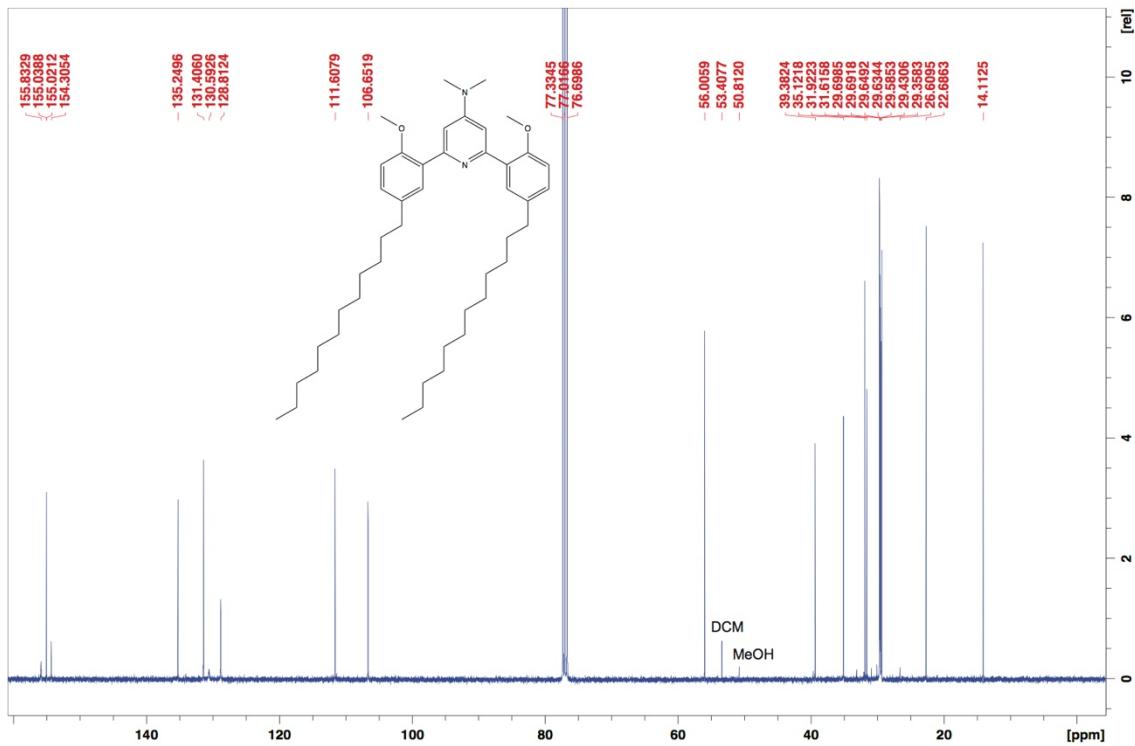
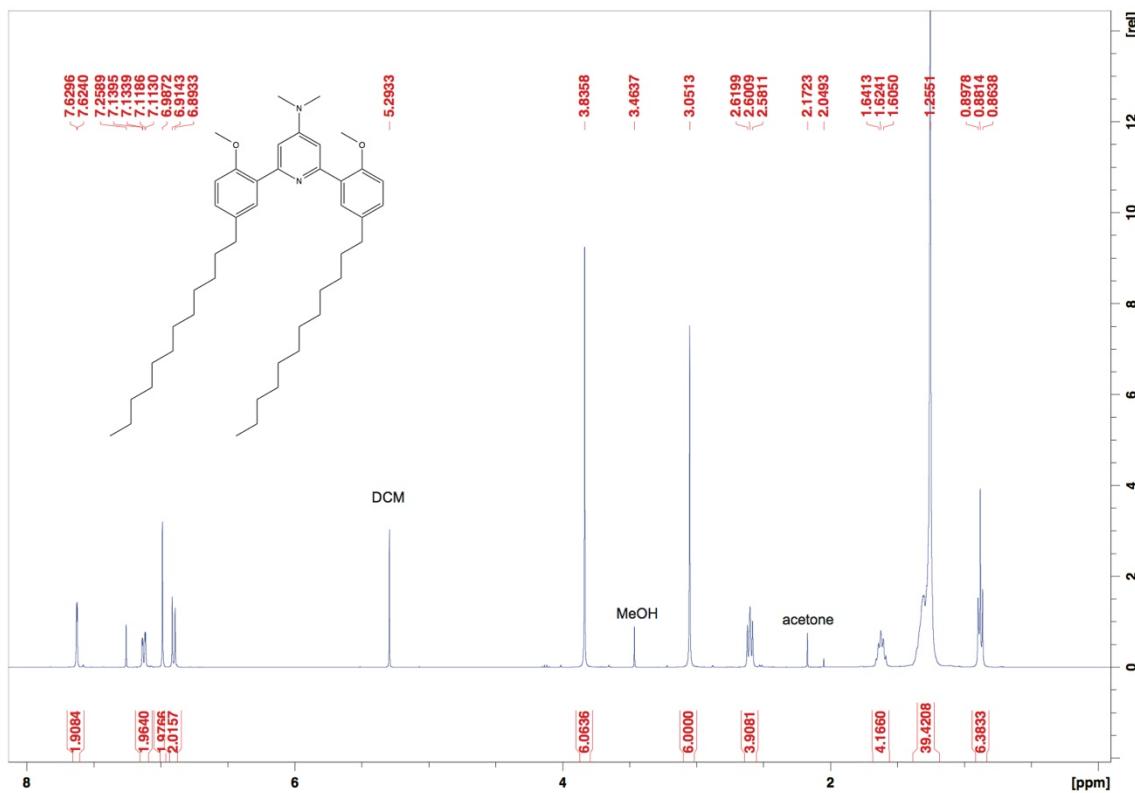


Figure S2.13 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound **3** (CDCl_3)

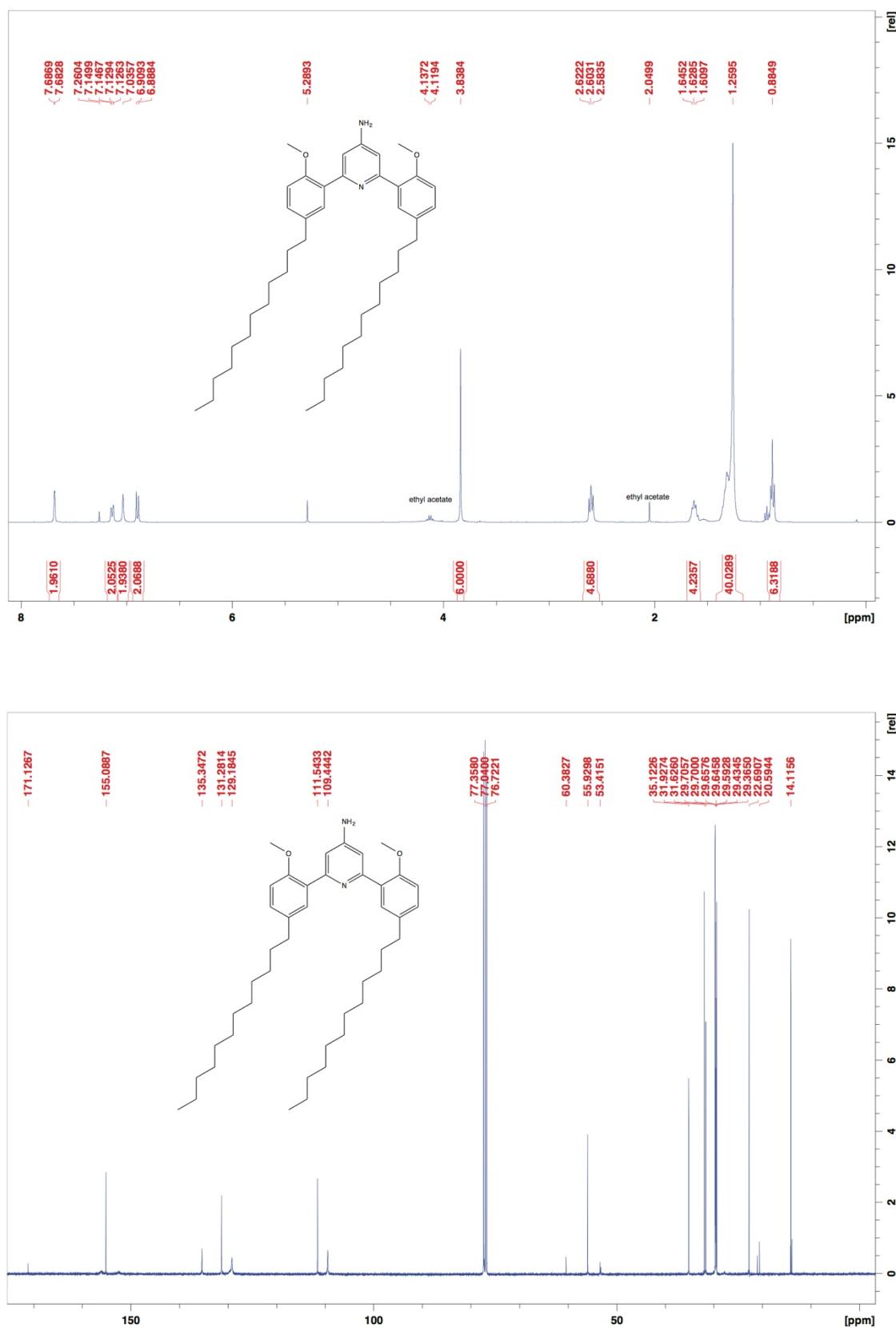


Figure S2.14 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound **4** (CDCl_3)

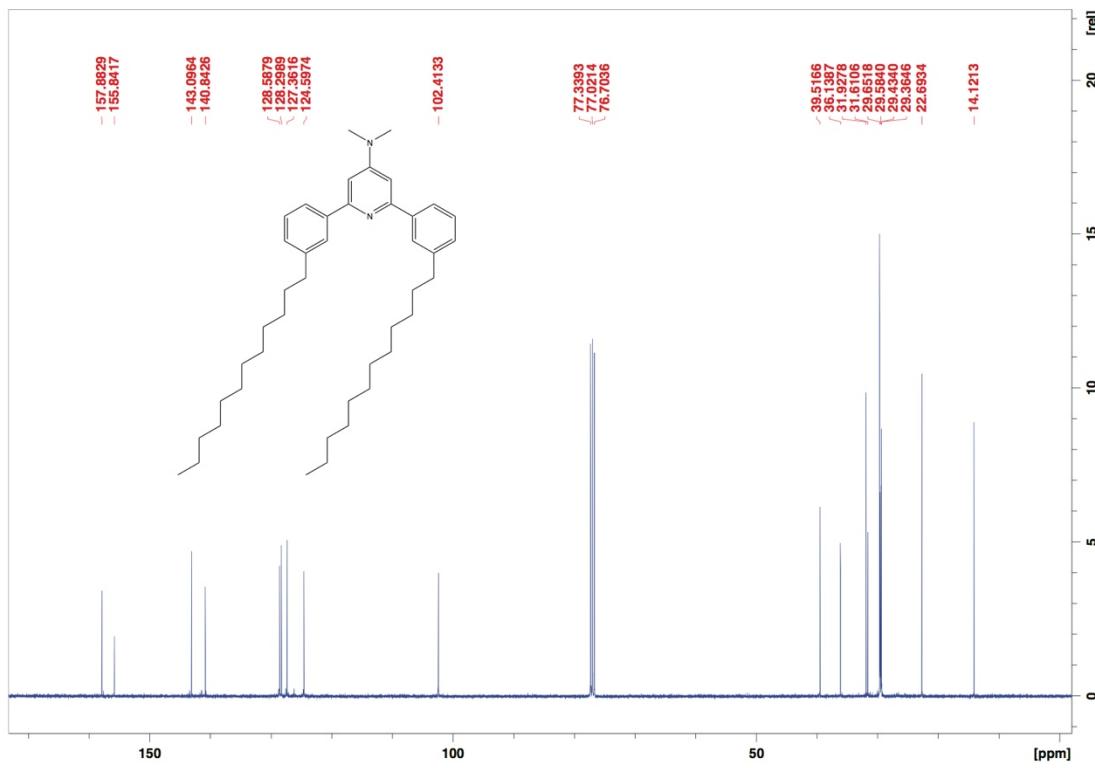
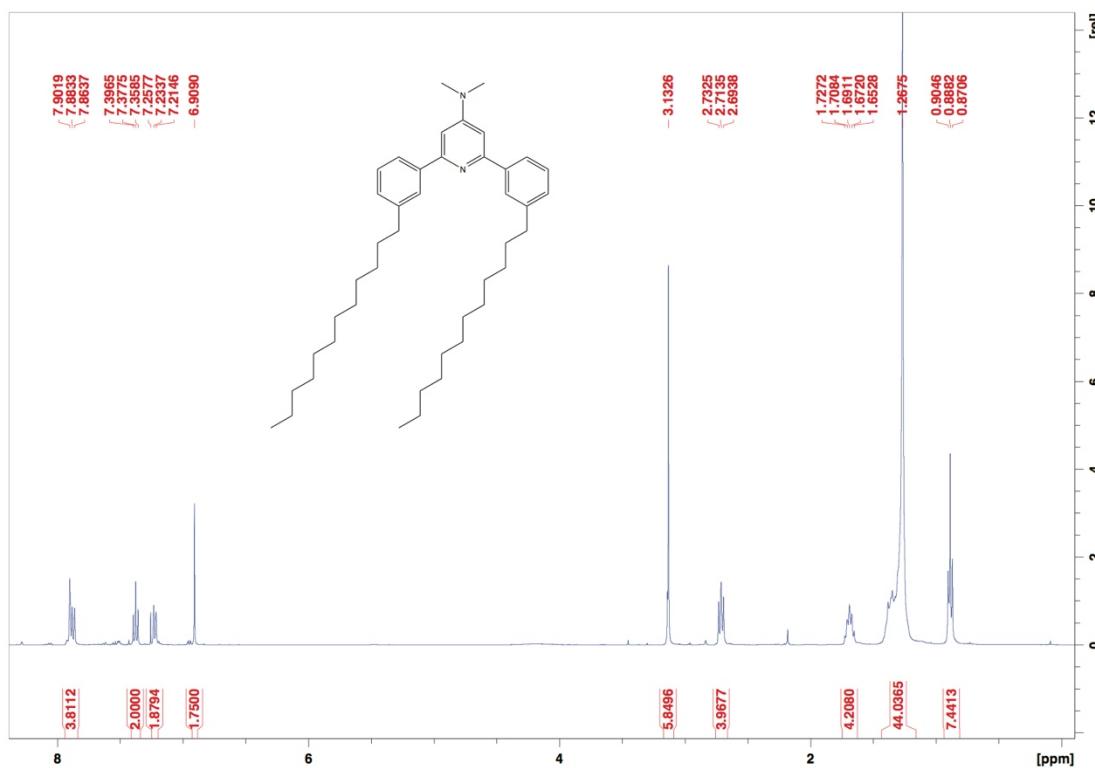


Figure S2.15 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound **5** (CDCl_3)

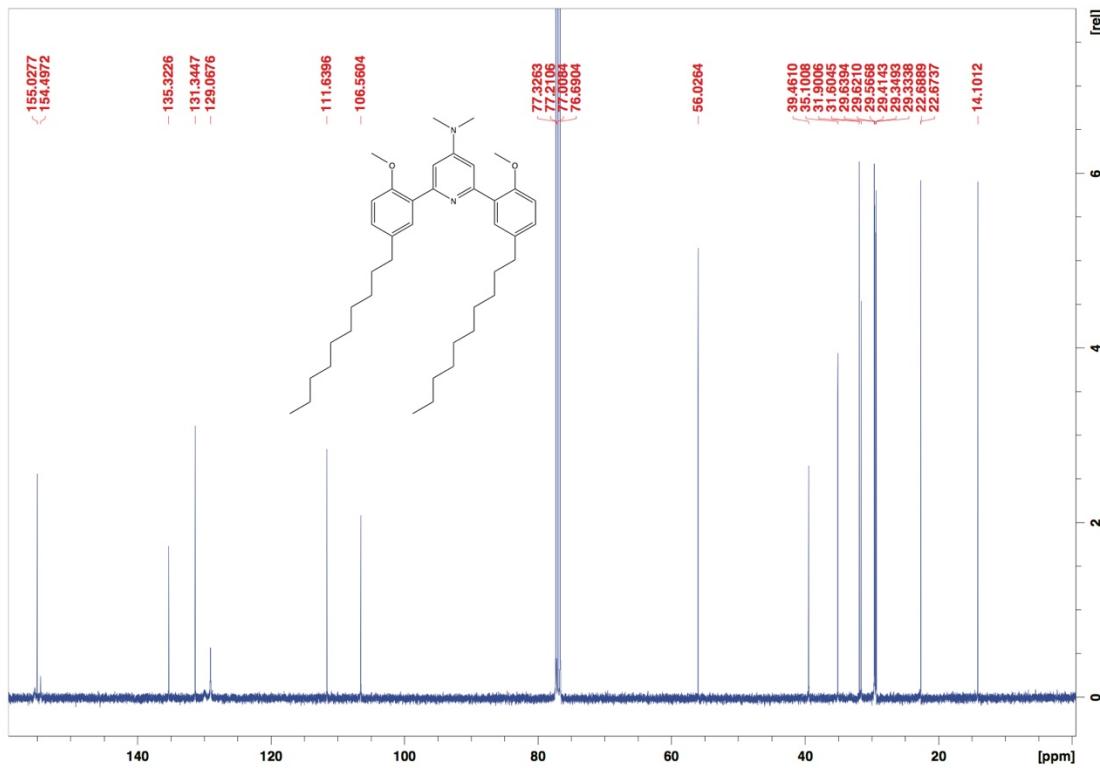
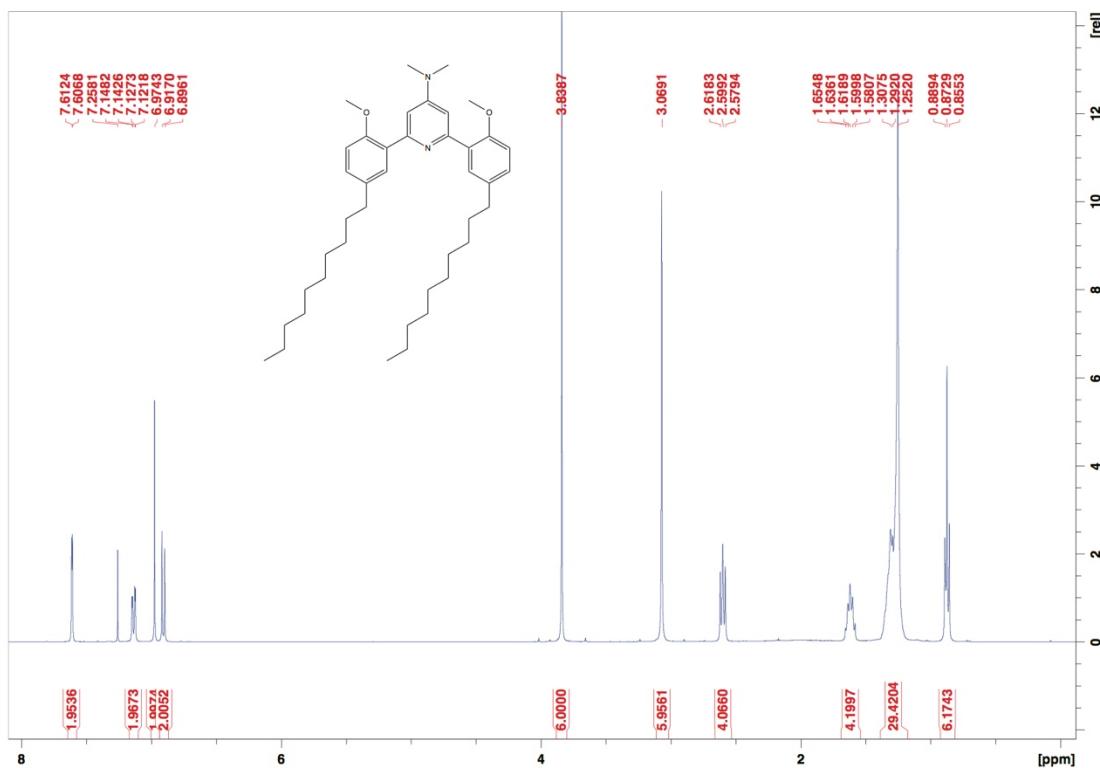


Figure S2.16 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound **6** (CDCl_3)

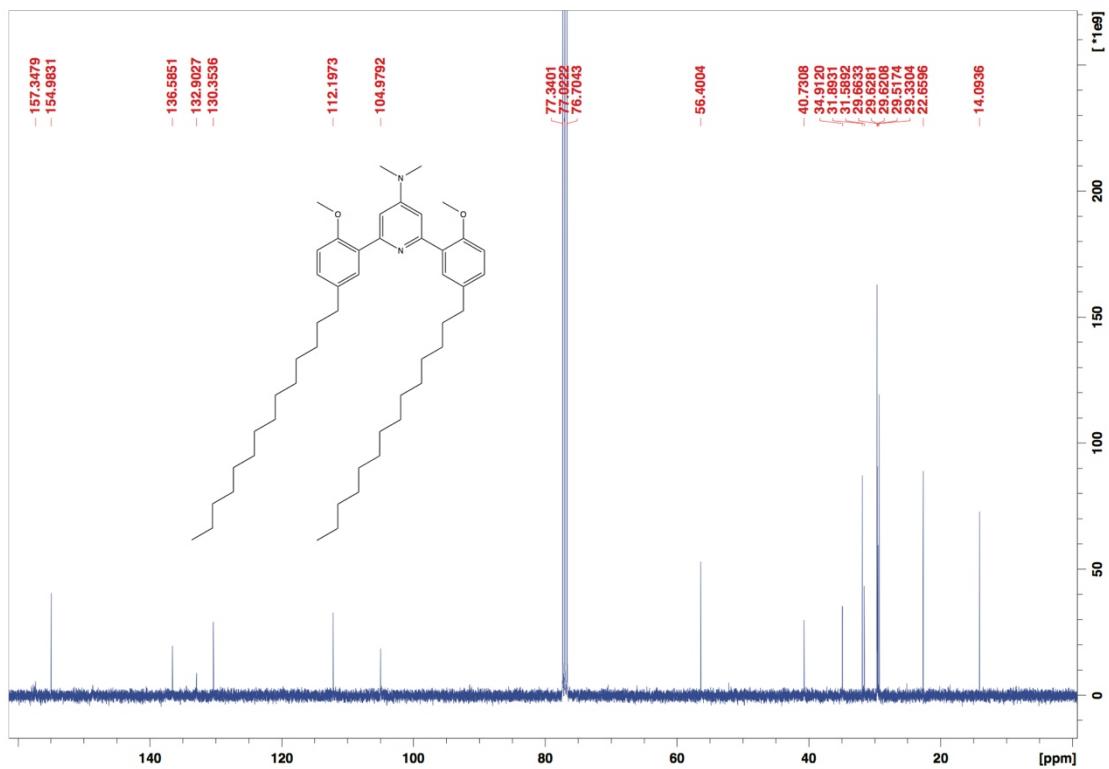
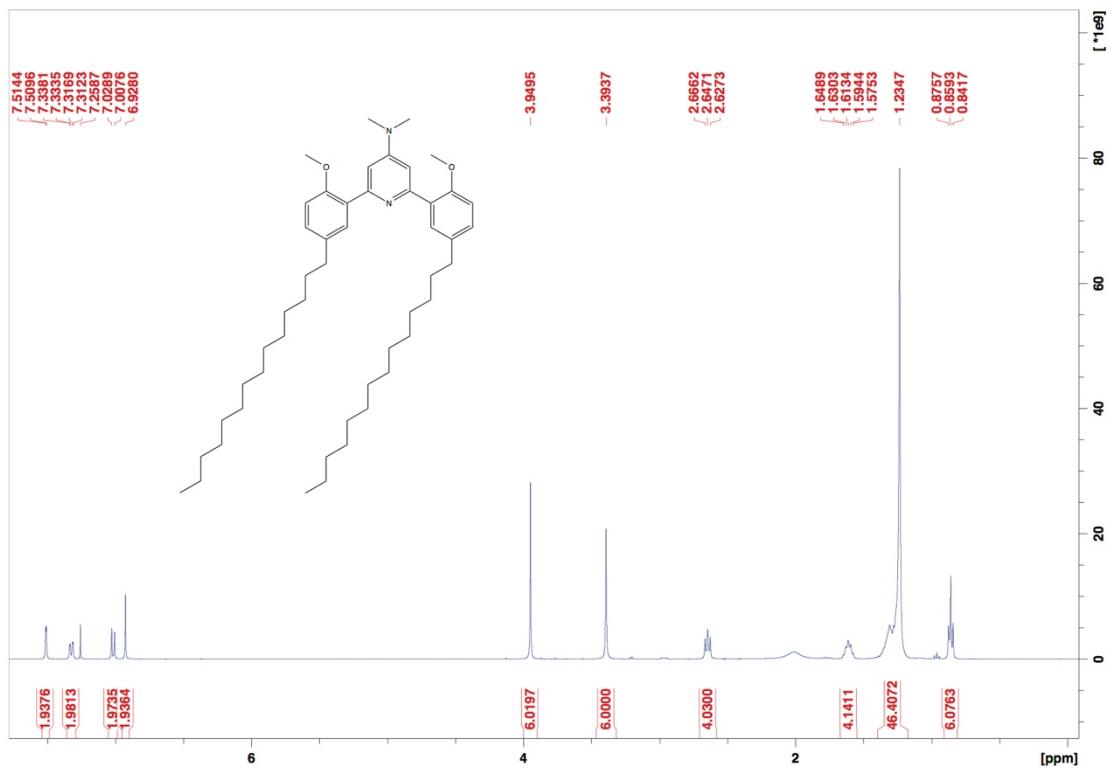
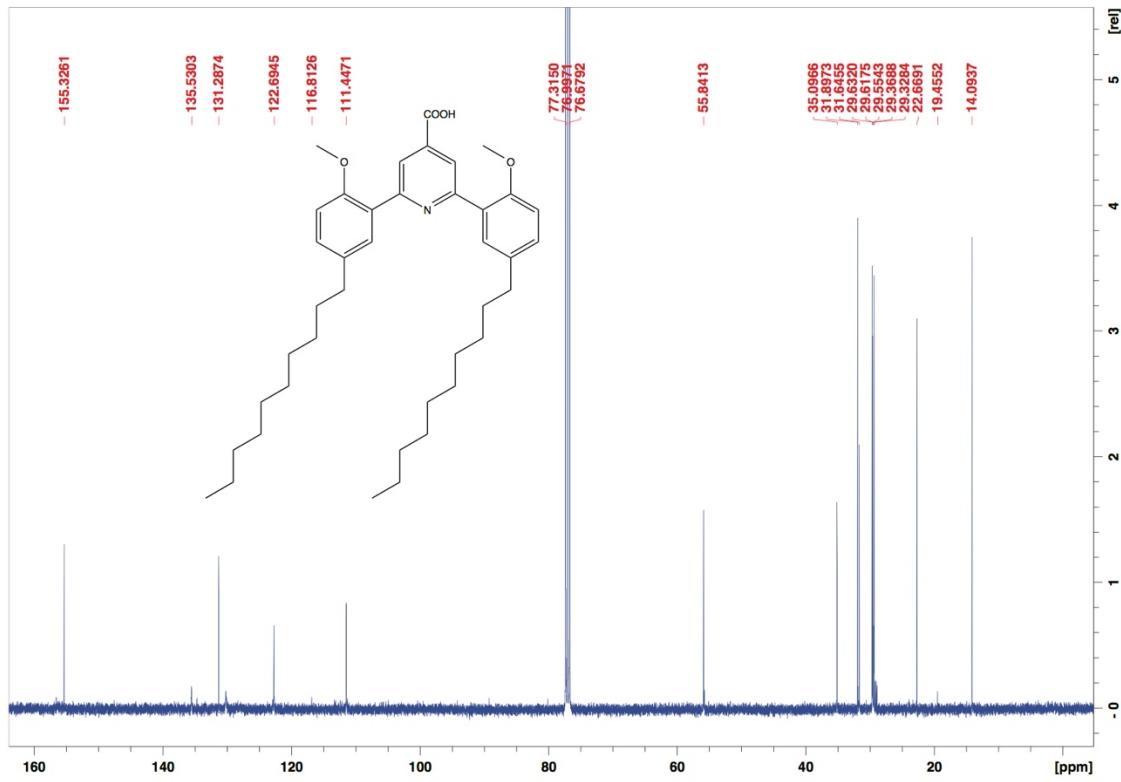
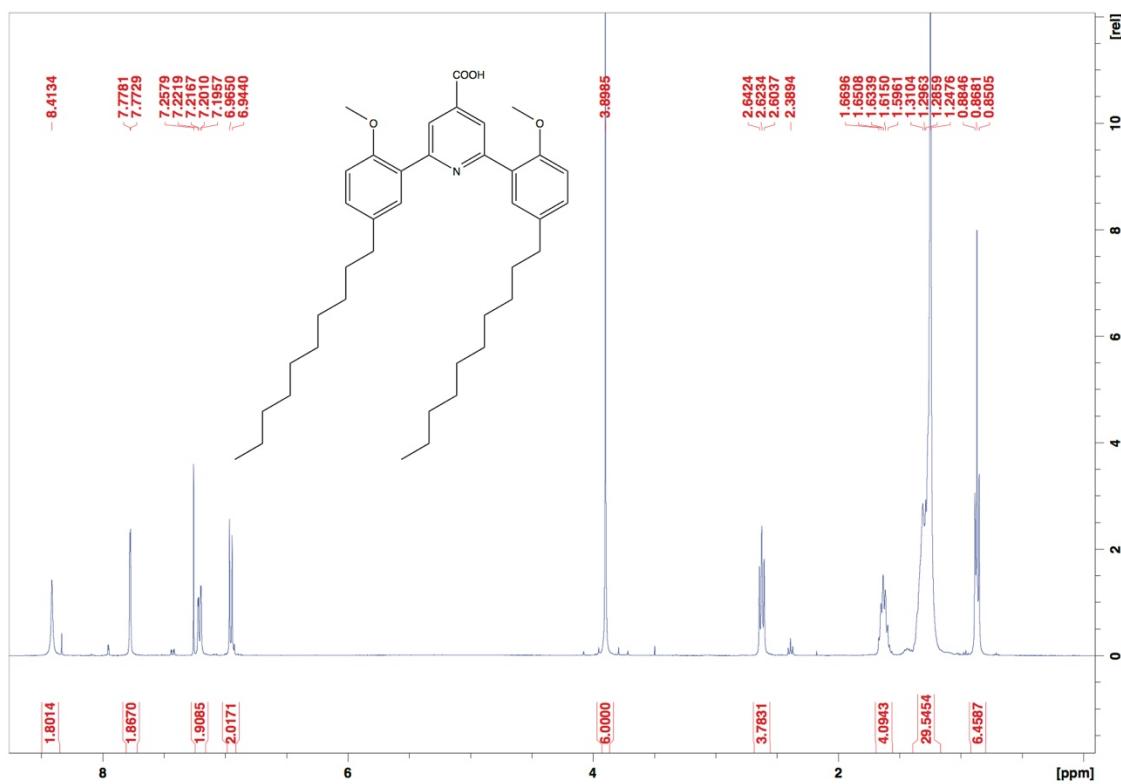
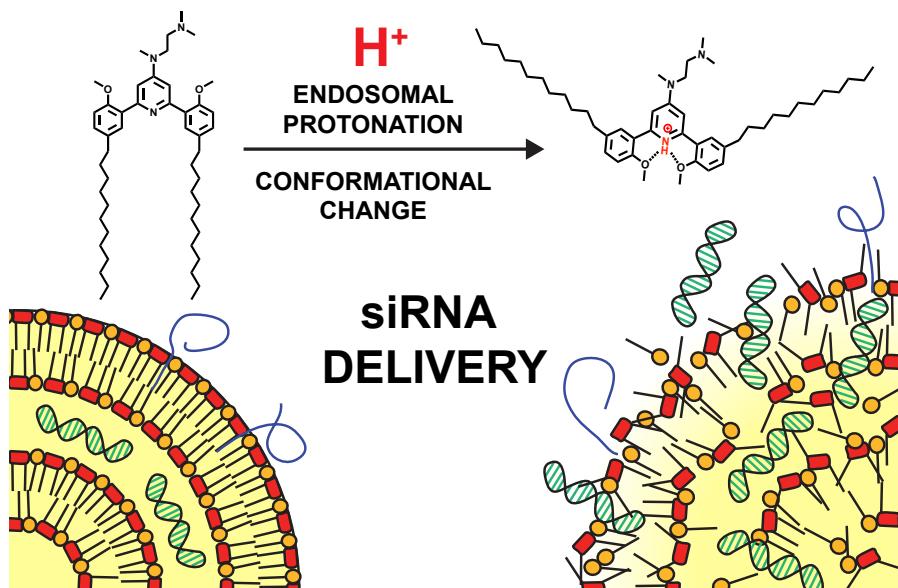


Figure S2.17 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound 7 (CDCl_3)



Chapitre 3 : Lipides Bascules Cationiques : Bascule Moléculaire pH-Sensible pour la Délivrance de siRNA

« Cationic Switchable Lipids: pH-Triggered Molecular Switch for siRNA Delivery »



Abstract : siRNA delivery materials based on cationic switchable lipids are demonstrated. A pH-sensitive molecular switch able to change its conformation upon protonation at endosomal pH values is embedded into the structure of cationic lipidoid materials, thus conferring endosomal escape properties. Leading material identified is able to induce efficient gene knockdown both *in vitro* and *in vivo*.

Soumis au journal ACS Nano Letters le 6 Aout 2016 : W. Viricel, S. Poirier, A. Mbarek, G. Mayer, J. Leblond, *Cationic Switchable Lipids: pH-Triggered Molecular Switch for siRNA Delivery*.

3.1 Introduction

RNAi technology has demonstrated strong potential for therapeutics and is currently showing impressive clinical progress.^[1] Silencing gene expression may be used to treat numerous diseases such as cancer^[2], hereditary disorders^[3] and infectious diseases.^[4] However, the strong hydrophilicity and anionic charge density of siRNA prevent their passive diffusion across cell membranes. Systemic administration of siRNA therefore requires the use of carriers able to encapsulate, protect and deliver the therapeutic cargo into the cytoplasm of target cells. Despite the many efforts made to tailor nanocarriers in order to overcome biological barriers, endosomal entrapment remains a major impediment to the *in vivo* therapeutic efficacy of the delivery platforms developed in the last decade.^[5]

One of the most clinically advanced delivery vehicles for siRNA therapeutics are lipid nanoparticles (LNP).^[1a] These siRNA delivery materials are principally composed of cationic lipids or “lipidoids”, identified through combinatorial synthesis and high throughput screening.^[6] Structure-activity analysis of these libraries suggests that using one or more tertiary amines as ionizable headgroups is essential to promoting endosomal escape and mediating meaningful gene silencing.^[7] At endosomal pH values, ionization of the tertiary amine alters the hydrodynamic radius of the lipid headgroup and induces an inverted non-bilayer structure, which is hypothesized to be responsible for destabilizing the endosomal membrane.^[8] Nevertheless, recent quantitative studies using siRNA/LNP have shown that only ~ 1–2% of siRNA is successfully delivered to the cytoplasm due to endosomal entrapment or recycling to the extracellular space.^[9] This observation highlights that endosomal sequestration is still a major barrier to gene delivery and suggests that developing lipid materials equipped with an efficient endosomal escape mechanism remains highly relevant.

We recently reported the use of pH-dependent switchable lipids for drug delivery.^[10] When incorporated into liposomes, the switchable lipids triggered a fast and effective intracytoplasmic delivery of a hydrophilic cell-impermeable compound, *via* an endosomal escape process. Upon protonation of the central pyridine, the conformation of the lipid switches to favor intramolecular hydrogen-bonding, which changes the relative orientation of the hydrocarbon chains of the molecule, disturbing the lipid packing of the nanoparticle and prompting the release of its therapeutic cargo (**Figure 3.1**). This pH-sensitive mechanism triggered complete drug release in less than 15 min and was not impacted by

polyethylene-glycol coating. As such, these materials show great potential for gene delivery. Therefore, we decided to develop an siRNA/LNP delivery platform based on such a pH-triggered conformational switch.

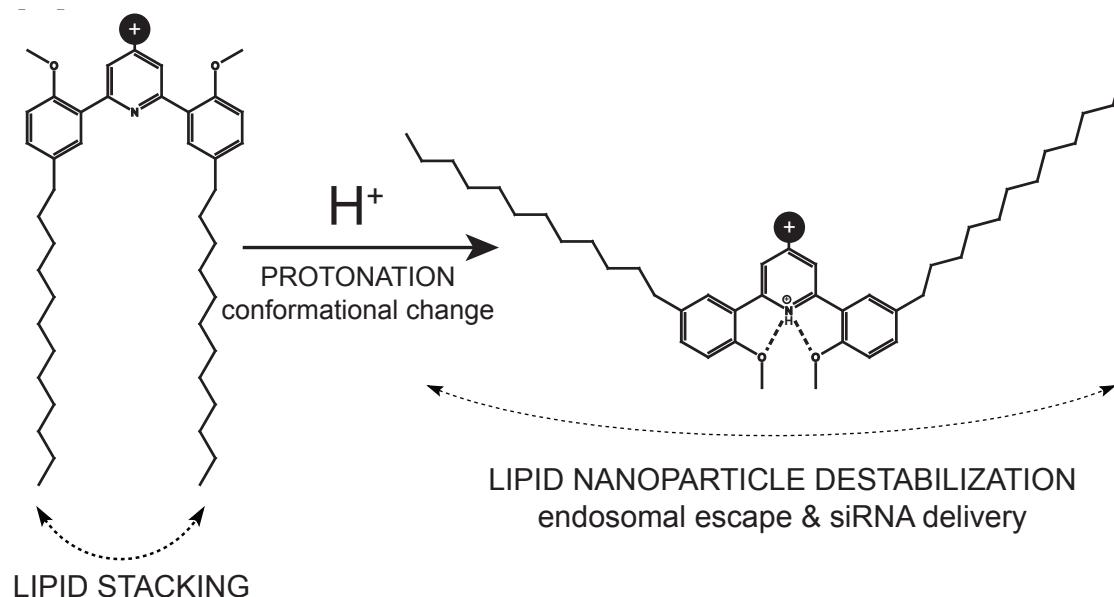


Figure 3.1 - Protonation-induced conformational change of the pH-sensitive cationic switchable lipids.

3.2 Experimental section

3.2.1 Materials, general methods and cell culture

All solvents and reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada), Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA) and Oakwood Chemical (West Columbia, SC, USA). Anhydrous tetrahydrofuran (THF) and dimethylformamide (DMF) were obtained from a Pure Solv PS-400-6 System (Innovative Technology, Amesbury, MA, USA). Cholesterol, DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and DSPE-PEG₂₀₀₀ (N-(carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, sodium salt) were supplied by Avanti® Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). DMG-PEG₂₀₀₀ (1,2-dimyristoyl-sn-glycerol, methoxypolyethyleneglycol 2000) was purchased from NOF America Corporation (White Plains, NY, USA). Chloroquine, genistein, chlorpromazine and resazurin sodium salt were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA) was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), Pitstop 2™ was obtained from Abcam® (Toronto, ON, Canada) and Bafilomycin A1 was obtained from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). All solvents and reagents were of analytical grade and were used as received. All liquid nuclear magnetic resonance spectra were recorded on a Varian 400 WB spectrometer, using residual solvent peak for calibration. High-resolution mass spectroscopy analysis was performed by the Regional Center for Mass Spectrometry of the University of Montréal. Chemical reactions were monitored by LC-MS (Infinity 1260 + MS 6120, Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada).

HeLa/GFP cells (GFP Reporter Stable Cell Line, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA) and HeLa cells (CCL-2™, ATCC®, Manassas, VA, USA) were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, cat #30-2003, ATCC®) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco, Burlington, ON, Canada). Huh-7 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, cat# 319-005-CL, Wisent, Montreal, QC, Canada) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco). Cells were incubated at 37°C under a water-saturated atmosphere supplemented with 5% CO₂.

3.2.2 Synthesis of the pH-sensitive cationic switchable lipids CSL1 and CSL3

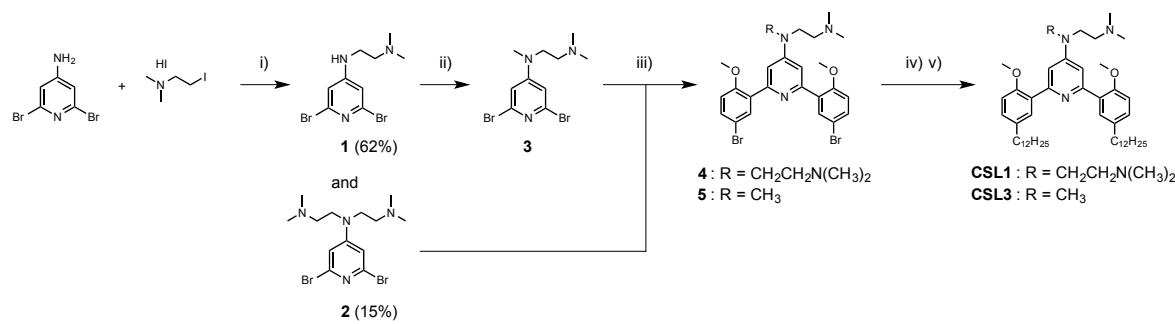


Figure 3.2 – Synthesis pathway of the pH-sensitive cationic switchable lipids CSL1 and CSL3

i) NaH, THF, 80°C, 0.5h ; ii) ICH₃, NaH, THF, 40°C, 2h ; iii) 5-bromo-2-methoxyphenylboronic acid, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, THF/H₂O, 80°C, 48h ; iv) 1-dodecyne, PdCl₂(PPh₃)₂, triphenylphosphine, TBAF, DMF/DIPA, 80°C, 16h ; v) H₂, Pd/C, EtOH, room temperature, 4h.

3.2.2.1 Synthesis of compounds **1** & **2**

In a 250 mL round-bottom flask previously purged with argon was added sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, un-rinsed) (926 mg / 27.6 mmol). Anhydrous THF (130 mL) was added, and 2,6-dibromopyridin-4-amine (1736 mg / 6.89 mmol) was slowly dissolved in the mixture. 2-iodo-N,N-dimethylethan-1-amine (iodide salt) (2253 mg / 6.89 mmol) was added, and the mixture was stirred 0.5 hours at 80°C under argon. The mixture was then slowly quenched with MeOH, and dry loaded into column chromatography on silica gel for purification (hexane/AcOEt, fast gradient from 100:0 to 0:100 ; DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 70:30) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system. The final product **1** was obtained as a yellow solid (1386 mg / 62%) and the final product **2** was obtained as a slightly orange solid (395 mg / 15%).

1 : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.22 (s, 6H), 2.52 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.08 (q, *J*₁ = 6.2 Hz, *J*₂ = 5.0 Hz, 2H), 6.56 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 39.49, 44.86, 56.68, 109.92, 140.60, 156.02. Calc [M+H] = 321.95490 ; Exp [M+H] = 321.95555 ; Error = - 2.01 ppm.

2 : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.25 (s, 12H), 2.42 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H), 3.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H), 6.58 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 45.80, 49.22, 55.91, 108.80, 141.06, 155.22. Calc [M+H] = 393.02840 ; Exp [M+H] = 393.02934 ; Error = - 2.41 ppm.

3.2.2.2 Synthesis of compound 3

In a 250 mL round-bottom flask previously purged with argon was added sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, un-rinsed) (654 mg / 19.5 mmol). Anhydrous THF (50 mL) was added, and **1** (786 mg / 2.43 mmol) was added in the mixture. Methyl iodide was added (449 mg / 3.16 mmol). The mixture was stirred at 40°C and was carefully monitored by LC-MS until entire consumption of the starting material (~ 2h). The mixture was then slowly quenched with MeOH, filtered (0.20 µm PTFE filter) and dry loaded into column chromatography on silica gel for purification (hexane/AcOEt, fast gradient from 100:0 to 0:100; DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 80:20) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system. The final product **3** was obtained as a yellow oil (640 mg / 78%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.30 (s, 6H), 2.49 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.99 (s, 3H), 3.49 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 6.77 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 37.19, 44.41, 49.10, 54.80, 108.68, 140.19, 156.34. Calc [M+H] = 335.97055 ; Exp [M+H] = 335.97180 ; Error = - 3.71 ppm.

3.2.2.3 Synthesis of compound 4

In a 50 mL round-bottom flask was dissolved **2** (127 mg / 0.32 mmol) and 5-bromo-2-methoxyphenylboronic acid (170 mg / 0.74 mmol) in 4 mL of THF. Na₂CO₃ (137 mg / 1.29 mmol), previously dissolved in 4 mL of distilled water, was added and the flask was purged three times with argon. Pd(PPh₃)₄ (3.7 mg / 0.003 mmol) was added and the flask was purged three times again. The mixture was stirred 48 hours at 80°C. The reaction was monitored by LC-MS until entire consumption of the starting materials. The mixture was then diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with dichloromethane (DCM). The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The final product was purified by reverse phase preparative HPLC on an Agilent Zorbax PrepHT Eclipse XDB-C18 21.2x150mm (5µm) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 15 % B ; 6 min – 80 % B ; 12 min - 80 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. Compound **4** was obtained as a white solid (58 mg / 30%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.48 (s, 12H), 2.79 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 3.67 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 3.86 (s, 6H), 6.97 (s, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.50 (dd, *J*₁ = 8.9 Hz, *J*₂ = 2.6 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 44.14, 55.21,

56.08, 107.00, 112.41, 113.35, 130.81, 132.32, 133.06, 152.55, 154.18, 156.23. Calc [M+H] = 605.11213 ; Exp [M+H] = 605.11451 ; Error = - 3.93 ppm.

3.2.2.4 Synthesis of compound 5

In a 100 mL round-bottom flask was dissolved **3** (694 mg / 2.06 mmol) and 5-bromo-2-methoxyphenylboronic acid (1189 mg / 5.15 mmol) in 6 mL of THF. Na₂CO₃ (873 mg / 8.24 mmol), previously dissolved in 6 mL of distilled water, was added and the flask was purged three times with argon. Pd(PPh₃)₄ (23.8 mg / 0.021 mmol) was added and the flask was purged three times again. The mixture was stirred 48 hours at 80°C. The reaction was monitored by LC-MS until entire consumption of the starting materials. The mixture was then diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with dichloromethane (DCM). The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The final product was purified using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system equipped with a 30 grams reversed-phase C18 HP Gold column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 20 % B ; 15 min – 90 % B followed by a column re-equilibration time of 4-5 CV. Compound **5** was obtained as a white solid (492 mg / 47%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.35 (s, 6H), 2.62 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.07 (s, 3H), 3.59 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.84 (s, 6H), 6.94 (s, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.48 (dd, *J*₁ = 8.8 Hz, *J*₂ = 2.5 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 37.09, 44.29, 48.82, 54.84, 55.17, 106.68, 112.36, 113.35, 130.40, 132.39, 133.07, 153.30, 154.21, 156.25. Calc [M+H] = 548.05428 ; Exp [M+H] = 548.05574 ; Error = - 2.66 ppm.

3.2.2.5 Synthesis of compound CSL1

Compound **4** (80 mg / 0.132 mmol) was weighted in a 20 mL microwave reaction vial. 1-dodecyne (66 mg / 0.40 mmol) and triphenylphosphine (10.4 mg / 0.04 mmol) were added. Dried tetra-n-butylammonium fluoride (TBAF) (241 mg / 0.92 mmol) was added (previously dried under high vacuum from 1.0 M TBAF solution in THF), followed by 2 mL of anhydrous DMF and 2 mL of diisopropylamine (DIPA). The reaction vial was purged 3 times with argon. PdCl₂(PPh₃)₂ was added (8.3 mg / 0.01 mmol), the vial was purged 3 times with argon and sealed. The mixture was stirred 16 hours at 80°C. The mixture was then diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column

chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 70:30) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system. The product was then dissolved in EtOH in a 100 mL round-bottom flask. Palladium (10 wt %Pd basis) on activated charcoal (40 mg) was added and the flask was purged 3 times with hydrogen. The mixture was then stirred 4 hours at room temperature under a 1 atm hydrogen pressure. The solution was then filtered on a PTFE filter (0.20 μ m) to remove the catalyst, and the organic phase was evaporated under vacuum. The final product was purified by reverse phase preparative HPLC on an Agilent Zorbax PrepHT Eclipse XDB-C8 21.2x100mm (5 μ m) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 30 % B ; 10 min – 95 % B ; 12 min - 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. Compound **CSL1** was obtained as a white solid (40 mg / 38%). 1 H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.87 (t, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.19-1.38 (m, 36H), 1.62 (quint, *J* = 7.4 Hz, 4H), 2.34 (s, 12H), 2.58-2.63 (m, 8H), 3.53 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 3.84 (s, 6H), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.00 (s, 2H), 7.12 (dd, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 2.3 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H). 13 C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 14.10, 22.68, 29.35-29.68, 29.70, 31.62, 35.12, 45.57, 48.61, 55.91, 56.06, 106.39, 111.42, 128.91, 130.19, 131.43, 135.30, 152.10, 154.96, 155.89. Calc [M+H] = 785.6667 ; Exp [M+H] = 785.66949 ; Error = - 3.54 ppm.

3.2.2.6 Synthesis of compound CSL3

Compound **5** (228 mg / 0.42 mmol) was weighted in a 20 mL microwave reaction vial. 1-dodecyne (207 mg / 1.25 mmol) and triphenylphosphine (33.7 mg / 0.125 mmol) were added. Dried tetra-n-butylammonium fluoride (TBAF) (760 mg / 2.91 mmol) was added (previously dried under high vacuum from 1.0 M TBAF solution in THF), followed by 2 mL of anhydrous DMF and 2 mL of diisopropylamine (DIPA). The reaction vial was purged 3 times with argon. PdCl₂(PPh₃)₂ was added (26 mg / 0.037 mmol), the vial was purged 3 times with argon and sealed. The mixture was stirred 16 hours at 80°C. The mixture was then diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 90:10) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system. The product was then dissolved in EtOH in a 100 mL round-bottom flask. Palladium (10 wt %Pd basis) on activated charcoal (50 mg) was added and the flask was purged 3 times with hydrogen. The mixture was then stirred 4

hours at room temperature under a 1 atm hydrogen pressure. The solution was then filtered on a PTFE filter ($0.20\text{ }\mu\text{m}$) to remove the catalyst, and the organic phase was evaporated under vacuum. The final product was purified by reverse phase preparative HPLC on an Agilent Zorbax PrepHT Eclipse XDB-C8 21.2x100mm ($5\mu\text{m}$) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 30 % B ; 10 min – 95 % B ; 12 min - 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. Compound **CSL3** was obtained as a slightly yellow wax (134 mg / 44%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0.87 (t, $J=6.4\text{ Hz}$, 6H), 1.20-1.37 (m, 36H), 1.59 (quint, $J=7.4\text{ Hz}$, 4H), 2.52 (s, 6H), 2.60 (t, $J=7.5\text{ Hz}$, 4H), 2.88 (t, $J=7.5\text{ Hz}$, 2H), 3.16 (s, 3H), 3.77 (t, $J=7.5\text{ Hz}$, 2H), 3.86 (s, 6H), 6.93 (d, $J=8.4\text{ Hz}$, 2H), 6.99 (s, 2H), 7.20 (dd, $J_1=8.4\text{ Hz}$, $J_2=2.2\text{ Hz}$, 2H), 7.57 (d, $J=2.2\text{ Hz}$, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 14.10, 22.67, 29.34-29.63, 29.67, 31.59, 35.00, 38.51, 44.35, 48.72, 54.47, 56.05, 106.12, 111.70, 126.16, 130.52, 131.05, 135.77, 153.41, 154.55, 154.92. Calc [M+H] = 728.60886 ; Exp [M+H] = 728.61108 ; Error = - 3.06 ppm.

3.2.3 Synthesis of the pH-sensitive cationic switchable lipid **CSL2**

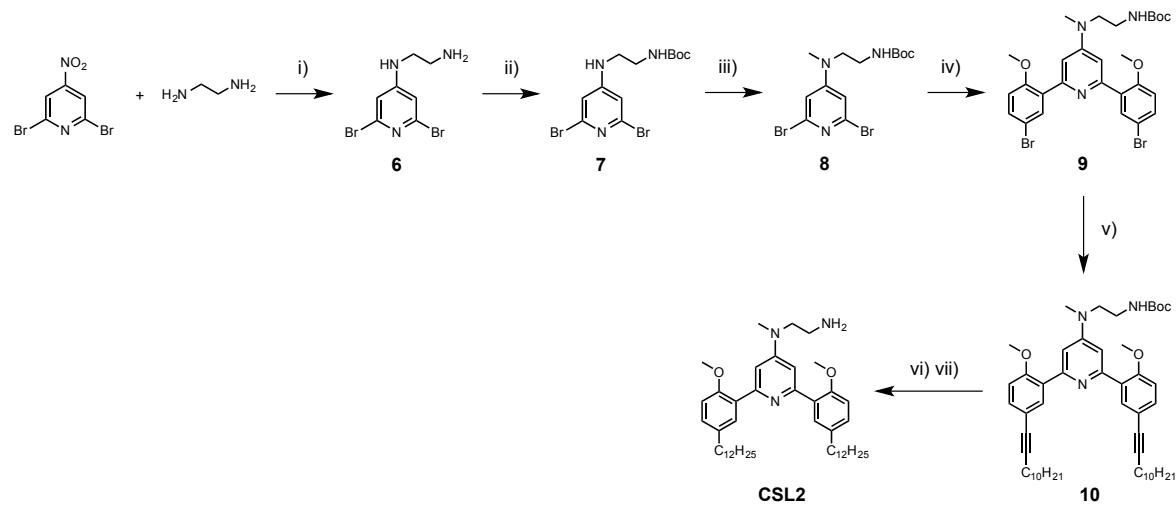


Figure 3.3 - Synthesis pathway of the pH-sensitive cationic switchable lipid **CSL2**

i) NaH , DMF, room temperature, 3h ; ii) Boc_2O , DCM, room temperature, 2h ; iii) ICH_3 , NaH , DMF, 40°C , 3h ; iv) 5-bromo-2-methoxyphenylboronic acid, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Na_2CO_3 , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, 80°C , 48h ; v) 1-dodecyne, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, triphenylphosphine, TBAF, DMF/DIPA, 80°C , 16h ; vi) H_2 , Pd/C , EtOH , room temperature, overnight ; vii) HCl 4M, dioxane, room temperature, 2h.

3.2.3.1 Synthesis of compound 6

Ethylenediamine (640 mg / 10.64 mmol) was added dropwise to a suspension of sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, un-rinsed) (255 mg / 10.64 mmol) in anhydrous DMF (20 mL). 2,6-dibromo-4-nitro-pyridine (2 g / 7.10 mmol) was introduced by small amounts. The mixture was stirred at room temperature for 3 hours, then carefully quenched with MeOH, washed with saturated Na₂CO₃ and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to afford a brown oil. The crude was purified by chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 80:20) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system to afford **6** (628 mg / 30%) as an orange oil. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.80 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.18 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.70 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 40.81, 45.12, 110.61, 141.29, 158.69. Calc [M+H] = 293.92360 ; Exp [M+H] = 293.92232 ; Error = - 4.37 ppm.

3.2.3.2 Synthesis of compound 7

To a solution of **6** (1.5 g / 5.08 mmol) in DCM (25 mL) was slowly added Boc₂O (1.33 g / 6.10 mmol). The medium was stirred at room temperature during 2h and then washed with saturated Na₂CO₃. The organic layer was decanted and the aqueous layer was extracted twice with DCM. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford a brown oil. The crude was purified by chromatography on silica gel (hexane/AcOEt, gradient from 100:0 to 0:100) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system to afford **7** (1.6 g / 79%) as an orange oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.44 (s, 9H), 3.20 (m, 2H), 3.38 (m, 2H), 4.92 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.54 (br, 1H), 6.54 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 28.26, 39.58, 44.65, 80.43, 109.69, 140.66, 156.24, 157.40. Calc [M+H] = 393.97603 ; Exp [M+H] = 393.97785 ; Error = 4.6 ppm.

3.2.3.3 Synthesis of compound 8

To a solution of **7** (1.2 g, 3.04 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) was added sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, un-rinsed) (153 mg / 4.56 mmol) and methyl iodide (863 mg, 6.08 mmol). The mixture was stirred at 40°C and was monitored by LC-MS until entire consumption of the starting material (~ 3h). The mixture was then slowly quenched with MeOH, washed with water and extracted with DCM. The crude was dry loaded into column chromatography on silica gel for purification (hexane/AcOEt, gradient from 100:0

to 0:100) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system to afford **8** (907 mg / 73%) as an orange solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.42 (s, 9H), 2.97 (s, 3H), 3.29 (m, 2H), 3.47 (m, 2H), 4.70 (br, 1H), 6.65 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 25.76, 35.30, 48.64, 77.40, 106.30, 138.46, 153.49, 153.72. Calc [M+H] = 407.99168 ; Exp [M+H] = 407.99221 ; Error = 1.3 ppm.

3.2.3.4 Synthesis of compound **9**

In a 50 mL round-bottom flask was dissolved **8** (240 mg / 0.59 mmol) and 5-bromo-2-methoxyphenylboronic acid (340 mg / 1.47 mmol) in 5 mL of THF. Na₂CO₃ (249 mg / 2.35 mmol), previously dissolved in 5 mL of distilled water, was added and the flask was purged three times with argon. Pd(PPh₃)₄ (8.2 mg / 0.012 mmol) was added and the flask was purged three times again. The mixture was stirred 48 hours at 80°C. The reaction was monitored by LC-MS until entire consumption of the starting materials. The mixture was then diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with dichloromethane (DCM). The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude was dry loaded into column chromatography on silica gel for purification (hexane/AcOEt, gradient from 100:0 to 0:100) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system to afford **9** (179 mg / 49%) as an orange solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.37 (s, 9H), 3.09 (s, 3H), 3.38 (m, 2H), 3.60 (m, 2H), 3.85 (s, 6H), 4.79 (br, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.95 (s, 2H), 7.44 (dd, *J*₁ = 8.7 Hz, *J*₂ = 2.5 Hz, 2H), 7.84 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 28.37, 38.31, 51.25, 56.22, 79.42, 106.69, 113.22, 113.29, 131.01, 132.44, 133.75, 153.62, 156.11, 164.74. Calc [M+H] = 620.07541 ; Exp [M+H] = 620.07685 ; Error = 2.3 ppm.

3.2.3.5 Synthesis of compound **10**

Compound **9** (270 mg / 0.34 mmol) was weighted in a 20 mL microwave reaction vial. 1-dodecyne (113 mg / 1.30 mmol) and triphenylphosphine (20 mg / 0.078 mmol) were added. Dried tetra-n-butylammonium fluoride (TBAF) (355 mg / 2.60 mmol) was added (previously dried under high vacuum from 1.0 M TBAF solution in THF), followed by 1 mL of anhydrous DMF and 1 mL of diisopropylamine (DIPA). The reaction vial was purged 3 times with argon. PdCl₂(PPh₃)₂ was added (21 mg / 0.030 mmol), the vial was purged 3 times with argon and sealed. The mixture was stirred 16 hours at 80°C. The mixture was then diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with DCM. The organic layer was

dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (hexane/AcOEt, gradient from 100:0 to 0:100) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system to afford **10** (141 mg / 41%) as a yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H), 1.16-1.34 (m, 28H), 1.35-1.50 (m, 13H), 1.58 (quint, *J* = 7.6 Hz, 4H), 2.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H), 3.05 (s, 3H), 3.36 (m, 2H), 3.54 (m, 2H), 3.84 (s, 6H), 4.69 (br, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.92 (s, 2H), 7.35 (dd, *J*₁ = 8.6 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 14.10, 19.45, 22.67, 28.27, 28.91-29.60, 31.89, 38.08, 38.21, 51.00, 55.80, 80.36, 88.83, 106.55, 111.27, 116.60, 130.66, 132.44, 134.66, 155.42, 156.32. Calc [M+H] = 792.56738 ; Exp [M+H] = 792.5681 ; Error = 0.91 ppm.

3.2.3.6 Synthesis of compound CSL2

Compound **10** (141 mg / 0.179 mmol) was dissolved in EtOH in a 100 mL round-bottom flask. Palladium (10 wt %Pd basis) on activated charcoal (50 mg) was added and the flask was purged 3 times with hydrogen. The mixture was then stirred 4 hours at room temperature under a 1 atm hydrogen pressure. The solution was then filtered on a PTFE filter (0.20 μm) to remove the catalyst, and the organic phase was evaporated under vacuum. The oily crude was dissolved in 4M HCl in dioxane (2 mL) and was stirred 2 hours at room temperature. The mixture was then slowly diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The final product was purified by reverse phase preparative HPLC on an Agilent Zorbax PrepHT Eclipse XDB-C8 21.2x100mm (5μm) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 30 % B ; 10 min – 95 % B ; 12 min - 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. Compound **CSL2** was obtained as a white waxy solid (80 mg / 64%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 1.18-1.37 (m, 36H), 1.59 (quint, *J* = 7.5 Hz, 4H), 2.59 (t, *J* = 7.8 Hz, 4H), 3.10 (s, 3H), 3.71 (m, 2H), 3.82 (s, 6H), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.04 (s, 2H), 7.14 (dd, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 2.3 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 14.11, 22.68, 29.35-29.69, 31.62, 31.91, 35.06, 38.51, 56.00, 106.31, 111.64, 127.87, 129.80, 131.14, 135.60, 154.23, 154.30, 154.96. Calc [M+H] = 700.57756 ; Exp [M+H] = 700.57702 ; Error = - 0.8 ppm.

3.2.4 Synthesis of the negative control cationic switchable lipid CSL4

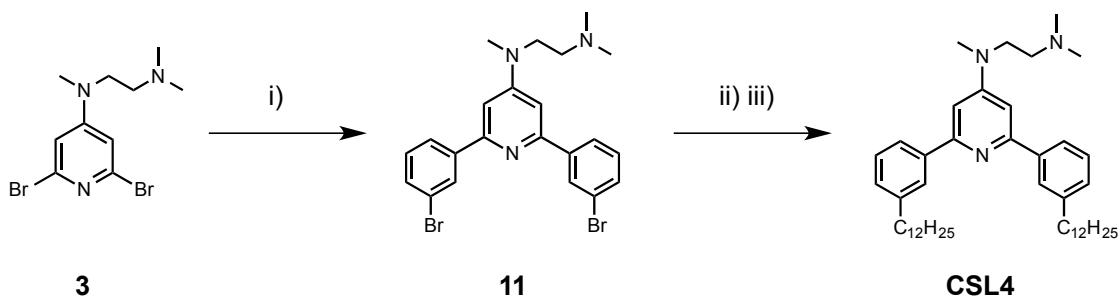


Figure 3.4 – Synthesis pathway of the negative control cationic switchable lipid CSL4

i) 3-bromophenylboronic acid, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Na_2CO_3 , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, 80°C , 24h ; ii) 1-dodecyne, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, triphenylphosphine, TBAF, DMF/DIPA , 80°C , 16h ; iii) H_2 , Pd/C , EtOH , room temperature, 4h.

3.2.4.1 Synthesis of compound 11

In a 50 mL round-bottom flask was dissolved **3** (171 mg / 0.51 mmol) and 3-bromophenylboronic acid (234 mg / 1.17 mmol) in 4 mL of THF. Na_2CO_3 (215 mg / 2.03 mmol), previously dissolved in 4 mL of distilled water, was added and the flask was purged three times with argon. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (6.0 mg / 0.005 mmol) was added and the flask was purged three times again. The mixture was stirred 24 hours at 80°C . The reaction was monitored by LC-MS until entire consumption of the starting materials. The mixture was then diluted with saturated Na_2CO_3 and extracted 3 times with dichloromethane (DCM). The organic layer was dried over MgSO_4 and evaporated under vacuum. The final product was purified by reverse phase preparative HPLC on an Agilent Zorbax PrepHT Eclipse XDB-C18 21.2x150mm (5 μm) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 15 % B ; 6 min – 80 % B ; 12 min - 80 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. Compound **4** was obtained as a slightly yellow waxy solid (139 mg / 56%). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 2.80 (s, 6H), 3.03 (s, 3H), 3.15 (t, $J = 2.3$ Hz, 2H), 3.78 (t, $J = 2.3$ Hz, 2H), 6.92 (s, 2H), 7.33 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.95 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 8.19 (s, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 38.13, 43.68, 47.46, 54.19, 104.01, 123.58, 126.98, 131.04, 131.30, 132.77, 143.14, 156.30, 156.93. Calc [M+H] = 488.03315 ; Exp [M+H] = 488.03532 ; Error = 4.4 ppm.

3.2.4.2 Synthesis of compound CSL4

Compound **11** (139 mg / 0.28 mmol) was weighted in a 10 mL microwave reaction vial. 1-dodecyne (139 mg / 0.83 mmol) and triphenylphosphine (22 mg / 0.083 mmol) were added. Dried tetra-n-butylammonium fluoride (TBAF) (509 mg / 1.95 mmol) was added (previously dried under high vacuum from 1.0 M TBAF solution in THF), followed by 1 mL of anhydrous DMF and 1 mL of diisopropylamine (DIPA). The reaction vial was purged 3 times with argon. $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ was added (17 mg / 0.025 mmol), the vial was purged 3 times with argon and sealed. The mixture was stirred 16 hours at 80°C. The mixture was then diluted with saturated Na_2CO_3 and extracted 3 times with DCM. The organic layer was dried over MgSO_4 and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 90:10) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system. The product was then dissolved in EtOH in a 100 mL round-bottom flask. Palladium (10 wt %Pd basis) on activated charcoal (50 mg) was added and the flask was purged 3 times with hydrogen. The mixture was then stirred 4 hours at room temperature under a 1 atm hydrogen pressure. The solution was then filtered on a PTFE filter (0.20 μm) to remove the catalyst, and the organic phase was evaporated under vacuum. The final product was purified by reverse phase preparative HPLC on an Agilent Zorbax PrepHT Eclipse XDB-C8 21.2x100mm (5 μm) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 30 % B ; 10 min – 95 % B ; 12 min - 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. Compound **CSL4** was obtained as a colorless oil (45 mg / 24%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 6H), 1.20-1.42 (m, 36H), 1.68 (quint, J = 7.5 Hz, 4H), 2.51 (s, 6H), 2.71 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 2.80 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.13 (s, 3H), 3.75 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 6.92 (s, 2H), 7.22 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.38 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.86 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.90 (s, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 14.12, 22.69, 29.36-29.69, 31.60, 31.92, 36.13, 38.15, 44.47, 48.56, 54.62, 102.27, 124.57, 127.35, 128.36, 128.76, 140.52, 143.18, 154.62, 158.16, 167.15. Calc [M+H] = 668.58773 ; Exp [M+H] = 668.58994 ; Error = 3.31 ppm.

3.2.5 Lipid nanoparticle preparation by manual extrusion

Lipid nanoparticles for *in vitro* studies were prepared by manual extrusion, using cationic switchable lipids (CSL), DSPC, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5 respectively. For *in vivo* experiments, lipid nanoparticles were prepared using microfluidic mixing (further detailed below). Stock solutions (20-40 mg/mL) of cationic switchable lipids and commercial co-lipids were prepared in ethanol and stored at -80°C before use. The lipid stock solutions were combined in a 5 mL round-bottom flask at the desired molar ratio, and the ethanol was removed under reduced pressure. The lipidic film thus obtained was dried overnight under high vacuum to remove any residual solvent. The lipidic film was hydrated on a vortex mixer with 1 mL of sterile 5% dextrose in water. The lipid suspension was then subjected to stepwise extrusions through polycarbonate membranes (200 and 100 nm – 9 passages per membrane) using a LiposoFast manual extruder (Avestin Inc., Ottawa, ON, Canada) heated at 60°C. Lipid nanoparticle preparations were stored in darkness at 4°C in microcentrifuge tubes. The cationic switchable lipid amount present in each preparation was quantified *via* HPLC-UV/MS (1260 Infinity, Agilent Technologies) against a calibration curve of cationic switchable lipid (25-150 µg/mL; from ethanol stock solution).

3.2.6 siRNA complexation and encapsulation efficiency

Stock solutions of lipid nanoparticle (made by manual extrusion) and siRNA were diluted in sterile 5% dextrose at appropriate concentrations, depending upon the lipid nitrogen/siRNA phosphate (N/P) ratio desired (unless indicated otherwise, a N/P ratio value of 4 was used for all the experiments). siRNA solution was added to the lipid nanoparticle solution, followed by brief vortexing. Complexation was then realized during 15 minutes at 50°C under vigorous vortexing (1200rpm) in a Labnet Vortemp™ 56.

For quantification of the encapsulation efficiency, lipid nanoparticles and siRNA were prepared for a final siRNA concentration of 100 nM. A SYBR® Gold (Thermo Scientific) assay was used to quantify the siRNA encapsulation efficiency of the formulations. After complexation (15 minutes, 50°C, vigorous vortexing), the solutions were centrifuged at 20 000g for 30 minutes. Unencapsulated free siRNA in the supernatant was quantified against a calibration curve of siRNA (2-100 nM), using the SYBR® Gold

fluorescent dye ($\lambda_{\text{ex/em}} = 495/537$) and a Safire microplate reader (Tecan, Seestrasse, Switzerland). siRNA encapsulation efficiency (%) was calculated as follow:

$$EE (\%) = \frac{100 \text{ (nM)} - \text{siRNA concentration in the supernatant (nM)}}{100 \text{ (nM)}} \times 100$$

3.2.7 Physicochemical characterization of lipid nanoparticles

Hydrodynamic diameter and ζ -potential of lipid nanoparticles/siRNA complexes were measured at 20°C by Dynamic Light Scattering using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK), using the automatic algorithm mode. For size measurements, lipid nanoparticles and siRNA were complexed together (260 nM final siRNA; 200 μL final volume) in 5% dextrose as described above. Complexes were then diluted with 800 μL Opti-MEM[®], equilibrated for 20 minutes at 20°C and measured. Size measurements are reported using the Z-Average value. ζ -potential measurements were realized at 20°C using the Smoluchowski model. Lipid nanoparticles and siRNA are complexed together (260 nM final siRNA; 200 μL final volume) in 5% dextrose as described previously. Complexes are then diluted with 800 μL dextrose 5%, equilibrated 15 minutes at 20°C and measured. Experiments were run in triplicate or more.

3.2.8 *In vitro* siRNA transfection assays

The RNAi induced silencing capabilities of each cationic switchable lipid was investigated in a HeLa/GFP model. Lipid nanoparticles (made by manual extrusion) and anti-GFP siRNA were complexed (N/P ratio of 4) as described above (for a final siRNA concentration/well of 1-60 nM) and were diluted in Opti-MEM[®] (250 μL). This reverse transfection media (300 μL) was put in the well (12-well plates), and 1 mL of cell suspension in complete culture media (EMEM/FBS 90:10) was added for a final concentration of 40 000 cells/well. Cells were then incubated for 72 hours. After incubation, cells were rinsed with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer (95% PBS, 5% FBS, 1.0 mM EDTA) for immediate analysis on a FACSCaliburTM flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). GFP expression for each replicate (mean fluorescent intensity; FlowJo software vX.0.7, Ashland, OR, USA) was calculated relative to the control samples that did not receive any siRNA treatment. Negative control included cells that were treated with naked anti-GFP siRNA (60 nM). Positive control included cells that were treated with

Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Scientific) according to the manufacturer's reverse transfection protocol (1 µL reagent/well; 60 nM siRNA/well). All experiments were realized in triplicate.

The RNAi silencing capabilities of the formulations made by microfluidic mixing (aimed for *in vivo* siRNA delivery) was assayed in HeLa/GFP (anti-GFP siRNA) and Huh-7 cells (anti-PCSK9 siRNA), using the same protocol. Transfection efficiency was assayed by either flow cytometry or western blotting after a 48 hour (HeLa/GFP) or 72 hour (Huh-7) incubation period.

3.2.9 *In vitro* cytotoxicity assay

Cytotoxicity of the lipid nanoparticle (made by manual extrusion) on HeLa/GFP cells was assessed using a resazurin-based cell viability assay (AlamarBlue®). The transfection procedure was strictly identical to that presented above (N/P ratio of 4, 1-60 nM final siRNA concentration/well), but the assay was carefully scaled down from 12-well plates to 96-well plates, according to the growth area of the wells (3000 cells/well, 200 µL final volume/well). After 72 hours of incubation, cells were washed with PBS, and 200 µL of fresh culture medium was added into the wells (EMEM/FBS 90:10). 20 µL of a freshly prepared resazurin solution (440 µM in PBS) were then added, and cells were incubated for 2 hours. The absorbance of each well was measured at 570 and 600 nm using a Safire microplate reader (Tecan). Cellular viability was normalized relative to the negative control (cells treated with dextrose 5%). Experiments were run in sixplicata.

3.2.10 Intracytoplasmic delivery of siRNA

Live-cell fluorescence microscopy was used to image the intracytoplasmic delivery of siRNA-Alexa647 (Qiagen) following transfection with the CSL3-based formulation (CSL3/DSPC/cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by manual extrusion). HeLa cells were routinely incubated 24 hours before imaging in 35 mm poly-d-lysine coated glass dishes (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) at a density of 40 000 cells/dish. siRNA were complexed with lipid nanoparticles (N/P ratio of 4) in 5% dextrose as described previously (70 µL final volume). Complexes were then diluted with 346 µL Opti-MEM® and 1384 µL of complete culture media (Opti-MEM®/FBS 90:10), for a final siRNA concentration of 50 nM. Cells were then incubated 10 minutes, 1 hour or 2 hours with the lipid nanoparticles. After incubation, cells were rinsed four times with Opti-

MEM[®]/FBS 90:10 and were immediately imaged in a phenol red-free culture media (Opti-MEM[®]/FBS 90:10). Imaging of HeLa cells was performed using an Olympus IX81 fluorescent microscope equipped with a Plan Apo N 60X 1.42 NA silicone objective (Olympus Canada Inc., Toronto, ON, Canada) and a 12 bits Retiga-2000R CCD Camera (QImaging, Surrey, BC, Canada), using MetaMorph Advanced software 7.8.9 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). siRNA-Alexa647 was imaged using the Cy5 channel ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 649/666). All fluorescence images were carefully exported with constant scaling and range of greylevel. Experiment was realized in triplicate.

3.2.11 Endosomal entrapment of the CSL4-based formulation

Live-cell fluorescence microscopy was used to compare the intracellular fate following endocytosis of the CSL3-based (pH-sensitive) and the CSL4-based (negative control) lipid nanoparticles formulations (CSL/DSPC/cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by manual extrusion). HeLa cells were routinely incubated 24 hours before imaging in 35 mm poly-d-lysine coated glass dishes (MatTek Corporation) at a density of 40 000 cells/dish. siRNA-Alexa647 (Qiagen) were complexed with lipid nanoparticles (N/P ratio of 4) in 5% dextrose as described previously (70 μ L final volume). Complexes were then diluted with 346 μ L Opti-MEM[®] and 1384 μ L of complete culture media (Opti-MEM[®]/FBS 90:10), for a final siRNA concentration of 50 nM. Cells were then incubated 16 hours with the lipid nanoparticles. After incubation, cells were rinsed twice with Opti-MEM[®]/FBS 90:10 and were stained with Hoechst 33342 (5 min, 2 μ g/mL, Sigma). Cells were rinsed twice with Opti-MEM[®]/FBS 90:10 and were immediately imaged in a phenol red-free culture media (Opti-MEM[®]/FBS 90:10). Alternatively, cells were exposed to 500 μ M chloroquine during the last hour of the 16-hour incubation period (CSL4-based formulation). Imaging of HeLa cells was performed using an Olympus IX81 fluorescent microscope equipped with a UPlanSApo 100X 1.40 NA silicone objective (Olympus Canada Inc.) and a 12 bits Retiga-2000R CCD Camera (QImaging), using MetaMorph Advanced software 7.8.9 (Molecular Devices). Hoechst 33342 was imaged using the DAPI channel ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 350/470) and siRNA-Alexa647 was imaged using the Cy5 channel ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 649/666). All fluorescence images were carefully exported with constant scaling and range of greylevel. Experiment was realized in triplicate.

Comparison of the cellular uptake of the CSL3 and CSL4-based formulations over the 16-hour incubation period was assayed by flow cytometry. HeLa cells were seeded in

12-well plates (100 000 cells/well) and allowed to attach overnight. The next day, lipid nanoparticles (25 µL in dextrose 5%) and siRNA-Alexa488 (25 µL in dextrose 5%) were complexed in dextrose 5% (N/P ratio of 4; siRNA concentration 25 nM/well) and were diluted in Opti-MEM® (250 µL) and 1 mL of complete culture media (EMEM/FBS 90:10). The solution was then transferred onto the cells (1300 µL final volume/well) and the plate was incubated for 16 hours. After incubation, cells were rinsed three times with EMEM/FBS 90:10, one time with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer (95% PBS, 5% FBS, 1.0 mM EDTA) for immediate analysis *via* flow cytometry. Experiment was realized in triplicate.

3.2.12 Lipid-mixing assay

The fusogenic potential of the CSL3/siRNA and CSL4/siRNA lipid nanoparticles was evaluated with an octadecyl Rhodamine B (R18) lipid-mixing assay. R18 was incorporated into the lipid nanoparticles at a self-quenched concentration of 6 mol%. Unlabeled 130 nm POPC vesicles were prepared in 5% dextrose using the manual extrusion method previously described (9 passages through a 200 nm polycarbonate membrane). R18 labeled lipid nanoparticles (CSL/DSPC/cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀/R18 50:10:31.5:2.5:6 mol% - made by manual extrusion) were complexed with anti-GFP siRNA as described above (N/P ratio of 4, in 5% dextrose). These labeled lipid nanoparticles were mixed with unlabeled POPC vesicles in a buffer at pH 7.4 (5 mM HEPES with ionic strength adjusted to 150 mM with NaCl) or at pH 5 (50 mM acetic buffer with ionic strength adjusted to 150 mM with NaCl), as described below.

In 3000 µL of buffer containing unlabeled POPC vesicles (100 µM total lipid content in the cuvette) were added the labeled lipid nanoparticles/siRNA (50 µL volume; 10 µM total lipid content in the cuvette). The increasing fluorescence of R18 was monitored ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 556/590, slits 5 nm) using a Hitachi F-2710 Spectrophotometer equipped with a water circulated cell holder with stirring. All experiments were performed at 20°C under medium stirring. After 15 minutes, 4 µL of pure octaethylene glycol monododecyl ether (Sigma) detergent (2.5 mM final concentration in the cuvette) was added to obtain the 100% dequenched fluorescence intensity. Raw data were recorded continuously during the experiment. The percentage of membrane fusion activity at a given time *t* was defined as:

$$\% \text{ } fusion_t = \left(\frac{I_t - I_o}{I_{100\%} - I_o} \right) \times 100$$

where I_o is the initial fluorescence intensity observed immediately after addition of labeled lipid nanoparticles; $I_{100\%}$ is the maximal fluorescence intensity value obtained after addition of detergent and I_t is the fluorescence intensity value measured at a given time t . Experiments were realized in triplicate.

3.2.13 Inhibition of GFP knockdown with Bafilomycin A1

In this experiment, HeLa/GFP cells were transfected with the CSL3-based lipid nanoparticles formulation (CSL3/DSPC/cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by manual extrusion) in the presence or absence of Bafilomycin A1, a known inhibitor of vacuolar H⁺ ATPases. HeLa/GFP cells were seeded in 12-well plates (40 000 cells/well) and allowed to attach overnight. The next day, cells were rinsed with Opti-MEM® and pre-incubated 30 minutes with Bafilomycin A1 (600 nM/well, diluted in Opti-MEM®) before incubation with lipid nanoparticles. Lipid nanoparticles and anti-GFP siRNA were complexed (N/P ratio of 4) as described above (for a final siRNA concentration of 10 and 25 nM/well). They were then diluted with Opti-MEM®, containing Bafilomycin A1 for a final concentration of 600 nM/well. Residual DMSO in the assay was 0.06% v/v (treated cells and negative control). Cells were then incubated for 4 hours with the lipid nanoparticles. After incubation, cells were rinsed twice with Opti-MEM® and 1 mL of complete culture media (EMEM/FBS 90:10 – with or without 600 nM Bafilomycin A1) was added. Cells were then incubated for 44 hours. After incubation, cells were rinsed with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer (95% PBS, 5% FBS, 1.0 mM EDTA) for immediate analysis *via* flow cytometry. GFP expression for each replicate (mean fluorescent intensity) was calculated relative to the control samples that did not receive any siRNA treatment. Experiments were realized in triplicate.

Comparison of the cellular uptake of the CSL3-based formulation in the presence or absence of Bafilomycin A1 over the 4-hour incubation period was assayed by flow cytometry. HeLa cells were seeded in 12-well plates (100 000 cells/well) and allowed to attach overnight. The next day, cells were rinsed with Opti-MEM® and pre-incubated 30 minutes with Bafilomycin A1 (600 nM/well, diluted in Opti-MEM®) before incubation with lipid nanoparticles. Lipid nanoparticles (25 µL in dextrose 5%) and siRNA-Alexa488 (25

μ L in dextrose 5%) were complexed in dextrose 5% (N/P ratio of 4; siRNA concentration 25 nM/well) and were diluted with Opti-MEM[®], containing Bafilomycin A1 for a final concentration of 600 nM/well. This solution was then transferred onto the cells (1300 μ L final volume/well) and the plate was incubated for 4 hours. After incubation, cells were rinsed three times with EMEM/FBS 90:10, one time with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer (95% PBS, 5% FBS, 1.0 mM EDTA) for immediate analysis *via* flow cytometry. Experiments were realized in triplicate.

3.2.14 Uptake inhibition by flow cytometry

HeLa cells were incubated with siRNA-Alexa488 packaged with the CSL3-based lipid nanoparticles formulation (CSL3/DSPC/cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by manual extrusion) in the presence or absence of endocytosis inhibitors. Inhibitors were used as follows: chlorpromazine (clathrin mediated endocytosis inhibitor) 10 μ g/mL; genistein (caveolae mediated endocytosis inhibitor) 200 μ M; Pitstop 2TM (clathrin and caveolae mediated endocytosis inhibitor) 20 μ M; EIPA (macropinocytosis inhibitor) 50 μ M. Residual DMSO in the assay was 0.2% v/v (treated cells and negative control). HeLa cells were seeded in 12-well plates (100 000 cells/well) and allowed to attach overnight. The next day, cells were rinsed with Opti-MEM[®] and pre-incubated 15 minutes with endocytosis inhibitors (diluted in Opti-MEM[®]) before incubation with lipid nanoparticles. Lipid nanoparticles and siRNA-Alexa488 were complexed in dextrose 5% (N/P ratio of 4; siRNA concentration 25 nM/well) and were diluted in Opti-MEM[®]. The solution was then transferred onto the cells (1300 μ L final volume/well) and the plate was incubated for 1 or 6 hours. After incubation, cells were rinsed three times with Opti-MEM[®]/FBS 90:10, one time with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer (95% PBS, 5% FBS, 1.0 mM EDTA) for immediate analysis *via* flow cytometry. Experiments were realized in triplicate.

Uptake inhibition was also confirmed by live-cell fluorescence microscopy. HeLa cells were routinely incubated 24 hours before imaging in 35 mm poly-d-lysine coated glass dishes (MatTek Corporation) at a density of 40 000 cells/dish. The next day, cells were rinsed with Opti-MEM[®] and pre-incubated 15 minutes with endocytosis inhibitors (diluted in Opti-MEM[®]) before incubation with lipid nanoparticles. siRNA-Alexa647 were complexed with lipid nanoparticles (N/P ratio of 4) as described previously (70 μ L final volume). Complexes were then diluted with Opti-MEM[®] for a final siRNA concentration of 25 nM/dish. Cells

were then incubated 1 hour with the lipid nanoparticles. After incubation, cells were rinsed twice with Opti-MEM®/FBS 90:10 and were stained with Hoechst 33342 (5 min, 2 µg/mL, Sigma). Cells were rinsed twice with Opti-MEM®/FBS 90:10 and were immediately imaged in a phenol red-free culture media (Opti-MEM®/FBS 90:10). Imaging of HeLa cells was performed using an Olympus IX81 fluorescent microscope equipped with a Plan Apo N 60X 1.42 NA silicone objective (Olympus Canada Inc.) and a 12 bits Retiga-2000R CCD Camera (QImaging), using MetaMorph Advanced software 7.8.9 (Molecular Devices). Hoechst 33342 was imaged using the DAPI channel ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 350/470) and siRNA-Alexa647 was imaged using the Cy5 channel ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 649/666). All fluorescence images were carefully exported with constant scaling and range of greylevel. Experiments were realized in triplicate.

3.2.15 Lipid nanoparticle preparation by microfluidic mixing

Lipid nanoparticles were prepared using a Nanoassemblr™ microfluidic instrument with herringbone rapid mixing features (Precision Nanosystems, Vancouver, BC, Canada). Cationic switchable lipids, DSPC, cholesterol and DMG-PEG₂₀₀₀ were solubilized in ethanol at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5. siRNA was diluted in 25 mM sodium acetate buffer pH 4.0. The siRNA/total lipid mass ratio was ~0.06, corresponding to a N/P ratio of 4. The two solutions were mixed at a flow rate of 12 mL/min, at a siRNA solution/lipid solution ratio of 3:1. Total volume of a batch is typically 2 mL (1.5 mL siRNA solution mixed with 0.5 mL of lipid solution). Nanoparticles were then dialyzed against saline (NaCl 0.9%) using Pur-A-Lyzer™ Maxi dialysis tubes MWCO 12-14 kDa (Sigma). If needed, nanoparticles were concentrated using Amicon Ultra-0.5 30K centrifugal filters device (EMD Millipore, Etobicoke, ON, Canada). Nanoparticles were then sterile filtered using a 0.2µm polyethersulfone 13 mm syringe filter (Pall Corporation, Mississauga, ON, Canada) and stored at 4°C until use. The siRNA encapsulation efficiency was quantified using a Ribogreen RNA quantitation assay (Thermo Scientific). Nanoparticle size was measured by Dynamic Light Scattering in saline (0.9% NaCl) at 20°C as previously described.

The final siRNA concentration was determined *via* ion-pairing reversed phase liquid chromatography. siRNA were analyzed using a Waters Xterra® MS C₁₈ column (2.1x50mm, 2.5 µm particle size) at 60°C on an Agilent 1100 HPLC system, with UV detection at 260 nm. Mobile phase A was 95% 0.1M triethylamine ammonium acetate (TEAA) pH 7.0 and 5% acetonitrile. Mobile phase B was 80% 0.1M TEAA pH 7.0 and 20%

acetonitrile. The gradient changes from 0% to 70% mobile phase B for 12 min with a flow rate of 0.4 mL/min. Injection volume was 6 µL. Calibration curves of siRNA duplex usually ranges from 20 to 100 µg/mL. Before analysis, an aliquot of the lipid nanoparticle formulation was diluted with 200 mM TEAA pH 7.0 + 2% (v/v) C₁₂E₈ detergent to liberate encapsulated siRNA.

3.2.16 Biodistribution and *ex-vivo* imaging in mice

All procedures used in animal studies were approved by the Comité de Déontologie de l’Expérimentation sur les Animaux (CDEA – Animal Care and Ethical Committee) of the University of Montreal and were consistent with local, state and federal regulations. Mice were maintained at the animal facilities of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) at the University of Montreal, and were housed under standard conditions. Food and water were provided *ad libitum*. Animals were acclimated to the animal facility for at least one week before experiments. Prior to injection, lipid nanoparticles formulations were diluted with saline (NaCl 0.9%) at siRNA concentrations such that each mouse was administered a dose of 10µL/g body-weight.

8 weeks old male CD-1 mice (Charles River, Saint-Constant, QC, Canada) were injected intravenously *via* the tail vein with CSL3-based lipid nanoparticles (CSL3/DSPC/cholesterol/DMG-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by microfluidic mixing) formulated with siRNA labeled with Cy5 on the sense strand, unformulated free siRNA-Cy5 or saline at a siRNA dose of 1.5 mg/kg. 4-hour post injection, mice were euthanized by CO₂ inhalation and organs (brain, lungs, heart, liver, spleen, kidneys) were immediately harvested and imaged using a Optix MX3 optical imaging system (Advanced Research Technologies, Montreal, QC, Canada). Data was processed using the OptiView® software from Advanced Research Technologies. Normalized photon counts (fluorescence intensity) was normalized by wet mass of organs. Experiment were realized in triplicate.

3.2.17 In vivo Factor VII silencing in mice

Prior to injection, lipid nanoparticles formulations (CSL/DSPC/cholesterol/DMG-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by microfluidic mixing) were diluted with saline (NaCl 0.9%) at siRNA concentrations such that each mouse was administered a dose of 10µL/g body-weight. 6 to 8-weeks old female C57BL/6 mice (Charles River, Saint-Constant, QC, Canada) received tail vein intravenous injection of saline (negative control, n=6) or LNP

containing anti-Factor VII siRNA (n=4). After 48h, mice were euthanized and blood was collected *via* intracardiac sampling on citrate tubes. Serum was separated from whole blood using serum separation tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and residual serum FVII levels were determined using the Biophen VII chromogenic assay (Aniara, West Chester, OH, USA) according to manufacturer's protocol. A standard curve was constructed using samples from saline-injected mice (pooled plasma, n=6) and relative Factor VII expression was determined by comparing treated groups to the standard curve.

3.3 Results & Discussion

The switchable lipid structure was used as a starting point for the design of cationic switchable lipids (CSL). The tricyclic pH-sensitive unit was maintained while various cationic headgroups on the 4' position of the central pyridine ring were introduced (**Figure 3.5A**). *In silico* predictions of $pK_{a\text{pyr}}$ were used to select the headgroup structure since it previously appeared as a major determinant of *in vitro* behaviour.^[15] Among the molecules synthesized in this study, only 4-dialkylaminopyridine derived-CSL presented an *in silico* $pK_{a\text{pyr}}$ value close to the endosomal pH value (~5-6), which is required to trigger the desired conformational switch within the endosomes.

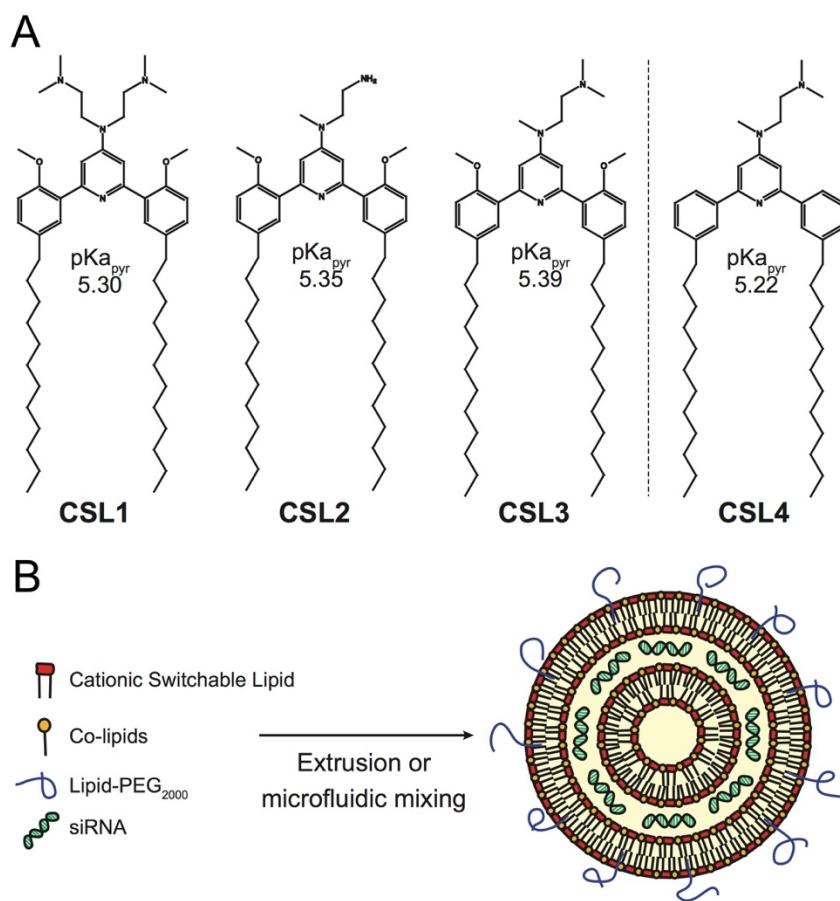


Figure 3.5 - (A) Overview of the chemical structures of the cationic switchable lipids. CSL4 is a negative control lipid, non-methoxylated counterpart of CSL3, unable to change its conformation upon protonation. (B) Hypothetical schematic representation of lipid nanoparticle/siRNA.

Four different CSL were synthesized (**Figures 3.2 to 3.4**), all containing two alkyl chains of 12 carbons (**Figure 3.5A**). Lipid chain lengths of 10 to 13 carbons has been

reported as an advantageous specification for efficient siRNA delivery *in vivo*.^[11] We have already demonstrated that this chain length is compatible with the pH-triggered conformational change of the switchable lipids and effectively promotes liposome bilayer destabilization.^[10] Three different cationic headgroups were incorporated on the CSL: double-dimethylamine headgroup (CSL1), mono primary amine headgroup (CSL2) or mono dimethylamine headgroup (CSL3). CSL4 is the non-switchable counterpart of CSL3, used as a negative control lipid. The removal of the two methoxy moieties prevents intramolecular hydrogen bonding with the protonated pyridine, thus preventing conformational switch and LNP destabilization (**Figure S3.1**). When relevant, CSL3-based LNP was compared to the negative control CSL4-based LNP in order to confirm the involvement of the pH-sensitive conformational switch. LNP incorporating either one of the four CSL materials were formulated with DSPC, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ as co-lipids (respectively 50:10:37.5:2.5 mol%). A hypothetical representation of the LNP is presented in **Figure 3.5B**. At a nitrogen/phosphate molar ratio of 4 which was used for all experiments, manual extrusion yielded LNP exhibiting a hydrodynamic diameter ~150 nm (**Figure S3.2A and S3.2B**). The siRNA encapsulation efficiency was determined to be 85-95% for all CSL, using a SYBR® Gold quantification assay (**Figure S3.2D**).

The siRNA transfection efficiency of CSL was evaluated *in vitro* in a HeLa/GFP model, using Lipofectamine® RNAiMAX as a positive control. Mono-substituted CSL2 and CSL3-based nanoparticles showed remarkable dose-responding knockdown efficiencies, whereas di-substituted CSL1 was unable to mediate siRNA delivery (**Figure 3.6A**). One may hypothesize that the two dimethylamine cationic groups of CSL1 impair the conformational switch. Either steric hindrance or intramolecular hydrogen bonds between dimethylamine groups and methoxy moieties might stabilize the lipid stacking conformation and prevent the rotation of the two lipid arms of CSL1. In addition, it has been reported that too many or too strong (*e.g.* quaternary amines) cationic headgroups can significantly impede the cytosolic release of the siRNA payload from the cationic lipid.^[12] Interestingly, the negative control CSL4 did not show any significant transfection efficiency, suggesting that the knockdown observed with CSL2 and CSL3 could be attributed to the pH-sensitive conformational switch. No significant cytotoxicity was detected for all the CSL materials at the conditions evaluated, using a resazurin-based cell viability assay (**Figure 3.6A**).

Time course delivery of intracytoplasmic Alexa647-siRNA delivery was assayed by live-cell fluorescence microscopy on HeLa cells, using the top performing material CSL3 (**Figure 3.6B**). After only 1 hour, diffuse fluorescence was obvious, confirming the escape of the siRNA payload from the endocytic pathway. At the two-hour time point, the entire cytoplasms were stained with intense diffuse fluorescence. Unsurprisingly, no internalization of naked Alexa647-siRNA was observed after a two-hour incubation in the same conditions (**Figure S3.3**). These results confirmed the efficient uptake and fast cytoplasmic delivery of siRNA encapsulated within the CSL3-based LNP, a prerequisite for mediating potent siRNA delivery.^[13]

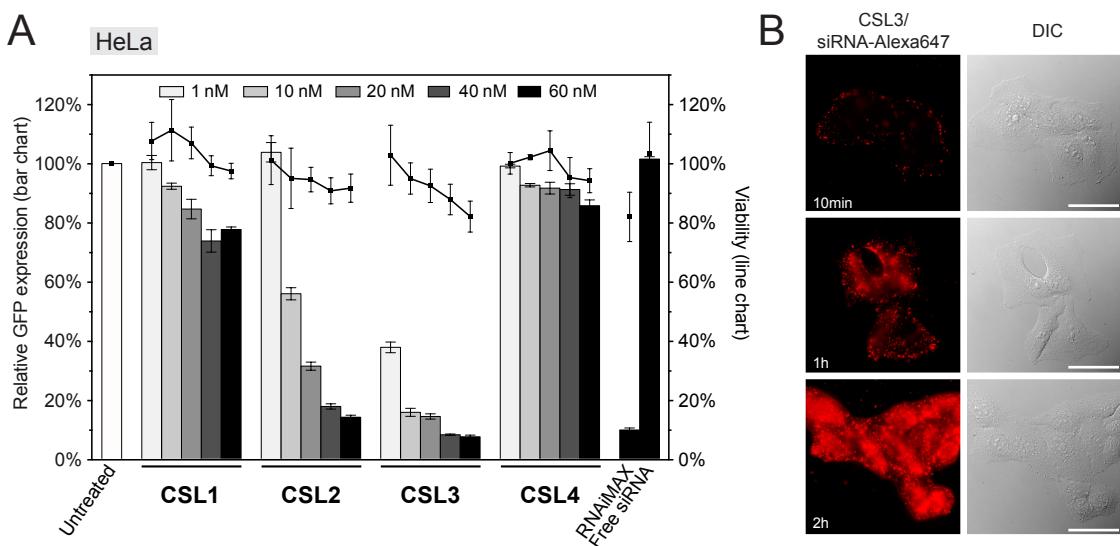


Figure 3.6 - (A) *In vitro* knockdown of GFP and viability assays on HeLa cells with formulated LNP. HeLa cells stably expressing GFP were treated with GFP targeting siRNA formulated LNP (CSL, DSPC, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5 respectively). RNAiMAX (Lipofectamine® RNAiMAX reagent – 60 nM), free siRNA (60 nM) and untreated cells were used as control experiments. Gene knockdown was assayed by flow cytometry after 72h incubation (n = 3). **(B)** Live-cell fluorescence imaging of HeLa cells following 10min, 1h or 2h incubation of CSL3/siRNA-Alexa647 nanoparticles. The concentration of labelled siRNA is 50 nM. DIC = Differential Interference Contrast. Scale bar = 20 μm.

To further confirm the importance of the CSL conformational change in the endosomal escape process, we compared the cellular trafficking of CSL3 and CSL4-based LNP encapsulating Alexa647-siRNA. After 16 hours of incubation, live-cell fluorescent microscopy revealed that the CSL4 negative control formulation was mainly entrapped within the endosomes (punctate fluorescence – **Figure 3.7A**). Disruption of the endosomal compartments by addition of chloroquine, a potent endosomolytic agent,^[14] yielded diffuse

cytoplasmic fluorescence. This confirmed that endosomal entrapment was the limiting barrier to siRNA cytoplasmic delivery for CSL4-based formulation (**Figure 3.7B**). Comparatively, the CSL3-based formulation was able to mediate endosomal escape and intracytoplasmic delivery of Alexa647-siRNA (diffuse fluorescence through the entire cells – **Figure 3.7C**). During this assay, nearly identical cellular uptake profiles were observed for the two formulations, as assayed by flow cytometry (**Figure 3.7D**). This suggests that the superior transfection efficiency observed with CSL3 is due to improved endosomal escape following its pH-induced conformational switch (**Figure 3.6A**).

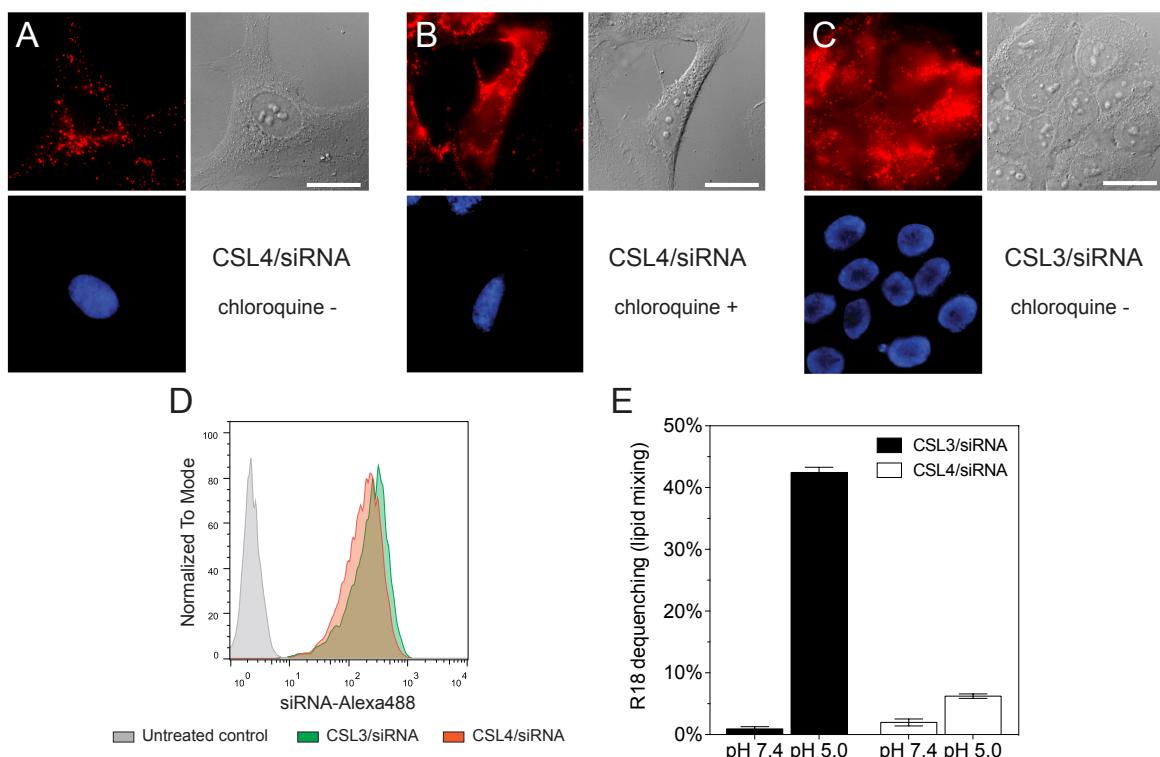


Figure 3.7 - Live-cell fluorescence imaging of HeLa cells following 16h incubation of (A) CSL4/siRNA LNP without chloroquine; (B) CSL4/siRNA LNP with chloroquine during the last hour of incubation and (C) CSL3/siRNA LNP without chloroquine. LNP are composed of CSL, DSPC, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5 respectively, and encapsulate siRNA-Alexa647 (final concentration 50 nM). Red fluorescence: siRNA-Alexa647. Blue fluorescence: nuclei stained with Hoechst 33342. Scale bar = 10 µm. (D) Flow cytometry uptake profiles of the CSL3/siRNA-Alexa488 and CSL4/siRNA-Alexa488 formulations (n = 3). (E) Lipid-mixing experiments using R18 incorporated into the CSL3/siRNA and CSL4/siRNA formulations, after incubation with empty phospholipid vesicles for 15 min under neutral or acidic conditions (n = 3).

Endosomal escape of nanocarriers has been suggested to occur through either fusion, active transport, disruption or lysis of the endosomes.^[9b] We conducted lipid-mixing assays

with octadecyl rhodamine B (R18) labelled LNP and model unlabeled phospholipid vesicles (**Figure 3.7E**).^[10,15] R18 dequenching, which is indicative of lipid mixing and thus fusogenic ability, occurred within minutes under acidic conditions with CSL3-based LNP. In contrast, CSL4-based LNP did not mediate significant fusogenic activities at acidic pH. No significant dequenching was observed for either formulation at neutral pH. This confirmed that fusion ability is involved in the endosomal escape mechanism of CSL3, as previously reported for other switchable lipids.^[10]

The pH of endosomes and lysosomes is controlled by acidification *via* vacuolar ATPases. These membrane-bound proton pumps can be inhibited using Bafilomycin A1 (Baf A1), thus blocking endosome acidification.^[14b] We therefore hypothesized that Baf A1 could hinder the mechanism of CSL3-based LNP.^[16] Compared to control cells transfected without Baf A1, Baf A1-treated cells showed a complete loss of GFP knockdown (**Figure 3.8A**). Here again, we checked that Baf A1 did not significantly impact CSL3/siRNA cellular uptake (**Figure 3.8B**). Therefore, we confirmed that the CSL3-based formulation requires the acidification of the endosomes to trigger its conformational switch and endosomal escape, thus ensuring its transfection efficiency.

Several cellular entry pathways can result in endocytic confinement of siRNA, such as clathrin, caveolae or macropinocytosis.^[9b] In order to better understand the cellular entry of the LNP, flow cytometry uptake assays of CSL3/siRNA-Alexa488 were performed on HeLa cells, in the presence of chemical inhibitors of endocytosis (**Figure 3.8C**). Without inhibition, an efficient and homogenous siRNA delivery was observed (**Figure S3.4**). However, strong uptake inhibition was observed in the presence of caveolae and clathrin inhibitors. It was previously reported that the main uptake mechanism of LNP/siRNA in HeLa cells and hepatocytes is the clathrin-induced macropinocytosis, starting after 2 hours of incubation. This macropinocytosis allows the bulk of the LNP into the cells and is mainly responsible for the gene silencing activity.^[6a,17] In our case, the macropinocytosis pathway (blocked using ethylisopropylamiloride – EIPA) did not seem significantly involved in LNP entry, despite a 6-hour incubation period. It appears that CSL3-based LNP were actively endocytosed via the clathrin and caveolae pathways. These findings were also confirmed by live-cell fluorescence microscopy (**Figure 3.8D**).

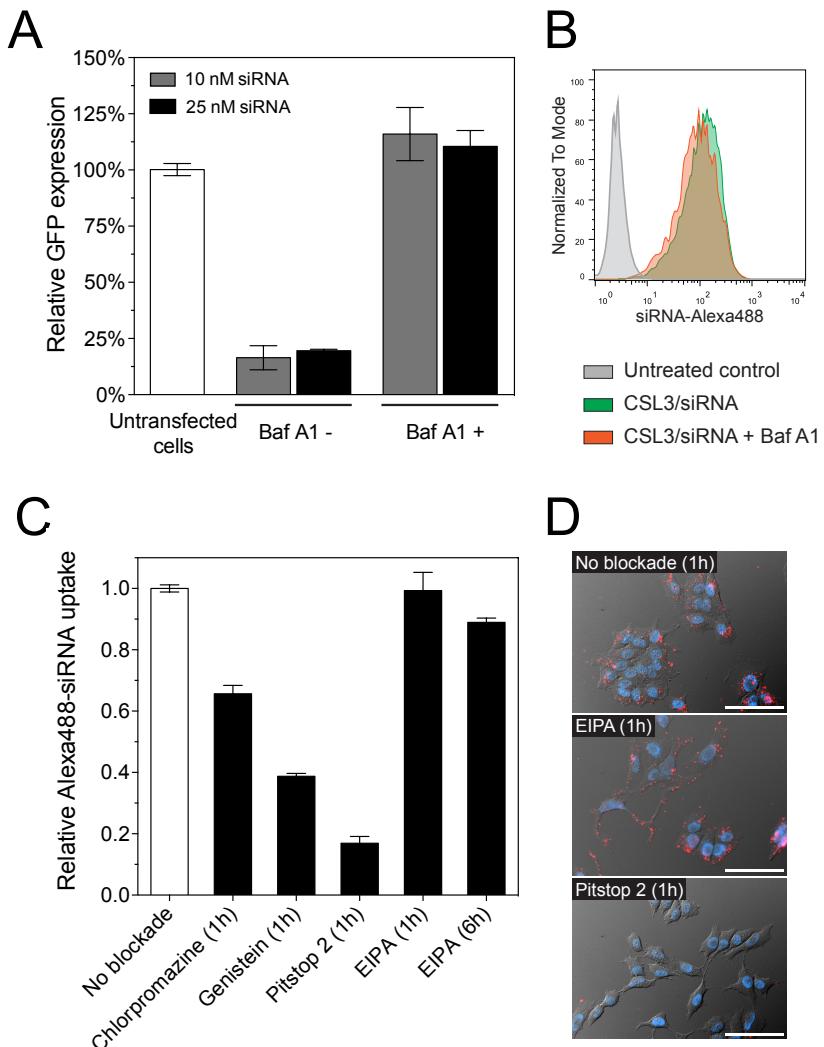


Figure 3.8 - (A) *In vitro* knockdown experiments on HeLa/GFP cells using CSL3/siRNA nanoparticles, in the presence or absence of Bafilomycin A1 (600 nM). Cells were incubated for 4h with the nanoparticles and knockdown was assayed after a 48h incubation period ($n = 3$). (B) Flow cytometry uptake profiles after a 4h incubation period of the cells with the CSL3/siRNA-Alexa488 nanoparticles in the presence or absence of Bafilomycin A1 ($n = 3$). (C) Alexa488 fluorescence uptake (flow cytometry) in HeLa cells following CSL3/siRNA-Alexa488 treatment in the presence of small molecules inhibiting clathrin (Chlorpromazine – 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), caveolae (Genistein – 200 μM), clathrin/caveolae (Pitstop 2 – 20 μM) or macropinocytosis (EIPA – 50 μM) endocytic pathways. (D) Representative images of cells treated 1 hour with CSL3/siRNA-Alexa488 nanoparticles without inhibitor, with EIPA or with Pitstop 2. Scale bar = 40 μm .

CSL3 and CSL4 LNP/siRNA were then assessed for their *in vivo* potential to deliver systemically a siRNA targeting the liver-secreted coagulation factor VII.^[11a] LNP were prepared using microfluidic mixing since this technique leads to optimized LNP and is an easily scalable process^[18]. The use of a microfluidic mixing device for LNP/siRNA assembly

allowed us to reach the critical size needed to achieve efficient delivery to the hepatocytes *via* the 100–150 nm-sized endothelial fenestrae of the mouse liver.^[19] The C18-anchored DSPE-PEG₂₀₀₀ lipid was also replaced with shorter C14-anchored DMG-PEG₂₀₀₀, as it has been reported that a shorter aliphatic anchor in the PEG-lipid yields greater hepatic gene silencing.^[20] As presented in **Figure 3.9A**, the hydrodynamic diameter of the LNP was around 70–90 nm as measured by dynamic light scattering and siRNA encapsulation efficiencies measured with a Ribogreen® fluorescent assay were 93%, which is similar to LNP obtained by manual extrusion (Figure S5D, Supporting Information). CSL3-based LNP made by microfluidic mixing showed efficient dose-responding siRNA delivery in the HeLa/GFP model and still outperformed the negative control CSL4-based LNP (**Figure 3.9B**). These results demonstrate that the pH-triggered mechanism of CSL3 is not altered either by the formulation technique or by the nature of the lipid-PEG. The gene silencing efficacy of the CSL3-based LNP was also confirmed in a hepatocyte cell line (Huh-7), targeting the therapeutic target PCSK9 protein.^[21] Total knockdown of PCSK9 and pro-PCSK9 proteins, as well as subsequent loss of PCSK9-induced LDLR degradation,^[22] demonstrate the efficient transfection ability of CSL3-based LNP with a siRNA dose as low as 10 nM (**Figure 3.9C**).

Ex-vivo fluorescence imaging studies were performed to assess the biodistribution of the CSL3-based formulation after systemic administration in male CD1 mice. CSL3/siRNA-Cy5 formulation was injected at siRNA dose of 1.5 mg/kg. Whole-organ images (**Figure 3.9D**) and fluorescence intensity normalized by wet-mass of organs (**Figure S3.5**) indicated that naked siRNA accumulate mainly in the kidneys, suggesting rapid renal clearance. On the other hand, a significant accumulation of siRNA was observed in the liver with the CSL3 nanoparticles. Although this important liver accumulation of siRNA is a prerequisite for hepatocyte gene knockdown, it is not sufficient by itself, as it was shown that some LNP can accumulate in the liver without mediating hepatocyte gene silencing.^[12b,23]

In vivo Factor VII silencing efficiency of the CSL3-based formulations was compared to that of the CSL4-based formulation (**Figure 3.9E**). CSL3-based LNP were found to demonstrate a dose-response knockdown, resulting in significant silencing efficacy (~50% silencing) at 1 mg/kg. At the same dose, negative control CSL4-based LNP were unable to mediate any silencing activity. These results confirm the crucial role of the pH-sensitive conformational change of CSL3 in the *in vivo* transfection efficacy, in agreement

with the *in vitro* results. The *in vivo* silencing efficacy of the CSL3 LNP may be further improved by lowering the molar percentage of DMG-PEG₂₀₀₀ in the formulation^[6c,20] or by using combinatorial approaches to enhance the potency of the CSL3 lipid structure (currently under investigation in our labs).

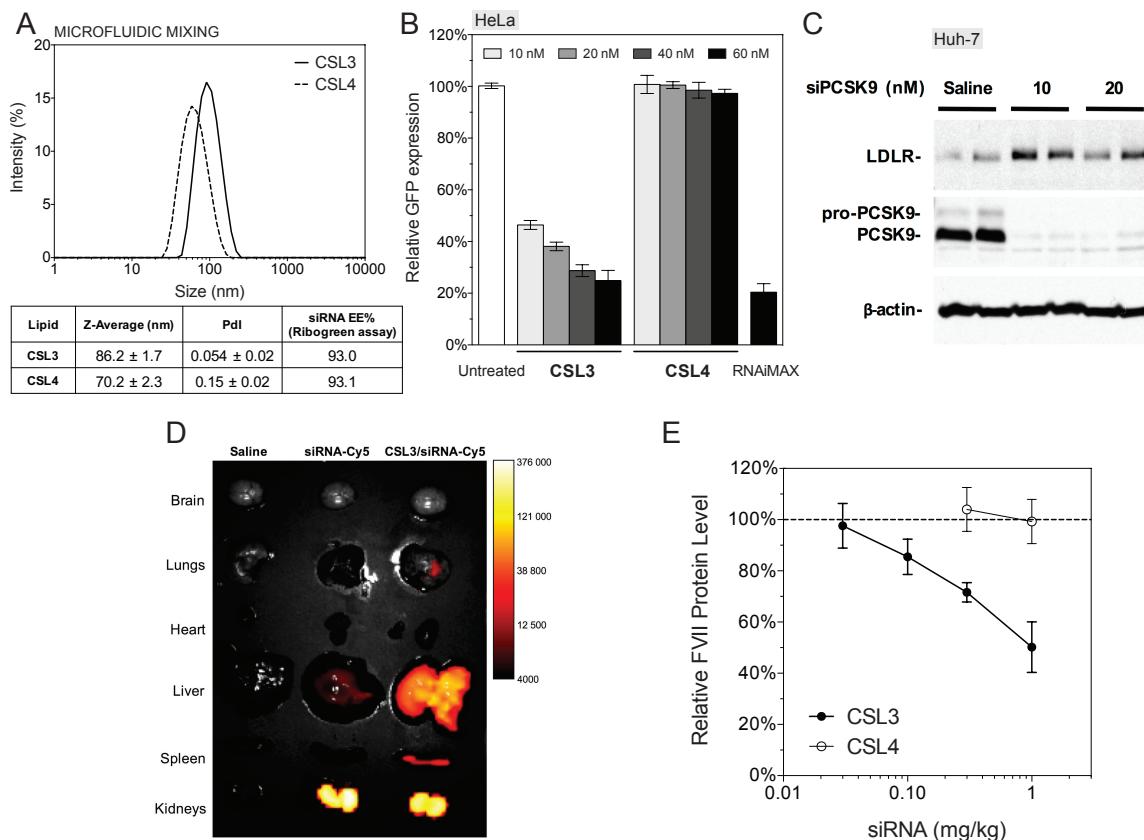


Figure 3.9 - (A) Particle size distribution and siRNA encapsulation efficiencies of CSL3 and CSL4-based LNP (CSL, DSPC, cholesterol and DMG-PEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5 respectively) prepared by microfluidic mixing. (B) *In vitro* GFP knockdown on HeLa/GFP cell with the CSL3 and CSL4-based LNP. RNAiMAX (Lipofectamine® RNAiMAX reagent – 60 nM) and untreated cells were used as control experiments. Gene knockdown was assayed by flow cytometry after a 48h incubation period (n = 3). (C) *In vitro* PCSK9 knockdown on human hepatocyte cell line (Huh-7) with the CSL3-based LNP. Knockdown of PCSK9 and LDLR levels were assayed 72h post-transfection by Western-blotting (n = 3). (D) Biodistribution of CSL3-based LNP formulated with siRNA-Cy5 (1.5 mg/kg). Organs were harvested 4 hours post-injection and *ex-vivo* imaged (n = 3). (E) *In vivo* silencing of liver Factor VII with the CSL3 and CSL4 formulations. Female C57BL/6 mice were intravenously injected with formulations and the percent reduction on Factor VII levels in serum was quantified 48h post-injection (n = 4).

3.4 Conclusion

In conclusion, we report the synthesis, *in vitro* and *in vivo* efficacy, and properties of cationic switchable lipids. This proof of concept study shows that this new class of lipid materials based on a pH-triggered conformational switch is suitable for efficient *in vitro* and *in vivo* siRNA delivery. Altogether, our results demonstrate that the pH-sensitive conformational switch plays a key role in the outstanding properties of CSL3-based materials, owing to its ability to promote endosomal escape. We believe that stimulus-responsive (ionic, redox, light)^[24] molecular switches have unique properties that may lead to significant innovations in the design of lipidoid materials in the field of gene delivery. In future studies, we plan to evaluate these siRNA delivery materials in a murine metastatic breast cancer model.

3.5 Acknowledgment

The National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) is acknowledged for financial support. We thank Suli-Anne Laurin for her contribution and Prof. Xavier Banquy (University of Montreal) for the use of his Nanoassemblr™ microfluidic mixing device.

3.6 References

- [1] a) G. Ozcan, B. Ozpolat, R. L. Coleman, A. K. Sood, G. Lopez-Berestein, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *87*, 108; b) J. E. Zuckerman, M. E. Davis, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 843.
- [2] a) J. Li, X. Yu, Y. Wang, Y. Yuan, H. Xiao, D. Cheng, X. Shuai, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 8217; b) X. Xu, J. Wu, Y. Liu, M. Yu, L. Zhao, X. Zhu, S. Bhasin, Q. Li, E. Ha, J. Shi, O. C. Farokhzad, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7091.
- [3] S. Crunkhorn, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 818.
- [4] E. P. Thi, C. E. Mire, A. C. H. Lee, J. B. Geisbert, J. Z. Zhou, K. N. Agans, N. M. Snead, D. J. Deer, T. R. Barnard, K. A. Fenton, I. MacLachlan, T. W. Geisbert, *Nature* **2015**, *521*, 362.
- [5] K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 129.
- [6] a) K. T. Love, K. P. Mahon, C. G. Levins, K. A. Whitehead, W. Querbes, J. R. Dorkin, J. Qin, W. Cantley, L. L. Qin, T. Racie, M. Frank-Kamenetsky, K. N. Yip, R. Alvarez, D. W. Y. Sah, A. de Fougerolles, K. Fitzgerald, V. Koteliansky, A. Akinc, R. Langer, D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 1864; b) Y. Dong, K. T. Love, J. R. Dorkin, S. Sirirungruang, Y. Zhang, D. Chen, R. L. Bogorad, H. Yin, Y. Chen, A. J. Vegas, C. A. Alabi, G. Sahay, K. T. Olejnik, W. Wang, A. Schroeder, A. K. R. Lytton-Jean, D. J. Siegwart, A. Akinc, C. Barnes, S. A. Barros, M. Carioto, K. Fitzgerald, J. Hettinger, V. Kumar, T. I. Novobrantseva, J. Qin, W. Querbes, V. Koteliansky, R. Langer, D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 3955; c) Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi, H. Harashima, *J. Controlled Release* **2016**, *229*, 48.
- [7] C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer, D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 12881.
- [8] M. Jayaraman, S. M. Ansell, B. L. Mui, Y. K. Tam, J. Chen, X. Du, D. Butler, L. Eltepu, S. Matsuda, J. K. Narayanannair, K. G. Rajeev, I. M. Hafez, A. Akinc, M. A. Maier, M. A. Tracy, P. R. Cullis, T. D. Madden, M. Manoharan, M. J. Hope, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8529.
- [9] a) G. Sahay, W. Querbes, C. Alabi, A. Eltoukhy, S. Sarkar, C. Zurenko, E. Karagiannis, K. Love, D. Chen, R. Zoncu, Y. Buganim, A. Schroeder, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat.*

Biotechnol. **2013**, *31*, 653; b) M. P. Stewart, A. Lorenz, J. Dahlman, G. Sahay, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2016**, *8*, 465.

[10] W. Viricel, A. Mbarek, J. Leblond, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12743.

[11] a) A. Akinc, A. Zumbuehl, M. Goldberg, E. S. Leshchiner, V. Busini, N. Hossain, S. A. Bacallado, D. N. Nguyen, J. Fuller, R. Alvarez, A. Borodovsky, T. Borland, R. Constien, A. de Fougerolles, J. R. Dorkin, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, M. John, V. Koteliansky, M. Manoharan, L. Nechev, J. Qin, T. Racie, D. Raitcheva, K. G. Rajeev, D. W. Y. Sah, J. Soutschek, I. Toudjarska, H.-P. Vornlocher, T. S. Zimmermann, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 561; b) K. A. Whitehead, J. R. Dorkin, A. J. Vegas, P. H. Chang, O. Veiseh, J. Matthews, O. S. Fenton, Y. Zhang, K. T. Olejnik, V. Yesilyurt, D. Chen, S. Barros, B. Klebanov, T. Novobrantseva, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, DOI 10.1038/ncomms5277.

[12] a) Y. J. Kwon, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1077; b) S. C. Semple, A. Akinc, J. Chen, A. P. Sandhu, B. L. Mui, C. K. Cho, D. W. Y. Sah, D. Stebbing, E. J. Crosley, E. Yaworski, I. M. Hafez, J. R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K. G. Rajeev, K. F. Wong, L. B. Jeffs, L. Nechev, M. L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M. A. Maier, M. Srinivasulu, M. J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S. A. Barros, S. De, S. K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W. L. Cantley, Y. K. Tam, M. Manoharan, M. A. Ciufolini, M. A. Tracy, A. de Fougerolles, I. MacLachlan, P. R. Cullis, T. D. Madden, M. J. Hope, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 172.

[13] C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, T. Stutzman, W. T. Young, R. Langer, D. G. Anderson, *ACS Nano* **2012**, *6*, 6133.

[14] a) J. C. Geoghegan, B. L. Gilmore, B. L. Davidson, *Mol. Ther. — Nucleic Acids* **2012**, *1*, e53; b) K. K. Hou, H. Pan, L. Ratner, P. H. Schlesinger, S. A. Wickline, *ACS Nano* **2013**, *7*, 8605.

[15] L. Yao, J. Daniels, D. Wijesinghe, O. A. Andreev, Y. K. Reshetnyak, *J. Controlled Release* **2013**, *167*, 228.

[16] A. Wittrup, A. Ai, X. Liu, P. Hamar, R. Trifonova, K. Charisse, M. Manoharan, T. Kirchhausen, J. Lieberman, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 870.

[17] J. Gilleron, W. Querbes, A. Zeigerer, A. Borodovsky, G. Marsico, U. Schubert, K. Manygoats, S. Seifert, C. Andree, M. Stöter, H. Epstein-Barash, L. Zhang, V. Koteliansky,

K. Fitzgerald, E. Fava, M. Bickle, Y. Kalaidzidis, A. Akinc, M. Maier, M. Zerial, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 638.

[18] N. M. Belliveau, J. Huft, P. J. Lin, S. Chen, A. K. Leung, T. J. Leaver, A. W. Wild, J. B. Lee, R. J. Taylor, Y. K. Tam, C. L. Hansen, P. R. Cullis, *Mol. Ther. — Nucleic Acids* **2012**, *1*, e37.

[19] a) S. Chen, Y. Y. C. Tam, P. J. C. Lin, M. M. H. Sung, Y. K. Tam, P. R. Cullis, *J. Controlled Release* **2016**, *235*, 236; b) E. Wisse, F. Jacobs, B. Topal, P. Frederik, B. De Geest, *Gene Ther.* **2008**, *15*, 1193.

[20] B. L. Mui, Y. K. Tam, M. Jayaraman, S. M. Ansell, X. Du, Y. Y. C. Tam, P. J. Lin, S. Chen, J. K. Narayananair, K. G. Rajeev, M. Manoharan, A. Akinc, M. A. Maier, P. Cullis, T. D. Madden, M. J. Hope, *Mol. Ther. — Nucleic Acids* **2013**, *2*, e139.

[21] M. Frank-Kamenetsky, A. Grefhorst, N. N. Anderson, T. S. Racie, B. Bramlage, A. Akinc, D. Butler, K. Charisse, R. Dorkin, Y. Fan, C. Gamba-Vitalo, P. Hadwiger, M. Jayaraman, M. John, K. N. Jayaprakash, M. Maier, L. Nechev, K. G. Rajeev, T. Read, I. Röhl, J. Soutschek, P. Tan, J. Wong, G. Wang, T. Zimmermann, A. de Fougerolles, H.-P. Vornlocher, R. Langer, D. G. Anderson, M. Manoharan, V. Koteliansky, J. D. Horton, K. Fitzgerald, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 11915.

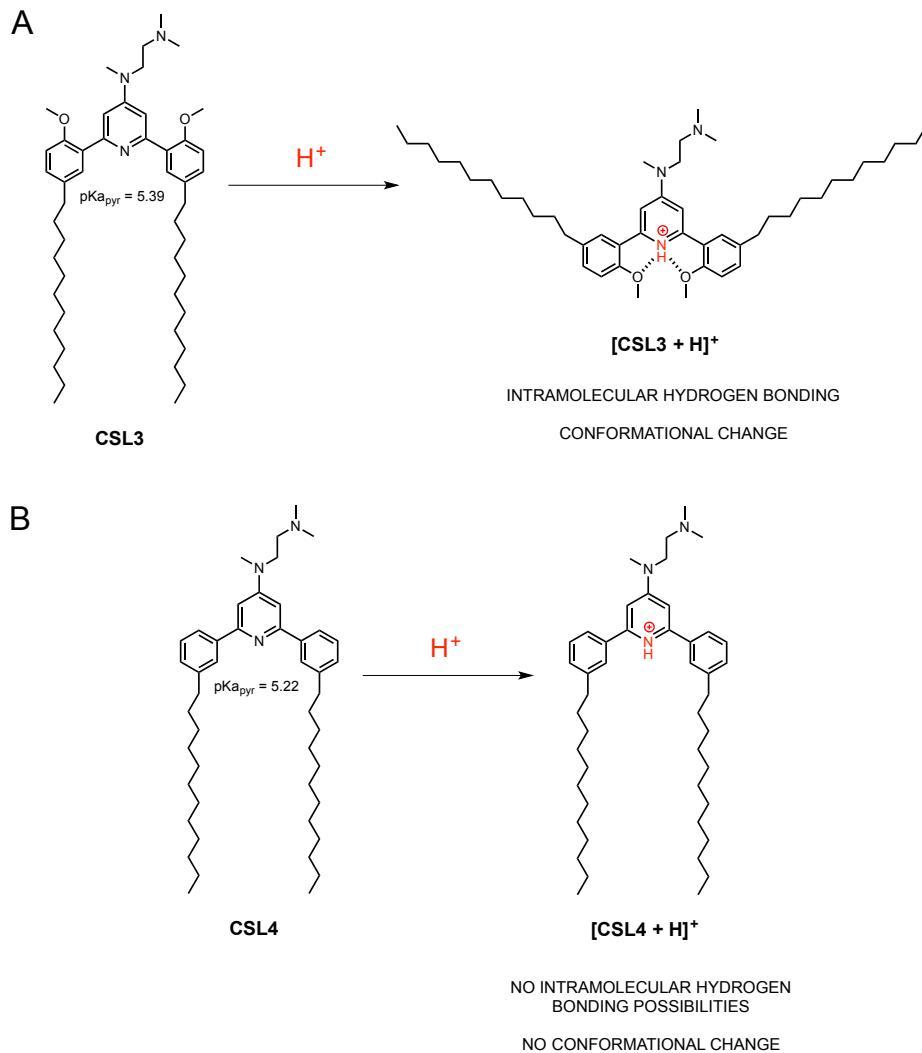
[22] S. Poirier, M. Mamarbachi, W.-T. Chen, A. S. Lee, G. Mayer, *Cell Rep.* **2015**, *13*, 2064.

[23] Y. Zhang, J. M. Pelet, D. A. Heller, Y. Dong, D. Chen, Z. Gu, B. J. Joseph, J. Wallas, D. G. Anderson, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 4641.

[24] J. Leblond, A. Petitjean, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 1043.

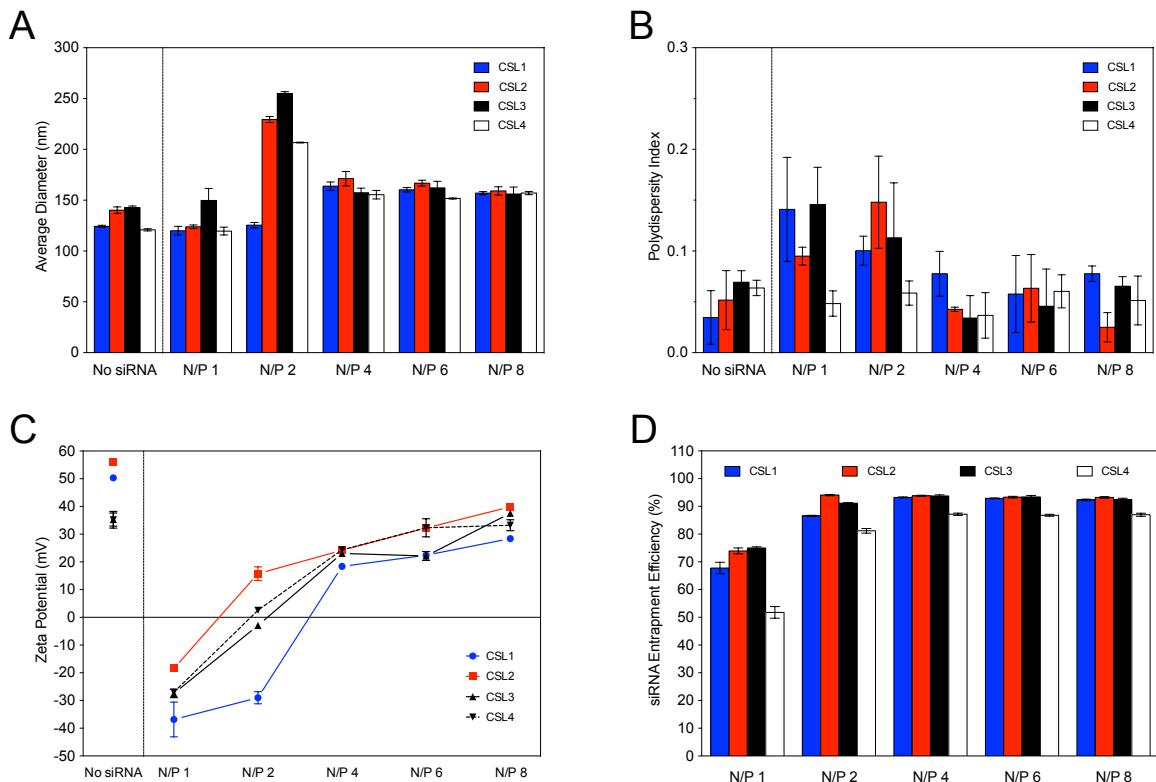
3.7 Supporting Information

Scheme S3.1 - Protonation induced conformational change of the cationic switchable lipids CSL3 and CSL4 (negative control lipid)



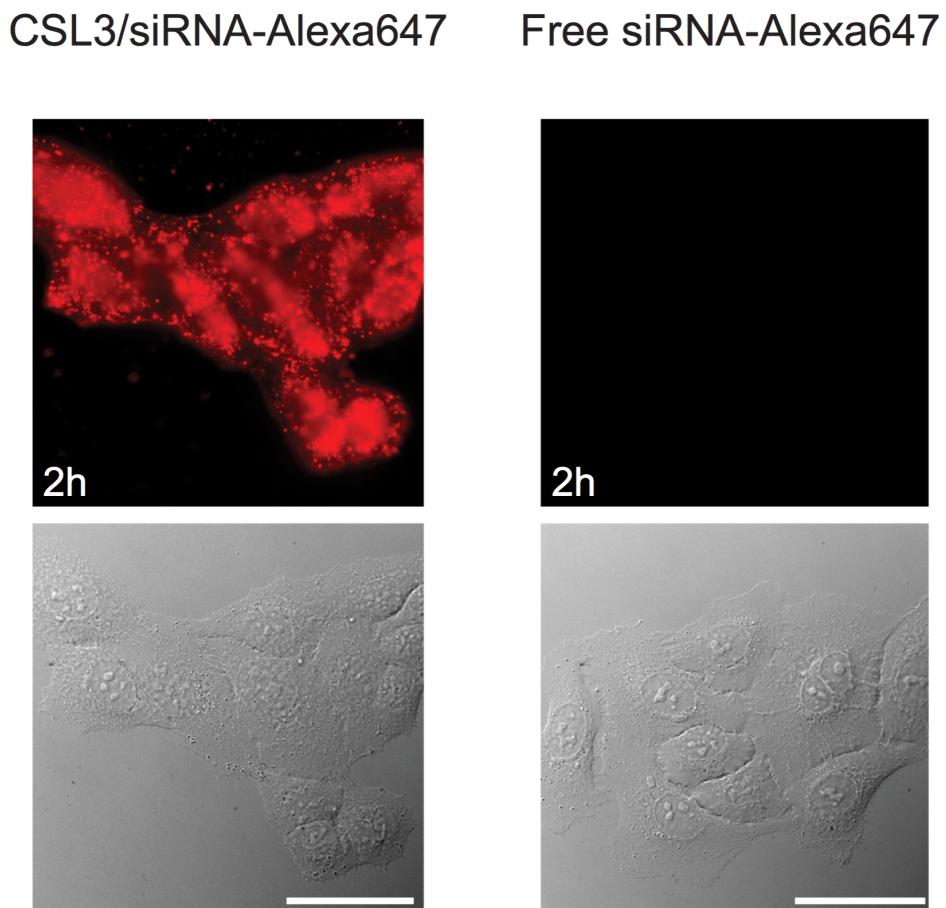
(A) Upon protonation of the central pyridine ring in the cationic switchable lipid CSL3, the formation of intramolecular hydrogen bonding between the protonated nitrogen and the two methoxy moieties leads the conformation to freeze, destabilizing the lipid nanoparticle and provoking endosomal escape. (B) The negative control cationic lipid CSL4 lacks the two methoxy moieties required to perform intramolecular hydrogen bonding with the protonated pyridine, and is therefore unable to freeze its conformation at endosomal pH values. Note that the $pK_{a\text{pyr}}$ values of the central pyridine ring of these two lipids are similar (5.39 and 5.22), as predicted *in silico* (CSpKaTM software, ChemSilico LLC.).

Figure S3.2 - Physicochemical characterisation of LNP/siRNA complexes made by manual extrusion



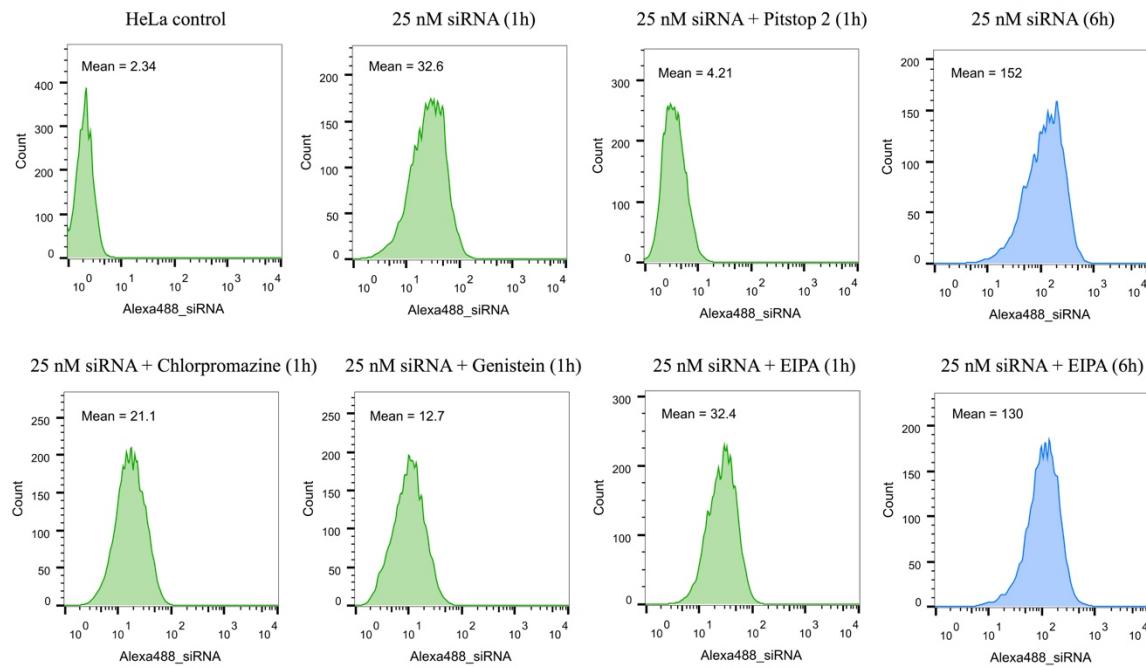
Physicochemical characterisation of the lipid nanoparticles encapsulating anti-GFP siRNA at different lipid nitrogen/siRNA phosphate (N/P) ratios. Lipid nanoparticles were prepared using cationic switchable lipids, DSPE, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5 respectively. Size (A) and polydispersity index (B) of the lipid nanoparticles/siRNA complexes were measured by dynamic light scattering in Opti-MEM®. Zeta potential (C) of lipid nanoparticles/siRNA complexes were measured in dextrose 5%. siRNA encapsulation efficiency (D) were measured using a SYBR® Gold fluorescence assay.

Figure S3.3 - CSL3/siRNA-Alexa647 and free siRNA-Alexa647 delivery on HeLa cells



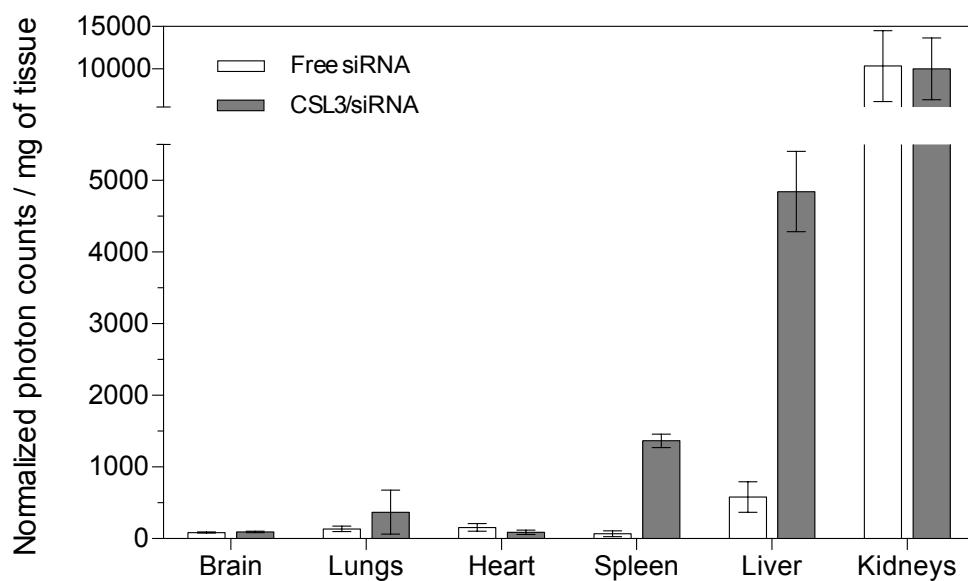
2-hour incubation of HeLa cells with CSL3/siRNA-Alexa647 LNP (CSL3, DSPC, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5 respectively – made by manual extrusion) or free siRNA-Alexa647. Final siRNA-Alexa647 concentration in the dish is 50 nM. Representative pictures are shown. Scale bar is 20 μ M.

Figure S3.4 - Flow cytometry profiles of uptake studies with endocytosis inhibitors



Representative flow cytometry profiles of cell uptake (1-hour incubation (green) or 6-hour incubation (blue)) of the CSL3-based lipid nanoparticles formulation (CSL3/DSPC/cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by manual extrusion) encapsulating siRNA-Alexa488 (25 nM/well), in the presence or absence of endocytosis inhibitors. HeLa cells were used for this study. Clathrin (Chlorpromazine – 10 µg/mL), caveolae (Genistein – 200 µM), clathrin/caveolae (Pitstop 2 – 20 µM) or macropinocytosis (EIPA – 50 µM) endocytic pathways were inhibited. Experiment was realised in triplicate.

Figure S3.5 - Quantification of biodistribution of siRNA-Cy5 encapsulated into CSL3 LNP



Quantification (photon counts normalized by organ wet mass) of siRNA-Cy5 biodistribution. siRNA-Cy5 were encapsulated into CSL3 LNP (CSL3/DSPC/cholesterol/DMG-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by microfluidic mixing). Organs were harvested and imaged 4 hours after tail vein injection at a siRNA-Cy5 dose of 1.5 mg/kg. Experiment was realized in triplicate.

Table S3.6 - siRNA sequences used in this study

siRNA	Sense strand	Antisense strand	Modification	Origin
siRNA GFP	Not provided	Not provided	None	Dharmacon (cat# P-002048-01-20)
siRNA-Alexa647	Not provided	Not provided	3'-Alexa Fluor 647 on the sense strand	Qiagen AllStars Negative Control siRNA (cat# 1027287)
siRNA-Alexa488	Not provided	Not provided	3'-Alexa Fluor 488 on the sense strand	Qiagen AllStars Negative Control siRNA (cat# 1027284)
siRNA-Cy5	5'-Cy5-UAGCGACUAAACACAUCAAUU-3'	5'-UUGAUGUGUUUAGUCGCUAUU-3'	5'-Cy5 on the sense strand	Dharmacon (siGENOME Non-Targeting Control siRNA)
siRNA PCSK9	5'-GccuGGAGuuuAuucGGAAdT*dT-3'	5'-UUCCGAAuAACUCCcAGGCdT*dT-3'	None	Dharmacon
siRNA FVII	5'-GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAfCdT*dT-3'	5'-GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdT*dT-3'	None	Dharmacon

2'-OMe modified nucleotides are in lower case. 2'-F modified nucleotides are denoted by “f”. Phosphorothioate linkages are represented by asterisks.

Figure S3.7 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound **CSL1**

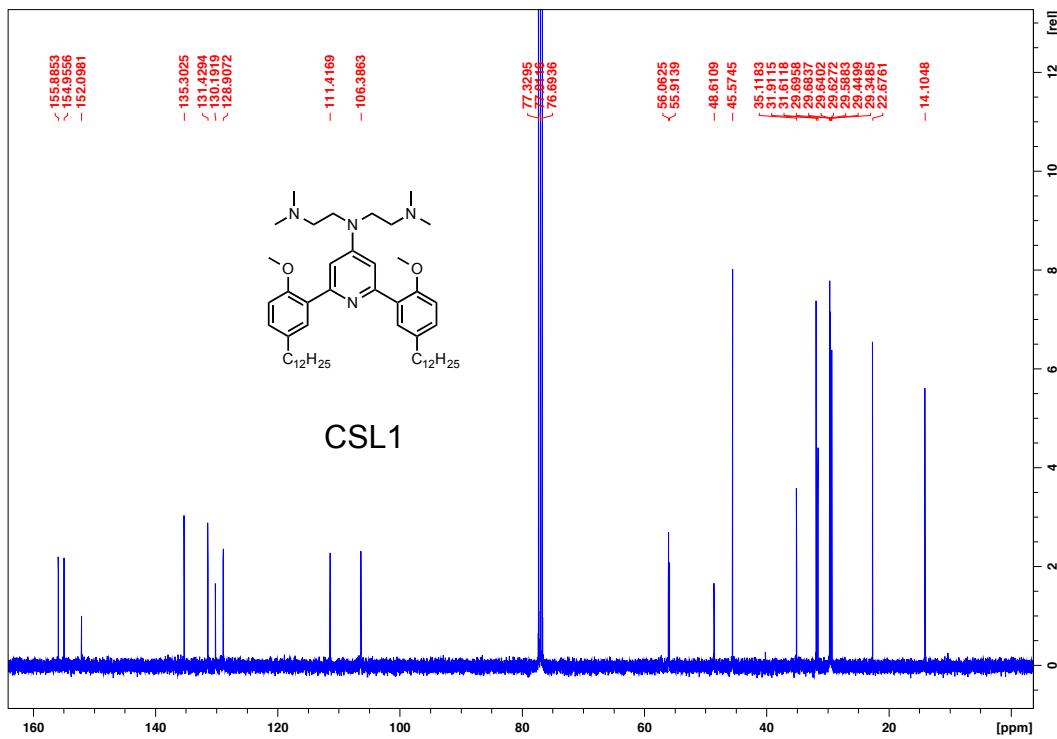
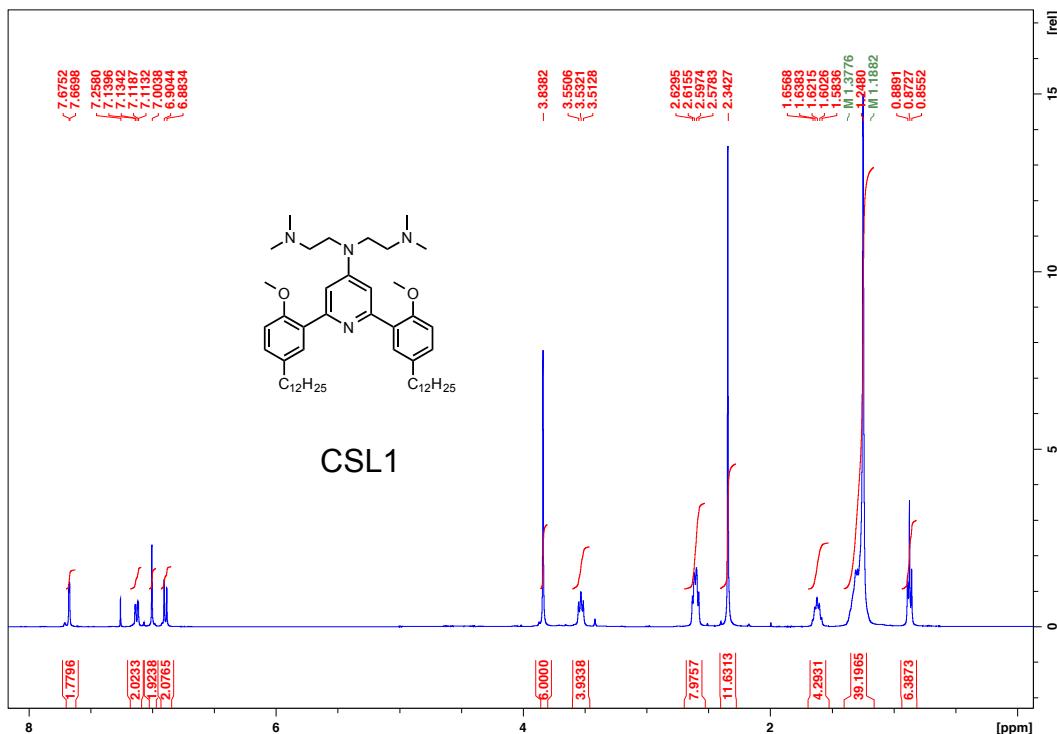


Figure S3.8 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound **CSL2**

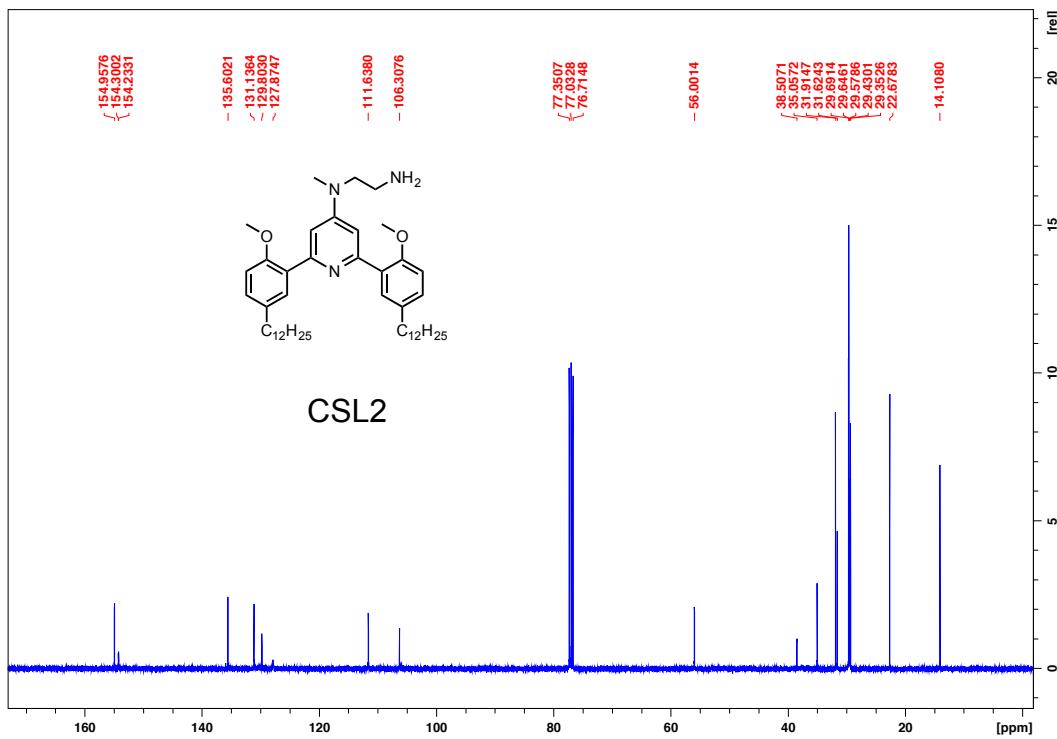
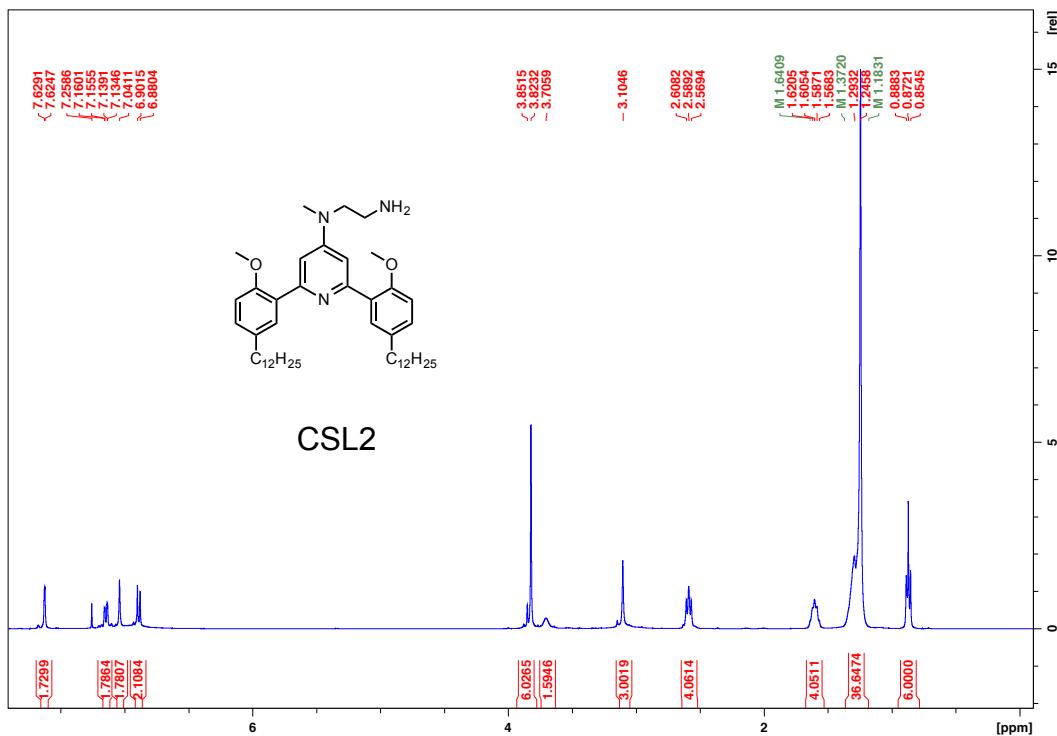


Figure S3.9 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound **CSL3**

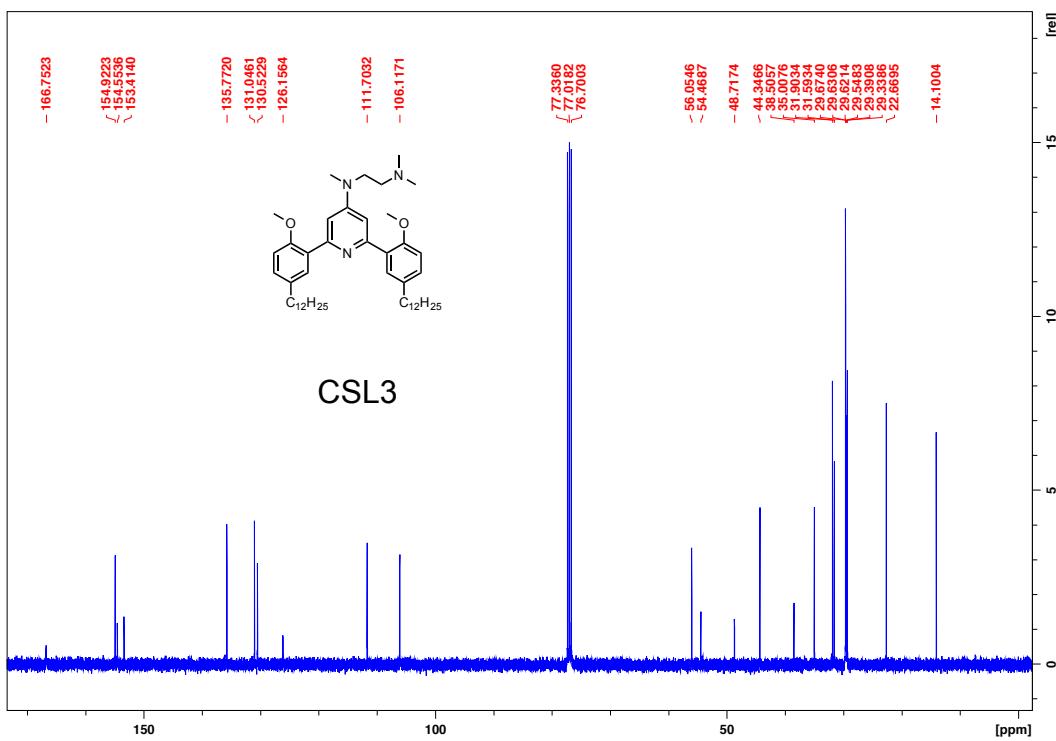
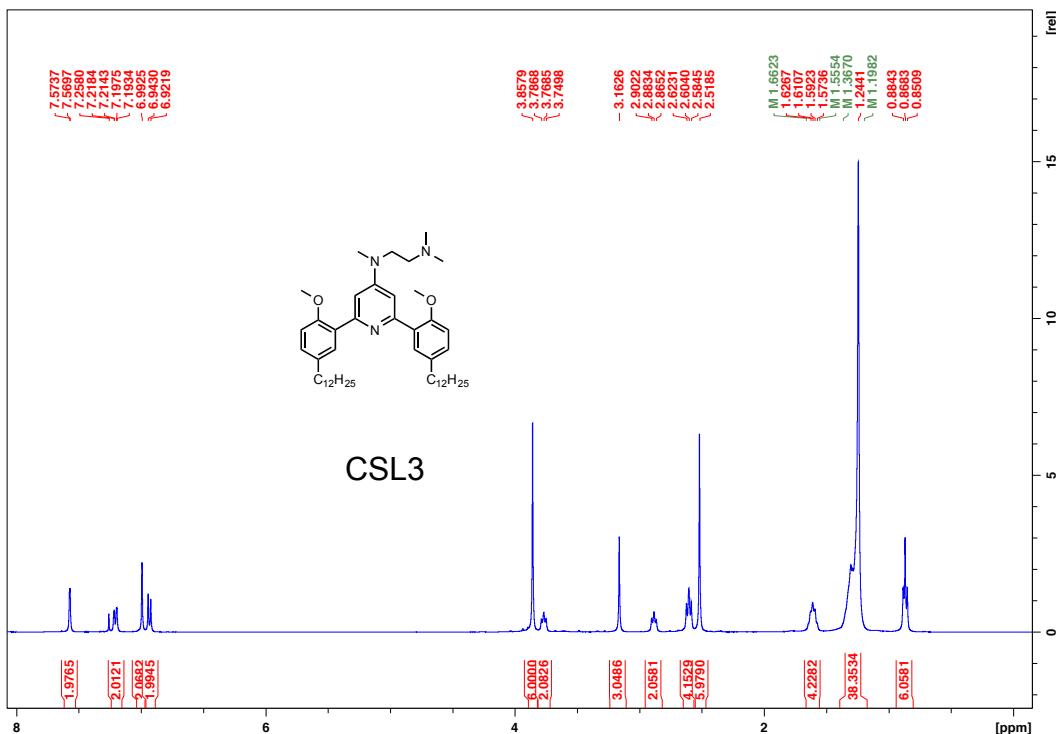
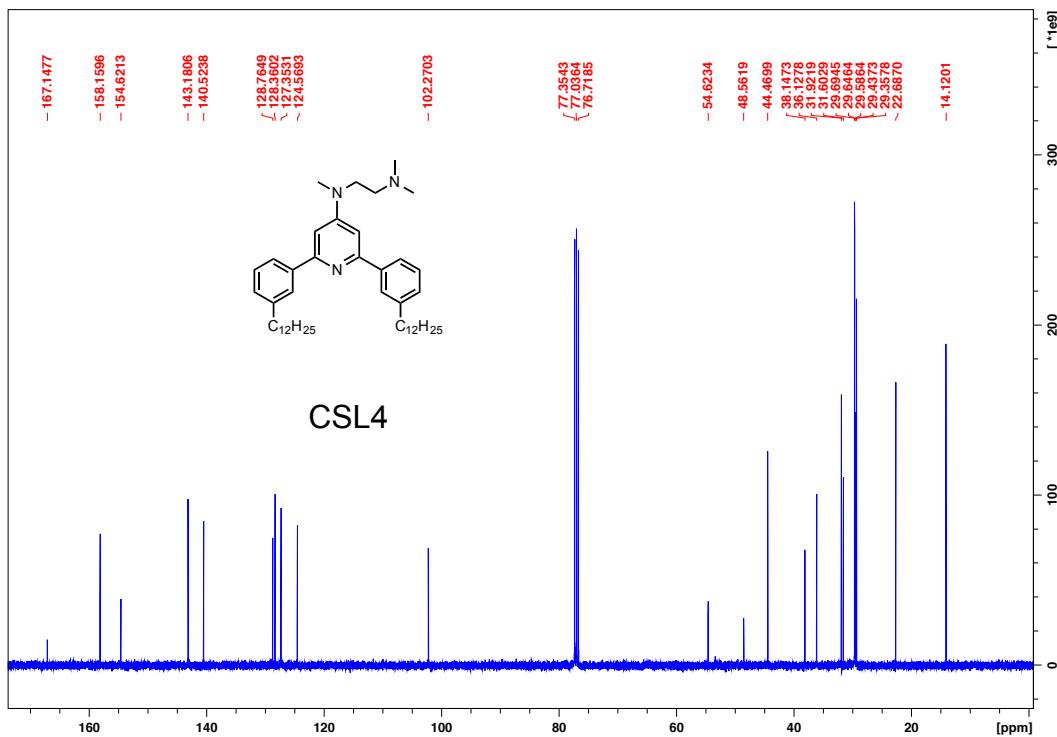
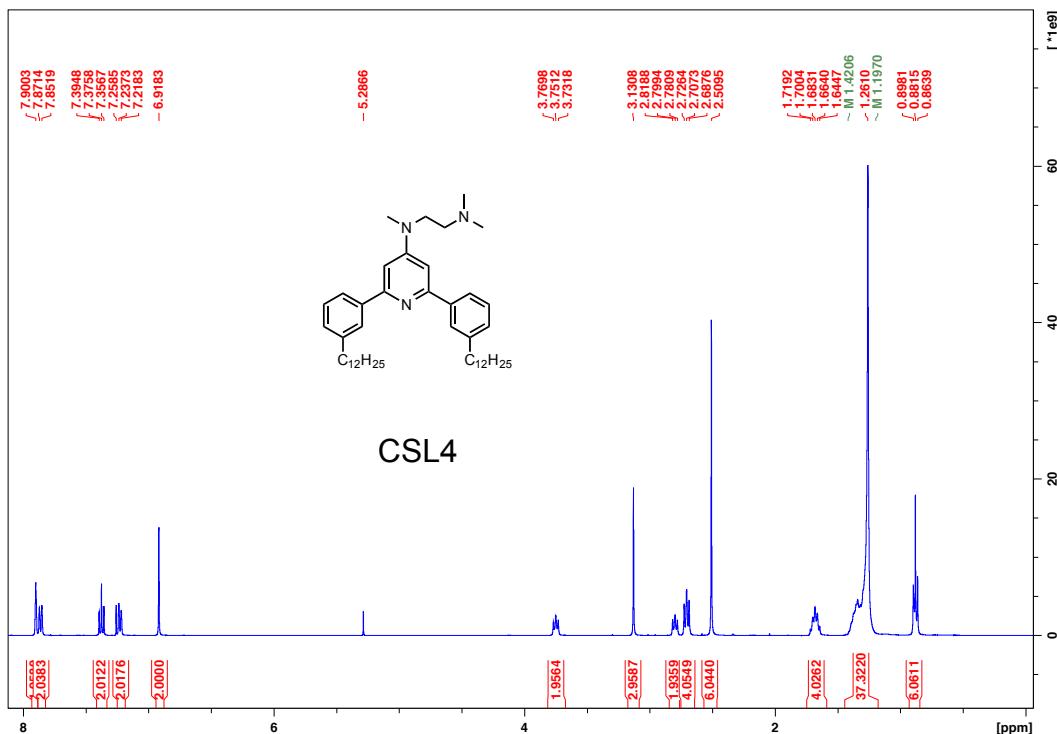


Figure S3.10 - ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound **CSL4**



Chapitre 4 : Discussion et perspectives

4.1 Synthèse chimique des lipides bascules

Les deux composés les plus prometteurs identifiés durant ces travaux de thèse sont les lipides bascules **2** (non-cationique) et **CSL3** (cationique) présentés en **Figure 4.1**. Ces deux lipides sont ceux qui se sont révélés les plus efficaces en terme de comportement pH-sensible, d'échappement endosomal et d'efficacité (délivrance intracytoplasmique de sulforhodamine B *in vitro* pour **2** et délivrance de siRNA *in vitro* et *in vivo* pour **CSL3**).

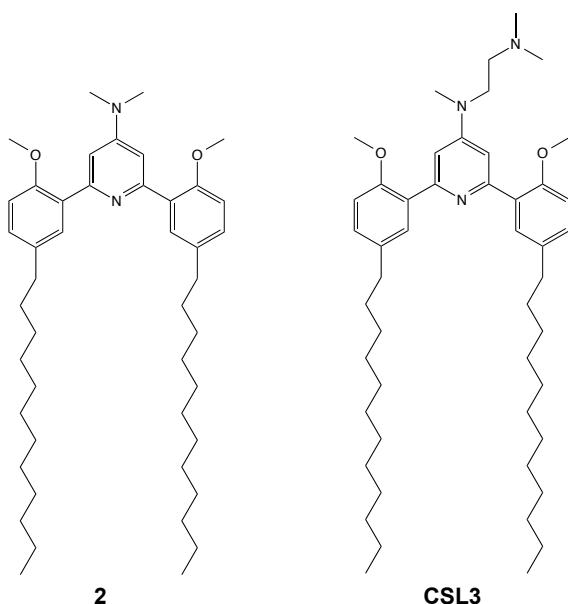


Figure 4.1 – Structure chimique des lipides bascules **2** (non-cationique) et **CSL3** (cationique)

Le composé **2** est synthétisé en 4 étapes à partir de produits commerciaux, avec un rendement global final de 42%. Les réactions de double-couplages de Suzuki et Sonogashira (respectivement couplage des deux cycles bromoanisole et couplage des deux chaînes alkyl) furent les plus difficiles à optimiser. L'impact du solvant, de la nature de la base, de la température et du catalyseur ont été investigues pour maximiser les rendements. Les purifications successives sont simples et peu onéreuses (chromatographie flash en phase normale). D'un point de vue de mise à l'échelle industrielle, cette voie de synthèse ne poserait *a priori* pas d'obstacles particuliers.

Le composé **CSL3** est synthétisé en 5 étapes à partir de produits commerciaux, avec un rendement global final de 10%. A cause de la composante cationique des composés, empêchant une séparation efficace en phase normale des produits secondaires mono- ou tri-

couplés (réactions de Suzuki et Sonogashira), deux purifications en phases inverses (HPLC préparative sur colonne C8) sont nécessaires. La synthèse du lipide bascule cationique **2** est donc plus exigeante même si rien ne s'oppose à une mise à l'échelle industrielle. A titre de comparaison, les meilleurs lipidoides cationiques actuels (C12-200, cKK-E12, DLin-MC3-DMA, YSK05)¹⁻⁴ se synthétisent en moins de 3 étapes, avec des rendements globaux finaux > 50% et sans faire appel à une purification en phase inverse.

Avec le recul, il aurait été préférable de réaliser une approche combinatoire pour identifier le lipide bascule cationique le plus efficace en terme de transfection de siRNA *in vivo* (2^{nde} publication). Au lieu de faire varier les têtes cationiques (la tête N,N-Diméthyl du lipide CSL3 étant la plus efficace selon la littérature)³, il aurait certainement été préférable de modifier la nature des chaînes lipidiques (pouvant avoir un impact majeur sur l'efficacité de transfection) et de réaliser le screening d'efficacité de ces formulations *in vivo* dans le modèle du FVII (1 mg/kg). Les manipulations *in vitro* (microscopie, mécanistique) et la synthèse du lipide contrôle négatif (sans groupements méthoxy) auraient été réalisées dans un second temps, après identification du *lead compound* doté de la meilleure efficacité de délivrance de siRNA *in vivo*. Il faut noter que ce scénario aurait été plus coûteux (achat de grandes quantités de siRNA-FVII et frais d'animalerie).

4.2 Formulation des nanoparticules

4.2.1 Encapsulation de siRNA

Comme vu dans la seconde publication, le lipide bascule cationique **CSL3** dispose d'excellentes capacités d'encapsulation de siRNA, quel que soit le mode de préparation choisi (extrusion manuelle ou mixage microfluidique). Le lipide bascule **2** n'est pas en soi dédié à la délivrance de gènes, mais il a permis d'introduire et de valider l'hypothèse d'une bascule moléculaire pH-sensible (1^{ère} publication). Il convient en effet de préciser que le groupement de tête N,N-Diméthylamine du composé **2** ne se protone pas à des valeurs de pH physiologiques (observé en prédictions *in silico*). Ceci indique que le lipide **2** est *a priori* non-cationique et donc incapable d'encapsuler des oligonucléotides anioniques. Nous avons quand même décidé de tester les capacités d'encapsulation de siRNA du lipide **2**, et de les comparer au lipide bascule cationique **CSL3** (**Figure 4.2**). Les formulations lipidiques utilisées lors de cet essai sont : lipide bascule **2** ou **CSL3**/DSPC/Cholestérol/DSPE-PEG₂₀₀₀ (50:10:37,5:2,5 mol%). Les nanoparticules sont formulées par extrusion manuelle dans du

dextrose 5% et l'efficacité d'encapsulation est déterminée avec le réactif SYBR® Gold de Thermo Scientific (voir 2^{nde} publication).

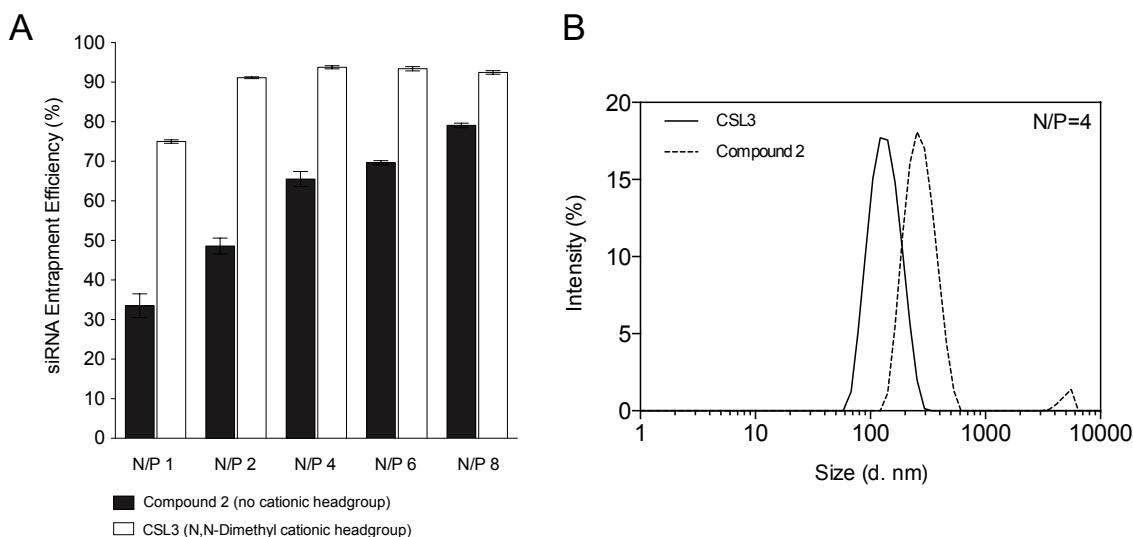


Figure 4.2 – (A) Comparaison de l'efficacité d'encapsulation de siRNA du lipide bascule non-cationique **2** et de son homologue cationique **CSL3**. **(B)** Mesure de taille des nanoparticules (Z-Average, DLS) réalisée après encapsulation des siRNA par les deux formulations (15 minutes d'incubation).

On peut constater que la formulation « non-cationique » **2** est capable d'encapsuler des siRNA (environ 65% d'efficacité d'encapsulation à N/P=4), de façon moins prononcée et efficace que la formulation cationique **CSL3**, mais suffisante pour des applications *in vitro* et *in vivo* éventuelles. A titre d'illustration, cKK-E12 (le lipidoïde cationique le plus performant *in vivo* à ce jour) dispose d'une efficacité d'encapsulation d'environ 65%.² Cette capacité est certainement due à une protonation partielle de la pyridine du composé **2**. En revanche pour cette formulation **2**, l'efficacité d'encapsulation se fait aux dépens d'une augmentation significative de tailles des nanoparticules (> 350 nm), rendant de nombreuses utilisations *in vivo* impossibles. Il faudrait essayer de formuler le lipide bascule **2** en microfluidique pour voir si ce problème d'augmentation de taille pourrait être corrigé.

En prenant en compte les résultats actuels, nous considérons que le lipide bascule **2** serait plutôt dédié à la délivrance liposomale pH-sensible de petites molécules thérapeutiques hydrophiles (gemcitabine, doxorubicine, cisplatin, 5-fluorouracile, acide folinique...) ou même hydrophobes (paclitaxel, irinotécan, méthotrexate...). Il a été constaté dans la première publication que l'efficacité d'encapsulation de sulforhodamine B diminuait lorsque le pourcentage du lipide bascule **2** augmentait dans la formulation. Ceci laisse

supposer qu'une balance entre efficacité d'encapsulation et potentiel pH-sensible devra être trouvée.

Le lipide bascule **CSL3** permettrait quant à lui la vectorisation d'oligonucléotides thérapeutiques (siRNA, ARNm, ADNp).

4.2.2 Les différentes techniques de formulation

Il a été montré que le lipide bascule non-cationique **2** peut être formulé par extrusion manuelle (1^{ère} publication, encapsulation de sulforhodamine B) et par mixage microfluidique (résultats préliminaires, voir section 4.5.1). Le lipide bascule cationique **CSL3** peut quant à lui être formulé avec les deux techniques (2^{nde} publication). Cette versatilité est un point fort mais peut devenir gênante lorsqu'il s'agit de caractériser et d'étudier le mécanisme de pH-sensibilité des lipides bascules (voir section 4.4). En effet, selon le mode de préparation et la formulation lipidique choisie, l'aspect final des nanoparticules est différent (voir section 1.2.1). Les avantages et inconvénients de chaque technique de formulation sont présentés dans le **Tableau 4.1**. Les particules faites par extrusion manuelle sont vraisemblablement des liposomes ayant une bicouche lipidique ordonnée tandis que le mixage microfluidique donne plutôt des nanoparticules lipidiques solides (sans bicouches ordonnées). Des expériences de cryo-microscopie électronique sont en cours afin de tenter de confirmer ces hypothèses.

	Avantages	Inconvénients
Extrusion manuelle	<ul style="list-style-type: none">Permet de formuler les nanoparticules lipidiques vides et de co-incuber avec les siRNA avant utilisation. Versatilité et économie de principes actifs (siRNA).	<ul style="list-style-type: none">Peu reproductible, taille des nanoparticules supérieure à 150nm.Pertes de lipides sur l'extrudeur, pouvant modifier les proportions lipidiques de la formulation finale.Impossible de réaliser la complexation des siRNA à forte concentration (précipitation des formulations), rendant impossible l'utilisation <i>in vivo</i>.Augmentation de taille des nanoparticules après complexation du siRNA.

Mixage microfluidique	<ul style="list-style-type: none"> Facilité de mise à l'échelle industrielle, facilité d'utilisation, reproductibilité. Taille des nanoparticules inférieure à 100 nm après dialyse. Pas de modification des différentes proportions de lipides dans la formulations finale (pas de pertes de lipides). 	<ul style="list-style-type: none"> Nécessité de formuler en même temps les lipides et les siRNA. Consommation de principe actif plus élevée (siRNA) Appareillage plus dispendieux.
------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tableau 4.1 – Avantages et inconvénients des deux techniques de formulation de nanoparticules lipidiques utilisées dans cette thèse.

En théorie, les deux techniques permettent l'encapsulation de petites molécules hydrophiles, hydrophobes et d'oligonucléotides. La formulation lipidique doit par contre être soigneusement choisie en fonction de l'utilisation prévue (lipide cationique pour les oligonucléotides, co-lipides « rigides » à hautes température de transition type DSPC pour encapsuler et retenir des petits composés hydrophiles comme la sulforhodamine B, présence ou non de cholestérol pour améliorer l'encapsulation des drogues et empêcher leur fuite).⁵⁻⁶

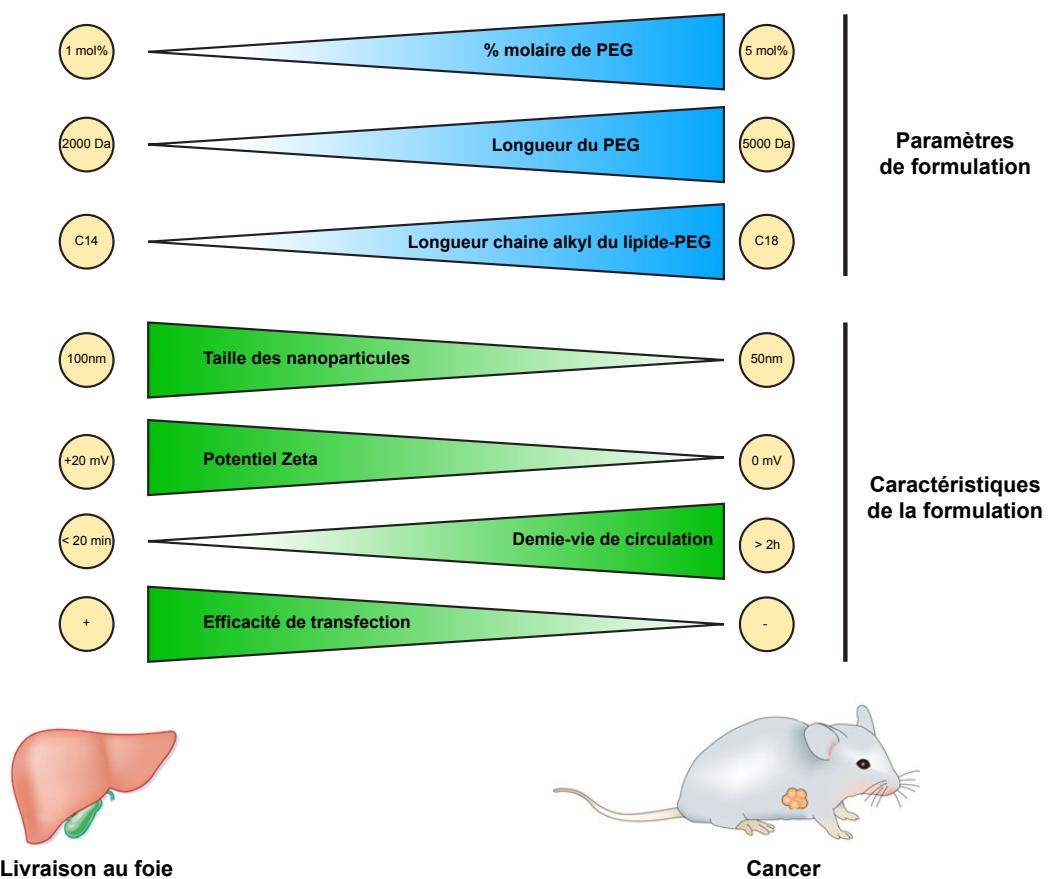


Figure 4.3 – Schéma récapitulant l'influence des paramètres de formulation sur les caractéristiques et sur l'application thérapeutique des nanoparticules lipidiques.

Le pourcentage molaire de lipide-PEG et sa nature (ancrage lipidique C14 ou C18 et longueur du PEG) influe sur la physico-chimie de la nanoparticule obtenue (taille, potentiel zeta, stabilité)⁷, sur sa pharmacocinétique (plus longue circulation avec un C18-PEG₂₀₀₀ qu'avec un C14-PEG₂₀₀₀)⁸ ainsi que l'efficacité de transfection.⁹ Une balance est à trouver entre formulation, durée de circulation et application thérapeutique (**Figure 4.3**).¹⁰

4.3 Autres applications *in vitro* de CSL3

4.3.1 Transfections sur lignées cellulaires cancéreuses

L'efficacité de délivrance de siRNA du lipide bascule cationique **CSL3** a été évaluée sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (A549, HeLa, MCF7 – **Figure 4.4**). Un siRNA anti-survivin (protéine anti-apoptose pro-cancer)¹¹ est ainsi livré avec la formulation lipidique CSL3/DSPC/Cholestérol/DSPE-PEG₂₀₀₀ (50:10:37,5:2,5 mol% - formulée par extrusion manuelle) et l'efficacité de transfection est déterminée après 48h par PCR quantitative.

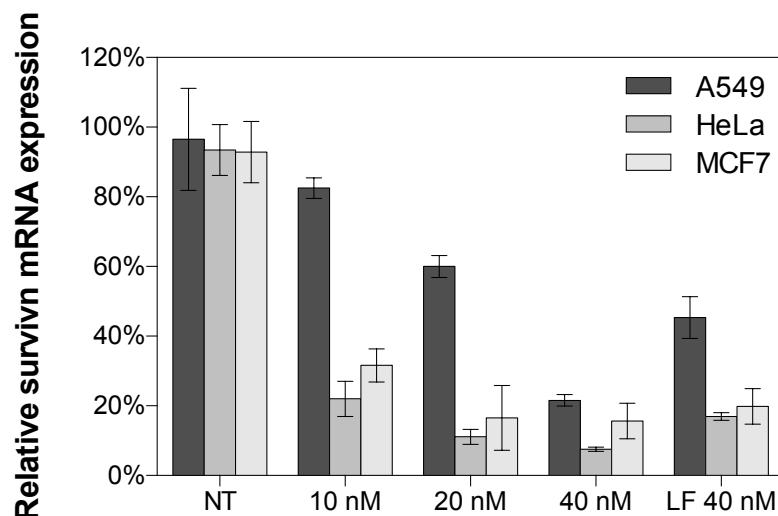


Figure 4.4 – Efficacité de délivrance de siRNA anti-survivin *in vitro* de la formulation lipidique CSL3 sur trois lignées cancéreuses. LF = Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Scientific).

La formulation **CSL3** se montre très efficace sur les trois lignées cancéreuses, battant systématiquement le réactif commercial de référence. Ces résultats préliminaires semblent confirmer les excellentes performances de transfection *in vitro* de la formulation et permettent d'envisager une éventuelle application thérapeutique anti-cancer (voir section 4.5.2.1).

4.3.2 Délivrance d'ARN double brin synthétique poly(I:C) à des cellules d'épithélium bronchique

Le poly(I:C) est un analogue d'ARN double brin viral de haut poids moléculaire (1,5-8 kb), capable de provoquer une réponse immunitaire antivirale de type IRF3/IFN- β dans le cytoplasme et une réponse inflammatoire de type IL-8 dans l'endosome.¹² Pour le traitement de maladies chroniques respiratoires, la stimulation IRF3/IFN- β est bénéfique pour traiter les exacerbations inflammatoires chroniques chez les patients atteints d'asthme ou de fibrose kystique tandis que la réponse inflammatoire IL-8 n'est pas souhaitée, afin de ne pas aggraver l'inflammation chronique du patient.¹³

Larry C. Lands et Nurlan Dauletbaev, des collaborateurs de l'université McGill, ont montré que la vectorisation liposomale de poly(I:C) permet de favoriser la réponse positive IRF3/IFN- β tout en minimisant la réponse néfaste IL-8.¹³ L'hypothèse avancée par les auteurs étant que le liposome permet l'échappement endosomal du poly(I:C), maximisant ainsi la stimulation cytoplasmique IRF3/IFN- β et minimisant ainsi la stimulation endosomale IL-8. *A contrario*, le poly(I:C) délivré nu s'accumule dans les endosomes et provoque une forte stimulation IL-8 néfaste (**Figure 4.5**).

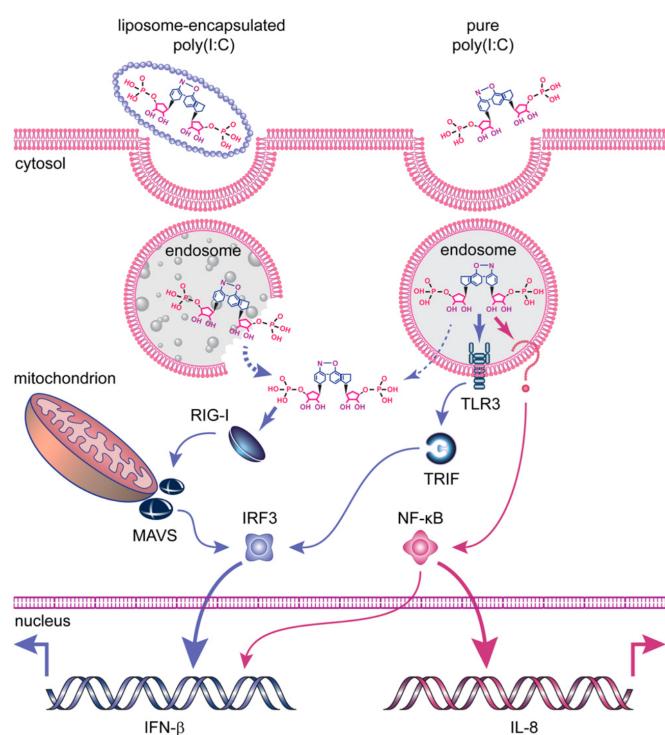


Figure 4.5 – Schéma présentant les différentes cascades de signalisation après stimulation de la cellule par du poly(I:C) nu ou encapsulé dans des liposomes.¹³ Le poly(I:C) nu s'accumule dans les endosomes et provoque

majoritairement la voie inflammatoire néfaste IL-8, par activation d'un récepteur endosomal inconnu activant la voie NF-κB/IL-8. Le poly(I:C) délivré avec un liposome doté de capacité d'échappement endosomal permet de favoriser l'activation de la voie cytoplasmique bénéfique IRF3/IFN-β.

Des essais préliminaires de délivrance de poly(I:C) *in vitro* ont été réalisés avec nos liposomes cationiques basés sur le lipide bascule pH-sensible CSL3 (CSL3/DSPC/cholestérol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:10:37,5:2,5 mol% - extrusion manuelle). Les essais de transfections de poly(I:C) ont été réalisés sur deux lignées cellulaires d'épithélium bronchique humain (16HBE14o- et CFBE41o-) et sur une lignée 16HBE14o- cultivée à l'interface eau/air (cellules différencierées, très difficile à transfacter). Le liposome cationique commercial LyoVec™ (Invivogen) est utilisé pour comparaison (**Figure 4.6**).

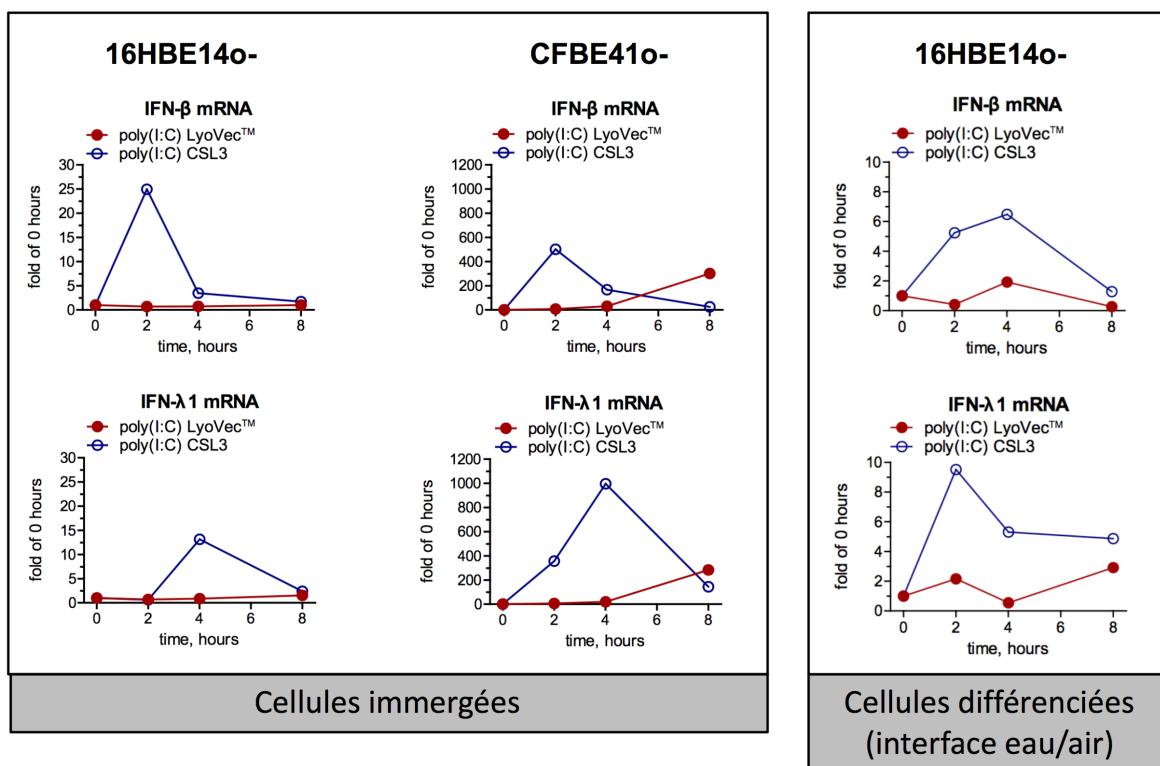


Figure 4.6 – Cinétique d'induction des gènes antiviraux IFN-β et IFN-λ suite à la délivrance de poly(I:C) avec les formulations liposomales CSL3 et LyoVec™. L'expression des gènes est suivie par qPCR.

La formulation CSL3 est capable d'induire une forte induction des gènes IFN-β et IFN-λ dans les lignées 16HBE14o- et CFBE41o- (respectivement ~20 fois et ~600-1000 fois par rapport au niveau basal). Dans la lignée différencierée cultivée à l'interface eau/air, l'induction de ces mêmes gènes est de l'ordre de ~6-10 fois. Le liposome commercial LyoVec™, en comparaison, est incapable de transfacter efficacement le poly(I:C) sur tous les types cellulaires, différencier ou non.

Ces résultats préliminaires démontrent que la délivrance d'un long oligonucléotide de type ARN est possible avec notre lipide cationique CSL3 (pré-requis pour la délivrance d'ARNm). Il est supposé que les bonnes capacités d'internalisation (**Figure 4.7**) et d'échappement endosomal conférées par notre liposome permettent de maximiser l'induction des gènes antiviraux (délivrance de poly(I:C) dans le cytoplasme). D'autres expériences sont en cours afin d'étudier l'échappement endosomal et les voies d'internalisations mises en jeu lors de la transfection de poly(I:C).

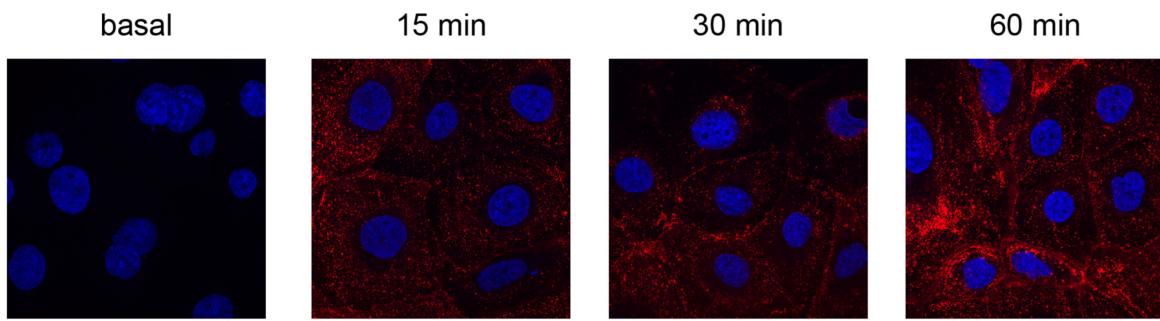


Figure 4.7 – Cinétique d'internalisation des liposomes CSL3/poly(I:C) marqués (0,5 mol% de DSPE-rhodamine B) sur la lignée CFBE41o- immergée. Bleu = Hoechst 33342. Rouge = liposomes marqués.

4.4 Discussion sur la mécanistique de la bascule pH-sensible

4.4.1 Discussion générale

Nous considérons que les lipides **2** et **CSL3** sont dotés d'un mécanisme de pH-sensibilité conféré par le changement de conformation de la molécule qui intervient à pH acide. Nous avons en effet observé que le lipide bascule **2** est capable de changer de conformation avec le pH (études RMN, 1^{ère} publication). Ensuite, nous avons vu que les liposomes incorporants **2** sont capables de relarguer leur contenu hydrophile (sulforhodamine B) à pH acide et que le lipide **CSL3** est capable de livrer des siRNA dans le cytoplasme cellulaire et que les lipides **2** et **CSL3** sont dotés de capacités fusogènes à pH acide (R18-mixing assay). Egalement, le retrait des deux fonctions méthoxy pour chacun de ces deux lipides bascules (lipides contrôles négatifs **4** et **CSL4**) provoque la perte du comportement pH-sensible (perte de la fuite de sulforhodamine, perte du comportement fusogène et perte de l'efficacité de transfection par séquestration endosomale). Tous ces résultats tendent à prouver notre hypothèse d'un changement de conformation du lipide bascule entraînant un relargage intracytoplasmique par échappement endosomal.

Trois mécanismes différents ont été proposés pour l'échappement endosomal des liposomes pH-sensibles : 1) la déstabilisation de la membrane endosomale *via* la formation de pores transitoires, 2) la déstabilisation du liposome lui-même et la diffusion de son contenu à travers la membrane endosomale, 3) la fusion entre la bicoche liposomale et la membrane endosomale, conduisant au relargage du contenu dans le cytosol.¹⁴ Nos résultats tendent à montrer que les lipides bascules sont capables de déstabiliser une bicoche lipidique (relargage de sulforhodamine B encapsulée) et de fusionner avec une vésicule lipidique vide (R18-mixing assay). Cela favoriserait l'hypothèse impliquant un contact avec la paroi endosomale (hypothèses 1 et 3 ci-dessus).

Plus étonnant encore, il semblerait que les liposomes pH-sensibles basés sur le lipide bascule **2** soient dotés de capacités de relargage de leur contenu et de fusion malgré l'incorporation dans la formulation de 5 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀. Une telle quantité de PEG dans une formulation liposomale cause en général une inhibition totale des capacités de fusion lors d'essais de « lipid-mixing » et cause une inhibition des capacités d'échappement endosomal.¹⁵⁻¹⁶ Ceci est expliqué par le fait que l'incorporation de PEG dans la formulation liposomale améliore considérablement la stabilité colloïdale et provoque habituellement une gêne stérique majeure empêchant l'interaction entre les membranes lipidiques du nanovecteur et de l'endosome.¹⁷

Il faut noter qu'à ce stade, il nous est impossible de conclure quant au mécanisme réel de déstabilisation et de fusion conféré par le changement conformationnel des lipides bascules. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées quant à la résultante qui intervient après changement de conformation des lipides bascules :

- Il peut se produire une rupture de phase (ou transition de phase hétérogène) entre les lipides bascules et les co-lipides (DSPC et/ou cholestérol) en surface de la bicoche lipidique du liposome.¹⁸ Il y aurait alors des zones très fortement chargées en lipides bascules et des zones très chargées en co-lipides, ceci créant un déséquilibre et une instabilité majeure, autorisant ainsi la déstabilisation globale du nanovecteur.
- Il est possible qu'il se produise l'ouverture de pores transitoires en surface du liposome suite au déclenchement des lipides bascules (autorisant ainsi la fuite de sulforhodamine B).¹⁹ Ce comportement serait alors analogue à celui de certains « Cell Penetrating Peptides » capables de former des pores hélicoïdaux transitoires.²⁰

- Il est possible que suite au déclenchement des lipides bascules, un certain pourcentage d'entre eux soit expulsé et transmis aux membranes lipidiques environnantes (membrane endosomale), autorisant ainsi la déstabilisation de cette nouvelle membrane (mécanisme de *flip-flop*, ou d'échanges de lipides). Le lipide bascule, une fois expulsé dans le milieu, jouerait le rôle de « surfactant déstabilisant ».²¹

Les deux méthodes de fabrication utilisées dans les études présentées (extrusion manuelle et mixage microfluidique) ainsi que le choix des co-lipides influent fortement sur la morphologie finale de la nanoparticule lipidique, et donc certainement sur la mécanistique du comportement pH-sensible, de la déstabilisation du nanovecteur et de l'échappement endosomal. Il y a fort à parier que les nanoparticules de la première publication (lipide bascule **2** avec DSPC en co-lipide) sont des liposomes unilamellaires à bicoche lipidique ordonnée. Dans la seconde étude (lipides bascules cationiques avec DSPC/cholestérol en co-lipides et interactions ioniques entre lipides cationiques et siRNA anioniques), les nanoparticules sont très certainement de type « solides pleines » lorsqu'elles sont formulées en microfluidique.²² Il est en revanche difficile de conclure quant à leur nature lorsque cette même formulation est fabriquée par extrusion manuelle. Des études de cryo-microscopie électronique sont en cours pour étudier et confirmer la morphologie des nanoparticules.

4.4.2 Etude du mécanisme pH-sensible

Plusieurs expériences pourraient être réalisées afin de mieux étudier et comprendre le mécanisme de pH-sensibilité qui intervient au niveau de la bicoche lipidique du nanovecteur suite au changement de conformation du lipide bascule. Dans un premier temps et par souci de simplicité, il faudrait réaliser ces essais sur des liposomes multilamellaires non extrudés avec seulement la DSPC en co-lipide. Il faudrait garder à l'esprit que les conclusions tirées sur ce modèle ne s'appliqueraient pas forcément aux nanoparticules lipidiques solides formulées en microfluidique et incorporant un fort pourcentage molaire de cholestérol.

4.4.2.1 Small Angle X-ray Scattering (SAXS)

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) permet d'observer des motifs structuraux des biomatériaux (compris entre 5 et 100 nm).²³ Les motifs répétés formés par l'alternance de bicoche phospholipidiques pourraient être observés à pH neutre et

possiblement modifiés ou annulés dès que le lipide bascule change de conformation et désorganise les motifs (pH acide). A titre d'illustration, la **Figure 4.8A** présente un profil SAXS classique de liposomes composés de 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (SOPs), où les 3 pics observés traduisent une organisation de phase lamellaire des lipides. De cette figure peut être extrait un profil de densité électronique (**Figure 4.8B**) qui permet d'analyser les distances entre chaque bicouche lipidique, la longueur de l'arrangement des chaînes alkyl et d'observer tout autre réarrangement majeur de phases lipidiques (passage en phases hexagonales par exemple). Il faudrait réaliser ce type d'acquisition sur nos liposomes pH-sensibles (lipide bascule 2/DSPC 50:50 mol% par exemple) à pH neutre et à pH acidifié. L'idée serait de voir l'impact du changement de conformation du lipide bascule 2 sur les profils SAXS (changement de phases, raccourcissement de la longueur de l'arrangement des chaînes alkyl, perte totale de signal...).

Des essais préliminaires ont été réalisés en collaboration avec l'université de Sherbrooke, sur des liposomes extrudés composés de 2/DSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (50:45:5 mol%). Aucun signal SAXS ne fut observé, même à pH neutre. Avec le recul, il aurait certainement fallu répéter ces expériences sur des liposomes non extrudés (l'acquisition d'un signal SAXS pour des liposomes extrudés requiert l'emploi d'un synchrotron comme source de rayons X)²⁴, sans présence de lipide-PEG dans la formulation et à des concentrations plus élevées pour se donner une meilleure chance d'acquérir un signal.

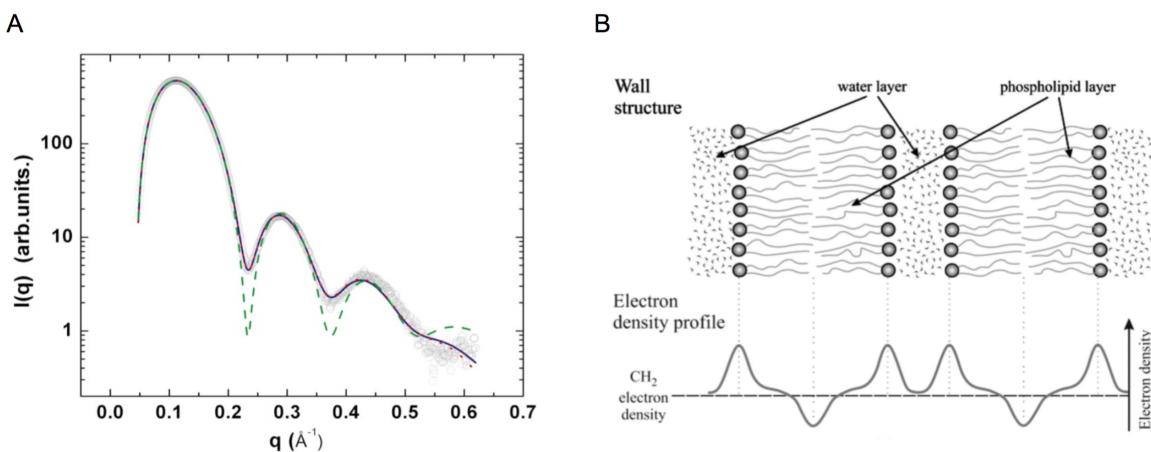


Figure 4.8 – (A) Profil SAXS à 3 pics caractéristique d'un arrangement liposomal en phases lamellaires (liposomes composés de 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine).²⁴ (B) Représentation schématique d'un profil de densité électronique de liposome.²³

4.4.2.2 RMN en milieu solide

La RMN à l'état solide permet d'étudier l'arrangement structurel des bicouches lipidiques (changements de phases lipidiques) et leur état (cristallin, gel, fluide). Il est possible de suivre les atomes de phosphore du co-lipide (DSPC) par RMN du ^{31}P .²⁵ Cette expérience donne des informations quand à l'arrangement des groupements polaires des têtes des phospholipides (**Figure 4.9**).

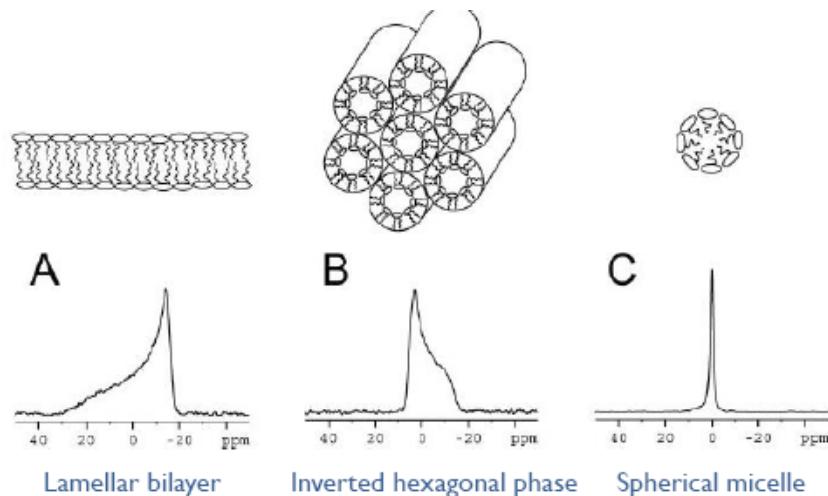


Figure 4.9 – Etude de l'organisation de phase des phospholipides par RMN du solide (^{31}P).

Il est également possible de formuler les liposomes avec un phospholipide commercial (DSPC) ayant des chaînes alkyl deutérées (^2H) et de faire de la RMN du deutérium (**Figure 4.10**). Cette expérience donne des informations quand à l'arrangement des chaînes alkyl hydrophobes des lipides (mouvement des chaînes alkyl, rigidité de la membrane, épaisseur de l'arrangement des chaînes alkyl).²⁶

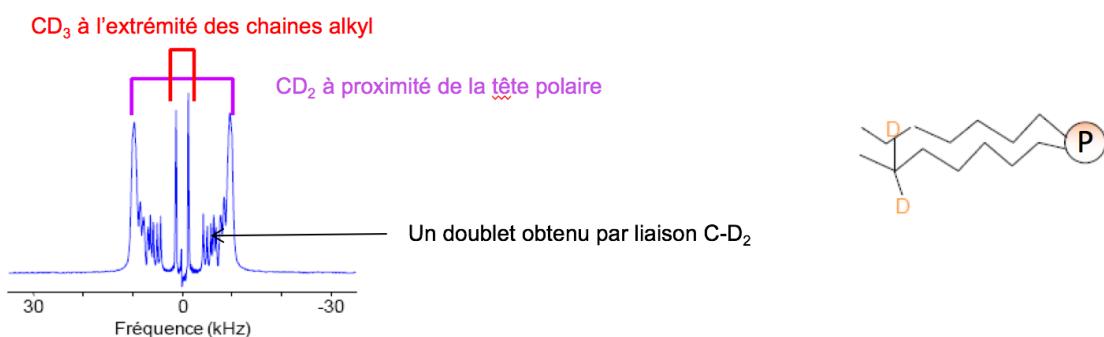


Figure 4.10 – Etude par RMN du solide du deutérium des chaînes alkyl d'un phospholipide deutéré formulé en liposomes multilamellaires.

Des essais préliminaires de RMN du ^{31}P ont été réalisés en collaboration avec le Pr. Isabelle Marcotte de l'Université du Québec à Montréal (UQAM). La formulation lipidique était composée de lipide bascule **2** et de DMPC (50:50 mol%), formulée à pH neutre puis acidifiée avec HCl pour obtenir un pH ~3-4 (**Figure 4.11**). A pH neutre (bleu) est observé l'empreinte classique d'un arrangement lipidique en bicouche lamellaires (voir **Figure 4.9A**). Après acidification (rouge), un pic autour de 0 ppm est observé, traduisant l'apparition de micelles dans le milieu (voir **Figure 4.9C**). Il semblerait que la présence de ces micelles soit due à la dégradation du lipide DMPC en milieu acide (estérification), puisque l'analyse similaire d'une formulation contrôle composée à 100% de DMPC présente également l'apparition du même pic de micelles à pH acide (données non montrées). Si l'on néglige ce pic à 0 ppm, aucune différence n'est observée dans les spectres ^{31}P entre pH neutre et pH acide.

Il faudrait réaliser des essais de RMN du deutérium avec le co-lipide DSPC deutéré (**Figure 4.10**) pour tenter d'observer le comportement des chaines alkyl (atomes ^2H de la DSPC) au lieu du ^{31}P afin de tenter de voir une différence entre les 2 valeurs de pH. Des essais préliminaires avaient été réalisés avec le lipide bascule non pH-sensible **1** (tête COOH) et DMPC deutérée (50:50 mol%). Une empreinte classique d'arrangement lamellaire avait été obtenue (**Figure 4.10**), mais aucune différence dans le spectre n'avait été détectée entre pH neutre et pH acide (données non montrées). Cette absence de différences est certainement due à l'emploi du lipide bascule **1** non pH-sensible (pas de changement de conformation avec l'abaissement du pH). Il faudrait ré-essayer cette manipulation avec le lipide bascule pH-sensible **2** et de la DSPC deutérée.

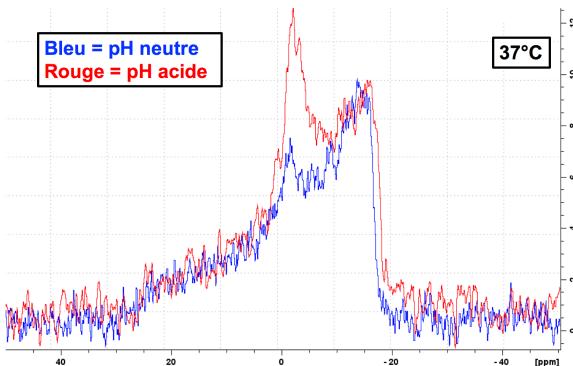


Figure 4.11 – Spectre RMN du solide (^{31}P) obtenu avec la formulation multilamellaire (non extrudée) lipide bascule **2**/DMPC (50:50 mol%).

Dans tous les cas, ces résultats préliminaires de RMN du solide ne semblent pour l'instant pas donner d'informations structurelles différentes entre pH neutre et pH acide (pas de changement de phase observée en RMN du ^{31}P). Il y aurait plus de chances d'observer des différences plus subtiles en RMN du deutérium, mais il faudrait refaire les expériences avec le lipide bascule **2**. Il faudra également prendre en compte l'éventuelle dégradation du phospholipide qui intervient à pH acide (apparition de micelles dans le milieu) dans les manipulations.

4.4.2.3 Microscopie électronique après cryofracture

Des études d'observation des liposomomes (extrudés ou non) pourraient être réalisées par microscopie électronique après cryofracture (congélation rapide, tranchage et fixation avec de l'or sous vide) dans l'espoir d'observer des changements morphologiques (craquelures, bourgeonnements ou agrégations des liposomes) ou des changements de phases lipidiques entre pH neutre et pH acide. Encore une fois, il faudrait commencer par étudier une formulation composée du lipide bascule **2** et de DSPC (50:50 mol%).

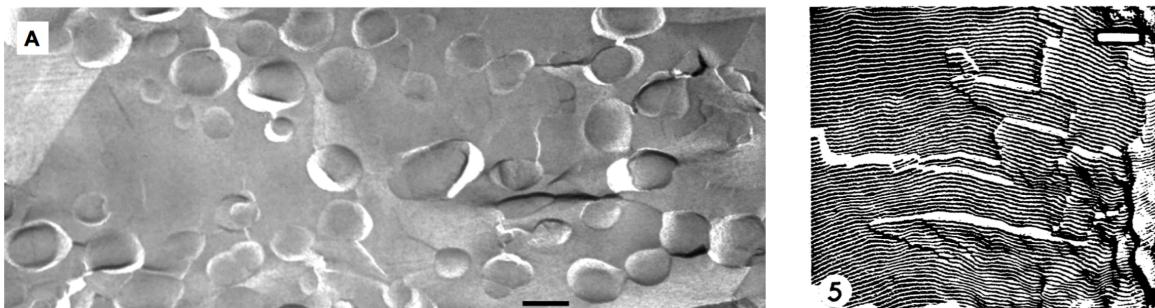


Figure 4.12 – Observation en microscopie électronique après cryofracture de liposomes extrudés (gauche)²⁷ et de liposomes multilamellaires (phase lipidique lamellaire) non extrudés (droite).²⁸

4.5 Perspectives futures

4.5.1 Délivrance de principes actifs anticancéreux hydrophiles avec le lipide bascule pH-sensible **2**

Une formulation liposomale pH-sensible composée de ~40 mol% de lipide bascule **2**, ~35 mol% de DSPC, 20 mol% de cholestérol et ~5 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ pourrait être utilisée pour des applications anticancer. Les principes actifs délivrés pourraient être hydrophiles (gemcitabine, doxorubicine, cisplatin, 5-fluorouracile, acide folinique – encapsulé dans le cœur aqueux du liposome) ou hydrophobes (paclitaxel, irinotécan,

méthotrexate – encapsulé dans la bicouche lipidique hydrophobe du liposome). Le mixage microfluidique serait la méthode utilisée pour formuler les nanoparticules, permettant ainsi d'atteindre des tailles de liposomes < 100 nm *via* un procédé simple et facile à mettre à l'échelle. Il est anticipé que de tels liposomes seraient dotés d'une durée de circulation longue (analogue à celle du Doxil®, soit > 48h), permettant une accumulation passive aux tissus tumoraux (effet EPR). Le potentiel pH-sensible des liposomes serait exploité pour favoriser l'échappement endosomal suite à l'internalisation cellulaire ainsi que pour relarguer la drogue spécifiquement dans l'environnement tumoral légèrement plus acide (pH ~6,5) que le pH sanguin.²⁹

A cause du caractère pH-sensible des liposomes incorporants le lipide bascule **2** (une exposition quelques minutes à pH ~5 étant suffisante pour relarguer une partie du contenu)³⁰, il n'est *a priori* pas possible dans notre cas d'utiliser une méthode active de *loading* comme un gradient transmembranaire de pH (citrate ou ammonium sulfate).³¹ Des essais de formulation préliminaires ont été réalisés par mixage microfluidique (formulation lipidique **2**/DSPC/cholestérol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 40:35:20:5) pour tenter d'encapsuler de façon passive le traceur hautement hydrophile sulforhodamine B. Les liposomes obtenus après purification sur colonne Sephadex™ G-50 (retrait de l'éthanol et de la sulforhodamine B non-encapsulée) ont une taille d'environ 85 nm, mais l'efficacité d'encapsulation était inférieure à 10 %, ne permettant pas d'atteindre une concentration finale en principe actif assez élevée pour une utilisation *in vivo*. En effet, la concentration finale en sulforhodamine B était d'environ 50-100 µg/mL, ce qui est trop peu pour injecter *in vivo* une dose de 5-7,5 mg/kg de principe actif pour une application anticancer (une concentration finale en principe actif de 500 µg/mL permet d'injecter une souris à 5 mg/kg avec un volume d'injection de 10µL/g).

Différentes stratégies pourraient être employées pour essayer d'encapsuler plus efficacement des composés hydrophiles dans la formulation (**Figure 4.13**). La première serait de jouer avec la solubilité de la drogue en fonction du pH. A titre d'exemple, il est possible de déprotomer et d'encapsuler efficacement la doxorubicine ou tout autre composé basique contenant une amine primaire en milieu alcalin (pH ~10).³² La cisplatine, à cause de sa faible solubilité aqueuse à 20°C, pourrait être encapsulée dans des proportions satisfaisantes pour une utilisation *in vivo* si elle est incorporée dans la phase organique lors

de la formulation par mixage microfluidique.³³ La seconde stratégie serait l’élaboration et l’encapsulation de prodrogues hydrophiles contenant une composante hydrophobe (chaine

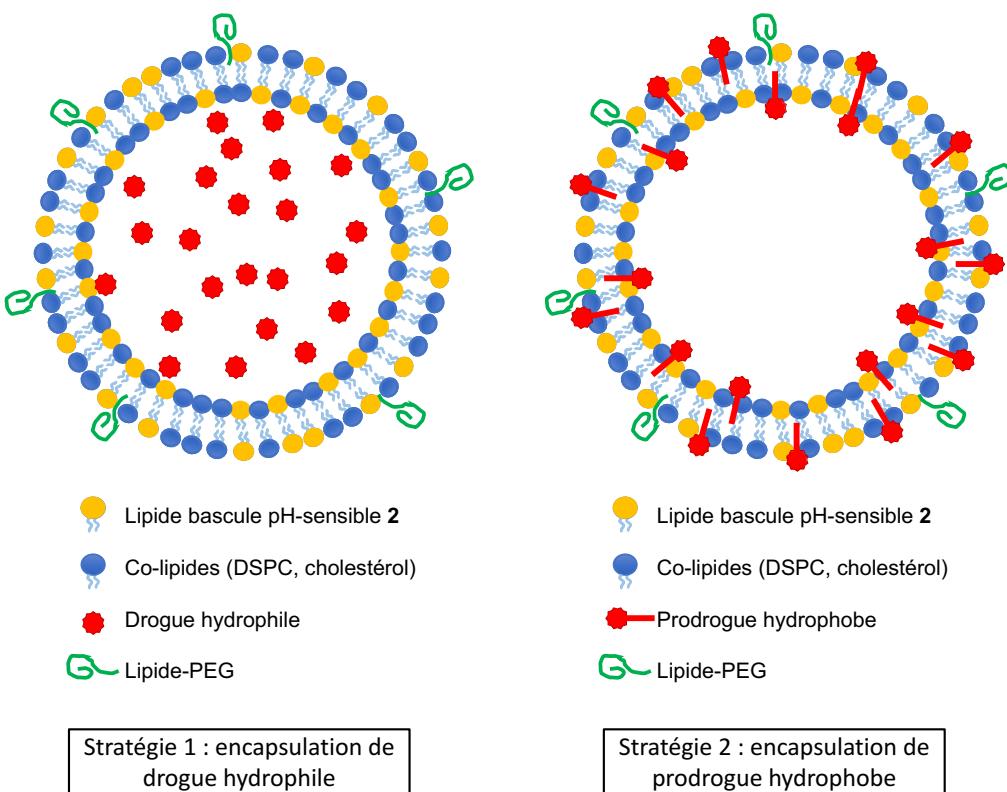


Figure 4.13 – Représentation schématique des deux stratégies envisagées pour délivrer des drogues anticancéreuses hydrophiles avec des nanoparticules lipidiques pH-sensibles basées sur le lipide bascule 2.

alkyl, cholestérol...) permettant une encapsulation efficace.³⁴ Plusieurs exemples sont présentés en **Figure 4.14**. Ces prodrogues seraient incorporées dans la phase organique avec les lipides lors de la formulation. Un ratio massique prodrogue/lipides de ~0,1-0,2 serait essayé en première intention. Egalement, il pourrait être envisagé d’encapsuler deux prodrogues synergiques dans la même formulation (par exemple cisplatine et gemcitabine, pour le cancer de la prostate ou du pancréas).³⁵

D’un point de vue formulation, il est possible de modifier la nature de la phase organique (éthanol, méthanol, DMSO, DMF, THF...), le ratio massique drogue/lipides et de jouer sur la composition lipidique (pourcentage molaire de lipide bascule 2 et de cholestérol) pour obtenir une efficacité d’encapsulation et une capacité de chargement satisfaisantes pour une utilisation *in vivo*.

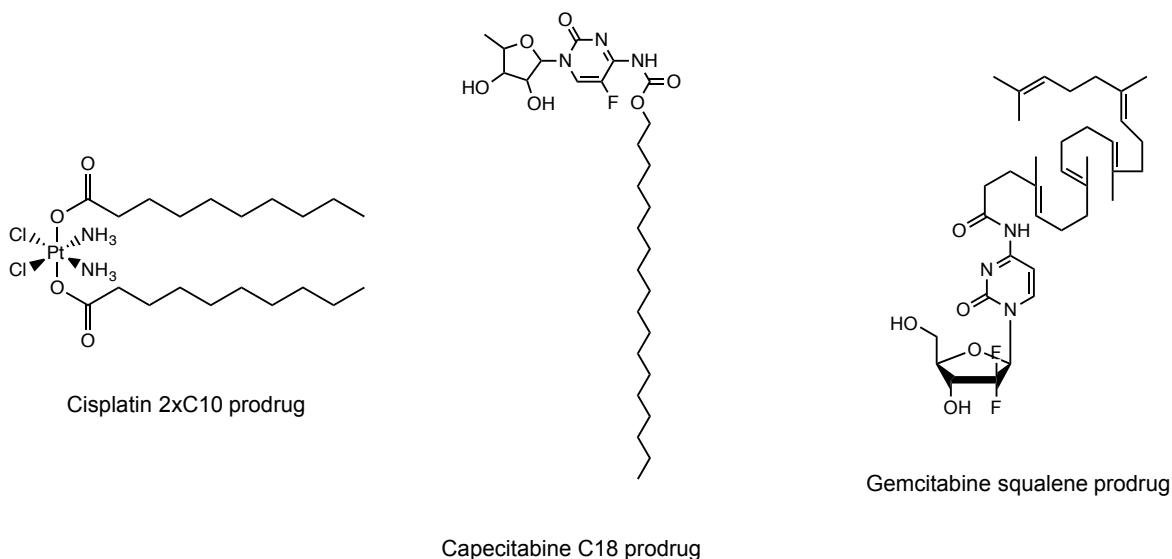


Figure 4.14 – Schéma présentant des prodrogues hydrophobes de composés hydrophiles (cisplatine³⁶, capecitabine³⁴, gemcitabine³⁷) dans le but d'améliorer leur efficacité d'encapsulation.

4.5.2 Vectorisation d'oligonucléotides thérapeutiques avec le lipide bascule pH-sensible CSL3

4.5.2.1 Délivrance de siRNA anti-survivin pour le traitement du cancer

Une formulation composée du lipide bascule cationique pH-sensible CSL3, de DSPC, de cholestérol et de DSPE-PEG₅₀₀₀ (50:10:35:5 mol% - formulé par mixage microfluidique) pourrait être utilisée pour délivrer un siRNA anti-survivin (protéine anti-apoptose pro-cancer) dans un modèle murin portant des xénogreffes MCF-7 orthotopiques de cancer du sein. Des essais de transfection préliminaires *in vitro* ont déjà été réalisés (voir **Figure 4.3**). L'un des défis majeurs serait d'obtenir un temps de circulation sanguine assez long ($t_{1/2} > 2$ h) pour avoir le temps de s'accumuler dans la tumeur. Dans cette optique, un fort pourcentage molaire de PEG de haute densité (5 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀) serait utilisé. Une étude d'imagerie de fluorescence *ex-vivo* (détection de siRNA-Cy5) sur souris porteuses de xénogreffe orthotopique MCF-7 est planifiée. En cas de détection d'un signal de fluorescence significatif (présence de siRNA-Cy5) dans la tumeur par rapport aux groupes contrôles négatifs siRNA nus et saline, une étude d'efficacité sera réalisée sur ce même modèle murin. Le suivi du diamètre de la tumeur après 4 injections tous les 2 jours de LNP/siRNA à la dose de 3 mg/kg pourra être réalisé, en co-traitement ou non avec un agent anticancéreux (doxorubicine, cisplatine).

4.5.2.2 Screening d'efficacité de vectorisation d'ARNm *in vitro* et *in vivo*

Une autre application de thérapie génique pour le lipide bascule **CSL3** serait la vectorisation *in vivo* d'ARNm. Il a été montré que l'efficacité de transfection d'ARNm *in vivo* est très dépendante de la structure du lipidoïde cationique utilisé³⁸, et particulièrement de la nature des chaînes lipidiques (longueur et insaturations).³⁹ Il faudrait certainement modifier la structure chimique de **CSL3** ou du lipide bascule **2** par une approche de chimie combinatoire pour espérer obtenir un nanovecteur ayant une efficacité de transfection d'ARNm optimale. Une vue d'ensemble d'une librairie de plusieurs lipides bascules cationiques en présentée en **Figure 4.15**. Une première étape serait de réaliser un *screening* *in vitro* d'efficacité de vectorisation d'ARNm codant pour la GFP sur cellules HeLa ou Huh7, en quantifiant l'efficacité de transfection par cytométrie en flux. Une seconde étape serait le *screening* *in vivo* de la vectorisation d'un ARNm codant pour l'érythropoïétine (EPO) humaine chez la souris, par injection de LNP/ARNm-EPO 0,75 mg/kg et quantification 6h post-injection de la concentration plasmatique d'EPO par ELISA.⁴⁰ Dans cette étude serait utilisée la formulation lipidique suivante : lipide bascule cationique/DOPE/cholestérol/DMG-PEG₂₀₀₀ (35:16:46,5:2,5).⁴⁰ Les nanoparticules seraient formulées par mixage microfluidique.

La formulation la plus efficace pourrait être utilisée pour la vectorisation au foie d'ARNm codant pour la protéine d'édition génomique Cas9 (pour cette application, une expression transitoire par délivrance d'ARNm est préférable par rapport à une expression plus « soutenue » par ADNp ou délivrance virale – voir **Tableau 1.5**).⁴¹

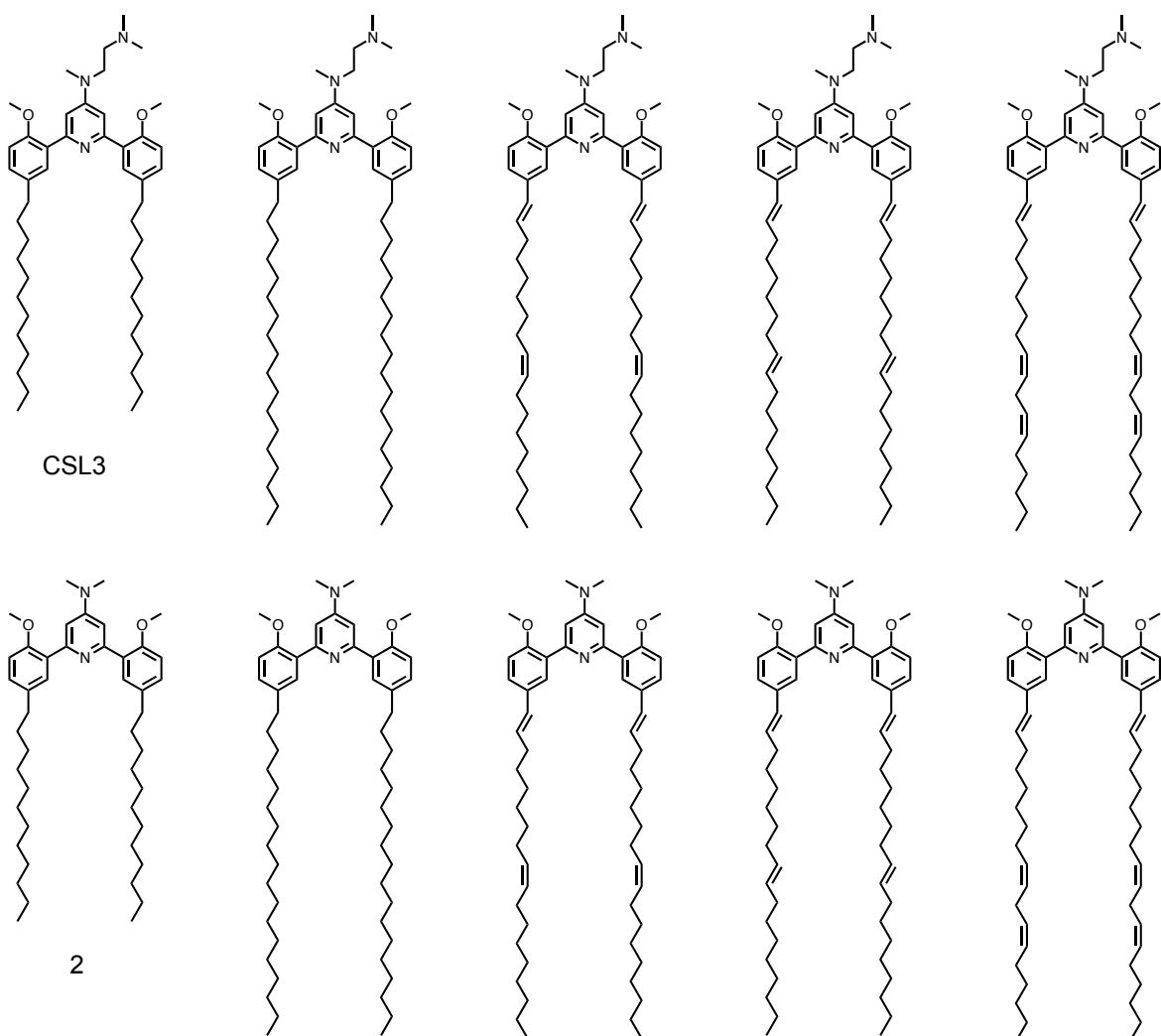


Figure 4.15 – Proposition d'une librairie de lipides bascules basés sur **CSL3** ou **2** pour réaliser un *screening in vivo* de vectorisation d'ARNm.

4.5.2.3 Vectorisation de miRNA pour le traitement du rétinoblastome

Le rétinoblastome est une tumeur maligne de la rétine qui touche majoritairement les jeunes enfants. Une stratégie novatrice pour traiter cette maladie serait la délivrance dans la tumeur oculaire de miRNA initialement sécrétés par les lymphocytes T, capables d'induire l'apoptose des cellules tumorales.⁴² Le nanovecteur lipidique basé sur le lipide bascule **CSL3** pourrait permettre la délivrance intracytoplasmique de miRNA après injection intravitrénienne. Des résultats préliminaires encourageants ont été obtenus avec le groupe de recherche du Pr. Pierre Hardy, du CHU Sainte-Justine de Montréal (**Figure 4.16**).

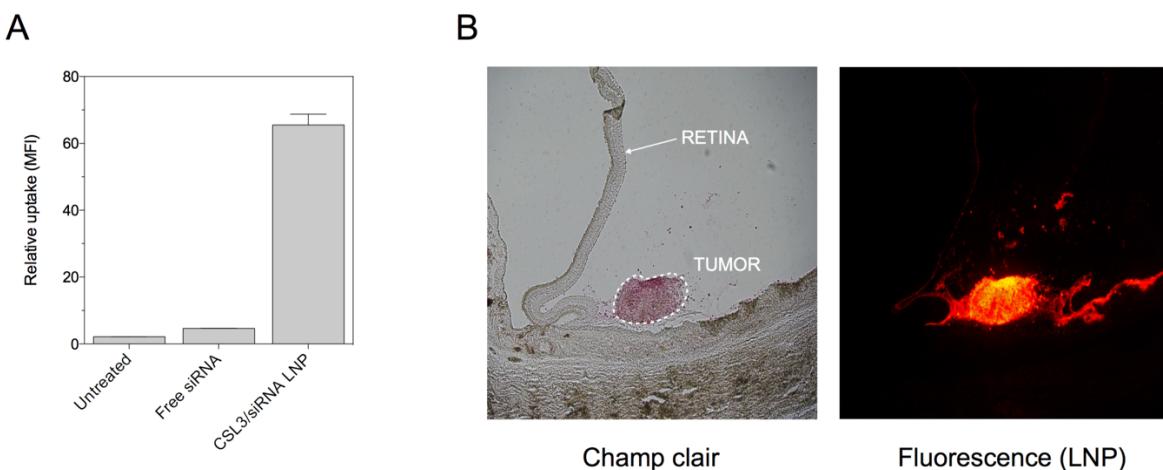


Figure 4.16 –(A) Internalisation de siRNA-Alexa488 délivré aux cellules de rétinoblastome humain Y79 avec la formulation **CSL3**/DSPC/cholestérol/DSPE-PEG₂₀₀₀ (50:10:37,5:2,5 mol%). La détection s'effectue par cytométrie en flux. (B) Détection de la présence de nanoparticules **CSL3** (marquées avec le fluorophore DilC₁₈) dans les tumeurs oculaires après injection intravitrénienne chez le lapin porteur d'un modèle de tumeur de rétinoblastome humain (cellules Y79).

Des essais d'internalisation *in vitro* ont montrés que les nanoparticules lipidiques **CSL3** étaient capables de livrer un siRNA-Alexa488 dans des cellules Y79 de rétinoblastome humain. Après injection intravitréenne de nanoparticules **CSL3** vides fluorescentes dans un modèle *in vivo* de lapin porteur de rétinoblastome, on observe une accumulation spécifique dans la tumeur. Aucune toxicité majeure n'a été détectée chez les lapins. De futurs essais d'efficacité de transfection de miRNA *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une étude d'efficacité *in vivo* pourront être faits.

4.6 Références

- (1) Love, K. T.; Mahon, K. P.; Levins, C. G.; Whitehead, K. A.; Querbes, W.; Dorkin, J. R.; Qin, J.; Cantley, W.; Qin, L. L.; Racie, T.; *et al.* Lipid-like Materials for Low-Dose, in Vivo Gene Silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 1864–1869.
- (2) Dong, Y.; Love, K. T.; Dorkin, J. R.; Sirirungruang, S.; Zhang, Y.; Chen, D.; Bogorad, R. L.; Yin, H.; Chen, Y.; Vegas, A. J.; *et al.* Lipopeptide Nanoparticles for Potent and Selective siRNA Delivery in Rodents and Nonhuman Primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 3955–3960.
- (3) Jayaraman, M.; Ansell, S. M.; Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Chen, J.; Du, X.; Butler, D.; Eltepu, L.; Matsuda, S.; Narayananair, J. K.; *et al.* Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8529–8533.
- (4) Sato, Y.; Hatakeyama, H.; Sakurai, Y.; Hyodo, M.; Akita, H.; Harashima, H. A pH-Sensitive Cationic Lipid Facilitates the Delivery of Liposomal siRNA and Gene Silencing Activity in Vitro and in Vivo. *J. Controlled Release* **2012**, *163*, 267–276.
- (5) Kaszás, N.; Budai, M.; Budai, L.; Gróf, P.; Zimmer, A.; Klebovich, I. Methods to increase the encapsulation efficiency for liposomal drugs. *Acta Pharm. Hung.* **2008**, *78*, 69–74.
- (6) Panwar, P.; Pandey, B.; Lakhera, P. C.; Singh, K. P. Preparation, Characterization, and in Vitro Release Study of Albendazole-Encapsulated Nanosize Liposomes. *Int. J. Nanomedicine* **2010**, *5*, 101–108.
- (7) Chen, S.; Tam, Y. Y. C.; Lin, P. J. C.; Sung, M. M. H.; Tam, Y. K.; Cullis, P. R. Influence of Particle Size on the in Vivo Potency of Lipid Nanoparticle Formulations of siRNA. *J. Controlled Release* **2016**, *235*, 236–244.
- (8) Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Jayaraman, M.; Ansell, S. M.; Du, X.; Tam, Y. Y. C.; Lin, P. J.; Chen, S.; Narayananair, J. K.; Rajeev, K. G.; *et al.* Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles. *Mol. Ther. — Nucleic Acids* **2013**, *2*, e139.

- (9) Sato, Y.; Note, Y.; Maeki, M.; Kaji, N.; Baba, Y.; Tokeshi, M.; Harashima, H. Elucidation of the Physicochemical Properties and Potency of siRNA-Loaded Small-Sized Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery. *J. Controlled Release* **2016**, *229*, 48–57.
- (10) Yamamoto, Y.; Lin, P. J. C.; Beraldi, E.; Zhang, F.; Kawai, Y.; Leong, J.; Katsumi, H.; Fazli, L.; Fraser, R.; Cullis, P. R.; *et al.* siRNA Lipid Nanoparticle Potently Silences Clusterin and Delays Progression When Combined with Androgen Receptor Cotargeting in Enzalutamide-Resistant Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**.
- (11) Carrasco, R. A.; Stamm, N. B.; Marcusson, E.; Sandusky, G.; Iversen, P.; Patel, B. K. R. Antisense Inhibition of Survivin Expression as a Cancer Therapeutic. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 221–232.
- (12) Alexopoulou, L.; Holt, A. C.; Medzhitov, R.; Flavell, R. A. Recognition of Double-Stranded RNA and Activation of NF-κB by Toll-like Receptor 3. *Nature* **2001**, *413*, 732–738.
- (13) Dauletbaev, N.; Cammisano, M.; Herscovitch, K.; Lands, L. C. Stimulation of the RIG-I/MAVS Pathway by Polyinosinic:Polycytidylic Acid Upregulates IFN-β in Airway Epithelial Cells with Minimal Costimulation of IL-8. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 2829–2841.
- (14) Drummond, D. C.; Zignani, M.; Leroux, J.-C. Current Status of pH-Sensitive Liposomes in Drug Delivery. *Prog. Lipid Res.* **2000**, *39*, 409–460.
- (15) Hatakeyama, H.; Akita, H.; Harashima, H. A Multifunctional Envelope Type Nano Device (MEND) for Gene Delivery to Tumours Based on the EPR Effect: A Strategy for Overcoming the PEG Dilemma. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 152–160.
- (16) Remaut, K.; Lucas, B.; Braeckmans, K.; Demeester, J.; De Smedt, S. C. Pegylation of Liposomes Favours the Endosomal Degradation of the Delivered Phosphodiester Oligonucleotides. *J. Controlled Release* **2007**, *117*, 256–266.
- (17) Hatakeyama, H.; Akita, H.; Harashima, H. The Polyethyleneglycol Dilemma: Advantage and Disadvantage of PEGylation of Liposomes for Systemic Genes and Nucleic Acids Delivery to Tumors. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 892–899.
- (18) Metso, A. J.; Zhao, H.; Tuunainen, I.; Kinnunen, P. K. J. Observation of the Main Phase Transition of Dinervonoylphosphocholine Giant Liposomes by Fluorescence Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2005**, *1713*, 83–91.

- (19) Li, W.; Nicol, F.; Szoka Jr., F. C. GALA: A Designed Synthetic pH-Responsive Amphipathic Peptide with Applications in Drug and Gene Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 967–985.
- (20) Wang, F.; Wang, Y.; Zhang, X.; Zhang, W.; Guo, S.; Jin, F. Recent Progress of Cell-Penetrating Peptides as New Carriers for Intracellular Cargo Delivery. *J. Controlled Release* **2014**, *174*, 126–136.
- (21) Lesieur, S.; Grabielle-Madelmont, C.; Ménager, C.; Cabuil, V.; Dadhi, D.; Pierrot, P.; Edwards, K. Evidence of Surfactant-Induced Formation of Transient Pores in Lipid Bilayers by Using Magnetic-Fluid-Loaded Liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5266–5267.
- (22) Leung, A. K. K.; Hafez, I. M.; Baoukina, S.; Belliveau, N. M.; Zhigaltsev, I. V.; Afshinmanesh, E.; Tielemans, D. P.; Hansen, C. L.; Hope, M. J.; Cullis, P. R. Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 18440–18450.
- (23) Nasedkin, A.; Davidsson, J.; Kumpugdee-Vollrath, M. Determination of Nanostructure of Liposomes Containing Two Model Drugs by X-Ray Scattering from a Synchrotron Source. *J. Synchrotron Radiat.* **2013**, *20*, 721–728.
- (24) Brzustowicz, M. R.; Brunger, A. T. X-Ray Scattering from Unilamellar Lipid Vesicles. *J. Appl. Crystallogr.* **2005**, *38*, 126–131.
- (25) Agrawal, P.; Kiihne, S.; Hollander, J.; Hofmann, M.; Langosch, D.; de Groot, H. A Solid-State NMR Study of Changes in Lipid Phase Induced by Membrane-Fusogenic LV-Peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2010**, *1798*, 202–209.
- (26) Brown, M. F.; Lope-Piedrafita, S.; Martinez, G. V.; Petrache, H. I. Solid-State Deuterium NMR Spectroscopy of Membranes. In *Modern Magnetic Resonance*; Webb, G. A., Ed.; Springer Netherlands, 2006; pp. 249–260.
- (27) Samoshina, N. M.; Liu, X.; Brazdova, B.; Franz, A. H.; Samoshin, V. V.; Guo, X. Fliposomes: pH-Sensitive Liposomes Containing a Trans-2-Morpholinocyclohexanol-Based Lipid That Performs a Conformational Flip and Triggers an Instant Cargo Release in Acidic Medium. *Pharmaceutics* **2011**, *3*, 379–405.

- (28) Hope, M. J.; Wong, K. F.; Cullis, P. R. Freeze-Fracture of Lipids and Model Membrane Systems. *J. Electron Microsc. Tech.* **1989**, *13*, 277–287.
- (29) Estrella, V.; Chen, T.; Lloyd, M.; Wojtkowiak, J.; Cornell, H. H.; Ibrahim-Hashim, A.; Bailey, K.; Balagurunathan, Y.; Rothberg, J. M.; Sloane, B. F.; *et al.* Acidity Generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1524–1535.
- (30) Viricel, W.; Mbarek, A.; Leblond, J. Switchable Lipids: Conformational Change for Fast pH-Triggered Cytoplasmic Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12743–12747.
- (31) Abraham, S. A.; Waterhouse, D. N.; Mayer, L. D.; Cullis, P. R.; Madden, T. D.; Bally, M. B. The Liposomal Formulation of Doxorubicin. In; Enzymology, B.-M. in, Ed.; Liposomes; Academic Press, 2005; Vol. 391, pp. 71–97.
- (32) Sanson, C.; Schatz, C.; Le Meins, J.-F.; Soum, A.; Thévenot, J.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. A Simple Method to Achieve High Doxorubicin Loading in Biodegradable Polymericosomes. *J. Controlled Release* **2010**, *147*, 428–435.
- (33) Tardi, P. G.; Dos Santos, N.; Harasym, T. O.; Johnstone, S. A.; Zisman, N.; Tsang, A. W.; Bermudes, D. G.; Mayer, L. D. Drug Ratio-Dependent Antitumor Activity of Irinotecan and Cisplatin Combinations in Vitro and in Vivo. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 2266–2275.
- (34) Mura, S.; Bui, D. T.; Couvreur, P.; Nicolas, J. Lipid Prodrug Nanocarriers in Cancer Therapy. *J. Controlled Release* **2015**, *208*, 25–41.
- (35) Heinemann, V.; Quietzsch, D.; Gieseler, F.; Gonnermann, M.; Schönekäs, H.; Rost, A.; Neuhaus, H.; Haag, C.; Clemens, M.; Heinrich, B.; *et al.* Randomized Phase III Trial of Gemcitabine Plus Cisplatin Compared With Gemcitabine Alone in Advanced Pancreatic Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 3946–3952.
- (36) Xu, X.; Xie, K.; Zhang, X.-Q.; Pridgen, E. M.; Park, G. Y.; Cui, D. S.; Shi, J.; Wu, J.; Kantoff, P. W.; Lippard, S. J.; *et al.* Enhancing Tumor Cell Response to Chemotherapy through Nanoparticle-Mediated Codelivery of siRNA and Cisplatin Prodrug. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 18638–18643.
- (37) Pili, B.; Reddy, L. H.; Bourgaux, C.; Lepêtré-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; Couvreur, P. Liposomal Squalenoyl-Gemcitabine: Formulation, Characterization and Anticancer Activity Evaluation. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1521–1526.

- (38) Li, B.; Luo, X.; Deng, B.; Wang, J.; McComb, D. W.; Shi, Y.; Gaensler, K. M. L.; Tan, X.; Dunn, A. L.; Kerlin, B. A.; *et al.* An Orthogonal Array Optimization of Lipid-like Nanoparticles for mRNA Delivery in Vivo. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 8099–8107.
- (39) Fenton, O. S.; Kauffman, K. J.; McClellan, R. L.; Appel, E. A.; Dorkin, J. R.; Tibbitt, M. W.; Heartlein, M. W.; DeRosa, F.; Langer, R.; Anderson, D. G. Bioinspired Alkenyl Amino Alcohol Ionizable Lipid Materials for Highly Potent In Vivo mRNA Delivery. *Adv. Mater.* **2016**, n/a – n/a.
- (40) Kauffman, K. J.; Dorkin, J. R.; Yang, J. H.; Heartlein, M. W.; DeRosa, F.; Mir, F. F.; Fenton, O. S.; Anderson, D. G. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 7300–7306.
- (41) Yin, H.; Song, C.-Q.; Dorkin, J. R.; Zhu, L. J.; Li, Y.; Wu, Q.; Park, A.; Yang, J.; Suresh, S.; Bizhanova, A.; *et al.* Therapeutic Genome Editing by Combined Viral and Non-Viral Delivery of CRISPR System Components in Vivo. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 328–333.
- (42) Montoya, V.; Fan, H.; Bryar, P. J.; Weinstein, J. L.; Mets, M. B.; Feng, G.; Martin, J.; Martin, A.; Jiang, H.; Laurie, N. A. Novel miRNA-31 and miRNA-200a-Mediated Regulation of Retinoblastoma Proliferation. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0138366.

Chapitre 5 : Conclusion

Dans cette thèse est reporté le développement de nouveaux nanovecteurs lipidiques pH-sensibles pour la vectorisation de principes actifs et de gènes. Ces formulations reposent sur l'utilisation de lipides bascules présentant un mécanisme novateur de pH-sensibilité, basé sur une bascule moléculaire capable de réaliser un changement conformationnel à pH acide. Il a été montré que de tels lipides peuvent être incorporés dans des nanoparticules lipidiques et sont capables de favoriser l'échappement endosomal du contenu thérapeutique hydrophile, contournant ainsi la barrière physiologique de la séquestration endosomale.

Le lipide bascule non-cationique **2** a été formulé dans une formulation liposomale destinée à la délivrance de principes actifs hydrophiles incapables de traverser les membranes cellulaires ou de s'échapper de l'endosome. Il a été montré que cette formulation permet la délivrance intracytoplasmique de sulforhodamine B, traceur hautement hydrophile, par un processus d'échappement endosomal. Cette première étude a permis d'introduire ce nouveau concept de pH-sensibilité et d'échappement endosomal entraînés par une bascule moléculaire.

Le lipide bascule cationique **CSL3** a été formulé dans des nanoparticules lipidiques pour la délivrance de siRNA, gènes hydrophiles sujets à la séquestration endosomale. Les études de transfection *in vitro* ont montré que cette formulation rivalise avec les réactifs commerciaux en termes d'efficacité et de cytotoxicité. Des études mécanistiques *in vitro* ont montré l'implication de la bascule moléculaire pH-sensible dans l'échappement endosomal et l'efficacité de transfection. Enfin, des études *in vivo* ont montré que cette formulation était capable de délivrer un siRNA au foie avec succès.

Les lipides bascules développés durant cette thèse pourraient avoir de nombreuses applications thérapeutiques, telles que la vectorisation de petites molécules thérapeutiques hydrophiles anticancéreuses (gemcitabine, doxorubicine, cisplatine, 5-fluorouracile...) ou de gènes thérapeutiques (siRNA, ARNm, édition génomique).

Annexe 1 : Article « Cationic Switchable Lipids: pH-Triggered Molecular Switch for siRNA Delivery », publié par le journal “Nanoscale” en Novembre 2016

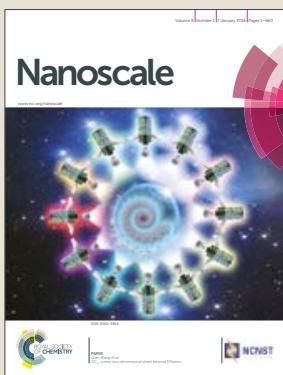
Cette annexe présente la version ASAP (As Soon As Publishable – Accepted Manuscript) publié en ligne le 21 novembre 2016 par Nanoscale. L’article dans sa mise en forme finale peut être consulté à l’url suivante : [dx.doi.org/10.1039/C6NR06701H](https://doi.org/10.1039/C6NR06701H).

Nanoscale

Accepted Manuscript

[View Article Online](#)
[View Journal](#)

This article can be cited before page numbers have been issued, to do this please use: W. Viricel, S. Poirier, A. Mbarek, R. M. Derbali, G. Mayer and J. Leblond-chain, *Nanoscale*, 2016, DOI: 10.1039/C6NR06701H.



This is an Accepted Manuscript, which has been through the Royal Society of Chemistry peer review process and has been accepted for publication.

Accepted Manuscripts are published online shortly after acceptance, before technical editing, formatting and proof reading. Using this free service, authors can make their results available to the community, in citable form, before we publish the edited article. We will replace this Accepted Manuscript with the edited and formatted Advance Article as soon as it is available.

You can find more information about Accepted Manuscripts in the [author guidelines](#).

Please note that technical editing may introduce minor changes to the text and/or graphics, which may alter content. The journal's standard [Terms & Conditions](#) and the ethical guidelines, outlined in our [author and reviewer resource centre](#), still apply. In no event shall the Royal Society of Chemistry be held responsible for any errors or omissions in this Accepted Manuscript or any consequences arising from the use of any information it contains.

Page 1 of 6

Please do not adjust margins



Journal Name

COMMUNICATION

Cationic Switchable Lipids: pH-Triggered Molecular Switch for siRNA Delivery

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

[www.rsc.org/](#)

A pH-sensitive molecular switch able to change its conformation upon protonation at endosomal pH values is embedded into the structure of cationic lipidoid materials, thus conferring endosomal escape properties. Involvement of the conformational switch in the endosomal escape process was confirmed and leading material identified was able to induce efficient gene knockdown both *in vitro* and *in vivo*. The lipid nanoparticles reported here are promising for therapeutic applications and this work could serve as a template for future design of stimulus-responsive (ionic, redox, light) molecular switch for drug and gene delivery.

RNAi technology has demonstrated strong potential for therapeutics and is currently showing impressive clinical progress.^{1,2} Silencing gene expression may be used to treat numerous diseases such as cancer,^{3–5} hereditary disorders⁶ and infectious diseases.⁷ However, the strong hydrophilicity and anionic charge density of siRNA prevent their passive diffusion across cell membranes. Systemic administration of siRNA therefore requires the use of carriers able to encapsulate, protect and deliver the therapeutic cargo into the cytoplasm of target cells. Despite the many efforts made to tailor nanocarriers in order to overcome biological barriers, endosomal entrapment remains a major impediment to the *in vivo* therapeutic efficacy of the delivery platforms developed in the last decade.⁸

One of the most clinically advanced delivery vehicles for siRNA therapeutics are lipid nanoparticles (LNP).¹ These siRNA delivery materials are principally composed of cationic lipids or "lipidoids", identified through combinatorial synthesis and high throughput screening.^{9–11} Structure-activity analysis of these libraries suggests that using one or more tertiary amines as ionizable headgroups is essential to promoting endosomal escape and mediating meaningful gene silencing.¹² At

endosomal pH values, ionization of the tertiary amine alters the hydrodynamic radius of the lipid headgroup and induces an inverted non-bilayer structure, which is hypothesized to be responsible for destabilizing the endosomal membrane.¹³ Nevertheless, recent quantitative studies using siRNA/LNP have shown that only ~1–2% of siRNA is successfully delivered to the cytoplasm due to endosomal entrapment or recycling to the extracellular space.^{14,15} This observation highlights that endosomal sequestration is still a major barrier to gene delivery and suggests that developing lipid materials equipped with an efficient endosomal escape mechanism remains highly relevant.

We recently reported the use of pH-dependent switchable lipids for drug delivery.¹⁶ When incorporated into liposomes, the switchable lipids triggered a fast and effective intracytoplasmic delivery of a hydrophilic cell-impermeable compound, *via* an endosomal escape process. Upon protonation of the central pyridine, the conformation of the lipid switches to favor intramolecular hydrogen-bonding, which changes the relative orientation of the hydrocarbon chains of the molecule, disturbing the lipid packing of the nanoparticle and prompting the release of its therapeutic cargo (Fig. 1A). This pH-sensitive mechanism triggered complete drug release in less than 15 min and was not impacted by polyethylene-glycol coating. As such, these materials show great potential for gene delivery. Therefore, we decided to develop an siRNA/LNP delivery platform based on such a pH-triggered conformational switch.

The switchable lipid structure was used as a starting point for the design of cationic switchable lipids (CSL). The tricyclic pH-sensitive unit was maintained while various cationic headgroups on the 4' position of the central pyridine ring were introduced (Fig. 1B). *In silico* predictions of $pK_{a_{pyr}}$ were used to select the headgroup structure since it previously appeared as a major determinant of *in vitro* behaviour.¹⁶ Among the molecules synthesized in this study, only 4-dialkylaminopyridine derived-CSL presented an *in silico* $pK_{a_{pyr}}$ value close to the endosomal pH value (~5–6), which is required to trigger the desired conformational switch within

^a Faculty of Pharmacy, University of Montreal,
P.O. Box 6128, Downtown Station, Montreal, QC, Canada
E-mail: jeanne.leblond-chain@umontreal.ca
^b Laboratory of Molecular Cell Biology, Montreal Heart Institute,
Montreal, H3T 1C8, QC, Canada
Electronic Supplementary Information (ESI) available: experimental details and additional figures. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

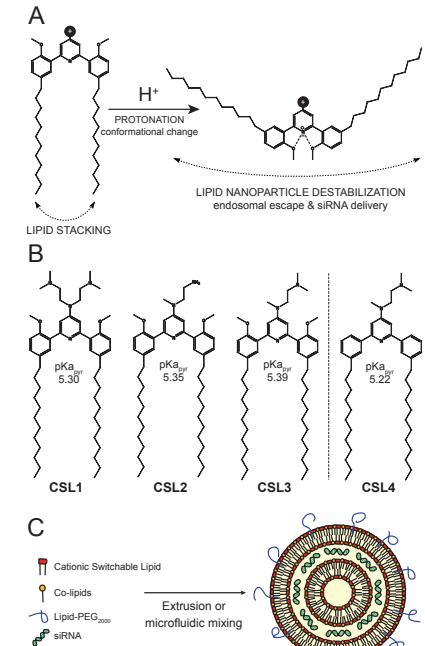


Fig. 1 (A) Protonation-induced conformational change of the pH-sensitive cationic switchable lipids. (B) Overview of the chemical structures of the cationic switchable lipids. CSL4 is a negative control lipid, non-methoxylated counterpart of CSL3, unable to change its conformation upon protonation. (C) Hypothetical schematic representation of lipid nanoparticle/siRNA.

the endosomes.

Four different CSL were synthesized (Fig. S1-S3), all containing two alkyl chains of 12 carbons (Fig 1B). Lipid chain lengths of 10 to 13 carbons has been reported as an advantageous specification for efficient siRNA delivery *in vivo*.^{17,18} We have already demonstrated that this chain length is compatible with the pH-triggered conformational change of the switchable lipids and effectively promotes liposome bilayer destabilization.¹⁶ Three different cationic headgroups were incorporated on the CSL: double-dimethylamine headgroup (CSL1), mono primary amine headgroup (CSL2) or mono dimethylamine headgroup (CSL3). CSL4 is the non-switchable counterpart of CSL3, used as a negative control lipid. The removal of the two methoxy moieties prevents intramolecular hydrogen bonding with the protonated pyridine, thus preventing conformational switch and LNP destabilization (Fig. S4). When relevant, CSL3-based LNP was compared to the

negative control CSL4-based LNP in order to confirm the involvement of the pH-sensitive conformational switch. LNP incorporating either one of the four CSL materials were formulated with DSPC, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ as co-lipids (respectively 50:10:37.5:2.5 mol%). A hypothetical representation of a LNP is presented in Fig. 1C. At a nitrogen/phosphate molar ratio of 4 which was used for all experiments, manual extrusion yielded LNP exhibiting a hydrodynamic diameter ~150 nm (Fig. S5A and S5B). The siRNA encapsulation efficiency was determined to be 85-95% for all CSL, using a SYBR® Gold fluorescence assay (Fig. S5D).

The siRNA transfection efficiency of CSL was evaluated *in vitro* in a HeLa/GFP model, using Lipofectamine® RNAimax as a positive control (Fig. 2A and Fig. S6). Mono-substituted CSL2 and CSL3-based nanoparticles showed remarkable dose-responding knockdown efficiencies, whereas di-substituted CSL1 was unable to mediate siRNA delivery. One may hypothesize that the two dimethylamine cationic groups of CSL1 impair the conformational switch. Either steric hindrance or intramolecular hydrogen bonds between dimethylamine groups and methoxy moieties might stabilize the lipid stacking conformation and prevent the rotation of the two lipid arms of CSL1. In addition, it has been reported that too many or too strong (e.g. quaternary amines) cationic headgroups can significantly impede the cytosolic release of the siRNA payload from the cationic lipid.¹⁹⁻²¹ Interestingly, the negative control CSL4 did not show any significant transfection efficiency, suggesting that the knockdown observed with CSL2 and CSL3 could be attributed to the pH-sensitive conformational switch. No significant cytotoxicity was detected for all the CSL materials at the conditions evaluated, using a resazurin-based cell viability assay (Fig. 2A).

Time course delivery of intracytoplasmic Alexa647-siRNA delivery was assayed by live-cell fluorescence microscopy on HeLa cells, using the top performing material CSL3 (Fig. 2B). After only 1 hour, diffuse fluorescence was obvious, confirming the escape of the siRNA payload from the endocytic pathway.

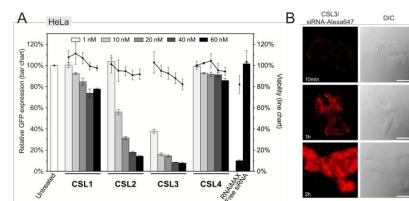


Fig. 2 (A) *In vitro* knockdown of GFP and viability assays on HeLa cells with formulated LNP. HeLa stably expressing GFP were treated with GFP targeting siRNA formulated LNP (CSL, DSPC, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀) at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5 respectively. RNAimax (Lipofectamine RNAimax reagent - 60 nM), free siRNA (60 nM) and untreated cells were used as control experiments. Gene knockdown was assayed by flow cytometry after 72h incubation (n = 3). (B) Live-cell fluorescence imaging of HeLa cells following 10min, 1h or 2h incubation of CSL3/siRNA-Alexa647 LNP. The concentration of labelled siRNA is 50 nM. Scale bar = 20 μm.

At the two-hour time point, the entire cytoplasms were stained with intense diffuse fluorescence. Unsurprisingly, no internalization of naked Alexa647-siRNA was observed after a two-hour incubation in the same conditions (Fig. S7). These results confirmed the efficient uptake and fast cytoplasmic delivery of siRNA encapsulated within the CSL3-based LNP, a prerequisite for mediating potent siRNA delivery.^{22,23}

To further confirm the importance of the CSL conformational change in the endosomal escape process, we compared the cellular trafficking of CSL3 and CSL4-based LNP encapsulating Alexa647-siRNA. After 16 hours of incubation, live-cell fluorescent microscopy revealed that the CSL4 negative control formulation was mainly entrapped within the endosomes (punctate fluorescence – Fig. 3A). Disruption of the endosomal compartments by addition of chloroquine, a potent endosomolytic agent,^{24,25} yielded diffuse cytoplasmic fluorescence. This confirmed that endosomal entrapment was the limiting barrier to siRNA cytoplasmic delivery for CSL4-based formulation (Fig. 3B). Comparatively, the CSL3-based formulation was able to mediate endosomal escape and intracytoplasmic delivery of Alexa647-siRNA (diffuse fluorescence through the entire cells – Fig. 3C). During this assay, nearly identical cellular uptake profiles were observed for the two formulations, as assayed by flow cytometry (Fig. 3D). This suggests that the superior transfection efficiency observed with CSL3 is due to improved endosomal escape following its pH-induced conformational switch (Fig. 2A).

Endosomal escape of nanocarriers has been suggested to occur through either fusion, active transport, disruption or lysis of the endosomes.¹⁵ We conducted lipid-mixing assays with octadecyl rhodamine B (R18) labelled LNP and model unlabeled phospholipid vesicles (Fig. 3E).^{16,26} R18 dequenching,

which is indicative of lipid mixing and thus fusogenic ability, occurred within minutes under acidic conditions with CSL3-based LNP. In contrast, CSL4-based LNP did not mediate major fusogenic activities at acidic pH. No significant dequenching was observed for either formulation at neutral pH. This confirmed that fusion ability is involved in the endosomal escape mechanism of CSL3, as previously reported for other switchable lipids.¹⁶

The pH of endosomes and lysosomes is controlled by acidification *via* vacuolar ATPases. These membrane-bound proton pumps can be inhibited using Bafilomycin A1 (Baf A1), thus blocking endosome acidification.²⁵ We therefore hypothesized that Baf A1 could hinder the mechanism of CSL3-based LNP.²⁷ Compared to control cells transfected without Baf A1, Baf A1-treated cells showed a complete loss of GFP knockdown (Fig. 4A). Here again, we checked that Baf A1 did not significantly impact CSL3/siRNA cellular uptake (Fig. 4B). Therefore, we confirmed that the CSL3-based formulation requires the acidification of the endosomes to trigger its conformational switch and endosomal escape, thus ensuring its transfection efficiency.

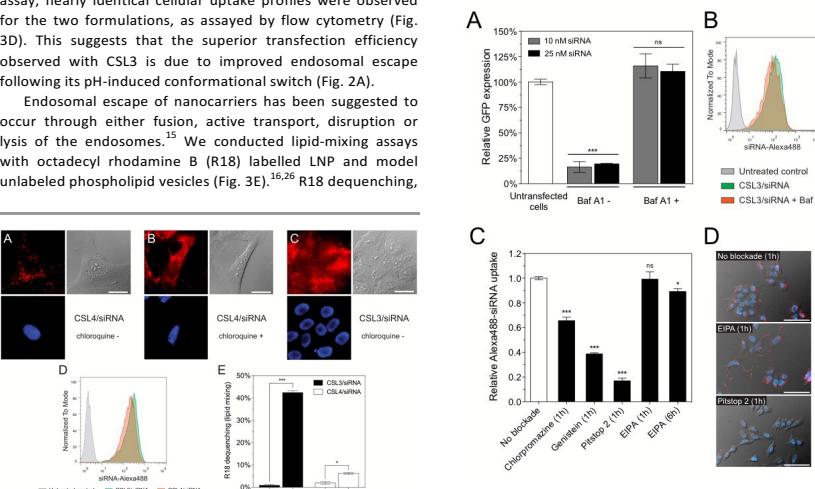


Fig. 4 (A) *In vitro* knockdown experiments on HeLa/GFP cells using CSL3/siRNA LNP, in the presence or absence of Baf A1 (600 nM). Cells were incubated for 4h with the LNP. Knockdown was assayed after a 48h incubation period (n = 3). (B) Flow cytometry uptake profiles after a 4h incubation period of the cells with the CSL3/siRNA-Alexa488 LNP in the presence or absence of Baf A1 (n = 3). (C) Alexa648 fluorescence uptake (flow cytometry) in HeLa cells following CSL3/siRNA-Alexa488 treatment in the presence of small molecules inhibiting clathrin (Chlorpromazine – 10 μg/ml), caveolae (Genistein – 20 μM), clathrin/caveolae (Pitstop 2 – 20 μM) or macropinocytosis (EIPA – 50 μM) endocytic pathways. (D) Representative images of cells treated 1 hour with CSL3/siRNA-Alexa647 LNP without inhibitor, with EIPA or with Pitstop 2. Scale bar = 40 μm. Statistical analysis performed with two-tailed Student's t-test: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Several cellular entry pathways can result in endocytic confinement of siRNA, such as clathrin, caveolae or macropinocytosis.¹⁵ In order to better understand the cellular entry of the LNP, flow cytometry uptake assays of CSL3/siRNA-Alexa488 were performed on HeLa cells, in the presence of chemical inhibitors of endocytosis (Fig. 4C). Without inhibition, an efficient and homogenous siRNA delivery was observed (Fig. S8). However, strong uptake inhibition was observed in the presence of clathrin and caveolae inhibitors. It was previously reported that the main uptake mechanism of LNP/siRNA in HeLa cells and hepatocytes is the clathrin-induced macropinocytosis, starting after 2 hours of incubation. This macropinocytosis allows the bulk of the LNP into the cells and is mainly responsible for the gene silencing activity.^{9,28} In our case, the macropinocytosis pathway (blocked using ethylisopropylamiloride – EIPA) did not seem significantly involved in LNP entry, despite a 6-hour incubation period. It appears that CSL3-based LNP were actively endocytosed via the clathrin and/or caveolae pathways. These findings were also confirmed by live-cell fluorescence microscopy (Fig. 4D).

CSL3 and CSL4 LNP/siRNA were then assessed for their *in vivo* potential to systematically deliver a siRNA targeting the liver-secreted coagulation factor VII.¹⁷ LNP were prepared using microfluidic mixing since this technique leads to optimized LNP and is an easily scalable process.^{29,30} The use of a microfluidic mixing device for LNP/siRNA assembly allowed us to reach the critical size needed to achieve efficient delivery to the hepatocytes *via* the 100–150 nm-sized endothelial fenestrae of the mouse liver.^{31,32} The C18-anchored DSPE-PEG₂₀₀₀ lipid was also replaced with shorter C14-anchored DMG-PEG₂₀₀₀, as it has been reported that a shorter aliphatic anchor in the PEG-lipid yields greater hepatic gene silencing.³³

***p<0.001.

As presented in Fig. 5A, the hydrodynamic diameter of the LNP was around 70–90 nm as measured by dynamic light scattering and siRNA encapsulation efficiencies measured with a Ribogreen® fluorescent assay were 93%, which is similar to LNP obtained by manual extrusion (Fig. SSD). LNP size remained stable for more than one week in PBS, ensuring colloidal stability before injection (Fig. S9). CSL3-based LNP made by microfluidic mixing showed efficient dose-responding siRNA delivery in the HeLa/GFP model and still outperformed the negative control CSL4-based LNP (Fig. 5B). These results demonstrate that the pH-triggered mechanism of CSL3 is not altered either by the formulation technique or by the nature of the lipid-PEG. The gene silencing efficacy of the CSL3-based LNP was also confirmed in a hepatocyte cell line (Huh-7), targeting the therapeutic target PCSK9 protein.³⁴ Total knockdown of PCSK9 and pro-PCSK9 proteins, as well as subsequent loss of PCSK9-induced LDLR degradation,³⁵ demonstrate the efficient transfection ability of CSL3-based LNP with a siRNA dose as low as 10 nM (Fig. 5C).

In vivo Factor VII silencing efficiency of the CSL3-based formulations was compared to that of the CSL4-based formulation (Fig. 5E). CSL3-based LNP were found to demonstrate a dose-response knockdown, resulting in significant silencing efficacy (~50% silencing) at 1 mg/kg. At the same dose, negative control CSL4-based LNP were unable to mediate any silencing activity. These results confirm the crucial role of the pH-sensitive conformational change of CSL3 in the *in vivo* transfection efficacy, in agreement with the *in vitro* results. The *in vivo* silencing efficacy of the CSL3 LNP may be further improved by lowering the molar percentage of DMG-PEG₂₀₀₀ in the formulation^{11,33} or by using combinatorial approaches to enhance the potency of the CSL3 lipid structure

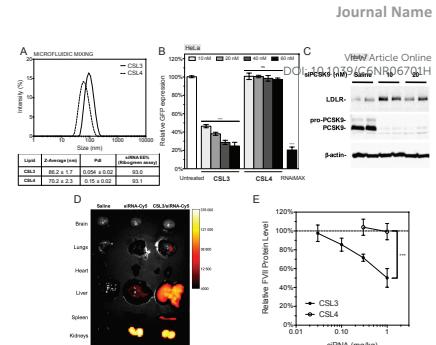


Fig. 5 (A) Particle size distribution and siRNA encapsulation efficiencies of CSL3 and CSL4-based LNP (CSL, DSPC, cholesterol and DMG-PEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5 respectively) prepared by microfluidic mixing. (B) *In vitro* GFP knockdown in HeLa/GFP cell with the CSL3 and CSL4-based LNP. RNAimax (Lipofectamine RNAimax reagent – 60 nM) and untreated cells were used as control experiments. Gene knockdown was assayed by flow cytometry after a 48h incubation period ($n = 3$). (C) *In vitro* PCSK9 knockdown on human hepatocyte cell line (Huh-7) with the CSL3-based LNP. Knockdown of PCSK9 and LDLR levels were assayed 72h post-transfection by Western-blotting ($n = 3$). (D) Biodistribution of CSL3-based LNP formulated with siRNA-Cy5 (1.5 mg/kg). Organs were harvested 4 hours post-injection and *ex vivo* imaged ($n = 3$). (E) *In vivo* silencing of liver Factor VII with the CSL3 and CSL4 formulations. Female C57BL/6 mice were intravenously injected with formulations and the percent reduction on Factor VII levels in serum was quantified 48h post-injection ($n = 4$). Statistical analysis performed with two-tailed Student's t-test: ns. p>0.05; ***p<0.001.

accumulate mainly in the kidneys, suggesting rapid renal clearance. On the other hand, a significant accumulation of siRNA was observed in the liver with the CSL3 nanoparticles. Although this tropism was attributed to the LNP formulation, the fluorescence in the kidneys remained high and suggested free circulating siRNA. This could be attributed either to residual siRNA in the formulation or to partial instability of LNP upon intravenous injection, as suggested by a serum stability study (Fig. S9). Although the important liver accumulation of siRNA is a prerequisite for hepatocyte gene knockdown, it is not sufficient by itself, as it was shown that some LNP can accumulate in the liver without mediating hepatocyte gene silencing.^{20,36}

In vivo Factor VII silencing efficiency of the CSL3-based formulations was compared to that of the CSL4-based formulation (Fig. 5E). CSL3-based LNP were found to demonstrate a dose-response knockdown, resulting in significant silencing efficacy (~50% silencing) at 1 mg/kg. At the same dose, negative control CSL4-based LNP were unable to mediate any silencing activity. These results confirm the crucial role of the pH-sensitive conformational change of CSL3 in the *in vivo* transfection efficacy, in agreement with the *in vitro* results. The *in vivo* silencing efficacy of the CSL3 LNP may be further improved by lowering the molar percentage of DMG-PEG₂₀₀₀ in the formulation^{11,33} or by using combinatorial approaches to enhance the potency of the CSL3 lipid structure

as well as the blood stability of the LNP (currently under investigation).

Conclusions

In summary, we report the synthesis, *in vitro* and *in vivo* efficacy, and properties of cationic switchable lipids. This proof of concept study shows that this new class of lipid materials based on a pH-triggered conformational switch is suitable for efficient siRNA delivery. Altogether, our results demonstrate that the pH-sensitive conformational switch plays a key role in the properties of CSL3-based materials, owing to its ability to promote endosomal escape. We believe that stimulus-responsive (ionic, redox, light)³⁷ molecular switches have unique properties that may lead to significant innovations in the design of lipidoid materials in the field of gene and drug delivery. In future studies, we plan to evaluate these siRNA delivery materials in a murine metastatic breast cancer model.

Acknowledgements

The National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) is acknowledged for financial support. We thank Prof. Xavier Banqué (University of Montreal) for the use of his Nanoassembler™ microfluidic mixing device.

Notes and references

- G. Ozcan, B. Ozpolat, R. L. Coleman, A. K. Sood and G. Lopez-Berestein, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2015, **87**, 108–119.
- J. E. Zuckerman and M. E. Davis, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2015, **14**, 843–856.
- K. Zhou, L. H. Nguyen, J. B. Miller, Y. Yan, P. Kos, H. Xiong, L. Li, J. Hao, J. T. Minnig, H. Zhu and D. J. Siegwart, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, **113**, 520–525.
- C. Qiu, W. Wei, J. Sun, H.-T. Zhang, J.-S. Ding, J.-C. Wang and Q. Zhang, *Nanoscale*, 2016, **8**, 13033–13044.
- X. Xu, J. Wu, Y. Liu, M. Yu, L. Zhao, X. Zhu, S. Basbin, Q. Li, E. Ha, J. Shi and O. C. Farokhzad, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, **55**, 7091–7094.
- S. Crunkhorn, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2013, **12**, 818–818.
- E. P. Thi, C. E. Mire, A. C. H. Lee, J. B. Geisbert, J. Z. Zhou, K. N. Agans, N. M. Snead, D. J. Deer, T. R. Barnard, K. A. Fenton, I. MacLachlan and T. W. Geisbert, *Nature*, 2015, **521**, 362–365.
- K. A. Whitehead, R. Langer and D. G. Anderson, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2009, **8**, 129–138.
- K. T. Love, P. K. Mahon, C. G. Levins, K. A. Whitehead, W. Querbes, J. R. Dorkin, J. Qin, W. Cantley, L. L. Qin, T. Racine, M. Frank-Kamenetsky, K. N. Yip, R. Alvarez, D. W. Y. Sah, A. de Fougerolles, K. Fitzgerald, V. Kotelansky, A. Akinc, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 1864–1869.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- S. Chen, Y. Y. C. Tam, P. J. C. Lin, M. M. H. Sung, Y. K. Tam and P. R. Cullis, *J. Controlled Release*, 2016, **235**, 236–244.
- E. Wisse, F. Jacobs, B. Topal, P. Frederik and B. De Geest, *Gene Ther.*, 2008, **15**, 1193–1199.
- B. L. Mui, Y. K. Tam, M. Jayaraman, S. M. Ansell, X. Du, Y. C. Tam, P. J. Lin, S. Chen, J. K. Narayananair, K. G. Rajeev, M. Du, D. Butler, L. Eltepu, S. Matsuda, J. K. Narayananair, K. G. Rajeev, I. M. Hafez, A. Akinc, M. A. Maier, M. A. Tracy, P. R. Cullis, T. D. Madden, M. Manoharan and M. J. Hope, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, **51**, 8529–8533.
- G. Sahay, W. Querbes, C. Alabi, A. Eltoukhy, S. Sarkar, C. Zurek, E. Karagiannis, K. Love, D. Chen, R. Zoncu, Y. Buganim, A. Schroeder, R. Langer and D. G. Anderson, *Nat. Biotechnol.*, 2013, **31**, 653–658.
- M. P. Stewart, A. Lorenz, J. Dahlman and G. Sahay, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2016, **8**, 465–478.
- W. Viricel, A. Mbarek and J. Leblond, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**, 12743–12747.
- A. Akinc, A. Zumkehr, M. Goldberg, E. S. Leshchiner, V. Busini, N. Hossain, S. A. Bacallado, D. N. Nguyen, J. Fuller, R. Alvarez, A. Borodovsky, T. Borland, R. Consten, A. de Fougerolles, J. R. Dorkin, K. N. Jayaparakash, M. Jayaraman, M. John, V. Kotelansky, M. Manoharan, L. Nechev, J. Qin, T. Racine, D. Raithcheva, K. G. Rajeev, D. W. Y. Sah, J. Soutschek, I. Toudjarska, H.-P. Vornlocher, T. S. Zimmermann, R. Langer and D. G. Anderson, *Nat. Biotechnol.*, 2008, **26**, 561–569.
- K. A. Whitehead, J. R. Dorkin, A. J. Vegas, P. H. Chang, O. Veisheit, J. Mattheus, O. S. Fenton, Y. Zhang, K. T. Olejnik, V. Yesilyurt, D. Chen, S. Barros, B. Klebanov, T. Novobrantseva, R. Langer and D. G. Anderson, *Nat. Commun.*, 2014, **5**.
- Y. Kwon, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 1077–1088.
- S. C. Semple, A. Akinc, J. Chen, A. P. Sandhu, B. L. Mui, C. K. Cho, D. W. Y. Sah, D. Stebbing, E. J. Crosley, E. Yaworski, I. M. Hafez, J. R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K. G. Rajeev, K. F. Wong, L. B. Jeffs, L. Nechev, M. L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M. A. Maier, M. Srivastava, M. J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S. A. Barros, S. De, S. K. Klumik, T. Borland, V. Kosovrasti, W. L. Cantley, Y. K. Tam, M. Manoharan, M. A. Ciufolini, M. A. Tracy, A. de Fougerolles, I. MacLachlan, P. R. Cullis, T. D. Madden and M. J. Hope, *Nat. Biotechnol.*, 2010, **28**, 172–176.
- S. Itakura, S. Hama, R. Matsui and K. Kogure, *Nanoscale*, 2016, **8**, 10649–10658.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, T. Stutzman, W. T. Young, R. Langer and D. G. Anderson, *ACS Nano*, 2012, **6**, 6133–6141.
- D. Ma, *Nanoscale*, 2014, **6**, 6415–6425.
- J. C. Geoghegan, B. L. Gilmore and B. L. Davidson, *Mol. Ther. — Nucleic Acids*, 2012, **1**, e53.
- K. H. Hou, H. Pan, L. Ratner, P. H. Schlesinger and S. A. Wickline, *ACS Nano*, 2013, **7**, 8605–8615.
- L. Yao, J. Daniels, D. Wijesinghe, O. A. Andreev and Y. K. Reshetnyak, *J. Controlled Release*, 2013, **167**, 228–237.
- A. Wittrup, A. Ai, X. Liu, P. Hamar, R. Trifanova, K. Charisse, M. Manoharan, T. Kirchhausen and J. Lieberman, *Nat. Biotechnol.*, 2015, **33**, 870–876.
- J. Gillieron, W. Querbes, A. Zeigerer, A. Borodovsky, G. Marsico, U. Schubert, K. Mangano, S. Seifert, C. Andree, M. Stöter, H. Epstein-Barash, L. Zhang, V. Kotelansky, K. Fitzgerald, E. Fava, M. Bickle, Y. Kalaidzidis, A. Akinc, M. Maier and M. Zerial, *Nat. Biotechnol.*, 2013, **31**, 638–646.
- N. M. Belliveau, J. Huft, P. J. Lin, S. Chen, A. K. Leung, T. J. Leaver, A. W. Wild, J. B. Lee, R. J. Taylor, Y. K. Tam, C. L. Hansen and P. R. Cullis, *Mol. Ther. — Nucleic Acids*, 2012, **1**, e37.
- Q. Feng, J. Sun and X. Jiang, *Nanoscale*, 2016, **8**, 12430–12443.
- S. Chen, Y. Y. C. Tam, P. J. C. Lin, M. M. H. Sung, Y. K. Tam and P. R. Cullis, *J. Controlled Release*, 2016, **235**, 236–244.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 1864–1869.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein, R. Langer and D. G. Anderson, *Nano Lett.*, 2016.
- Y. Sato, Y. Note, M. Maeki, N. Kaji, Y. Baba, M. Tokeshi and H. Harashima, *J. Controlled Release*, 2016, **229**, 48–57.
- C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 12881–12886.
- Y. Dong, J. R. Dorkin, W. Wang, P. H. Chang, M. J. Webber, B. C. Tang, J. Yang, I. Abutbul-Iontua, D. Danino, F. DeRosa, M. Heartlein

COMMUNICATION

- Manoharan, A. Akinc, M. A. Maier, P. Cullis, T. D. Madden and M. J. Hope, *Mol. Ther. — Nucleic Acids*, 2013, **2**, e139.
- 34 M. Frank-Kamenetsky, A. Grefhorst, N. N. Anderson, T. S. Racine, B. Bramlage, A. Akinc, D. Butler, K. Charisse, R. Dorkin, Y. Fan, C. Gamba-Vitalo, P. Hadwiger, M. Jayaraman, M. John, K. N. Jayaprakash, M. Maier, L. Nechev, K. G. Rajeev, T. Read, I. Röhl, J. Soutschek, P. Tan, J. Wong, G. Wang, T. Zimmermann, A. de Fougerolles, H.-P. Vornlocher, R. Langer, D. G. Anderson, M. Manoharan, V. Kotieliansky, J. D. Horton and K. Fitzgerald, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 11915–11920.
- 35 S. Poirier, M. Mamarbachi, W.-T. Chen, A. S. Lee and G. Mayer, *Cell Rep.*, 2015, **13**, 2064–2071.
- 36 Y. Zhang, J. M. Pelet, D. A. Heller, Y. Dong, D. Chen, Z. Gu, B. I. Joseph, J. Wallas and D. G. Anderson, *Adv. Mater.*, 2013, **25**, 4641–4645.
- 37 J. Leblond and A. Petitjean, *ChemPhysChem*, 2011, **12**, 1043–1051.

Journal Name

[View Article Online](#)
DOI: 10.1039/C6NR06701H

Nanoscale Accepted Manuscript

Supporting Information

Cationic Switchable Lipids: pH-Triggered Molecular Switch for siRNA Delivery

Warren Viricel¹, Steve Poirier², Amira Mbarek¹, Rabeb Mouna Derbali¹, Gaetan Mayer^{1,2},
Jeanne Leblond^{1*}

¹ Faculty of Pharmacy, University of Montreal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montreal,
QC, Canada

² Laboratory of Molecular Cell Biology, Montreal Heart Institute, Montreal, H1T 1C8, QC,
Canada

*Address correspondence to jeanne.leblond-chain@umontreal.ca

Table of figures

Scheme S1. Synthesis pathway of the cationic switchable lipids CSL1 and CSL3	6
Scheme S2. Synthesis pathway of the cationic switchable lipid CSL2	7
Scheme S3. Synthesis pathway of the negative control cationic lipid CSL4	8
Scheme S4. Protonation induced conformational change of the cationic switchable lipids CSL3 and CSL4 (negative control lipid)	9
Figure S5. Physicochemical characterisation of LNP/siRNA complexes made by manual extrusion	10
Figure S6. Forward transfection on HeLa/GFP cells with CSL3 and CSL4 LNP	11
Figure S7. CSL3/siRNA-Alexa647 and free siRNA-Alexa647 delivery on HeLa cells	12
Figure S8. Flow cytometry profiles of uptake studies with endocytosis inhibitors	13
Figure S9. Stability study of CSL3 LNP made by microfluidic mixing	14
Figure S10. Quantification of biodistribution of siRNA-Cy5 encapsulated into CSL3 LNP	15
Table S11. siRNA sequences used in this study	16
Figure S12. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectrums of compound CSL1	17
Figure S13. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectrums of compound CSL2	18
Figure S14. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectrums of compound CSL3	19
Figure S15. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectrums of compound CSL4	20

Table of content

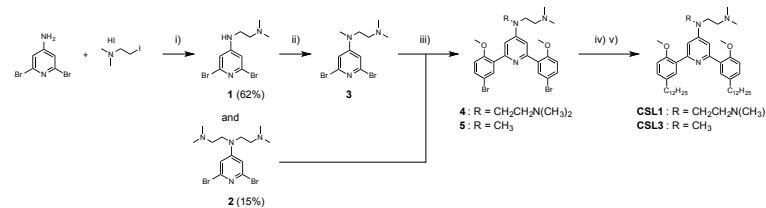
Materials, general methods and cell culture	21
Synthesis of the pH-sensitive cationic switchable lipids CSL1 and CSL3	22
1.1 Synthesis of compounds 1 & 2	22
1.2 Synthesis of compound 3	22
1.3 Synthesis of compound 4	23
1.4 Synthesis of compound 5	23
1.5 Synthesis of compound CSL1	24
1.6 Synthesis of compound CSL3	25
Synthesis of the pH-sensitive cationic switchable lipid CSL2	26
2.1 Synthesis of compound 6	26
2.2 Synthesis of compound 7	26
2.3 Synthesis of compound 8	27
2.4 Synthesis of compound 9	27
2.5 Synthesis of compound 10	28
2.6 Synthesis of compound CSL2	28
Synthesis of the negative control cationic lipid CSL4	29
3.1 Synthesis of compound 11	29
3.2 Synthesis of compound CSL4	30
Lipid nanoparticle preparation by manual extrusion	31
siRNA complexation and encapsulation efficiency	32
Physicochemical characterization of lipid nanoparticles	33
<i>In vitro</i> siRNA transfection assays	34
<i>In vitro</i> cytotoxicity assay	35
Intracytoplasmic delivery of siRNA	36
Endosomal entrapment of the CSL4-based formulation	37
Lipid-mixing assay	38

Inhibition of GFP knockdown with Bafilomycin A1	39
Uptake inhibition by flow cytometry	40
Lipid nanoparticle preparation by microfluidic mixing	42
Biodistribution and ex-vivo imaging in mice	43
Serum stability study	44
In vivo Factor VII silencing in mice	45
References	46

Abbreviations

AcOEt: ethyl acetate; C₁₂E₈: octaethylene glycol monododecyl ether; CSL: cationic switchable lipid; DCM: dichloromethane; DIPA: diisopropylamine; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMF: dimethylformamide; DMG-PEG₂₀₀₀: 1,2-dimyristoyl-sn-glycerol methoxypolyetheneglycol 2000; DMSO: dimethyl sulfoxide; DSPC: (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DSPE-PEG₂₀₀₀: N-(carboxymethoxypolyetheneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; EIPA: 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride; EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium; EtOH: ethanol; FBS : fetal bovine serum; FVII: coagulation factor VII; GFP: green fluorescent protein; HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; LDLR: low density lipoprotein receptor; LNP: lipid nanoparticle; MeOH : methanol; PBS : phosphate buffer saline; PCSK9: proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; PEG: poly(ethyleneglycol); POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; R18: octadecyl rhodamine B; TBAF: tetra-n-butylammonium fluoride; TEAA: triethylammonium acetate; TFA: trifluoroacetic acid; THF: tetrahydrofuran.

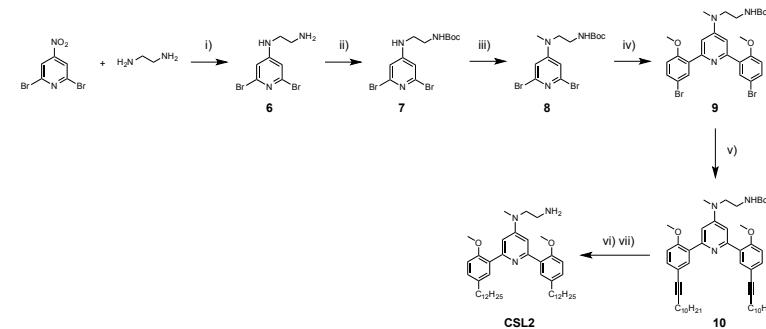
Scheme S1. Synthesis pathway of the cationic switchable lipids CSL1 and CSL3



The synthesis and characterization of the compounds are further detailed below.

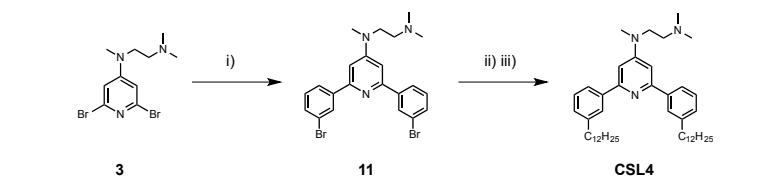
Reagents and conditions:
 i) NaH, THF, 80°C, 0.5h ; ii) ICH₃, NaH, THF, 40°C, 2h ; iii) 5-bromo-2-methoxyphenylboronic acid, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, THF/H₂O, 80°C, 48h ; iv) 1-dodecyne, PdCl₂(PPh₃)₂, PPh₃, TBAF, DMF/DIPA, 80°C, 16h ; v) H₂, Pd/C, EtOH, room temperature, 4h.

Scheme S2. Synthesis pathway of the cationic switchable lipid CSL2



The synthesis and characterization of the compounds are further detailed below.

Scheme S3. Synthesis pathway of the negative control cationic lipid CSL4

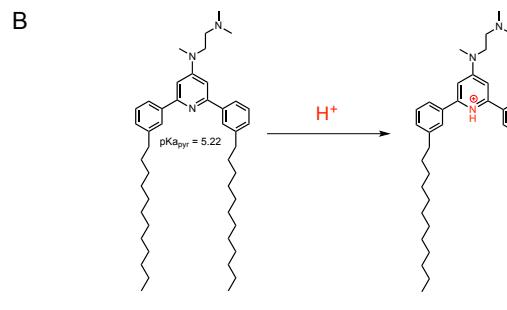
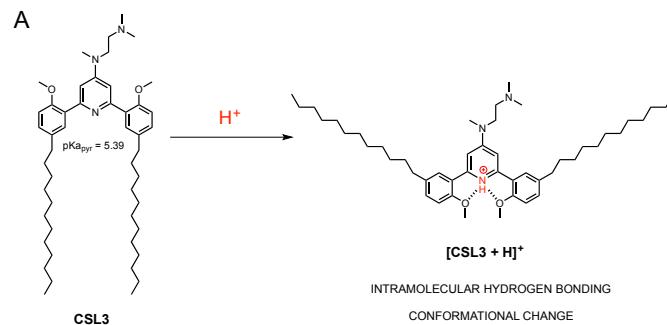


i) 3-bromophenylboronic acid, Pd(PPh_3)₄, Na₂CO₃, THF/H₂O, 80°C, 24 h; ii) 1-dodecyne, PdCl₂(PPh_3)₂, PPh_3 , TBAF, DMF/DIPA, 80°C, 16 h; iii) H₂, Pd/C, EtOH, room temperature, 4 h.

The synthesis and characterization of the compounds are further detailed below.

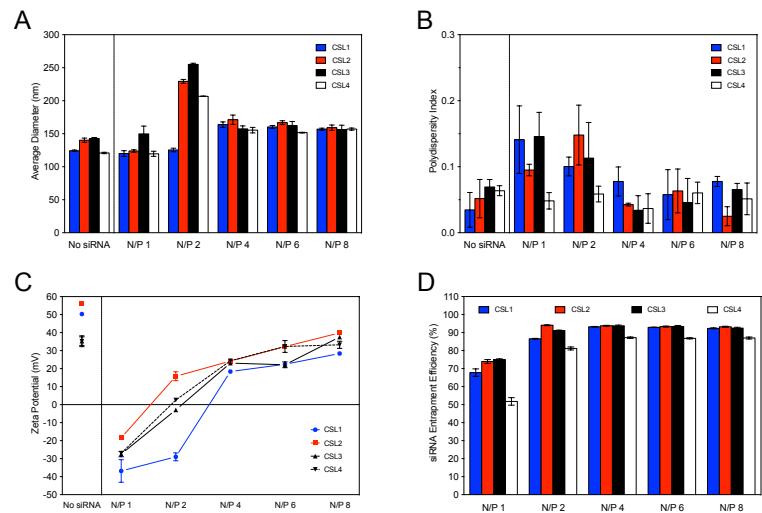
Scheme S4. Protonation induced conformational change of the cationic switchable lipids

CSL3 and CSL4 (negative control lipid)



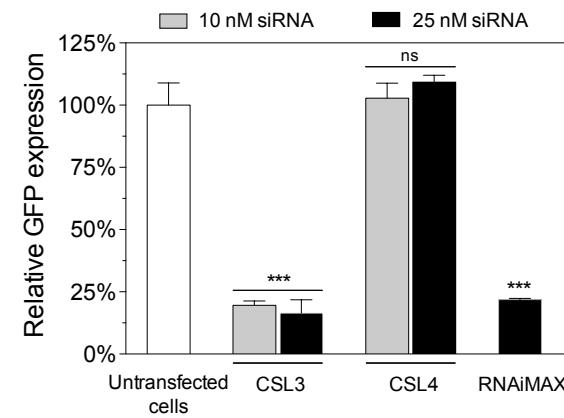
(A) Upon protonation of the central pyridine ring in the cationic switchable lipid CSL3, the formation of intramolecular hydrogen bonding between the protonated nitrogen and the two methoxy moieties leads the conformation to freeze, destabilizing the lipid nanoparticle and provoking endosomal escape. This behavior was observed in a previous work.¹ **(B)** The negative control cationic lipid CSL4 lacks the two methoxy moieties required to perform intramolecular hydrogen bonding with the protonated pyridine, and is therefore unable to freeze its conformation at endosomal pH values. Note that the $pK_{a,pyr}$ values of the central pyridine ring of these two lipids are similar (5.39 and 5.22), as predicted *in silico* (CSpKa™ software, ChemSilico LLC.).

Figure S5. Physicochemical characterisation of LNP/siRNA complexes made by manual extrusion



Physicochemical characterisation of the lipid nanoparticles encapsulating anti-GFP siRNA at different lipid nitrogen/siRNA phosphate (N/P) ratios. Lipid nanoparticles were prepared using cationic switchable lipids, DSPC, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5 respectively. Size (A) and polydispersity index (B) of the lipid nanoparticles/siRNA complexes were measured by dynamic light scattering in Opti-MEM®. Zeta potential (C) of lipid nanoparticles/siRNA complexes were measured in dextrose 5%. siRNA encapsulation efficiency (D) was measured using a SYBR® Gold fluorescence assay.

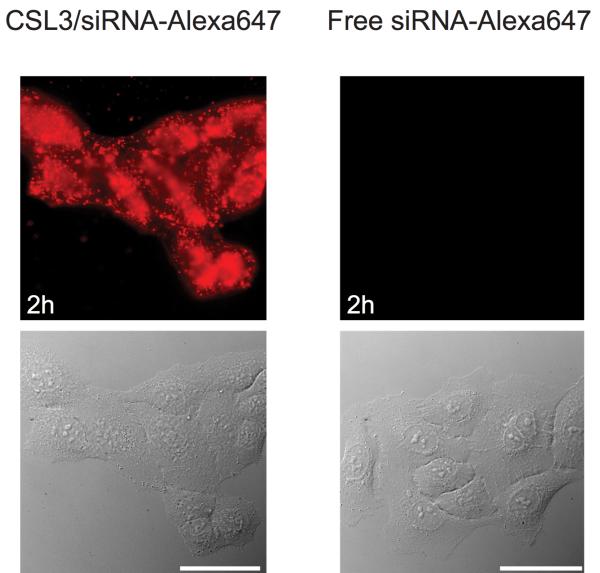
Figure S6. Forward transfection on HeLa/GFP cells with CSL3 and CSL4 LNP



Forward transfection on HeLa/GFP cells with CSL3 and CSL4-based LNP (CSL, DSPC, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5 respectively – made by manual extrusion). Gene knockdown was assayed by flow cytometry after a 48h incubation period (n = 3). Statistical analysis performed with two-tailed Student's t-test: ns. p>0.05; ***p<0.001.

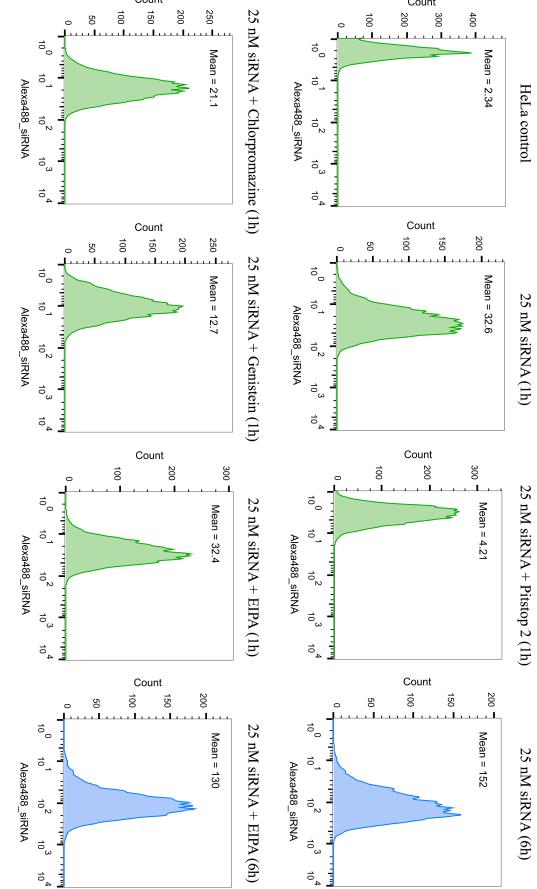
Forward transfection was realized to make sure that transfection efficiency of CSL3 and CSL4 LNP remains similar, regardless of the chosen transfection method (reverse or forward transfection).

Figure S7. CSL3/siRNA-Alexa647 and free siRNA-Alexa647 delivery on HeLa cells



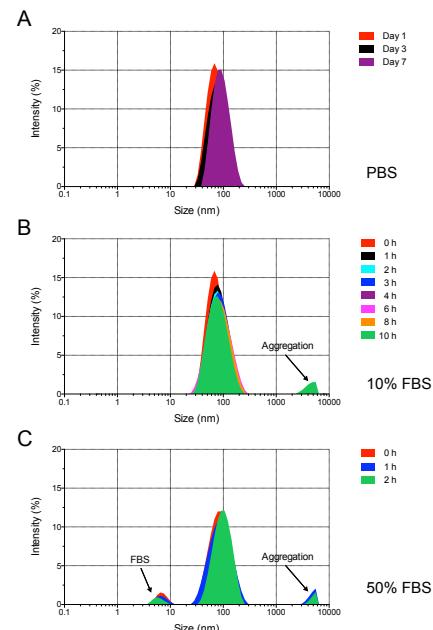
2-hour incubation of HeLa cells with CSL3/siRNA-Alexa647 LNP (CSL3, DSPC, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5 respectively – made by manual extrusion) or free siRNA-Alexa647. Final siRNA-Alexa647 concentration in the dish is 50 nM. Representative pictures are shown. Scale bar is 20 μ M.

Figure S8. Flow cytometry profiles of uptake studies with endocytosis inhibitors



Representative flow cytometry profiles of cell uptake (1-hour incubation (green) or 6-hour incubation (blue)) of the CSL3-based lipid nanoparticles formulation (CSL3/DSPC/cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by manual extrusion) encapsulating siRNA-Alexa488 (25 nM/well), in the presence or absence of endocytosis inhibitors. HeLa cells were used for this study. Clathrin (Chlorpromazine – 10 μ g/ml), caveolae (Gemistein – 200 μ M), clathrin/caveolae (Pitstop 2 – 20 μ M) or macropinocytosis (EIPA – 50 μ M) endocytic pathways were inhibited. Experiment was realised in triplicate.

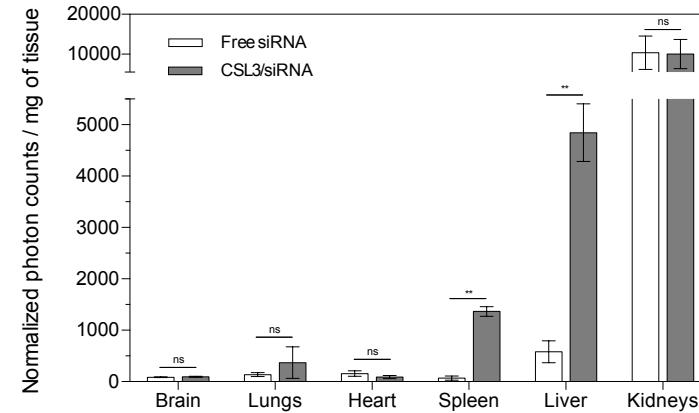
Figure S9. Stability study of CSL3 LNP made by microfluidic mixing



CSL3 LNP (CSL3/DSPC/cholesterol/DMG-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by microfluidic mixing) were incubated in PBS buffer containing 0% (A), 10% (B) or 50% (C) FBS.

Upon storage in PBS at +4°C, CSL3-based LNP are stable for >7 days. When incubated in buffer containing 10% FBS, LNP remain stable for 10h at 37°C. Nevertheless, aggregation occurs at the 10-hour and 1-hour time point in 10% and 50% FBS respectively. This partial serum instability could result in the premature release of siRNA in the blood stream following intravenous injection, explaining the relatively high fluorescent signal observed in the kidneys in the biodistribution study (see Figure S10).

Figure S10. Quantification of biodistribution of siRNA-Cy5 encapsulated into CSL3 LNP



Quantification (photon counts normalized by organ wet mass) of siRNA-Cy5 biodistribution. siRNA-Cy5 were encapsulated into CSL3 LNP (CSL3/DSPC/cholesterol/DMG-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by microfluidic mixing). Organs were harvested and imaged 4 hours after tail vein injection at a siRNA-Cy5 dose of 1.5 mg/kg. Experiment was realized in triplicate. Statistical analysis performed with two-tailed Student's t-test: ns. p>0.05; *p<0.05; **p<0.01.

siRNA	Sense strand	Antisense strand	Modification	Origin
siRNA GFP	Not provided	Not provided	None	Dharmacon (cat# P-002048-01-20)
siRNA-Alexa647	Not provided	Not provided	3'-Alexa Fluor 647 on the sense strand	Qigen AllStars Negative Control siRNA (cat# 1027287)
siRNA-Alexa488	Not provided	Not provided	3'-Alexa Fluor 488 on the sense strand	Qigen AllStars Negative Control siRNA (cat# 1027284)
siRNA-Cy5	5'-CCG-UAGGGACUAACACAUCAAUU-3'	5'-UUGAUUGUUUAGUCGUAUU-3'	5'-Cy5 on the sense strand	Dharmacon (siGENOME Non-Targeting Control siRNA)
siRNA PCSK9	5'-GcUGGAGGuuuAuuGGAAct*dt-3'	5'-UUCCGAAuAACUCCAGGd*dt-3'	None	Dharmacon
siRNA FVII	5'-GGAAUUCUfUfUfCAGUfUfUfUfCAGt*dt-3'	5'-GfUfUAGAfCfUfUfUfUfUfCAGt*dt-3'	None	Dharmacon

2'-OMe modified nucleotides are in lower case. 2'-F modified nucleotides are denoted by “f”. Phosphorothioate linkages are represented by asterisks. siRNA PCSK9 and siRNA FVII sequences were obtained from the literature.^{2,3}

Figure S12. ¹HNMR and ¹³CNMR spectra of compound CSL1

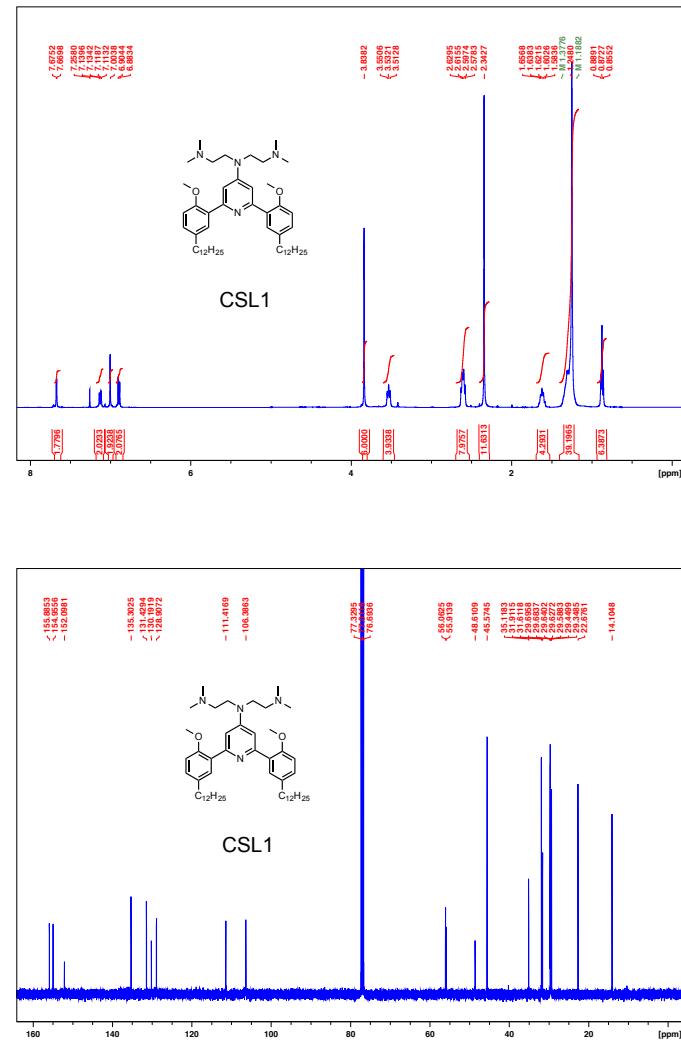


Figure S13. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound CSL2

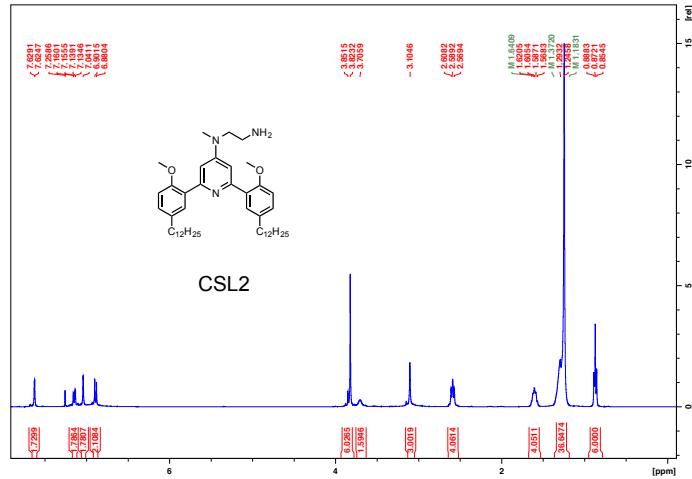


Figure S14. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound CSL3

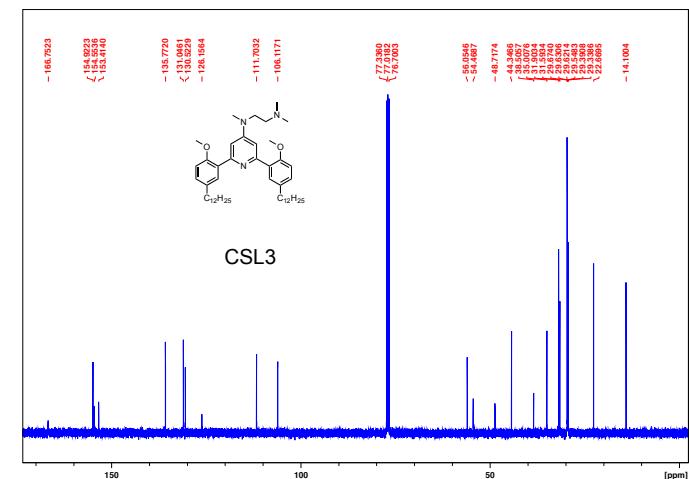
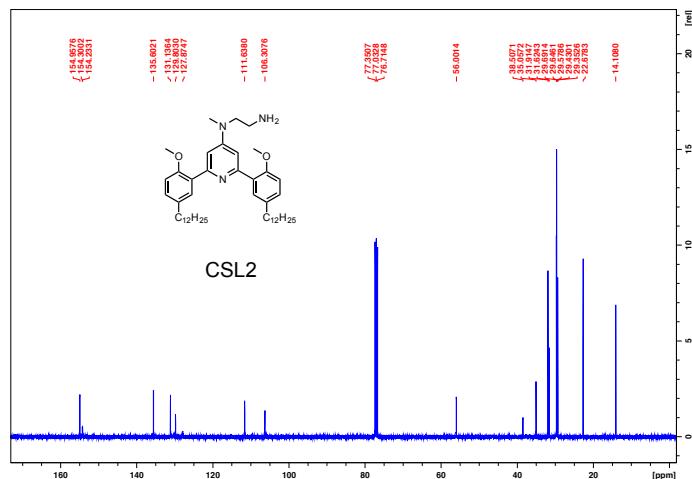
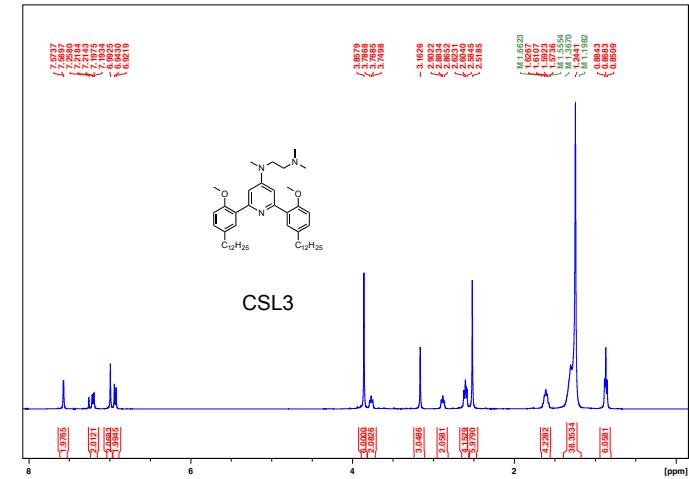
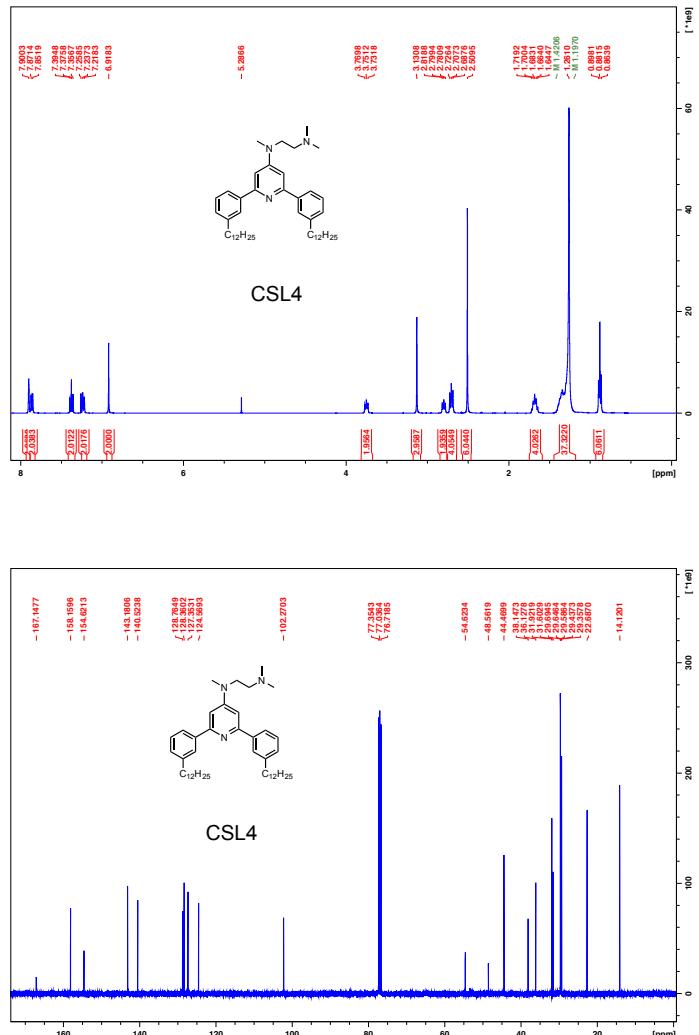


Figure S15. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound CSL4



Materials, general methods and cell culture

All solvents and reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada), Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA) and Oakwood Chemical (West Columbia, SC, USA). Anhydrous tetrahydrofuran (THF) and dimethylformamide (DMF) were obtained from a Pure Solv PS-400-6 System (Innovative Technology, Amesbury, MA, USA). Cholesterol, DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and DSPE-PEG₂₀₀₀ (N-(carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, sodium salt) were supplied by Avanti[®] Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). DMG-PEG₂₀₀₀ (1,2-dimyristoyl-sn-glycerol, methoxypolyethyleneglycol 2000) was purchased from NOF America Corporation (White Plains, NY, USA). Chloroquine, genistein, chlorpromazine and resazurin sodium salt were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA) was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), Pitstop 2TM was obtained from Abcam[®] (Toronto, ON, Canada) and Bafilomycin A1 was obtained from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). All solvents and reagents were of analytical grade and were used as received. All liquid nuclear magnetic resonance spectra were recorded on a Varian 400 WB spectrometer, using residual solvent peak for calibration. High-resolution mass spectroscopy analysis was performed by the Regional Center for Mass Spectrometry of the University of Montréal. Chemical reactions were monitored by LC-MS (Infinity 1260 + MS 6120, Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada).

HeLa/GFP cells (GFP Reporter Stable Cell Line, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA) and HeLa cells (CCL-2TM, ATCC[®], Manassas, VA, USA) were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, cat #30-2003, ATCC[®]) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco, Burlington, ON, Canada). Huh-7 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, cat# 319-005-CL, Wisent, Montreal, QC, Canada) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco). Cells were incubated at 37°C under a water-saturated atmosphere supplemented with 5% CO₂.

Statistical analyses were performed using Prism[®] 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Synthesis of the pH-sensitive cationic switchable lipids CSL1 and CSL3

1.1 Synthesis of compounds 1 & 2

In a 250 mL round-bottom flask previously purged with argon was added sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, un-rinsed) (926 mg / 27.6 mmol). Anhydrous THF (130 mL) was added, and 2,6-dibromopyridin-4-amine⁴ (1736 mg / 6.89 mmol) was slowly dissolved in the mixture. 2-iodo-N,N-dimethylethan-1-amine (iodide salt)⁵ (2253 mg / 6.89 mmol) was added and the mixture was stirred 0.5 hours at 80°C under argon. The mixture was then slowly quenched with MeOH, and dry loaded into column chromatography on silica gel for purification (hexane/AcOEt, fast gradient from 100:0 to 0:100 ; DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 70:30) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system. The final product **1** was obtained as a yellow solid (1386 mg / 62%) and the final product **2** was obtained as a slightly orange solid (395 mg / 15%).

1 : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.22 (s, 6H), 2.52 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.08 (q, J₁ = 6.2 Hz, J₂ = 5.0 Hz, 2H), 6.56 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 39.49, 44.86, 56.68, 109.92, 140.60, 156.02. Calc [M+H] = 321.95490 ; Exp [M+H] = 321.95555 ; Error = - 2.01 ppm.

2 : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.25 (s, 12H), 2.42 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 3.37 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 6.58 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 45.80, 49.22, 55.91, 108.80, 141.06, 155.22. Calc [M+H] = 393.02840 ; Exp [M+H] = 393.02934 ; Error = - 2.41 ppm.

1.2 Synthesis of compound 3

In a 250 mL round-bottom flask previously purged with argon was added sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, un-rinsed) (654 mg / 19.5 mmol). Anhydrous THF (50 mL) was added, and **1** (786 mg / 2.43 mmol) was added to the mixture. Methyl iodide was added (449 mg / 3.16 mmol). The reaction was stirred at 40°C and was carefully monitored by LC-MS until entire consumption of the starting material (~ 2h). The mixture was then slowly quenched with MeOH, filtered (0.20 µm PTFE filter) and dry loaded into column chromatography on silica gel for purification (hexane/AcOEt, fast gradient from 100:0 to 0:100; DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 80:20) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system. The final product **3** was obtained as a

yellow oil (640 mg / 78%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.30 (s, 6H), 2.49 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.99 (s, 3H), 3.49 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 6.77 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 37.19, 44.41, 49.10, 54.80, 108.68, 140.19, 156.34. Calc [M+H] = 335.97055 ; Exp [M+H] = 335.97180 ; Error = - 3.71 ppm.

1.3 Synthesis of compound 4

In a 50 mL round-bottom flask was dissolved **2** (127 mg / 0.32 mmol) and 5-bromo-2-methoxyphenylboronic acid (170 mg / 0.74 mmol) in 4 mL of THF. Na₂CO₃ (137 mg / 1.29 mmol), previously dissolved in 4 mL of distilled water, was added and the flask was purged three times with argon. Pd(PPh₃)₄ (3.7 mg / 0.003 mmol) was added and the flask was purged three times again. The mixture was stirred 48 hours at 80°C. The reaction was monitored by LC-MS until entire consumption of the starting materials. The mixture was then diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with dichloromethane (DCM). The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by reverse phase preparative HPLC on an Agilent Zorbax PrepHT Eclipse XDB-C18 21.2x150mm (5µm) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 15 % B ; 6 min – 80 % B ; 12 min - 80 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. Compound **4** was obtained as a white solid (58 mg / 30%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.48 (s, 12H), 2.79 (t, J = 6.5 Hz, 4H), 3.67 (t, J = 6.5 Hz, 4H), 3.86 (s, 6H), 6.97 (s, 2H), 7.05 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.50 (dd, J₁ = 8.9 Hz, J₂ = 2.6 Hz, 2H), 7.73 (d, J = 2.6 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 44.14, 55.21, 56.08, 107.00, 112.41, 113.35, 130.81, 132.32, 133.06, 152.55, 154.18, 156.23. Calc [M+H] = 605.11213 ; Exp [M+H] = 605.11451 ; Error = - 3.93 ppm.

1.4 Synthesis of compound 5

In a 100 mL round-bottom flask was dissolved **3** (694 mg / 2.06 mmol) and 5-bromo-2-methoxyphenylboronic acid (1189 mg / 5.15 mmol) in 6 mL of THF. Na₂CO₃ (873 mg / 8.24 mmol), previously dissolved in 6 mL of distilled water, was added and the flask was purged three times with argon. Pd(PPh₃)₄ (23.8 mg / 0.021 mmol) was added and the flask was purged three times again. The mixture was stirred 48 hours at 80°C. The reaction was monitored by LC-MS until entire consumption of the starting materials. The mixture was then diluted with

saturated Na_2CO_3 and extracted 3 times with dichloromethane (DCM). The organic layer was dried over MgSO_4 and evaporated under vacuum. The final product was purified using a Teledyne Isco CombiFlash[®] purification system equipped with a 30 grams reversed-phase C18 HP Gold column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 20 % B ; 15 min – 90 % B followed by a column re-equilibration time of 4-5 CV. Compound 5 was obtained as a white solid (492 mg / 47%). ¹H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 2.35 (s, 6H), 2.62 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.07 (s, 3H), 3.59 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.84 (s, 6H), 6.94 (s, 2H), 7.02 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.48 (dd, J_1 = 8.8 Hz, J_2 = 2.5 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 2.5 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 37.09, 44.29, 48.82, 54.84, 55.17, 106.68, 112.36, 113.35, 130.40, 132.39, 133.07, 153.30, 154.21, 156.25. Calc [M+H] = 548.05428 ; Exp [M+H] = 548.05574 ; Error = - 2.66 ppm.

1.5 Synthesis of compound CSL1

Compound 4 (80 mg / 0.132 mmol) was weighted in a 20 mL microwave reaction vial. 1-dodecyne (66 mg / 0.40 mmol) and PPh_3 (10.4 mg / 0.04 mmol) were added. Dried tetra-n-butylammonium fluoride (TBAF) (241 mg / 0.92 mmol) was added (previously dried under high vacuum from 1.0 M TBAF solution in THF), followed by 2 mL of anhydrous DMF and 2 mL of diisopropylamine (DIPA). The reaction vial was purged 3 times with argon. $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ was added (8.3 mg / 0.01 mmol), the vial was purged 3 times with argon and sealed. The mixture was stirred 16 hours at 80°C. The mixture was then diluted with saturated Na_2CO_3 and extracted 3 times with DCM. The organic layer was dried over MgSO_4 and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 90:10) using a Teledyne Isco CombiFlash[®] purification system. The product was then dissolved in EtOH in a 100 mL round-bottom flask. Palladium (10 wt %Pd basis) on activated charcoal (50 mg) was added and the flask was purged 3 times with hydrogen. The mixture was then stirred 4 hours at room temperature under a 1 atm hydrogen pressure. The solution was then filtered on a PTFE filter (0.20 μm) to remove the catalyst, and the organic phase was evaporated under vacuum. The final product was purified by reverse phase preparative HPLC on an Agilent Zorbax PrepHT Eclipse XDB-C8 21.2x100mm (5 μm) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 30 % B ; 10 min – 95 % B ; 12 min - 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. Compound 5 was obtained as a white solid (492 mg / 47%). ¹H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 2.35 (s, 6H), 2.62 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.07 (s, 3H), 3.59 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.84 (s, 6H), 6.94 (s, 2H), 7.02 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.48 (dd, J_1 = 8.8 Hz, J_2 = 2.5 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 2.5 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 37.09, 44.29, 48.82, 54.84, 55.17, 106.68, 112.36, 113.35, 130.40, 132.39, 133.07, 153.30, 154.21, 156.25. Calc [M+H] = 548.05428 ; Exp [M+H] = 548.05574 ; Error = - 2.66 ppm.

Compound CSL1 was obtained as a white solid (40 mg / 38%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0.87 (t, J = 6.6 Hz, 6H), 1.19-1.38 (m, 36H), 1.62 (quint, J = 7.4 Hz, 4H), 2.34 (s, 12H), 2.58-2.63 (m, 8H), 3.53 (t, J = 7.4 Hz, 4H), 3.84 (s, 6H), 6.89 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.00 (s, 2H), 7.12 (dd, J_1 = 8.4 Hz, J_2 = 2.3 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 2.3 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 14.10, 22.68, 29.35-29.68, 29.70, 31.62, 35.12, 45.57, 48.61, 55.91, 56.06, 106.39, 111.42, 128.91, 130.19, 131.43, 135.30, 152.10, 154.96, 155.89. Calc [M+H] = 785.6667 ; Exp [M+H] = 785.66949 ; Error = - 3.54 ppm.

1.6 Synthesis of compound CSL3

Compound 5 (228 mg / 0.42 mmol) was weighted in a 20 mL microwave reaction vial. 1-dodecyne (207 mg / 1.25 mmol) and PPh_3 (33.7 mg / 0.125 mmol) were added. Dried tetra-n-butylammonium fluoride (TBAF) (760 mg / 2.91 mmol) was added (previously dried under high vacuum from 1.0 M TBAF solution in THF), followed by 2 mL of anhydrous DMF and 2 mL of diisopropylamine (DIPA). The reaction vial was purged 3 times with argon. $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ was added (26 mg / 0.037 mmol), the vial was purged 3 times with argon and sealed. The mixture was stirred 16 hours at 80°C. The mixture was then diluted with saturated Na_2CO_3 and extracted 3 times with DCM. The organic layer was dried over MgSO_4 and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 90:10) using a Teledyne Isco CombiFlash[®] purification system. The product was then dissolved in EtOH in a 100 mL round-bottom flask. Palladium (10 wt %Pd basis) on activated charcoal (50 mg) was added and the flask was purged 3 times with hydrogen. The mixture was then stirred 4 hours at room temperature under a 1 atm hydrogen pressure. The solution was then filtered on a PTFE filter (0.20 μm) to remove the catalyst, and the organic phase was evaporated under vacuum. The final product was purified by reverse phase preparative HPLC on an Agilent Zorbax PrepHT Eclipse XDB-C8 21.2x100mm (5 μm) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 30 % B ; 10 min – 95 % B ; 12 min - 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. Compound CSL3 was obtained as a slightly yellow wax (134 mg / 44%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0.87 (t, J = 6.4 Hz, 6H), 1.20-1.37 (m, 36H), 1.59 (quint, J = 7.4 Hz, 4H), 2.52 (s, 6H), 2.60 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 2.88 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.16 (s, 3H), 3.77 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.86 (s, 6H), 6.93 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.99 (s, 2H), 7.20 (dd, J_1 = 8.4 Hz, J_2 = 2.2 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 2.2 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 14.10, 22.67, 29.34-29.63,

29.67, 31.59, 35.00, 38.51, 44.35, 48.72, 54.47, 56.05, 106.12, 111.70, 126.16, 130.52, 131.05, 135.77, 153.41, 154.55, 154.92. Calc [M+H] = 728.60886 ; Exp [M+H] = 728.61108 ; Error = - 3.06 ppm.

2.3 Synthesis of compound 8

Synthesis of the pH-sensitive cationic switchable lipid CSL2

2.1 Synthesis of compound 6

Ethylenediamine (640 mg / 10.64 mmol) was added dropwise to a suspension of sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, un-rinsed) (255 mg / 10.64 mmol) in anhydrous DMF (20 mL). 2,6-dibromo-4-nitropyridine⁶ (2 g / 7.10 mmol) was introduced by small amounts. The mixture was stirred at room temperature for 3 hours, then carefully quenched with MeOH, washed with saturated Na₂CO₃ and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to afford a brown oil. The crude was purified by chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 80:20) using a Teledyne Isco CombiFlash[®] purification system to afford **6** (628 mg / 30%) as an orange oil. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.80 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.18 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 6.70 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 40.81, 45.12, 110.61, 141.29, 158.69. Calc [M+H] = 293.92360 ; Exp [M+H] = 293.92232 ; Error = - 4.37 ppm.

2.2 Synthesis of compound 7

To a solution of **6** (1.5 g / 5.08 mmol) in DCM (25 mL) was slowly added Boc₂O (1.33 g / 6.10 mmol). The medium was stirred at room temperature during 2h and then washed with saturated Na₂CO₃. The organic layer was decanted and the aqueous layer was extracted twice with DCM. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford a brown oil. The crude was purified by chromatography on silica gel (hexane/AcOEt, gradient from 100:0 to 0:100) using a Teledyne Isco CombiFlash[®] purification system to afford **7** (1.6 g / 79%) as an orange oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.44 (s, 9H), 3.20 (m, 2H), 3.38 (m, 2H), 4.92 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 5.54 (br, 1H), 6.54 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 28.26, 39.58, 44.65, 80.43, 109.69, 140.66, 156.24, 157.40. Calc [M+H] = 393.97603 ; Exp [M+H] = 393.97785 ; Error = 4.6 ppm.

To a solution of **7** (1.2 g, 3.04 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) was added sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, un-rinsed) (153 mg / 4.56 mmol) and methyl iodide (863 mg, 6.08 mmol). The mixture was stirred at 40°C and was monitored by LC-MS until entire consumption of the starting material (~ 3h). The mixture was then slowly quenched with MeOH, washed with water and extracted with DCM. The crude was dry loaded into column chromatography on silica gel for purification (hexane/AcOEt, gradient from 100:0 to 0:100) using a Teledyne Isco CombiFlash[®] purification system to afford **8** (907 mg / 73%) as an orange solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.42 (s, 9H), 2.97 (s, 3H), 3.29 (m, 2H), 3.47 (m, 2H), 4.70 (br, 1H), 6.65 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 25.76, 35.30, 48.64, 77.40, 106.30, 138.46, 153.49, 153.72. Calc [M+H] = 407.99168 ; Exp [M+H] = 407.99221 ; Error = 1.3 ppm.

2.4 Synthesis of compound 9

In a 50 mL round-bottom flask was dissolved **8** (240 mg / 0.59 mmol) and 5-bromo-2-methoxyphenylboronic acid (340 mg / 1.47 mmol) in 5 mL of THF. Na₂CO₃ (249 mg / 2.35 mmol), previously dissolved in 5 mL of distilled water, was added and the flask was purged three times with argon. Pd(PPh₃)₄ (8.2 mg / 0.012 mmol) was added and the flask was purged three times again. The mixture was stirred 48 hours at 80°C. The reaction was monitored by LC-MS until entire consumption of the starting materials. The mixture was then diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with dichloromethane (DCM). The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude was dry loaded into column chromatography on silica gel for purification (hexane/AcOEt, gradient from 100:0 to 0:100) using a Teledyne Isco CombiFlash[®] purification system to afford **9** (179 mg / 49%) as an orange solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.37 (s, 9H), 3.09 (s, 3H), 3.38 (m, 2H), 3.60 (m, 2H), 3.85 (s, 6H), 4.79 (br, 1H), 6.86 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.95 (s, 2H), 7.44 (dd, J₁ = 8.7 Hz, J₂ = 2.5 Hz, 2H), 7.84 (d, J = 2.5 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 28.37, 38.31, 51.25, 56.22, 79.42, 106.69, 113.22, 113.29, 131.01, 132.44, 133.75, 153.62, 156.11, 164.74. Calc [M+H] = 620.07541 ; Exp [M+H] = 620.07685 ; Error = 2.3 ppm.

2.5 Synthesis of compound **10**

Compound **9** (270 mg / 0.34 mmol) was weighted in a 20 mL microwave reaction vial. 1-dodecyne (113 mg / 1.30 mmol) and PPh₃ (20 mg / 0.078 mmol) were added. Dried tetra-n-butylammonium fluoride (TBAF) (355 mg / 2.60 mmol) was added (previously dried under high vacuum from 1.0 M TBAF solution in THF), followed by 1 mL of anhydrous DMF and 1 mL of diisopropylamine (DIPA). The reaction vial was purged 3 times with argon. PdCl₂(PPh₃)₂ was added (21 mg / 0.030 mmol), the vial was purged 3 times with argon and sealed. The mixture was stirred 16 hours at 80°C. The mixture was then diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (hexane/AcOEt, gradient from 100:0 to 0:100) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system to afford **10** (141 mg / 41%) as a yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H), 1.16-1.34 (m, 28H), 1.35-1.50 (m, 13H), 1.58 (quint, *J* = 7.6 Hz, 4H), 2.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H), 3.05 (s, 3H), 3.36 (m, 2H), 3.54 (m, 2H), 3.84 (s, 6H), 4.69 (br, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.92 (s, 2H), 7.35 (dd, *J*₁ = 8.6 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 14.10, 19.45, 22.67, 28.27, 28.91-29.60, 31.89, 38.08, 38.21, 51.00, 55.80, 80.36, 88.83, 106.55, 111.27, 116.60, 130.66, 132.44, 134.66, 155.42, 156.32. Calc [M+H] = 792.56738 ; Exp [M+H] = 792.5681 ; Error = 0.91 ppm.

2.6 Synthesis of compound **CSL2**

Compound **10** (141 mg / 0.179 mmol) was dissolved in EtOH in a 100 mL round-bottom flask. Palladium (10 wt %Pd basis) on activated charcoal (50 mg) was added and the flask was purged 3 times with hydrogen. The mixture was then stirred 4 hours at room temperature under a 1 atm hydrogen pressure. The solution was then filtered on a PTFE filter (0.20 µm) to remove the catalyst, and the organic phase was evaporated under vacuum. The oily crude was dissolved in 4M HCl in dioxane (2 mL) and was stirred 2 hours at room temperature. The mixture was then slowly diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The final product was purified by reverse phase preparative HPLC on an Agilent Zorbax PrepHT Eclipse XDB-C8 21.2x100mm (5µm) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 15 % B ; 6 min – 80 % B ; 12 min - 80 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. Compound **4** was obtained as a slightly yellow waxy solid (139 mg / 56%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.80 (s, 6H), 3.03 (s, 3H), 3.15 (t, *J* = 2.3 Hz, 2H), 3.78 (t, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.92 (s, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 8.19 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 38.13, 43.68, 47.46, 54.19, 104.01, 123.58, 126.98, 131.04, 131.30, 132.77, 143.14, 156.30, 156.93. Calc [M+H] = 488.03315 ; Exp [M+H] = 488.03532 ; Error = 4.4 ppm.

The mobile phase gradient was: 0 min – 30 % B ; 10 min – 95 % B ; 12 min - 95 % B followed by a column re-

equilibration time of 4 min. Compound **CSL2** was obtained as a white waxy solid (80 mg / 64%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 1.18-1.37 (m, 36H), 1.59 (quint, *J* = 7.5 Hz, 4H), 2.59 (t, *J* = 7.8 Hz, 4H), 3.10 (s, 3H), 3.71 (m, 2H), 3.82 (s, 6H), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.04 (s, 2H), 7.14 (dd, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 2.3 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 14.11, 22.68, 29.35-29.69, 31.62, 31.91, 35.06, 38.51, 56.00, 106.31, 111.64, 127.87, 129.80, 131.14, 135.60, 154.23, 154.30, 154.96. Calc [M+H] = 700.57756 ; Exp [M+H] = 700.57702 ; Error = - 0.8 ppm.

Synthesis of the negative control cationic lipid **CSL4**

3.1 Synthesis of compound **11**

In a 50 mL round-bottom flask was dissolved **3** (171 mg / 0.51 mmol) and 3-bromophenylboronic acid (234 mg / 1.17 mmol) in 4 mL of THF. Na₂CO₃ (215 mg / 2.03 mmol), previously dissolved in 4 mL of distilled water, was added and the flask was purged three times with argon. Pd(PPh₃)₄ (6.0 mg / 0.005 mmol) was added and the flask was purged three times again. The mixture was stirred 24 hours at 80°C. The reaction was monitored by LC-MS until entire consumption of the starting materials. The mixture was then diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with dichloromethane (DCM). The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The final product was purified by reverse phase preparative HPLC on an Agilent Zorbax PrepHT Eclipse XDB-C18 21.2x150mm (5µm) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 15 % B ; 6 min – 80 % B ; 12 min - 80 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. Compound **4** was obtained as a slightly yellow waxy solid (139 mg / 56%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.80 (s, 6H), 3.03 (s, 3H), 3.15 (t, *J* = 2.3 Hz, 2H), 3.78 (t, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.92 (s, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 8.19 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 38.13, 43.68, 47.46, 54.19, 104.01, 123.58, 126.98, 131.04, 131.30, 132.77, 143.14, 156.30, 156.93. Calc [M+H] = 488.03315 ; Exp [M+H] = 488.03532 ; Error = 4.4 ppm.

3.2 Synthesis of compound **CSL4**

Compound **11** (139 mg / 0.28 mmol) was weighted in a 10 mL microwave reaction vial. 1-dodecyne (139 mg / 0.83 mmol) and PPh₃ (22 mg / 0.083 mmol) were added. Dried tetra-n-butylammonium fluoride (TBAF) (509 mg / 1.95 mmol) was added (previously dried under high vacuum from 1.0 M TBAF solution in THF), followed by 1 mL of anhydrous DMF and 1 mL of diisopropylamine (DIPA). The reaction vial was purged 3 times with argon. PdCl₂(PPh₃)₂ was added (17 mg / 0.025 mmol), the vial was purged 3 times with argon and sealed. The mixture was stirred 16 hours at 80°C. The mixture was then diluted with saturated Na₂CO₃ and extracted 3 times with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 90:10) using a Teledyne Isco CombiFlash® purification system. The product was then dissolved in EtOH in a 100 mL round-bottom flask. Palladium (10 wt %Pd basis) on activated charcoal (50 mg) was added and the flask was purged 3 times with hydrogen. The mixture was then stirred 4 hours at room temperature under a 1 atm hydrogen pressure. The solution was then filtered on a PTFE filter (0.20 µm) to remove the catalyst, and the organic phase was evaporated under vacuum. The final product was purified by reverse phase preparative HPLC on an Agilent Zorbax PrepHT Eclipse XDB-C8 21.2x100mm (5µm) column. Mobile phase A was composed of water + 0.1% formic acid and mobile phase B was composed of MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 30 % B ; 10 min – 95 % B ; 12 min - 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min.

Compound **CSL4** was obtained as a colorless oil (45 mg / 24%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 6H), 1.20-1.42 (m, 36H), 1.68 (quint, J = 7.5 Hz, 4H), 2.51 (s, 6H), 2.71 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 2.80 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.13 (s, 3H), 3.75 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 6.92 (s, 2H), 7.22 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.38 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.86 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.90 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 14.12, 22.69, 29.36-29.69, 31.60, 31.92, 36.13, 38.15, 44.47, 48.56, 54.62, 102.27, 124.57, 127.35, 128.36, 128.76, 140.52, 143.18, 154.62, 158.16, 167.15. Calc [M+H] = 668.58773 ; Exp [M+H] = 668.58994 ; Error = 3.31 ppm.

Lipid nanoparticle preparation by manual extrusion

Lipid nanoparticles for *in vitro* studies were prepared by manual extrusion, using cationic switchable lipids (CSL), DSPC, cholesterol and DSPE-PEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5 respectively. For *in vivo* experiments, lipid nanoparticles were prepared using microfluidic mixing (further detailed below). Stock solutions (20-40 mg/mL) of cationic switchable lipids and commercial co-lipids were prepared in ethanol and stored at -80°C before use. The lipid stock solutions were combined in a 5 mL round-bottom flask at the desired molar ratio, and the ethanol was removed under reduced pressure. The lipiddic film thus obtained was dried overnight under high vacuum to remove any residual solvent. The lipiddic film was hydrated on a vortex mixer with 1 mL of sterile 5% dextrose in water. The lipid suspension was then subjected to stepwise extrusions through polycarbonate membranes (200 and 100 nm – 9 passages per membrane) using a LiposoFast manual extruder (Avestin Inc., Ottawa, ON, Canada) heated at 60°C. The cationic switchable lipid amount present in each preparation was quantified via HPLC-UV/MS (1260 Infinity, Agilent Technologies) against a calibration curve of cationic switchable lipid (25-250 µg/mL; from ethanol stock solution).

siRNA complexation and encapsulation efficiency

Stock solutions of lipid nanoparticle (made by manual extrusion) and siRNA were diluted in sterile 5% dextrose at appropriate concentrations, depending upon the lipid nitrogen/siRNA phosphate (N/P) ratio desired (unless indicated otherwise, a N/P ratio value of 4 was used for all the experiments). siRNA solution was added to the lipid nanoparticle solution, followed by brief vortexing. Complexation was then realized during 15 minutes at 50°C under vigorous vortexing (1200rpm) in a Labnet Vortemp™ 56.

For quantification of the encapsulation efficiency, lipid nanoparticles and siRNA were prepared for a final siRNA concentration of 100 nM. A SYBR® Gold (Thermo Scientific) assay was used to quantify the siRNA encapsulation efficiency of the formulations. After complexation (15 minutes, 50°C, vigorous vortexing), the solutions were centrifuged at 20 000g for 30 minutes. Unencapsulated free siRNA in the supernatant was quantified against a calibration curve of siRNA (2-100 nM), using the SYBR® Gold fluorescent dye ($\lambda_{\text{ex/em}} = 495/537$) and a Safire microplate reader (Tecan, Seestrasse, Switzerland). siRNA encapsulation efficiency (%) was calculated as follows:

$$EE (\%) = \frac{100 (\text{nM}) - \text{siRNA concentration in the supernatant} (\text{nM})}{100 (\text{nM})} \times 100$$

Physicochemical characterization of lipid nanoparticles

Hydrodynamic diameter and ζ -potential of lipid nanoparticles/siRNA complexes were measured at 20°C by Dynamic Light Scattering using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK), using the automatic algorithm mode. For size measurements, lipid nanoparticles and siRNA were complexed together (260 nM final siRNA; 200 μL final volume) in 5% dextrose as described above. Complexes were then diluted with 800 μL Opti-MEM®, equilibrated for 20 minutes at 20°C and measured. Size measurements are reported using the Z-Average value. ζ -potential measurements were realized at 20°C using the Smoluchowski model. Lipid nanoparticles and siRNA are complexed together (260 nM final siRNA; 200 μL final volume) in 5% dextrose as described previously. Complexes are then diluted with 800 μL dextrose 5%, equilibrated 15 minutes at 20°C and measured. Experiments were run in triplicate or more.

***In vitro* siRNA transfection assays**

The RNAi induced silencing capabilities of each cationic switchable lipid was investigated in a HeLa/GFP model. Lipid nanoparticles (made by manual extrusion) and anti-GFP siRNA were complexed (N/P ratio of 4) as described above (for a final siRNA concentration/well of 1-60 nM) and were diluted in Opti-MEM[®] (250 µL). This reverse transfection media (300 µL) was put in the well (12-well plates), and 1 mL of cell suspension in complete culture media (EMEM/FBS 90:10) was added for a final concentration of 40 000 cells/well. Cells were then incubated for 72 hours. After incubation, cells were rinsed with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer (95% PBS, 5% FBS, 1.0 mM EDTA) for immediate analysis on a FACSCaliburTM flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). GFP expression for each replicate (mean fluorescent intensity; FlowJo software vX.0.7, Ashland, OR, USA) was calculated relative to the control samples that did not receive any siRNA treatment. Negative control included cells that were treated with naked anti-GFP siRNA (60 nM). Positive control included cells that were treated with Lipofectamine[®] RNAiMAX (Thermo Scientific) according to the manufacturer's reverse transfection protocol (1 µL reagent/well; 60 nM siRNA/well). All experiments were realized in triplicate.

The RNAi silencing capabilities of the formulations made by microfluidic mixing (aimed for *in vivo* siRNA delivery) was assayed in HeLa/GFP (anti-GFP siRNA) and Huh-7 cells (anti-PCSK9 siRNA), using the same protocol. Transfection efficiency was assayed by either flow cytometry or western blotting⁷ after a 48 hour (HeLa/GFP) or 72 hour (Huh-7) incubation period.

Forward transfection was also realized to make sure that transfection efficiency of CSL3 and CSL4 lipid nanoparticles remains similar, regardless of the chosen transfection method. HeLa/GFP cells were seeded in 12-well plates (40 000 cells/well) and allowed to attach overnight. The next day, cells were incubated in Opti-MEM[®] for 4 hours with lipid nanoparticles (made by manual extrusion) or Lipofectamine[®] RNAiMAX (1 µL reagent/well; 25 nM siRNA/well). After incubation, cells were rinsed with Opti-MEM[®] and 1 mL of complete culture media (EMEM/FBS 90:10) was added. Cells were then incubated for 44 hours. After incubation, cells were rinsed with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer for immediate analysis *via* flow cytometry.

***In vitro* cytotoxicity assay**

Cytotoxicity of the lipid nanoparticles (made by manual extrusion) on HeLa/GFP cells was assessed using a resazurin-based cell viability assay (AlamarBlue[®]). The transfection procedure was strictly identical to that presented above (N/P ratio of 4, 1-60 nM final siRNA concentration/well), but the assay was carefully scaled down from 12-well plates to 96-well plates, according to the growth area of the wells (3000 cells/well, 200 µL final volume/well). After 72 hours of incubation, cells were washed with PBS, and 200 µL of fresh culture medium was added into the wells (EMEM/FBS 90:10). 20 µL of a freshly prepared resazurin solution (440 µM in PBS) were then added, and cells were incubated for 2 hours. The absorbance of each well was measured at 570 and 600 nm using a Safire microplate reader (Tecan). Cellular viability was normalized relative to the negative control (cells treated with dextrose 5%). Experiments were run in sixplicata.

Intracytoplasmic delivery of siRNA

Live-cell fluorescence microscopy was used to image the intracytoplasmic delivery of siRNA-Alexa647 (Qiagen) following transfection with the CSL3-based formulation (CSL3/DSPC/cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by manual extrusion). HeLa cells were routinely incubated 24 hours before imaging in 35 mm poly-d-lysine coated glass dishes (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) at a density of 40 000 cells/dish. siRNA were complexed with lipid nanoparticles (N/P ratio of 4) in 5% dextrose as described previously (70 µL final volume). Complexes were then diluted with 346 µL Opti-MEM® and 1384 µL of complete culture media (Opti-MEM®/FBS 90:10), for a final siRNA concentration of 50 nM. Cells were then incubated 10 minutes, 1 hour or 2 hours with the lipid nanoparticles. After incubation, cells were rinsed four times with Opti-MEM®/FBS 90:10 and were immediately imaged in a phenol red-free culture media (Opti-MEM®/FBS 90:10). Imaging of HeLa cells was performed using an Olympus IX81 fluorescent microscope equipped with a Plan Apo N 60X 1.42 NA silicone objective (Olympus Canada Inc., Toronto, ON, Canada) and a 12 bits Retiga-2000R CCD Camera (QImaging, Surrey, BC, Canada), using MetaMorph Advanced software 7.8.9 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). siRNA-Alexa647 was imaged using the Cy5 channel ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 649/666). All fluorescence images were carefully exported with constant scaling and range of greylevel. Experiment was realized in triplicate.

Endosomal entrapment of the CSL4-based formulation

Live-cell fluorescence microscopy was used to compare the intracellular fate following endocytosis of the CSL3-based (pH-sensitive) and the CSL4-based (negative control) lipid nanoparticles formulations (CSL/DSPC/cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by manual extrusion). HeLa cells were routinely incubated 24 hours before imaging in 35 mm poly-d-lysine coated glass dishes (MatTek Corporation) at a density of 40 000 cells/dish. siRNA-Alexa647 (Qiagen) were complexed with lipid nanoparticles (N/P ratio of 4) in 5% dextrose as described previously (70 µL final volume). Complexes were then diluted with 346 µL Opti-MEM® and 1384 µL of complete culture media (Opti-MEM®/FBS 90:10), for a final siRNA concentration of 50 nM. Cells were then incubated 16 hours with the lipid nanoparticles. After incubation, cells were rinsed twice with Opti-MEM®/FBS 90:10 and were stained with Hoechst 33342 (5 min, 2 µg/mL, Sigma). Cells were rinsed twice with Opti-MEM®/FBS 90:10 and were immediately imaged in a phenol red-free culture media (Opti-MEM®/FBS 90:10). Alternatively, cells were exposed to 500 µM chloroquine during the last hour of the 16-hour incubation period (CSL4-based formulation). Imaging of HeLa cells was performed using an Olympus IX81 fluorescent microscope equipped with a UPlanSApo 100X 1.40 NA silicone objective (Olympus Canada Inc.) and a 12 bits Retiga-2000R CCD Camera (QImaging), using MetaMorph Advanced software 7.8.9 (Molecular Devices). Hoechst 33342 was imaged using the DAPI channel ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 350/470) and siRNA-Alexa647 was imaged using the Cy5 channel ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 649/666). All fluorescence images were carefully exported with constant scaling and range of greylevel. Experiment was realized in triplicate.

Comparison of the cellular uptake of the CSL3 and CSL4-based formulations over the 16-hour incubation period was assayed by flow cytometry. HeLa cells were seeded in 12-well plates (100 000 cells/well) and allowed to attach overnight. The next day, lipid nanoparticles (25 µL in dextrose 5%) and siRNA-Alexa488 (25 µL in dextrose 5%) were complexed in dextrose 5% (N/P ratio of 4; siRNA concentration 25 nM/well) and were diluted in Opti-MEM® (250 µL) and 1 mL of complete culture media (EMEM/FBS 90:10). The solution was then transferred onto the cells (1300 µL final volume/well) and the plate was incubated for 16 hours. After incubation, cells were rinsed three times with EMEM/FBS 90:10, once with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer (95% PBS, 5% FBS, 1.0 mM EDTA) for immediate analysis via flow cytometry. Experiment was realized in triplicate.

Lipid-mixing assay

The fusogenic potential of the CSL3/siRNA and CSL4/siRNA lipid nanoparticles was evaluated with an octadecyl Rhodamine B (R18) lipid-mixing assay.^{1,8} R18 was incorporated into the lipid nanoparticles at a self-quenched concentration of 6 mol%. Unlabeled 130 nm POPC vesicles were prepared in 5% dextrose using the manual extrusion method previously described (9 passages through a 200 nm polycarbonate membrane). R18 labeled lipid nanoparticles (CSL3/DSPC/cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by manual extrusion) were complexed with anti-GFP siRNA as described above (N/P ratio of 4, in 5% dextrose). These labeled lipid nanoparticles were mixed with unlabeled POPC vesicles in a buffer at pH 7.4 (5 mM HEPES with ionic strength adjusted to 150 mM with NaCl) or at pH 5 (50 mM acetic buffer with ionic strength adjusted to 150 mM with NaCl), as described below.

In 3000 µL of buffer containing unlabeled POPC vesicles (100 µM total lipid content in the cuvette) were added the labeled lipid nanoparticles/siRNA (50 µL volume; 10 µM total lipid content in the cuvette). The increasing fluorescence of R18 was monitored ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 556/590, slits 5 nm) using a Hitachi F-2710 Spectrophotometer equipped with a water circulated cell holder with stirring. All experiments were performed at 20°C under medium stirring. After 15 minutes, 4 µL of pure octaethylene glycol monododecyl ether (Sigma) detergent (2.5 mM final concentration in the cuvette) was added to obtain the 100% dequenched fluorescence intensity. Raw data were recorded continuously during the experiment. The percentage of membrane fusion activity at a given time t was defined as:

$$\% \text{fusion}_t = \left(\frac{I_t - I_o}{I_{100\%} - I_o} \right) \times 100$$

where I_o is the initial fluorescence intensity observed immediately after addition of labeled lipid nanoparticles; $I_{100\%}$ is the maximal fluorescence intensity value obtained after addition of detergent and I_t is the fluorescence intensity value measured at a given time t . Experiments were realized in triplicate.

Inhibition of GFP knockdown with Bafilomycin A1

In this experiment, HeLa/GFP cells were transfected with the CSL3-based lipid nanoparticles formulation (CSL3/DSPC/cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by manual extrusion) in the presence or absence of Bafilomycin A1, a known inhibitor of vacuolar H⁺ ATPases. HeLa/GFP cells were seeded in 12-well plates (40 000 cells/well) and allowed to attach overnight. The next day, cells were rinsed with Opti-MEM^{*} and pre-incubated 30 minutes with Bafilomycin A1 (600 nM/well, diluted in Opti-MEM^{*}) before incubation with lipid nanoparticles. Lipid nanoparticles and anti-GFP siRNA were complexed (N/P ratio of 4) as described above (for a final siRNA concentration of 10 and 25 nM/well). They were then diluted with Opti-MEM^{*}, containing Bafilomycin A1 for a final concentration of 600 nM/well. Residual DMSO in the assay was 0.06% v/v (treated cells and negative control). Cells were then incubated for 4 hours with the lipid nanoparticles. After incubation, cells were rinsed twice with Opti-MEM^{*} and 1 mL of complete culture media (EMEM/FBS 90:10 – with or without 600 nM Bafilomycin A1) was added. Cells were then incubated for 44 hours. After incubation, cells were rinsed with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer (95% PBS, 5% FBS, 1.0 mM EDTA) for immediate analysis via flow cytometry. GFP expression for each replicate (mean fluorescent intensity) was calculated relative to the control samples that did not receive any siRNA treatment. Experiments were realized in triplicate.

Comparison of the cellular uptake of the CSL3-based formulation in the presence or absence of Bafilomycin A1 over the 4-hour incubation period was assayed by flow cytometry. HeLa cells were seeded in 12-well plates (100 000 cells/well) and allowed to attach overnight. The next day, cells were rinsed with Opti-MEM^{*} and pre-incubated 30 minutes with Bafilomycin A1 (600 nM/well, diluted in Opti-MEM^{*}) before incubation with lipid nanoparticles. Lipid nanoparticles (25 µL in dextrose 5%) and siRNA-Alexa488 (25 µL in dextrose 5%) were complexed in dextrose 5% (N/P ratio of 4; siRNA concentration 25 nM/well) and were diluted with Opti-MEM^{*}, containing Bafilomycin A1 for a final concentration of 600 nM/well. This solution was then transferred onto the cells (1300 µL final volume/well) and the plate was incubated for 4 hours. After incubation, cells were rinsed three times with EMEM/FBS 90:10, one time with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer (95% PBS, 5% FBS, 1.0 mM EDTA) for immediate analysis via flow cytometry. Experiments were realized in triplicate.

Uptake inhibition by flow cytometry

HeLa cells were incubated with siRNA-Alexa488 packaged with the CSL3-based lipid nanoparticles formulation (CSL3/DSPC/cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by manual extrusion) in the presence or absence of endocytosis inhibitors. Inhibitors were used as follows: chlorpromazine (clathrin mediated endocytosis inhibitor) 10 µg/mL^{9,10}; genistein (caveolae mediated endocytosis inhibitor) 200 µM¹¹; Pitstop 2™ (clathrin and caveolae mediated endocytosis inhibitor) 20 µM¹²; EIPA (macropinocytosis inhibitor) 50 µM.¹³ Discrimination of the clathrin and caveolae uptake pathways was not intended, because of the rather questionable specificity of the pharmacological endocytosis inhibitors between these two pathways.^{12,14,15} Residual DMSO in the assay was 0.2% v/v (treated cells and negative control).

HeLa cells were seeded in 12-well plates (100 000 cells/well) and allowed to attach overnight. The next day, cells were rinsed with Opti-MEM® and pre-incubated 15 minutes with endocytosis inhibitors (diluted in Opti-MEM®) before incubation with lipid nanoparticles. Lipid nanoparticles and siRNA-Alexa488 were complexed in dextrose 5% (N/P ratio of 4; siRNA concentration 25 nM/well) and were diluted in Opti-MEM®. The solution was then transferred onto the cells (1300 µL final volume/well) and the plate was incubated for 1 or 6 hours. After incubation, cells were rinsed three times with Opti-MEM®/FBS 90:10, once with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer (95% PBS, 5% FBS, 1.0 mM EDTA) for immediate analysis *via* flow cytometry. Experiments were realized in triplicate.

Uptake inhibition was also confirmed by live-cell fluorescence microscopy. HeLa cells were routinely incubated 24 hours before imaging in 35 mm poly-d-lysine coated glass dishes (MatTek Corporation) at a density of 40 000 cells/dish. The next day, cells were rinsed with Opti-MEM® and pre-incubated 15 minutes with endocytosis inhibitors (diluted in Opti-MEM®) before incubation with lipid nanoparticles. siRNA-Alexa647 were complexed with lipid nanoparticles (N/P ratio of 4) as described previously (70 µL final volume). Complexes were then diluted with Opti-MEM® for a final siRNA concentration of 25 nM/dish. Cells were then incubated 1 hour with the lipid nanoparticles. After incubation, cells were rinsed twice with Opti-MEM®/FBS 90:10 and were stained with Hoechst 33342 (5 min, 2 µg/mL, Sigma). Cells were rinsed twice with Opti-MEM®/FBS 90:10 and were immediately imaged in a phenol red-free culture media (Opti-MEM®/FBS 90:10). Imaging of HeLa cells was performed using an Olympus IX81 fluorescent microscope equipped with a Plan Apo N 60X 1.42 NA silicone

objective (Olympus Canada Inc.) and a 12 bits Retiga-2000R CCD Camera (QImaging), using MetaMorph Advanced software 7.8.9 (Molecular Devices). Hoechst 33342 was imaged using the DAPI channel ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 350/470) and siRNA-Alexa647 was imaged using the Cy5 channel ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 649/666). All fluorescence images were carefully exported with constant scaling and range of greylevel. Experiments were realized in triplicate.

Lipid nanoparticle preparation by microfluidic mixing

Lipid nanoparticles were prepared according to previously reported procedures^{16,17}, using a Nanoassembler™ microfluidic instrument with herringbone rapid mixing features (Precision Nanosystems, Vancouver, BC, Canada). Cationic switchable lipids, DSPC, cholesterol and DMG-PEG₂₀₀₀ were solubilized in ethanol at a molar ratio of 50:10:37.5:2.5. siRNA was diluted in 25 mM sodium acetate buffer pH 4.0. The siRNA/total lipid mass ratio was ~0.06, corresponding to a N/P ratio of 4. The two solutions were mixed at a flow rate of 12 mL/min, at a siRNA solution/lipid solution ratio of 3:1. Total volume of a batch is typically 2 mL (1.5 mL siRNA solution mixed with 0.5 mL of lipid solution). Nanoparticles were then dialyzed against saline (NaCl 0.9%) using Pur-A-Lyzer™ Maxi dialysis tubes MWCO 12-14 kDa (Sigma). If needed, nanoparticles were concentrated using Amicon Ultra-0.5 30K centrifugal filters device (EMD Millipore, Etobicoke, ON, Canada). Nanoparticles were then sterile filtered using a 0.2µm polyethersulfone 13 mm syringe filter (Pall Corporation, Mississauga, ON, Canada) and stored at 4°C until use. The siRNA encapsulation efficiency was quantified using a Ribogreen RNA quantitation assay (Thermo Scientific).¹⁸ Nanoparticle size was measured by Dynamic Light Scattering in saline (0.9% NaCl) at 20°C as previously described.

The final siRNA concentration was determined via ion-pairing reversed phase liquid chromatography, according to a previously reported procedure.¹⁹ siRNA were analyzed using a Waters Xterra® MS C₁₈ column (2.1x50mm, 2.5 µm particle size) at 60°C on an Agilent 1100 HPLC system, with UV detection at 260 nm. Mobile phase A was 95% 0.1M triethylamine ammonium acetate (TEAA) pH 7.0 and 5% acetonitrile. Mobile phase B was 80% 0.1M TEAA pH 7.0 and 20% acetonitrile. The gradient changes from 0% to 70% mobile phase B for 12 min with a flow rate of 0.4 mL/min. Injection volume was 6 µL. Calibration curves of siRNA duplex usually ranges from 20 to 100 µg/mL. Before analysis, an aliquot of the lipid nanoparticle formulation was diluted with 200 mM TEAA pH 7.0 + 2% (v/v) C₁₂E₈ detergent to liberate encapsulated siRNA.

Biodistribution and ex-vivo imaging in mice

All procedures used in animal studies were approved by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux (CDEA – Animal Care and Ethical Committee) of the University of Montreal and were consistent with local, state and federal regulations. Mice were maintained at the animal facilities of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) at the University of Montreal, and were housed under standard conditions. Food and water were provided *ad libitum*. Animals were acclimated to the animal facility for at least one week before experiments. Prior to injection, lipid nanoparticles formulations were diluted with saline (NaCl 0.9%) at siRNA concentrations such that each mouse was administered a dose of 10µL/g body-weight.

8-week-old male CD-1 mice (Charles River, Saint-Constant, QC, Canada) were injected intravenously *via* the tail vein with CSL3-based lipid nanoparticles (CSL3/DSPC/cholesterol/DMG-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by microfluidic mixing) formulated with siRNA labeled with Cy5 on the sense strand, unformulated free siRNA-Cy5 or saline at a siRNA dose of 1.5 mg/kg. 4-hour post injection, mice were euthanized by CO₂ inhalation and organs (brain, lungs, heart, liver, spleen, kidneys) were immediately harvested and imaged using a Optix MX3 optical imaging system (Advanced Research Technologies, Montreal, QC, Canada). Data was processed using the OptiView® software from Advanced Research Technologies. Normalized photon counts (fluorescence intensity) was normalized by wet mass of organs. Experiments were realized in triplicate.

Serum stability study

This study was conducted as previously described by Zhou *et al.*²⁰ In order to estimate the stability of CSL3-based LNP (CSL3/DSPC/cholesterol/DMG-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by microfluidic mixing) in the presence of plasma, DLS measurements of LNP/siRNA incubated into PBS, PBS/FBS 90:10 or PBS/FBS 50:50 (v/v) were realized using a Malvern Zetasizer Nano ZS (thermostated at 37°C, automatic algorithm mode). For the storage stability study in PBS, LNP were kept at +4°C between each measurement. Experiments were realized in triplicate.

In vivo Factor VII silencing in mice

Prior to injection, lipid nanoparticles formulations (CSL/DSPC/cholesterol/DMG-PEG₂₀₀₀ 50:10:37.5:2.5 mol% - made by microfluidic mixing) were diluted with saline (NaCl 0.9%) at siRNA concentrations such that each mouse was administered a dose of 10µL/g body-weight. 6 to 8-weeks old female C57BL/6 mice (Charles River, Saint-Constant, QC, Canada) received tail vein intravenous injection of saline (negative control, n=6) or LNP containing anti-Factor VII siRNA (n=4). After 48h, mice were euthanized and blood was collected *via* intracardiac sampling on citrate tubes. Serum was separated from whole blood using serum separation tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and residual serum FVII levels were determined using the Biophen VII chromogenic assay (Aniara, West Chester, OH, USA) according to manufacturer's protocol. A standard curve was constructed using samples from saline-injected mice (pooled plasma, n=6) and relative Factor VII expression was determined by comparing treated groups to the standard curve.

References

- 1 W. Viricel, A. Mbarek and J. Leblond, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**, 12743–12747.
- 2 M. Frank-Kamenetsky, A. Grefhorst, N. N. Anderson, T. S. Racie, B. Bramlage, A. Akinc, D. Butler, K. Charisse, R. Dorkin, Y. Fan, C. Gamba-Vitalo, P. Hadwiger, M. Jayaraman, M. John, K. N. Jayaprakash, M. Maier, L. Nechev, K. G. Rajeev, T. Read, I. Röhl, J. Soutschek, P. Tan, J. Wong, G. Wang, T. Zimmermann, A. de Fougerolles, H.-P. Vornlocher, R. Langer, D. G. Anderson, M. Manoharan, V. Koteliansky, J. D. Horton and K. Fitzgerald, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 11915–11920.
- 3 K. T. Love, K. P. Mahon, C. G. Levins, K. A. Whitehead, W. Querbes, J. R. Dorkin, J. Qin, W. Cantley, L. L. Qin, T. Racie, M. Frank-Kamenetsky, K. N. Yip, R. Alvarez, D. W. Y. Sah, A. de Fougerolles, K. Fitzgerald, V. Koteliansky, A. Akinc, R. Langer and D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 1864–1869.
- 4 D. A. Hay, F. M. Adam, G. Bish, F. Calo, R. Dixon, M. J. Fray, J. Hitchin, P. Jones, M. Paradowski, G. C. Parsons, K. J. W. Proctor, D. C. Pryde, N. N. Smith and T.-D. Tran, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 5728–5732.
- 5 EP2781519 (A1), 2014.
- 6 C. Riemer, E. Borroni, B. Levet-Trafit, J. R. Martin, S. Poli, R. H. P. Porter and M. Bös, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 1273–1276.
- 7 S. Poirier, M. Mamarbachi, W.-T. Chen, A. S. Lee and G. Mayer, *Cell Rep.*, 2015, **13**, 2064–2071.
- 8 L. Yao, J. Daniels, D. Wijesinghe, O. A. Andreev and Y. K. Reshetnyak, *J. Controlled Release*, 2013, **167**, 228–237.
- 9 T. dos Santos, J. Varela, I. Lynch, A. Salvati and K. A. Dawson, *PLoS ONE*, 2011, **6**, e24438.
- 10 K. von Gersdorff, N. N. Sanders, R. Vandenbroucke, S. C. De Smedt, E. Wagner and M. Ogris, *Mol. Ther.*, 2006, **14**, 745–753.
- 11 J. Rejman, A. Bragonzi and M. Conese, *Mol. Ther.*, 2005, **12**, 468–474.
- 12 D. Dutta, C. D. Williamson, N. B. Cole and J. G. Donaldson, *PLoS ONE*, 2012, **7**, e45799.
- 13 J. Gilleron, W. Querbes, A. Zeigerer, A. Borodovsky, G. Marsico, U. Schubert, K. Manygoats, S. Seifert, C. Andree, M. Stöter, H. Epstein-Barash, L. Zhang, V. Koteliansky, K. Fitzgerald, E. Fava, M. Bickle, Y. Kalaidzidis, A. Akinc, M. Maier and M. Zerial, *Nat. Biotechnol.*, 2013, **31**, 638–646.
- 14 A. K. Willox, Y. M. E. Sahraoui and S. J. Royle, *Biol. Open*, 2014, BIO20147955.
- 15 D. Vercauteren, R. E. Vandenbroucke, A. T. Jones, J. Rejman, J. Demeester, S. C. De Smedt, N. N. Sanders and K. Braeckmans, *Mol. Ther.*, 2010, **18**, 561–569.
- 16 B. L. Mui, Y. K. Tam, M. Jayaraman, S. M. Ansell, X. Du, Y. Y. C. Tam, P. J. Lin, S. Chen, J. K. Narayananair, K. G. Rajeev, M. Manoharan, A. Akinc, M. A. Maier, P. Cullis, T. D. Madden and M. J. Hope, *Mol. Ther. — Nucleic Acids*, 2013, **2**, e139.
- 17 Y. Zhang, J. M. Pelet, D. A. Heller, Y. Dong, D. Chen, Z. Gu, B. J. Joseph, J. Wallas and D. G. Anderson, *Adv. Mater.*, 2013, **25**, 4641–4645.
- 18 C. Walsh, K. Ou, N. Belliveau, T. Leaver, A. Wild, J. Huft, P. Lin, S. Chen, A. Leung, J. Lee, C. Hansen, R. Taylor, E. Ramsay and P. Cullis, in *Drug Delivery System*, ed. K. K. Jain, Springer New York, 2014, pp. 109–120.
- 19 V. Murugaiah, W. Zedalis, G. Lavine, K. Charisse and M. Manoharan, *Anal. Biochem.*, 2010, **401**, 61–67.
- 20 K. Zhou, L. H. Nguyen, J. B. Miller, Y. Yan, P. Kos, H. Xiong, L. Li, J. Hao, J. T. Minnig, H. Zhu and D. J. Siegwart, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, **113**, 520–525.