



HAL
open science

Electrophorèse capillaire et analyse de la dispersion de Taylor pour l'étude des interactions antigènes/adjuvants dans les vaccins et la caractérisation des formulations vaccinales à ARN messenger

Camille Malburet

► **To cite this version:**

Camille Malburet. Electrophorèse capillaire et analyse de la dispersion de Taylor pour l'étude des interactions antigènes/adjuvants dans les vaccins et la caractérisation des formulations vaccinales à ARN messenger. Autre. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTTS126 . tel-03646686

HAL Id: tel-03646686

<https://theses.hal.science/tel-03646686v1>

Submitted on 19 Apr 2022

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En ingénierie biomoléculaire

Ecole Doctorale Sciences Chimiques Balard - ED 459
Institut des Biomolécules Max Mousseron
Equipe Dynamique des Systèmes Biomoléculaires Complexes

Electrophorèse capillaire et analyse de la dispersion de Taylor
pour l'étude des interactions antigènes/adjuvants dans les vaccins
et la caractérisation des formulations vaccinales à ARN messenger

Présentée par Camille Malburet
Le 17 décembre 2021

Devant le jury composé de

Serge Rudaz, Professeur, Université de Genève, Suisse
Marianne Fillet, Professeur, Université de Liège, Belgique
François Couderc, Professeur, Université de Toulouse III, France
Michel Martin, DR CNRS, ESPCI ParisTech, France
Laurent Leclercq, CR CNRS, IBMM, France
Hervé Cottet, Professeur, Université de Montpellier, France

Rapporteur
Rapporteur
Président du Jury
Examineur
Co-directeur de thèse
Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Je remercie tout d'abord mon directeur et mon co-directeur de thèse Hervé Cottet et Laurent Leclercq. Merci pour tout ce que vous m'avez appris. Merci pour vos idées, votre pédagogie et votre rigueur. J'ai apprécié chacune de nos réunions. Merci pour toutes nos discussions. Ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Merci à Jean-François Cotte mon encadrant industriel, qui a su gérer la coordination des projets, en arrêter certains, en prioriser d'autres pour aller le plus loin possible. Merci pour ton soutien et tes conseils. Merci à Jérôme Thiebaud mon co-encadrant industriel pour son enthousiasme et sa bienveillance. Merci pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions et avoir été une source de conseils et de réflexions.

Merci aux rapporteurs Marianne Fillet, Serge Rudaz, François Couderc et Michel Martin pour le temps qu'ils auront accordé à mon travail et pour leurs commentaires.

Merci à l'entreprise Sanofi Pasteur pour avoir financé mon travail de recherche. Merci à Stephanie Prizzon et à Olivier Pitiot pour avoir pu rendre cette thèse possible.

Merci à Joseph Chamieh pour ses remarques toujours pertinentes qui m'ont débloqué plus d'une fois et pour son humour sarcastique comme il en faudrait plus. Merci également à Philippe Gonzalez, Anna Domènech Tarrat, Xiaoling Leclercq, Jean-Philippe Biron, Jean-Christophe Rossi et Laurent Boiteau pour leur aide et tous les moments passés ensemble.

Merci à Phu Cao Ngoc pour avoir partagé sa culture sans filtre, pour sa gentillesse et sa solidarité. Merci à Charly Renard et à Mihail Deleanu, pour les soirées jeux et les intéressants débats que nous avons eus devant nos CE. Merci à Sébastien Roca pour ton humour, ton énergie et nos discussions. Merci à Laura Dhellemmes et à Quentin Pereyra, j'ai adoré tous les moments que nous avons passés ensemble.

Merci à Coline Canovas, Emilie Bazin, Marie Garinot, Sergio Marco, Marie-Claire Nicolai et à Patrick Bonifassi pour votre aide sur les projets et pour les bons moments passés ensemble.

Remerciements

Merci aux managers de mes précédents stages et emplois, Pierre Hennebert, Laure Pujol, Myriam Sohn, Bernd Herzog, Stephanie Acker, Stephanie Spataro, Cosette Lair, Laurent Simon et Fabien Valadon, vous m'avez permis d'en arriver ici, vous avez eu confiance en moi, m'avez donné des responsabilités et m'avez montré mon potentiel dans des domaines aussi divers qu'enrichissants.

Merci à Isabelle Constant, Marine Cordera, Vincent Rumin, Thomas Dumont, Raphaël Faucher, Florent Giordanengo, Alizée Olivares, Camille Ferreri, Corentin Lambert, Samy Vial, Robin Szymanski, Amélie Schultheiss, Igor Agapi et Florian Hopp pour avoir été à mes côtés ces dernières années.

Merci à Nicolas Malburet pour avoir été un exemple de rationalité et d'intégrité tout au cours de ma vie.

Merci à mes parents pour m'avoir montré ce qu'était entreprendre et travailler pour soi. Merci à ma mère pour m'avoir appris à être consciencieuse et fiable. Merci à mon père pour avoir été un modèle de franchise, pour son humour cynique et pour m'avoir transmis une fraction de son intelligence et beaucoup de son entêtement.

Last but not least, Terry Cristinelli thank you for lifting me up and keeping me grounded.

Sommaire

Liste des abréviations	8
Introduction Générale.....	9
Chapitre I. Etude bibliographique	13
1 Contexte de l'étude	13
1.1 Principe de la vaccination.....	13
1.2 Histoire de la vaccination	13
1.3 Les différentes catégories de vaccins	15
1.4 Les adjuvants	19
1.5 Les autres composants d'un vaccin	22
1.6 Les interactions antigènes-adjuvants	22
2 Caractérisation des interactions entre les antigènes et les adjuvants	27
2.1 Equilibres chimiques et isothermes d'adsorption.....	27
2.2 Méthodes analytiques pour l'étude et la caractérisation des interactions.....	38
2.3 Etat de l'art de la caractérisation des interactions antigènes-adjuvants.....	64
3 Caractérisation des formulations vaccinales ARNm-LNP.....	78
3.1 Différents types d'ARN.....	78
3.2 Synthèse des ARNm.....	79
3.3 Éléments structurels.....	80
3.4 Systèmes de délivrance intracellulaire.....	82
3.5 Constituants des LNPs.....	86
3.6 Formulation des LNPs	89
3.7 Délivrance intracellulaire des LNPs	92
3.8 Caractéristiques physicochimiques affectant la délivrance intracellulaire	93
3.9 Méthodes de caractérisation	96
3.10 Applications thérapeutiques	104
3.11 Directives des agences règlementaires	106
4 Conclusion.....	108
5 Références	109
Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par analyse frontale continue en électrophorèse capillaire (FACCE)	123
Article 1. Study of interactions between antigens and polymeric adjuvants in vaccines by frontal analysis continuous capillary electrophoresis	124
Abstract.....	124
Graphical abstract	125
1 Introduction	125
2 Materials and methods	128
2.1 Chemicals	128
2.2 Sample preparation	128
2.3 FACCE	129
3 Theoretical background.....	129
3.1 Isotherm of adsorption.....	129
3.2 Model of n independent sites of equal energy	130
3.3 Scatchard representation.....	131

3.4	Free ligand concentration	132
4	Results and Discussion	133
4.1	Development and optimization of the FACCE methodology	133
4.2	Adsorption isotherms.....	136
4.3	Impact of the ionic strength on antigen-adjuvant interactions	138
4.4	Impact of the adjuvant concentration on the interactions.....	140
4.5	Impact of the adjuvant molar mass.....	142
4.6	The case of the vaccine antigen in development	143
5	Conclusion.....	145
6	Supporting information	146
6.1	Influence of the co-hydrodynamic pressure on the adsorption.....	146
6.2	Optimization of the capillary washing conditions.....	146
6.3	Adsorption isotherms of lysozyme on SPA09 for both addition orders.....	147
7	References	147
Chapitre III. Etude des interactions antigens / adjuvants par analyse de dispersion de Taylor :		
caractérisation de la taille et paramètres de liaison		152
Article 2. Antigen-adjuvant interactions in vaccines by Taylor dispersion analysis: size		
characterization and binding parameters.....		153
Abstract.....		153
Graphical abstract		153
1	Introduction	154
2	Experimental section	156
2.1	Chemicals and Materials	156
2.2	Sample preparation.....	156
2.3	Capillary coating.....	157
2.4	TDA	157
2.5	Transmission electron microscopy (TEM).....	157
3	Results and discussion.....	158
3.1	Development and optimization of TDA for the study of antigen/adjuvant interactions.....	158
3.2	Determining the complex size and the free antigen concentration.....	160
3.3	Size comparison between TDA and TEM	163
3.4	Adsorption isotherms.....	164
3.5	TDA / FACCE comparison	167
4	Conclusions	169
5	Supporting information	169
5.1	Theoretical background on TDA.....	169
5.2	Gaussian fit of the first derivative of the elution front	171
5.3	Influence of capillary coatings and mobilization pressures.....	172
5.4	Study of viscosity impact	173
5.6	Taylorgrams obtained for the isotherm of adsorption	174
6	References	175
Chapitre IV. Séparation de trois souches de poliovirus par électrophorèse capillaire et étude de		
leur interaction avec l'oxyhydroxyde d'aluminium.		178
Article 3. Separation of three strains of polio virus by capillary zone electrophoresis and study of		
their interaction with aluminum oxyhydroxide.....		179

Abstract	179
Graphical abstract.....	180
1 Introduction	180
2 Experimental section	182
2.1 Chemicals and Materials	182
2.2 Sample preparation	182
2.3 Capillary coating.....	183
2.4 CE	183
3. Results and discussion.....	183
3.1 Optimization of the separation of multiple proteins/antigens by CZE.....	183
4. Conclusions	190
5 References	191
Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des nanoparticules lipidiques pour les vaccins à ARNm.....	195
Article 4. Size and charge characterization of lipid nanoparticles for mRNA vaccines	196
Abstract	196
Graphical abstract.....	196
1 Introduction	197
2 Experimental Section	199
2.1 Chemicals and Materials	199
2.2 Formulation of LNPs	200
2.3 Taylor Dispersion Analysis (TDA)	200
2.4 Dynamic Light Scattering (DLS) and Laser Doppler Electrophoresis (LDE)	202
3 Results and Discussion.....	203
3.1 TDA method development for the characterization of LNP size and size distribution.....	203
3.2 Comparison between TDA and DLS for LNPs size analysis	207
3.3 Characterization of LNPs global charge by CE.....	209
4 Conclusions	213
5 Supporting information	214
5.1 Chemical formula of the lipids used in the formulation	214
5.2 PEO, Ultratrol LN and DDAB-DLPC capillary coating protocols.....	214
5.3 Calculation of the viscosity of PBS and LNP solutions	215
5.4 CRLI Fit.....	216
6 References	218
Chapitre VI. Analyse de la dispersion de Taylor pour le développement des formulations de nanoparticules lipidiques pour les vaccins à ARNm.....	222
Article 5. Taylor dispersion analysis to support LNP formulations for mRNA vaccines.....	223
Abstract	223
Graphical abstract.....	223
1 Introduction	224
2 Materials and Methods	225
2.1 Chemicals and Materials	225
2.2 Formulation of LNPs	226
2.3 Taylor Dispersion Analysis (TDA)	227
2.4 Dynamic Light Scattering (DLS)	228

2.5	Encapsulation efficiency by Ribogreen assay	228
3	Results	229
3.1	Lipid nanoparticles (LNPs) formulation.....	229
3.2	Characterization of LNPs size and size distribution by TDA and DLS	230
3.3	Study of the degradation of mRNA in the presence of ribonucleases	233
3.4	Calculation of mRNA encapsulation efficiency by TDA.....	234
4	Discussion	236
5	Supporting information	239
5.1	Two-Gaussian fit of the elution profiles obtained by TDA.....	239
5.2	Polydispersity curves obtained by DLS.....	240
5.3	Polydispersity curves obtained by TDA.....	241
5.4	Study of mRNA degradation with voluntary addition of RNase A.....	242
	Conclusion générale et perspectives.....	246
	Résumé en Français.....	250
	Résumé en Anglais.....	251

Liste des abréviations

FACCE: Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis
TDA: Taylor Dispersion Analysis
CZE: Capillary Zone Electrophoresis
DLS: Dynamic Light Scattering
LDE: Laser Doppler Electrophoresis
TEM: Transmission electron microscopy
ITC: Isothermal Titration Calorimetry
DSC: Differential Scanning Calorimetry
SPR: Surface Plasmon Resonance
SEC: Size Exclusion Chromatography
mRNA: messenger RiboNucleic Acid
FLuc: Firefly Luciferase
LNP: Lipid NanoParticle
IVT: *in vitro* transcribed
Cyt C: Cytochrome C
RNase A: RiboNuclease A
BSA: Bovine Serum Albumin
LYZ: LYsoZyme
BLG: β -LactoGlobulin
MB: MyoGlobin
PrSA: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase from *S. aureus*
SPA09: PAA: polyacrylic acid
AlOOH: Aluminium Oxyhydroxide
IPV: Inactivated Poliomyelitis Vaccine
HPC: HydroxyPropyl Cellulose
PB: Polybrene
DMF: DiMethylFormamide
EACA: ϵ -aminocaproic acid, 6-aminohexanoic acid
 β -ala: β -alanine, 3-aminopropionic acid
CQAs: Critical Quality Attributes

Introduction Générale

L'objectif de cette thèse a été dans un premier temps d'évaluer les performances de l'électrophorèse capillaire (CE) et de l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA) pour l'étude des interactions antigène-adjuvant dans les vaccins. Dans un second temps, au vu de l'accélération du développement des vaccins à base d'acide nucléique, un nouvel objectif a été défini consistant à étudier et à caractériser les formulations vaccinales à ARN messenger (ARNm) par CE et TDA. Il s'agit d'une thèse CIFRE qui résulte de la collaboration entre l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) à Montpellier et l'entreprise pharmaceutique Sanofi Pasteur à Marcy-l'Etoile.

Dans un vaccin, les antigènes sont les molécules qui induisent la réponse immunitaire protectrice contre un ou plusieurs pathogènes. Dans le cas des vaccins sous-unitaires, seuls une ou des parties spécifiques du pathogène sont injectés. Comme ces sous-unités (protéines, polysaccharides, conjugués) sont incapables de provoquer les maladies, les vaccins sous-unitaires sont considérés comme très sûrs, ils sont également bien tolérés, mais sont souvent moins immunogènes que les vaccins à germes entiers vivants atténués ou inactivés. C'est pourquoi il est parfois nécessaire d'ajouter un adjuvant dans la formulation vaccinale. Les adjuvants sont des substances utilisées pour moduler et renforcer la réponse immunitaire induite par les antigènes. Les interactions entre les antigènes et les adjuvants peuvent avoir un impact significatif sur la réponse immunitaire. Le développement d'un candidat vaccin implique donc de prendre en compte et d'étudier précisément les mélanges antigènes/adjuvants, ainsi que leurs potentielles interactions. Or, les interactions antigènes/adjuvants sont souvent difficiles à étudier compte-tenu de la complexité de chacun des partenaires, de leur faible concentration et du grand nombre de constituants dans la formulation finale. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles méthodologies analytiques pour l'étude de ces interactions.

Les méthodes électrophorétiques ont déjà fait leurs preuves concernant la caractérisation des interactions en solution d'une grande variété de systèmes physicochimiques. L'analyse frontale continue en électrophorèse capillaire (*frontal analysis continuous capillary electrophoresis*, FACCE) est une technique permettant de quantifier la concentration en ligand libre à l'équilibre

dans un mélange ligand/substrat, et ainsi de déterminer expérimentalement l'isotherme d'adsorption. De cette isotherme, il est possible d'extraire les paramètres d'interaction (stœchiométrie, constante d'interaction de site). D'autre part, l'analyse de la dispersion de Taylor (*Taylor dispersion analysis*, TDA) est une technique analytique permettant la mesure des coefficients de diffusion et des rayons hydrodynamiques (R_h) de nanoparticules. Cette technique est applicable à l'étude de complexes et permet d'observer une large gamme de R_h allant de l'angström au sub-micron. Ainsi, avec un même appareillage d'électrophorèse capillaire, il peut être possible d'obtenir des informations, à la fois sur les interactions antigène/adjuvant, et sur la taille des complexes formés. A notre connaissance, les techniques FACCE et TDA n'ont jamais été employées pour l'étude des interactions antigène/adjuvant dans le domaine des vaccins.

Les vaccins ARNm sont devenus récemment une alternative prometteuse aux approches vaccinales conventionnelles. Ces vaccins ne contiennent pas des antigènes classiques, mais les informations nécessaires pour produire un antigène en utilisant la machinerie cellulaire humaine. Ceci est proche du processus des infections virales naturelles, où l'information génétique virale est utilisée pour produire des protéines virales à partir d'une cellule hôte. L'utilisation de vaccin ARNm présente plusieurs avantages par rapport aux vaccins à germes entiers, sous-unitaires ou à base d'ADN. En effet, l'ARNm est une plateforme non infectieuse qui n'a pas besoin d'entrer dans le noyau cellulaire pour être efficace et qui a un potentiel de développement et de fabrication rapide. Les vaccins à ARNm sont fabriqués en utilisant des processus définis, quel que soit l'antigène codé par l'ARNm, ce qui permet de simplifier la production et le contrôle qualité de ces vaccins et de réduire les délais de développement et de mise sur le marché. L'utilisation de l'ARNm a cependant longtemps été freinée par l'instabilité de l'ARNm nu et par l'inefficacité de son administration intracellulaire. Or, l'efficacité des vaccins ARNm repose sur la capacité de l'ARNm à atteindre le cytoplasme des cellules, où il peut être traduit en antigène d'intérêt permettant de déclencher la réponse immunitaire. Les progrès récents concernant la structure de l'ARNm transcrit *in vitro* (*in vitro transcribed*, IVT) et les vecteurs de délivrance d'ARNm ont permis de surmonter ces problèmes, permettant le développement de nouveaux vaccins préventifs et thérapeutiques basés sur la technologie de l'ARN messenger.

Les nanoparticules lipidiques (*lipid nanoparticles*, LNPs) sont actuellement les vecteurs non viraux les plus avancés sur le plan clinique pour l'administration *in vivo* d'ARNm. Les LNPs ne sont pas de simples vecteurs, mais jouent un rôle actif dans l'efficacité vaccinale. La taille et la charge des LNPs sont des paramètres critiques qui impactent leur comportement *in vivo*. En effet, la taille des nanoparticules est connue pour influencer la voie d'internalisation cellulaire et la pharmacocinétique des LNPs. D'autre part, la caractérisation de la taille des LNPs est d'une importance majeure lors des études de stabilité pour vérifier qu'il n'y a pas d'agrégation ou de fusion entre les nanoparticules. La charge joue également un rôle clé dans l'internalisation cellulaire, dictant le transport des particules à travers les barrières biologiques. Enfin, la taille et la charge sont deux paramètres qui peuvent être optimisés pour cibler spécifiquement certains organes, ce qui est primordial pour de nombreuses applications thérapeutiques.

L'optimisation des formulations de vaccins à ARNm nécessite le développement de nouvelles méthodes analytiques pour caractériser la taille et la charge des LNPs, mieux comprendre les limites actuelles, et challenger les méthodes analytiques existantes. L'électrophorèse capillaire doit permettre de déterminer la densité de charge de surface de ces nanoparticules (sous champ électrique) et la TDA doit permettre de caractériser leur taille (avec le même appareillage sans application de champ électrique).

Afin de mieux appréhender le travail effectué dans cette thèse, le premier chapitre présente le principe et l'histoire de la vaccination ainsi que les différents types de vaccins et d'adjuvants. Puis la caractérisation des interactions antigènes/adjuvants est développée en rappelant les différents modèles théoriques permettant de décrire les interactions ainsi que les méthodes analytiques couramment utilisées pour leur étude. Enfin, ce premier chapitre se termine sur la présentation des formulations vaccinales ARNm-LNP et leur caractérisation, avec des informations sur la synthèse des ARNm et la formulation des LNPs. Les caractéristiques physicochimiques affectant la délivrance intracellulaire et les méthodes de caractérisations associées sont aussi abordées.

Le deuxième chapitre montre le développement d'une méthodologie d'analyse frontale continue en électrophorèse capillaire (FACCE) pour l'étude des interactions entre un adjuvant polymérique

anionique (acide polyacrylique, SPA09) et un antigène vaccinal cationique en développement pour le traitement du staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*).

Dans le troisième chapitre, le même couple antigène-adjuvant a été étudié par analyse de la dispersion de Taylor (TDA) afin de déterminer la taille des complexes antigène-adjuvant et les paramètres d'interaction. Les tailles de complexes obtenues par TDA ont été comparées aux résultats obtenus par microscopie électronique à transmission (MET) et les paramètres d'interaction ont été comparés aux résultats précédemment obtenus par FACCE.

Le quatrième chapitre présente le développement d'une méthodologie d'analyse par électrophorèse capillaire de zone (CZE) pour l'étude des interactions antigène-adjuvant dans le cadre de combinaisons vaccinales contenant des mélanges d'antigènes. La méthodologie développée a été utilisée pour séparer trois souches de poliovirus inactivé et étudier leur interaction avec l'oxyhydroxyde d'aluminium (AlOOH), un adjuvant couramment utilisé dans les formulations vaccinales commerciales.

Dans le cinquième chapitre, une méthode d'analyse de la dispersion de Taylor (TDA) a été mise au point pour caractériser la taille et la polydispersité des LNPs encapsulant l'ARN messager. L'électrophorèse capillaire (CE) a également été utilisée pour déterminer la charge des LNPs. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et par électrophorèse laser doppler (LDE).

Enfin, dans le sixième chapitre, différents paramètres de formulation impactant la taille des LNPs ont été étudiés. La taille et la polydispersité des différentes formulations ont été déterminées par TDA et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par DLS. La TDA a également été employée pour étudier la dégradation de l'ARNm en présence de RNase et pour calculer le taux d'encapsulation de l'ARNm dans les LNPs.

Chapitre I. Etude bibliographique

1 Contexte de l'étude

1.1 Principe de la vaccination

La vaccination est l'action d'introduire dans l'organisme une entité biologique dérivée d'un pathogène capable de stimuler le système immunitaire afin de protéger l'organisme d'une future infection par ce même pathogène.

1.2 Histoire de la vaccination

Bien avant que le concept moderne de la vaccination ait été découvert, de nombreux essais de stimulation du système immunitaire afin de protéger l'organisme d'une future infection furent réalisés à travers les siècles. Les premiers essais documentés et largement pratiqués à travers le monde concernent la variolisation.¹ Il était connu qu'une personne survivant à la variole était par la suite immunisé contre cette maladie. Ainsi, la variolisation consistait en la mise en contact volontaire d'un individu avec le virus de la variole prélevé sur un sujet faiblement malade. La variolisation semble s'être développée en Asie Centrale au début du deuxième millénaire, puis s'être étendue vers l'ouest jusqu'à la Turquie, en Afrique puis enfin à l'Europe au début du XVIII^{ème} siècle.²

Au 18^{ème} siècle, le corps médical était déjà bien organisé en Europe, et comme il y avait une importante demande de protection contre la variole, les médecins ont rapidement commencé la procédure de variolisation à grande échelle. Cependant, la variolisation était loin d'être sans risques. En effet, 2 à 3% des personnes variolées décédaient des suites de la maladie ou souffraient d'autres maladies transmises par la procédure. Le taux de mortalité associé à la variolisation était néanmoins 10 fois inférieur à celui associé à la variole elle-même.²

Le concept moderne de vaccination a été introduit par Edward Jenner à la fin du XVIII^{ème} siècle. Il était connu que les laitières étaient naturellement protégées contre la variole après avoir souffert de la vaccine. La vaccine communément appelée « variole de la vache » est un virus proche de celui

Chapitre I. Etude bibliographique

de la variole humaine. En utilisant cette observation, Edward Jenner établit que la vaccine pouvait être transmise d'une personne à une autre et utilisée comme mécanisme délibéré de protection. Ainsi, il lança des essais et inocula des individus avec la vaccine. Les résultats de cette enquête ont confirmé sa théorie, les personnes ayant participé aux essais se sont avérées protégées contre la variole.² En dépit des erreurs et des nombreuses controverses, l'utilisation de la vaccination se répandit rapidement en Angleterre et, en 1800, elle avait également atteint la plupart des pays européens. Les travaux de Jenner sur la vaccination contre la variole détiennent le titre de la première tentative scientifique visant à contrôler une maladie infectieuse à grande échelle par un moyen autre que la transmission de la maladie elle-même. Au cours des premières décennies du XIX^{ème} siècle, le transfert de bras à bras était la principale méthode de vaccination humaine. D'autres maladies reconnues, telles que la syphilis et la tuberculose, étaient parfois transmises avec le vaccin. Il était urgent de trouver un moyen alternatif de vacciner et de garantir un approvisionnement régulier en vaccin.

Les travaux de Louis Pasteur sur l'atténuation de la bactérie choléra du poulet à la fin des années 1870 constituent la première avancée majeure après les travaux d'Edward Jenner. Contrairement à ce qui était le cas dans la vaccination contre la variole, on ne se sert pas, comme vaccin, d'un virus bénin fourni par la nature, mais on provoque artificiellement l'atténuation d'une souche, initialement très virulente. De plus, cette avancée permet de remplacer la vaccination de personne à personne par quelque chose de plus sûr, moins susceptible de transmettre d'autres maladies.¹ Au début du XX^{ème} siècle, cinq vaccins humains étaient utilisés: le vaccin antivariolique original de Jenner, le vaccin antirabique de Pasteur, et trois vaccins bactériens contre la fièvre typhoïde, le choléra et la peste. De plus, la vaccination avec de l'antitoxine diphtérique ou tétanique était une pratique acceptée. La deuxième moitié du XX^{ème} siècle peut véritablement être qualifiée d'âge d'or du développement du vaccin. Cela est dû principalement à la capacité de développer des virus dans des cultures cellulaires et a permis l'émergence de plusieurs vaccins viraux tels que les ceux contre la fièvre jaune et contre la grippe. Après les avancées en matière de culture cellulaire, la biotechnologie et la biogénétique ont permis à la vaccination de continuer à progresser. Ces progrès ont permis le développement d'un vaccin contre l'hépatite B, au début des années 80, qui permet notamment une diminution des cancers du foie. Les progrès en matière de synthèse artificielle et

les travaux sur les capsules qui entourent les bactéries ont également conduit à la mise au point de vaccins contre les pneumocoques et méningites.

Enfin, au début des années 90, une équipe de chercheurs a montré que l'injection directe d'ARNm transcrit *in vitro* (IVT) dans le muscle squelettique de souris conduisait à l'expression de la protéine codée par l'ARNm.³ Ce rapport montre pour la première fois la possibilité d'utiliser l'ARNm IVT à des fins thérapeutiques. Depuis, l'ARNm s'est révélé prometteur pour le traitement d'un large éventail de maladies et de nombreux types de cancer.⁴⁻⁷ Ces progrès ont été basés sur une meilleure compréhension de la structure de l'ARNm IVT, ainsi que sur le développement de nouveaux vecteurs de délivrance.⁸ En 2020, les premiers vaccins à base d'ARNm ont reçu l'approbation des autorités de santé, pour une distribution à grande échelle dans le cas de la pandémie mondiale du COVID-19.⁹

1.3 Les différentes catégories de vaccins

Tous les vaccins contiennent un composant actif appelé l'antigène, qui génère la réponse immunitaire protectrice. Les vaccins peuvent être classés en différentes catégories selon le type d'antigène qu'ils contiennent.

1.3.1 Les vaccins à base de pathogènes entiers

Les vaccins à germes entiers, contiennent des corps bactériens ou des particules virales dans leur totalité.

1.3.1.1 Les vaccins vivants atténués

Les vaccins vivants atténués contiennent des micro-organismes vivants dont le pouvoir pathogène a été atténué. Traditionnellement, la majorité des vaccins vivants atténués (variole, fièvre jaune, poliomyélite, rougeole, oreillons, rubéole) étaient basés sur la sélection de variantes naturelles survenues lors du passage du virus dans des cellules animales semi-permissives ou atypiques et/ou dans des conditions de croissance modifiées. Ces variantes naturelles atténuées montraient une capacité réduite à provoquer des maladies.¹⁰ Les micro-organismes vivants peuvent se répliquer dans les cellules hôtes, ce qui laisse à l'organisme le temps de produire des cellules

mémoire pour une réponse immunitaire durable. Le défi concernant ce type de vaccins consiste à obtenir une atténuation suffisante pour assurer la sécurité sans inhiber la réaction immunitaire.¹¹

Une des préoccupations majeures concernant ces vaccins est que les micro-organismes vivants atténués peuvent revenir à une forme pathogène après multiplication et provoquer la maladie. C'est pourquoi la stabilité de ces vaccins doit être étudiée en détails. La majorité des micro-organismes vivants atténués sont sensibles aux changements de température. C'est pourquoi il est nécessaire de respecter certaines plages de température pour que les vaccins restent actifs. D'autre part, les vaccins vivants atténués ne sont pas adaptés aux personnes ayant un système immunitaire affaibli, car l'organisme peut rencontrer des difficultés à éliminer les agents pathogènes atténués.

1.3.1.2 Les vaccins inactivés

Les vaccins inactivés contiennent des micro-organismes qui sont tués par des processus physiques ou chimiques. L'inactivation doit détruire la capacité de l'agent pathogène à se répliquer, mais le maintenir suffisamment intact pour que le système immunitaire puisse le reconnaître en engendrant une réponse immunitaire suffisante. Le formaldéhyde est le produit le plus largement utilisé pour l'inactivation des micro-organismes utilisés dans les vaccins. La propiolactone (BPL) est un agent d'inactivation également fréquemment utilisé. D'autres nouvelles méthodes d'inactivation tel que le traitement au peroxyde d'hydrogène, le traitement au doigts de zinc (*zinc fingers*) et l'irradiation aux rayons gamma peuvent être employées.¹⁰

1.3.2 Les vaccins sous-unitaires

Les vaccins sous-unitaires ne contiennent que des fragments des agents pathogènes contre lesquels ils protègent. Ainsi, ils ne contiennent que les composants essentiels nécessaires pour déclencher une réponse immunitaire protectrice et limiter les effets secondaires indésirables associés à d'autres composants. Comme seuls des fragments de l'agent pathogène sont utilisés et que ces vaccins ne contiennent pas de micro-organismes vivants, ils ne présentent donc pas de risque d'induire la maladie contre laquelle ils protègent. Ainsi, les vaccins sous-unitaires peuvent être administrés aux personnes dont le système immunitaire est affaibli.¹² L'immunogénicité des vaccins sous-unitaires est généralement plus faible que celle induite par des vaccins vivants atténués ou inactivés.

1.3.3 Les vaccins à base d'anatoxines

Les vaccins à base d'anatoxines contiennent une toxine produite par le germe qui cause la maladie. La toxine est rendue inoffensive et est utilisée comme antigène dans le vaccin pour induire l'immunité. La réponse immunitaire est ciblée sur la toxine plutôt que sur le germe entier. Les vaccins à base d'anatoxines sont sûrs car ils ne peuvent pas provoquer les maladies qu'ils sont sensés prévenir, ils ne contiennent pas l'agent pathogène.¹³

1.3.4 Les vaccins à base d'acides nucléiques

1.3.4.1 Les vecteurs viraux

Les virus sont des porteurs naturels d'instructions génétiques. Ils sont intrinsèquement équipés pour pénétrer dans des cellules cibles, délivrer des instructions génétiques aux principaux compartiments intracellulaires et stimuler l'expression de protéines. L'idée des vaccins à base de vecteurs viraux est d'exploiter les caractéristiques intrinsèques des virus pour diriger l'expression génétique. Dans un premier temps, un virus à faible séroprévalence est identifié. Un plasmide est utilisé pour insérer la séquence antigénique d'intérêt dans un squelette viral à la place de la séquence de gène viral¹⁴. Ainsi, les gènes viraux sont remplacés par des gènes d'intérêt. L'administration de vaccins à base de vecteurs viraux induit non seulement des réponses immunitaires contre l'antigène mais également contre le vecteur viral. Une immunité préexistante contre le vecteur viral influence donc négativement les vaccinations ultérieures utilisant le même vecteur¹⁵. Les vecteurs viraux les plus fréquemment utilisés pour la délivrance de gènes sont les lentivirus, les rétrovirus, les adénovirus et les virus adéno-associés (AAV). Plusieurs entreprises telles que AstraZeneca, Johnson&Johnson, Spoutnik et CanSino ont développé avec succès des vaccins à adénovirus contre le COVID-19.

1.3.4.2 Les ADN plasmidiques

Les vaccins à ADN sont basés sur l'utilisation de plasmides qui ont été conçus pour exprimer un antigène spécifique¹⁵. La plupart des plasmides sont des molécules d'ADN circulaires. Ce sont des unités de répllication autonome qui se répliquent de manière indépendante du chromosome bactérien. Le plasmide codant l'antigène protéique est répliqué dans des bactéries

puis purifié. L'administration d'ADN plasmidique « nu » (en absence de vecteur) peut générer une réponse immunitaire, cependant cette réponse est souvent faible¹⁶. Malgré les progrès concernant les vecteurs de libération intracellulaires, la libération de l'ADN plasmidique reste un facteur limitant. En effet, l'ADN doit non seulement entrer dans la cellule puis dans le noyau pour y être transcrit en ARNm.

1.3.4.3 Les ARN messagers (ARNm)

L'ARNm est l'étape intermédiaire entre l'ADN codant les protéines et la production de protéines par les ribosomes dans le cytoplasme, comme l'illustre la Figure 1.

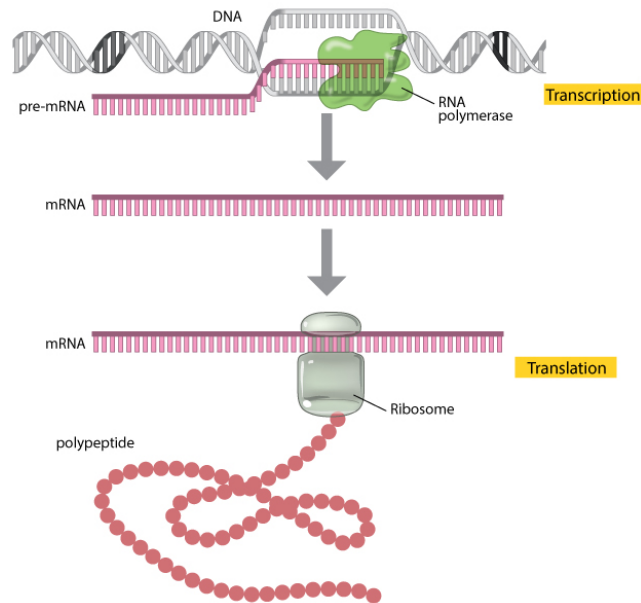


Figure 1 : Processus de transcription et de traduction. Pendant la transcription, l'enzyme ARN polymérase utilise l'ADN comme matrice pour produire l'ARNm. L'ARNm est ensuite traduit par un ribosome pour construire la protéine (polypeptide) codée par le gène d'origine.¹⁷

Contrairement à l'ADN, l'ARNm IVT n'a pas besoin d'entrer dans le noyau des cellules pour être fonctionnel ; une fois qu'il a atteint le cytoplasme, l'ARNm IVT peut être directement traduit. Les vaccins à base d'ARNm IVT ne sont pas soumis aux contraintes que rencontrent l'ADN plasmidique et les vecteurs viraux. Ainsi, le développement de thérapies à base d'ARNm IVT suscite actuellement un large intérêt en tant qu'alternative prometteuse et polyvalente aux approches vaccinales conventionnelles.

1.4 Les adjuvants

Dans le contexte des vaccins, un adjuvant est un composant capable de moduler la réponse immunitaire induite par l'antigène. Les vaccins sous-unitaires ou synthétiques hautement purifiés présentent un excellent profil d'innocuité. Inversement, l'immunogénicité de ces antigènes bien définis peut-être faible et ces vaccins nécessitent souvent l'ajout d'adjuvants pour avoir une réponse immunitaire suffisante.¹⁸

1.4.1 Le rôle des adjuvants

Les adjuvants peuvent être utilisés à différentes fins telles que:¹⁹

- influencer sur la qualité de la réponse immunitaire en améliorant la reconnaissance des agents pathogènes.
- réduire la quantité d'antigène nécessaire à une immunisation réussie (permettant également de réduire la probabilité d'une compétition entre antigènes dans les vaccins combinés) et rendre la production de vaccins plus économique et plus réalisable, notamment lorsque la dose d'antigène disponible est limitée.
- réduire la fréquence de vaccination en induisant une réponse immunitaire de plus longue durée.
- améliorer la rapidité de la réponse immunitaire, en particulier pendant les campagnes de vaccination d'urgence en cas d'épidémies.
- élargir le profil de la réponse immunitaire car de nombreux agents pathogènes présentent une dérive antigénique importante et/ou des variations de contrainte.
- améliorer la stabilité de la formulation, car les adjuvants peuvent rendre le vaccin moins susceptible de se dégrader.
- améliorer la réponse immunitaire des populations ayant une réactivité immunitaire réduite, telles que les nourrissons, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées.

1.4.2 Les différents types d'adjuvants

Actuellement, de nombreux adjuvants sont en cours de développement. La sélection d'un adjuvant pour un vaccin tient compte de nombreux facteurs. La sécurité des adjuvants est le critère primordial, celui-ci dépendant du rapport bénéfice/risque du vaccin envisagé. Ainsi, un adjuvant

doit être sûr, bien toléré, compatible avec l'antigène et économiquement réalisable. L'établissement de tous ces paramètres, tout en maintenant l'innocuité du vaccin contenant l'adjuvant, est un processus long et complexe. C'est pourquoi, aujourd'hui, seuls peu d'adjuvants sont autorisés dans les vaccins humains commerciaux.²⁰ Il existe plusieurs types d'adjuvants tels que : (i) les sels d'aluminium ; (ii) les émulsions ; (iii) les dérivés bactériens ; (iv) les adjuvants glucidiques ; (v) les liposomes ; (vi) les cytokines ; (vii) et les polymères.²¹

Les modes d'actions des adjuvants sont complexes, multiples et, pour la majorité des adjuvants, pas encore complètement résolus. De plus, un même adjuvant peut avoir plusieurs modes d'action.

1.4.2.1 Adjuvant polyacrylate

Les polyélectrolytes anioniques sont utilisés comme adjuvants de vaccins depuis les années 1970. Historiquement, l'effet adjuvant du PAA avait été démontré chez des souris immunisées avec des globules rouges de mouton en 1971²². De nombreuses études ont par la suite permis de confirmer l'activité adjuvante du PAA et de ses dérivés. Les PAA réticulés de haut poids moléculaire, connus sous les noms commerciaux de Carbomer®, Carbopol®, ou Montanide® Gel notamment, sont des adjuvants efficaces présents dans de nombreux vaccins vétérinaires.^{23,24} Par exemple, Mumford et al.²⁵ ont montré que le Carbomer® est un adjuvant efficace dans les vaccins contre la grippe équine contenant le virus inactivé, et Gelfi et al.²⁶ ont montré que le Carbopol® est un adjuvant efficace dans les vaccins contre le polyomavirus hémorragique de l'oie contenant le virus inactivé.

D'un point de vue physico-chimique, les polymères d'acide acrylique constituent une forme spécifique de systèmes de distribution de particules formant de petites particules (~ 10 nm de diamètre pour le PAA-20) fortement chargées négativement lors d'une dissolution dans de l'eau ou dans un tampon à pH 7,0. Du fait de leur charge de surface élevée, ces particules peuvent adsorber des antigènes par des interactions électrostatiques, soit par interaction de charge directe avec des antigènes cationiques, soit, dans le cas d'antigènes chargés négativement, par pontage de cations divalents tels que Cu^{2+} . Il a été démontré que l'aptitude à former des complexes avec des antigènes joue un rôle dans l'activité adjuvante des PAA.²⁷

Des expériences ont également montré que le poids moléculaire était un facteur déterminant pour l'activité adjuvante de ces polyélectrolytes, indépendamment de leur nature chimique, montrant d'abord une forte augmentation de l'activité adjuvante avec une augmentation du poids moléculaire moyen pour ensuite atteindre un plateau.²⁸ Ainsi, il est important de vérifier l'absence de contaminants de faible poids moléculaire ou de monomères résiduels susceptibles d'impacter négativement l'activité de l'adjuvant.²⁹

1.4.2.2 Sels d'aluminium

Les sels d'aluminium constituent la classe d'adjuvants la plus couramment utilisée et sont la première classe d'adjuvants dont l'utilisation fut approuvée dans les vaccins humains. Ainsi, depuis les années 1920, plusieurs milliards de doses de vaccins contenant des sels d'aluminium en tant qu'adjuvants ont été administrées à l'homme.^{30,31} Les sels d'aluminium les plus couramment utilisés sont l'hydroxyde d'aluminium et le phosphate d'aluminium.

1.4.2.2.1 Hydroxyde d'aluminium

Couramment nommé hydroxyde d'aluminium (sa dénomination exacte est oxyhydroxyde d'aluminium (AlOOH)), l'oxyhydroxyde d'aluminium est un composé stœchiométrique. La surface est composée de groupes Al-OH et Al-O-Al . Les groupes Al-OH peuvent accepter un proton, entraînant une charge de surface positive, ou donner un proton, entraînant une charge de surface négative. Le point isoélectrique d' Al-OH est environ égal à 11,4. Ainsi, l'oxyhydroxyde d'aluminium présente une charge de surface positive à pH 7,4.³³

1.4.2.2.2 Phosphate d'aluminium.

Couramment nommé phosphate d'aluminium (sa dénomination exacte est hydroxyphosphate d'aluminium amorphe, $(\text{Al}_x(\text{OH})_y(\text{PO}_4)_z)$), l'hydroxyphosphate d'aluminium n'est pas un composé stœchiométrique. Le degré de substitution de l'hydroxyle varie avec le procédé de préparation. La surface de l'adjuvant est composée de groupes Al-OH et Al-OPO_3 . Le point isoélectrique de l'hydroxyphosphate d'aluminium peut varier de 4,5 à 9,4 en fonction du degré de substitution du phosphate. Les adjuvants phosphate d'aluminium commerciaux ont des

valeurs de point isoélectrique comprises entre 4,5 et 5,5 et sont donc chargés négativement à pH 7,4.³³

Les vaccins contenant de l'aluminium sont formulés par adsorption d'un antigène donné sur des gels d'hydroxyde d'aluminium ou de phosphate d'aluminium. L'impact de l'adsorption doit être évalué au cas par cas. Les conditions physico-chimiques telles que le pH, la température, la cristallinité, la taille de la particule de gel d'adjuvant d'aluminium, la force ionique et la composition du mélange réactionnel peuvent affecter l'adsorption de l'antigène sur l'adjuvant contenant de l'aluminium.³⁴ Le pH et la force ionique peuvent modifier la charge de surface du gel et des antigènes, tandis que la température peut affecter la vitesse d'interaction entre le gel et l'antigène. La taille des particules de gel et la cristallinité peuvent affecter la surface du gel disponible pour l'adsorption. La taille des particules dépend de l'environnement et du processus de fabrication des adjuvants d'aluminium.

1.5 Les autres composants d'un vaccin

La composition des vaccins est complexe et varie grandement en fonction de l'antigène. Cependant, certains composants sont présents dans la grande majorité des formulations telles que :

- les agents de stabilisation utilisés pour maintenir la qualité du vaccin durant sa durée de vie : albumine, gélatine, lactose, saccharose, sorbitol.³⁵
- les conservateurs utilisés pour prévenir les proliférations bactériennes et fongiques dans les vaccins : phénoxyéthanol, phénol.³⁵

1.6 Les interactions antigènes-adjuvants

Les deux composants ayant un rôle primordial sur l'efficacité d'un vaccin sont l'antigène et l'adjuvant. Les antigènes génèrent une réponse immunitaire protectrice et les adjuvants permettent de façonner la réponse afin d'obtenir la protection souhaitée.

Une étude de Xiong et al.³⁶ montre l'impact que peuvent avoir différents adjuvants sur l'immunogénicité et l'efficacité d'un vaccin. Le vaccin étudié était un vaccin vivant atténué nommé

Mycoplasma hyopneumoniae souche 168, habituellement injecté par voie intrapulmonaire. Cette voie d'administration expose les animaux à un risque plus élevé d'infection que la voie intramusculaire. Le but de l'étude était d'évaluer différents adjuvants afin de pouvoir fournir une protection efficace par inoculation intramusculaire. Quatre adjuvants (nommés A, C, D et E) ont été sélectionnés sur la base de résultats d'expériences antérieures réalisées chez la souris. Le Tableau 1 présente le schéma expérimental réalisé.

Group		Vaccine	Adjuvant	Adjuvant type	Adjuvant formulation	Challenge
G1	Negative control	-	-	-	-	-
G2	Live vaccine without adjuvant	Live vaccine	-	-	-	+
G3	Live vaccine with adjuvant A	Live vaccine	Adjuvant A	Aqueous	ISCOM-matrix	+
G4	Live vaccine with adjuvant C	Live vaccine	Adjuvant C	Aqueous	Carbomer + astragalus polysaccharide	+
G5	Live vaccine with adjuvant D	Live vaccine	Adjuvant D	Aqueous	Levamisole + chitosan	+
G6	Live vaccine with adjuvant E	Live vaccine	Adjuvant E	Oil-in-water	Squalene + Tween 80 + Span 85	+
G7	Challenged control	-	-	-	-	+

Tableau 1 : Expérience d'efficacité du vaccin *M. hyopneumoniae* en présence de différents adjuvants chez le porc.

Vingt-huit jours après l'expérience, les 7 groupes d'animaux ont été abattus. Les porcs du groupe témoin présentaient des lésions pneumoniques graves, le score médian des lésions était de 14,81. Les porcs ayant reçu le vaccin vivant sans adjuvant n'ont pas acquis de protection significative, avec un score médian de lésion de 9,28 ($P > 0,05$). Les vaccins avec les adjuvants A et C ont induit une protection significative. Pour le vaccin avec l'adjuvant A, le score médian de lésions était de 3,57 ($P < 0,01$) et pour le vaccin avec l'adjuvant C, le score médian de lésions était de 5,28 ($P < 0,05$). Les efficacités vaccinales obtenues pour ces deux groupes étaient de $80,62 \pm 36,30\%$ (adjuvant A) et de $68,27 \pm 48,10\%$ (adjuvant C). Les adjuvants D et E n'ont pas entraîné de diminutions significatives du score des lésions (voir Figure 2).

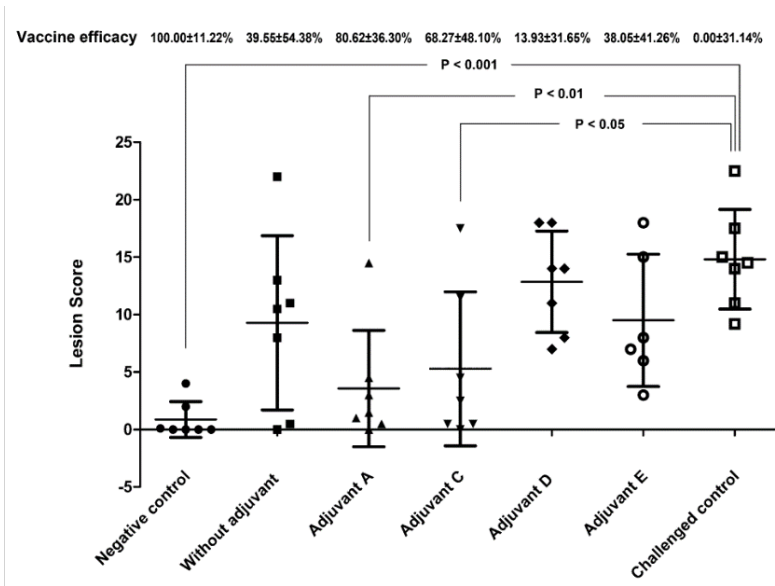


Figure 2 : Scores des lésions pulmonaires 28 jours après l’expérience. Les scores ont été déterminés selon la méthode décrite par Madec et al.³⁷. L’efficacité a été déterminée avec la formule suivante : [(score médian du groupe témoin exposé au test - score médian du groupe vacciné) / (score médian du groupe témoin exposé au test - score médian négatif du groupe témoin)]x100%.³⁶

Les antigènes et les adjuvants font séparément l’objet d’une étude approfondie avant qu’un vaccin n’atteigne le stade de l’homologation. Les antigènes sont minutieusement sélectionnés en fonction d’approches bio-informatiques et expérimentales pour leur capacité à induire une immunité protectrice. Les adjuvants sont également soigneusement testés et caractérisés.^{38,39} Cependant, une analyse approfondie des interactions physico-chimiques pouvant avoir lieu entre l’antigène et l’adjuvant fait souvent défaut. L’association antigène – adjuvant devrait être davantage caractérisée pour pouvoir mieux comprendre l’impact de l’adjuvant sur la formulation vaccinale et pouvoir optimiser la formulation afin d’obtenir une stabilité vaccinale et une activité biologique maximales. Par ailleurs, dans certains cas, la présence d’interactions antigène – adjuvant peut ne pas être nécessaire, ni même souhaitable.^{40,41}

Hansen B. et al ont étudié l’effet de l’adsorption d’un antigène sur différents adjuvants contenant de l’aluminium sur la réponse immunitaire⁴². L’antigène étudié est le HIV1 SF162dV2gp140 (gp140), un potentiel antigène du VIH. Quatre adjuvants ont été étudiés : l’hydroxyde d’aluminium (Al(OH)₃), le phosphate d’aluminium (Al_x(OH)_y(PO₄)_z), et deux hydroxydes d’aluminium traité avec deux concentrations différentes de dihydrogénophosphate de potassium afin de produire des

adjuvants ayant des coefficients d'adsorption intermédiaires. Les coefficients d'adsorption de l'antigène sur chaque adjuvant ont été obtenus en traçant les isothermes d'adsorption de Langmuir. Les résultats obtenus sont : 1900 mL de gp140 /mg d'AH pour l'hydroxyde d'aluminium (AH), 1200 mL/mg pour l'hydroxyde d'aluminium traité au phosphate (PTAH-1), 800 mL/mg pour l'hydroxyde d'aluminium traité au phosphate (PTAH-2) et 400 mL/mg pour le phosphate d'aluminium (AP). Les quatre adjuvants ont été utilisés dans des vaccins contenant 1 µg ou 10 µg de gp140 par dose. Des groupes de 10 souris ont été immunisés par voie intramusculaire aux jours 0 et 21 avec les différents vaccins. Le sérum des souris a été analysé après 42 jours par la méthode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Les concentrations d'anticorps obtenues sont présentées en Figure 3.

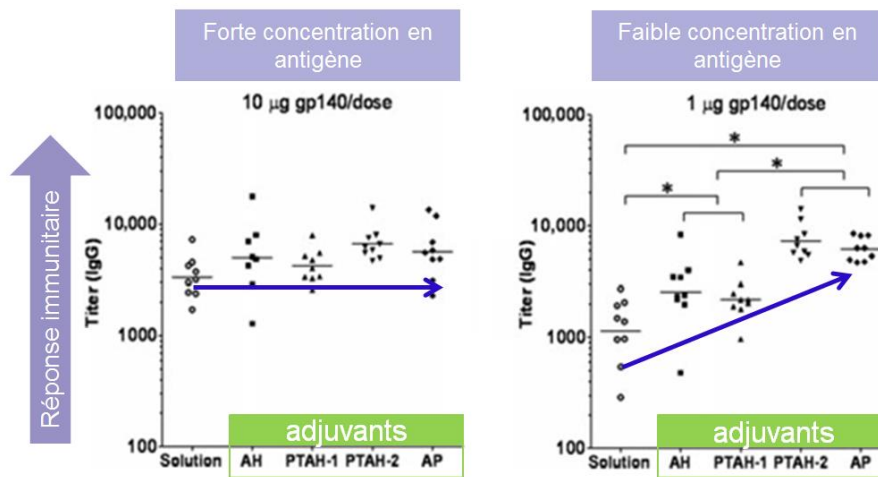


Figure 3 : Immunoglobulines de type G (IgG) anti-gp140 dosées par la méthode immuno-enzymatique ELISA dans le sérum de souris ayant reçu une injection de gp140 à raison de 10 ou 1 µg / dose avec ou sans adjuvants. Chaque point représente un échantillon individuel et la barre indique la concentration moyenne (moyenne géométrique). Adapté de ⁴²

Aucune différence significative des concentrations moyennes d'anticorps n'a été observée en présence ou en absence d'un adjuvant pour les vaccins contenant 10 µg de gp140 par dose. A l'inverse, pour les vaccins contenant 1 µg de gp140 par dose, un impact significatif de la présence d'adjuvants sur la production d'anticorps existe. La production d'anticorps est cependant diminuée si l'antigène est trop fortement adsorbé sur l'adjuvant. En effet, les vaccins contenant les adjuvants avec les plus faibles coefficients d'adsorption, c'est-à-dire PTAH-2 (à 800 mL/mg) et AP (à 400 mL/mg), ont produit des concentrations d'anticorps plus élevées que les vaccins contenant les

Chapitre I. Etude bibliographique

adjuvants avec les coefficients d'adsorption les plus élevés, c'est-à-dire AH (à 1900 mL/mg) et PTAH-1 (à 1200 mL/mg). Cela souligne l'importance de l'interaction antigène/adjuvant dans les formulations vaccinales. Ce facteur est particulièrement important lorsque la dose d'antigène est faible. Des études pour obtenir une adsorption optimale de l'antigène sont nécessaires pour renforcer l'immunogénicité. D'autre part, il est intéressant de noter sur la Figure 3 que les concentrations moyennes d'anticorps produits par la dose de 1 µg formulée avec des adjuvants contenant de l'aluminium ayant les coefficients d'adsorption les plus bas (PTAH-2 et AP) sont similaires à ceux des vaccins contenant une dose de 10 µg.

Les isothermes d'adsorption d'antigènes sur des gels d'aluminium sont facilement accessibles car l'antigène libre peut être séparé aisément du complexe et de l'adjuvant par simple centrifugation. Ce n'est pas le cas pour la majorité des autres adjuvants. Ainsi, le développement de nouvelles méthodes analytiques permettant de caractériser les mélanges antigène-adjuvant et leurs interactions est nécessaire. Ces méthodes permettront de mieux comprendre l'impact de la formulation sur l'interaction antigène-adjuvant et donc d'optimiser la stabilité et l'activité biologique des vaccins.

2 Caractérisation des interactions entre les antigènes et les adjuvants

2.1 Equilibres chimiques et isothermes d'adsorption

Afin de caractériser les interactions antigènes-adjuvants, il est nécessaire d'étudier les équilibres chimiques. Si l'équilibre est atteint, le tracé de l'isotherme d'adsorption associée à un modèle mathématique approprié permet de décrire le système, quelles que soient les concentrations initiales en substrat et en ligand. Un équilibre chimique est le résultat de deux réactions chimiques antagonistes simultanées dont les effets s'annulent mutuellement. Dans le cadre de l'étude des interactions entre un substrat (S) et un ligand (L), les deux réactions chimiques qui s'opposent sont l'association et la dissociation des deux partenaires d'interaction. Le substrat est communément défini comme le partenaire d'interaction ayant la plus grande dimension moléculaire.⁴³

2.1.1 L'interaction substrat-ligand

Le modèle général permettant de décrire l'interaction entre un substrat S et un ligand L est donné par l'équation-bilan suivante :



où m et n représentent respectivement les stœchiométries d'interaction associées au substrat et au ligand. Il est possible de définir la constante de formation globale du complexe β_{mn} telle que :

$$\beta_{mn} = \frac{[S_mL_n]}{[S]^m[L]^n} \quad (2)$$

où $[S_mL_n]$ est la concentration du complexe, $[S]$ est la concentration du substrat libre et $[L]$ est la concentration du ligand libre. Néanmoins, dans la plupart des systèmes, l'un des partenaires d'interaction ne s'auto-agrège pas, et le schéma réactionnel général se simplifie en l'équation (3):



La constante de formation globale devient alors plus simplement :

$$\beta_n = \frac{[SL_n]}{[S][L]^n} \quad (4)$$

2.1.2 Modèle des équilibres successifs

Dans le modèle des équilibres successifs, il est considéré que l'équilibre passe par une succession d'équilibres intermédiaires menant au complexe final SL_n . Les équilibres successifs de complexation sont définis pour tout i compris entre 1 et n par :



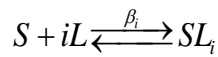
Les constantes d'interactions successives K_i sont définies pour tout i compris entre 1 et n par :

$$K_i = \frac{[SL_i]}{[SL_{i-1}][L]} \quad (6)$$

La relation entre les constantes successives d'interaction et la constante globale de formation est :

$$\beta_i = \prod_{j=1}^{j=i} K_j \quad (7)$$

où β_i est la constante d'équilibre associée à l'équilibre suivant :



Les équations de conservation de masse s'écrivent :

$$[S]_0 = [S] + \sum_{i=1}^n [SL_i] \quad (8)$$

$$[L]_0 = [L] + \sum_{i=1}^n i[SL_i] \quad (9)$$

où $[S]_0$ est la concentration initiale du substrat, $[L]_0$ est la concentration initiale du ligand et $[SL_i]$ est la concentration du complexe intermédiaire contenant i ligands. Le nombre moyen de ligands liés par molécule de substrat \bar{n} est défini par :

$$\bar{n} = \frac{[L]_{lié}}{[S]_0} = \frac{[L]_0 - [L]}{[S]_0} \quad (10)$$

où $[L]_{lié}$ est la concentration en ligand lié dans le milieu, à l'équilibre. Ainsi, pour calculer \bar{n} , il suffit de déterminer expérimentalement la concentration en ligand libre $[L]$ à l'équilibre. Le développement de l'équation (10), compte-tenu des équations de conservation de masse, donne :

$$\bar{n} = \frac{[SL] + 2[SL_2] + \dots + n[SL_n]}{[S] + [SL] + [SL_2] + \dots + [SL_n]} \quad (11)$$

En divisant le numérateur et le dénominateur par $[S]$, on obtient l'expression qui relie \bar{n} aux constantes de formation globales :

$$\bar{n} = \frac{\sum_{i=1}^n i\beta_i[L]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \beta_i[L]^i} \quad (12)$$

Le nombre moyen de ligands liés par molécule de substrat \bar{n} est relié aux constantes successives K_i par l'équation (12). Ainsi, la détermination de la concentration en ligand libre $[L]$ pour différents rapports $[L]_0/[S]_0$ permet de tracer l'isotherme d'adsorption, qui peut être ajustée par l'équation (12) à l'aide des n constantes K_1 à K_n et du nombre maximum de ligands par substrat n à saturation.

2.1.3 Modèle de sites indépendants de même énergie

Le modèle des n sites indépendants de même énergie décrit un substrat possédant n sites d'interaction d'égale énergie avec le ligand. L'occupation de l'un des sites du substrat n'influe pas sur l'occupation des autres sites.⁴⁴ Par ailleurs, on suppose que l'énergie d'interaction est la même pour chaque site. La Figure 4 illustre l'exemple d'un substrat avec deux sites indépendants d'interaction avec un ligand.

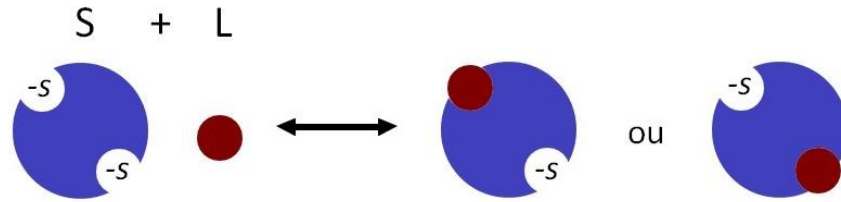


Figure 4 : Représentation schématique de l'interaction d'un substrat (S) ayant deux sites (-s) indépendants avec un ligand (L) dans le cas $n=2$.

L'équilibre permettant de décrire l'interaction entre un site $-s$ d'un substrat S et un ligand L est donné par l'équation suivante :



La constante d'interaction k du ligand avec un site, appelée constante de site, est définie telle que :

$$k = \frac{[L - s]}{[-s][L]} \quad (14)$$

où $[L - s]$ est la concentration en sites occupés par un ligand, $[-s]$ est la concentration en site libre et $[L]$ est la concentration en ligand libre. Dans le cas d'un substrat possédant n sites d'interaction indépendants et de même énergie, les constantes d'interaction successives sont reliées à la constante de site k selon la relation suivante :

$$K_i = \frac{n - i + 1}{i} k \quad (15)$$

La relation entre deux constantes d'interactions successives est donnée par :

$$\frac{K_{i+1}}{K_i} = \frac{(n - i)i}{(i + 1)(n - i + 1)} \quad (16)$$

Les équations de conservation de masse s'écrivent pour ce système :

$$[L]_0 = [L] + [L - s] \quad (17)$$

$$[-s]_0 = [-s] + [L - s] = n[S]_0 \quad (18)$$

où $[L]_0$ est la concentration initiale en ligand, $[-s]_0$ est la concentration initiale en site et $[S]_0$ est la concentration initiale en substrat. En utilisant les équations de conservation de masse, l'équation (14) devient :

$$k = \frac{[L]_0 - [L]}{[L](n[S]_0 - [L]_0 + [L])} \quad (19)$$

Ainsi, la détermination expérimentale de la concentration en ligand libre $[L]$ permet de calculer la constante d'interaction du ligand avec un site k , pour peu qu'on connaisse le nombre de sites n par substrat. Le nombre moyen de ligands L liés par substrat S peut être défini par :

$$\bar{n} = \frac{[L]_{lié}}{[S]_0} = n \frac{[L - s]}{[S]_0} \quad (20)$$

En utilisant l'équation de la constante d'interaction du ligand avec un site k et les équations de conservation de masse, l'équation devient :

$$\bar{n} = n \frac{k[L][-s]}{[-s] + [L - s]} = n \frac{k[L]}{1 + k[L]} \quad (21)$$

Le rapport $\frac{k[L]}{1 + k[L]}$ est appelé taux moyen d'occupation d'un site. Il varie entre 0 (site jamais occupé) et 1 (site entièrement occupé).

2.1.4 Modèle de plusieurs classes de sites indépendants d'énergies différentes

Un substrat peut avoir plusieurs sites d'interaction n'ayant pas la même énergie, partagés en plusieurs classes de sites, les sites étant indépendants les uns des autres. Plusieurs constantes de sites k_i relatives à chaque classe de site i sont alors définies. La détermination expérimentale de ces constantes est obtenue par ajustement non linéaire de l'isotherme d'adsorption par l'équation (22) :

$$\bar{n} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i k_i [L]}{1 + k_i [L]} \quad (22)$$

où m est le nombre de classes de sites, n_i est le nombre de sites de la classe i et k_i est la constante de site relative à la classe i . On notera cependant qu'on ajoute deux paramètres d'ajustement pour chaque nouvelle classe de sites.

2.1.5 Notion de coopérativité

Pour un substrat possédant plusieurs sites d'interaction, la notion de coopérativité fait référence à l'influence de l'occupation de l'un des sites du substrat sur l'interaction du ligand avec les sites restants disponibles. Trois états peuvent être distingués : ⁴⁵

- L'état non-coopératif pour lequel l'occupation d'un site n'influe pas sur les sites restants disponibles, c'est-à-dire que les sites sont indépendants.
- L'état coopératif pour lequel l'occupation d'un des sites favorise l'occupation des autres sites restants disponibles.
- L'état anti-coopératif pour lequel l'occupation d'un des sites défavorise l'occupation des autres sites restants disponibles.

Les systèmes coopératifs et anti-coopératifs peuvent être dus à un changement de conformation du substrat modifiant ainsi l'accès du ligand en solution aux sites vacants.

2.1.6 Modélisation des isothermes d'adsorption

Le graphe $\bar{n} = f([L])$ est appelé isotherme d'adsorption du ligand L sur le substrat S . L'ajustement non linéaire de la courbe $\bar{n} = f([L])$ permet d'accéder aux différents paramètres d'interaction. Cette isotherme peut également être linéarisée en vue d'une détermination plus simple des paramètres d'interaction par régression linéaire.

2.1.6.1 Modèle de Langmuir

L'isotherme d'adsorption de Langmuir, a été développée à l'origine pour décrire l'adsorption sur du charbon actif.⁴⁶ Dans ce modèle, les sites sont considérés comme étant indépendants et de même énergie. L'adsorption est supposée en monocouche (la couche adsorbée est constituée d'une seule molécule en épaisseur). L'adsorption ne peut se produire que sur un nombre fini de sites

d'adsorptions. Graphiquement, l'isotherme d'adsorption de Langmuir se caractérise par un plateau de saturation. L'expression mathématique du modèle de Langmuir est donnée par l'équation (23) :

$$\bar{n} = n \frac{k[L]}{1 + k[L]} \quad (23)$$

Trois méthodes de linéarisation de l'isotherme d'adsorption de Langmuir sont couramment utilisées.

2.1.6.1.1 La méthode x-réciproque

La méthode x-réciproque repose sur l'utilisation de l'équation suivante pour linéariser les données expérimentales :

$$\frac{\bar{n}}{[L]} = nk - \bar{n}k \quad (24)$$

La stœchiométrie de l'interaction n et la constante intrinsèque k peuvent être déterminées en représentant le nombre moyen de ligands liés par molécule de substrat divisé par la concentration en ligand libre $\bar{n}/[L]$ en fonction du nombre moyen de ligands liés par molécule de substrat \bar{n} . La pente de la droite obtenue donne accès à $-k$. L'intersection avec l'axe des abscisses permet d'obtenir n , comme l'illustre la Figure 5.

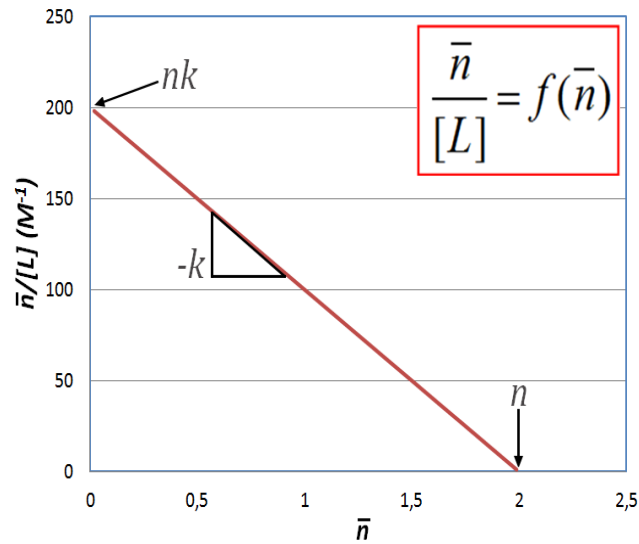


Figure 5 : Linéarisation de l'isotherme d'adsorption par la méthode x-réciproque. Cas de n sites indépendants avec $n=2$; $k=100 \text{ M}^{-1}$

2.1.6.1.2 La méthode y-réciproque

La méthode dite y-réciproque repose sur l'utilisation de l'équation suivante pour linéariser les données expérimentales :

$$\frac{[L]}{\bar{n}} = \frac{1}{nk} + \frac{1}{n}[L] \quad (25)$$

Le nombre de sites n peut être calculé grâce à la pente de la droite obtenue en représentant la concentration en ligands libres divisé par le nombre moyen de ligands liés par molécule $[L]/\bar{n}$ en fonction de la concentration en ligands libres $[L]$. La constante k peut être déterminée grâce à l'ordonnée à l'origine, comme l'illustre la Figure 6.

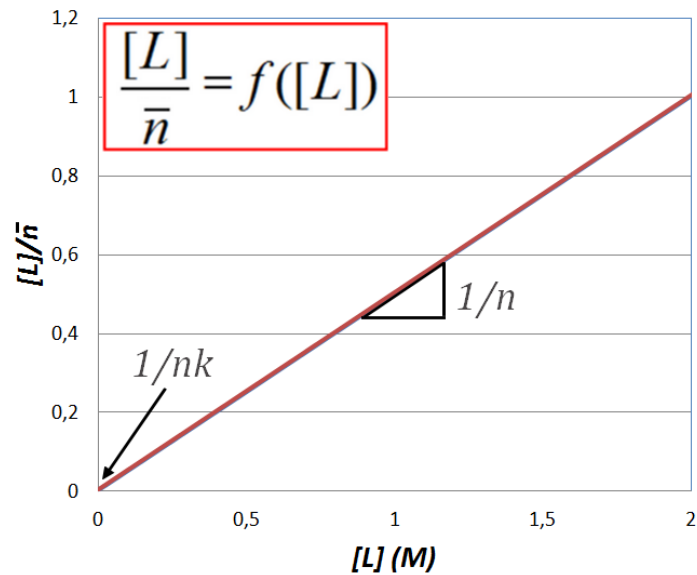


Figure 6 : Linéarisation de l'isotherme d'adsorption par la méthode y - réciproque. Cas de n sites indépendants avec n=2 ; k=100 M⁻¹

2.1.6.1.3 La méthode double-réciproque

La méthode dite double-réciproque repose sur l'utilisation de l'équation suivante pour linéariser les données expérimentales :

$$\frac{1}{\bar{n}} = \frac{1}{nk[L]} + \frac{1}{n} \quad (26)$$

Elle consiste à représenter l'inverse du nombre moyen de ligands liés par molécule $1/\bar{n}$ en fonction de l'inverse de la concentration en ligands libres $[L]$. La pente de la droite est égale à $\frac{1}{nk}$ et d'ordonnée à l'origine $\frac{1}{n}$. La constante k est accessible en divisant l'ordonnée à l'origine par la pente de la droite, comme l'illustre la Figure 7.

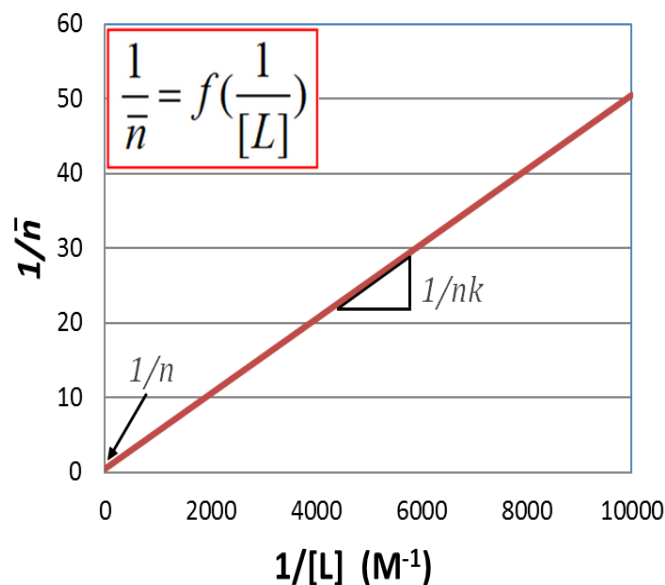


Figure 7 : Linéarisation de l'isotherme d'adsorption par la méthode double - réciproque. $n=2$; $k=100 \text{ M}^{-1}$

2.1.6.2 Autres types d'ajustement des isothermes d'adsorption

D'autres modèles mathématiques décrivant les isothermes d'adsorption ont été développés dans le but de décrire au mieux les systèmes rencontrés expérimentalement. Le Tableau 2 présente les expressions mathématiques des formes non linéaires et linéaires des modèles de Freundlich, Dubinin–Radushkevich, Tempkin, Flory–Huggins, Hill, Redlich–Peterson, Sips, Toth, Koble–Corrigan, Khan, Radke–Prausnitz, Brunauer–Emmett–Teller (BET), Frenkel–Halsey–Hill (FHH) et MacMillan–Teller (MET). Les définitions des différents termes utilisés dans le Tableau 2 sont données dans la légende. On notera que dans ce tableau, la grande majorité des isothermes proposées exprime la quantité de ligands liés (en g) par g de substrat, plutôt qu'en nombre (ou en mole). Pour certains systèmes, où les substrats (ou les ligands) sont mal définis ou multiples, la représentation des isothermes d'adsorption en g de ligand / g de substrat est souvent utilisée.

Isotherm	Nonlinear form	Linear form	Plot
Freundlich	$q_e = K_F C_e^{1/n}$	$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e$	$\log q_e$ vs $\log C_e$
Dubinin–Radushkevich	$q_e = (q_s) \exp(-k_{ad} \varepsilon^2)$	$\ln(q_e) = \ln(q_s) - k_{ad} \varepsilon^2$	$\ln(q_e)$ vs ε^2
Tempkin	$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln A_T C_e$	$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln A_T + \left(\frac{RT}{b_T}\right) \ln C_e$	q_e vs $\ln C_e$
Flory–Huggins	$\frac{\theta}{C_0} = K_{FH}(1 - \theta)^{n_{FH}}$	$\log\left(\frac{\theta}{C_0}\right) = \log(K_{FH}) + n_{FH} \log(1 - \theta)$	$\log\left(\frac{\theta}{C_0}\right)$ vs $\log(1 - \theta)$
Hill	$q_e = \frac{q_{SH} C_e^{n_H}}{K_D + C_e^{n_H}}$	$\log\left(\frac{q_e}{q_{SH} - q_e}\right) = n_H \log(C_e) - \log(K_D)$	$\log\left(\frac{q_e}{q_{SH} - q_e}\right)$ vs $\log(C_e)$
Redlich–Peterson	$q_e = \frac{K_R C_e}{1 + a_R C_e^p}$	$\ln\left(K_R \frac{C_e}{q_e} - 1\right) = p \ln(C_e) + \ln(a_R)$	$\ln\left(K_R \frac{C_e}{q_e} - 1\right)$ vs $\ln(C_e)$
Sips	$q_e = \frac{K_S C_e^{\beta_S}}{1 + a_S C_e^{\beta_S}}$	$\beta_S \ln(C_e) = -\ln\left(\frac{K_S}{q_e}\right) + \ln(a_S)$	$\ln\left(\frac{K_S}{q_e}\right)$ vs $\ln(C_e)$
Toth	$q_e = \frac{K_T C_e}{(a_T + C_e)^{1/t}}$	$\ln\left(\frac{q_e}{K_T}\right) = \ln(C_e) - \frac{1}{t} \ln(a_T + C_e)$	$\ln\left(\frac{q_e}{K_T}\right)$ vs $\ln(C_e)$
Koble–Corrigan	$q_e = \frac{A C_e^B}{1 + B C_e^B}$	$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{A C_e^B} + \frac{B}{A}$	-
Khan	$q_e = \frac{q_s b_K C_e}{(1 + b_K C_e)^{1/p_K}}$	-	-
Radke–Prausnitz	$q_e = \frac{a_{RP} r_R C_e^{\beta_R}}{a_{RP} + r_R C_e^{\beta_R}}$	-	-
BET	$q_e = \frac{q_s C_{BET} C_e}{(C_s - C_e)[1 + (C_{BET} - 1)(C_e/C_s)]}$	$\frac{C_e}{q_e(C_s - C_e)} = \frac{1}{q_s C_{BET}} + \frac{(C_{BET} - 1) C_e}{q_s C_{BET} C_s}$	$\frac{C_e}{q_e(C_s - C_e)}$ vs $\frac{C_e}{C_s}$
FHH	$\ln\left(\frac{C_e}{C_s}\right) = -\frac{\alpha}{RT} \left(\frac{q_s}{q_e d}\right)^r$	-	-
MET	$q_e = q_s \left(\frac{k}{\ln(C_s/C_e)}\right)^{1/3}$	-	-

Tableau 2 : Liste des différents modèles d'isothermes d'adsorption ainsi que leur forme linéarisée lorsqu'elle existe et le système d'axes à utiliser pour la linéarisation ⁴⁶

a_K	Khan isotherm model exponent	K_R	Redlich–Peterson isotherm constant (L/g)
a_R	Redlich–Peterson isotherm constant (1/mg)	K_S	Sips isotherm model constant (L/g)
a_{RP}	Radke–Prausnitz isotherm model constant	K_T	Toth isotherm constant (mg/g)
a_S	Sips isotherm model constant (L/mg)	n	adsorption intensity
a_T	Toth isotherm constant (L/mg)	n_{FH}	Flory–Huggins isotherm model exponent
A	Koble–Corrigan isotherm constant (L ⁿ mg ¹⁻ⁿ /g)	n_H	Hill cooperativity coefficient of the binding interaction
A_T	Tempkin isotherm equilibrium binding constant (L/g)	p	number of parameter
b_K	Khan isotherm model constant	q_e	amount of adsorbate in the adsorbent at equilibrium (mg/g)
b_T	Tempkin isotherm constant	q_s	theoretical isotherm saturation capacity (mg/g)
B	Koble–Corrigan isotherm constant (L/mg) ⁿ	q_{SH}	Hill isotherm maximum uptake saturation (mg/L)
B_{DR}	Dubinin–Radushkevich isotherm constant	r	inverse power of distance from the surface
C_e	equilibrium concentration (mg/L)	r_R	Radke–Prausnitz isotherm model constant
C_0	adsorbate initial concentration (mg/L)	R	universal gas constant (8.314 J/mol K)
C_s	adsorbate monolayer saturation concentration (mg/L)	t	Toth isotherm constant
C_{BET}	BET adsorption isotherm relating to the energy of surface interaction (L/mg)	T	temperature (K)
d	Interlayer spacing (m)	θ	degree of surface coverage
ε	Dubinin–Radushkevich isotherm constant	α	Frenkel–Halsey–Hill isotherm constant (J m ^r /mole) with r is the sign of inverse power of distance from the surface
E	mean free energy (kJ/mol)	β_R	Radke–Prausnitz isotherm model exponent
g	Redlich–Peterson isotherm exponent	β_S	Sips isotherm model exponent
k	MacMillan–Teller (MET) isotherm constant		
K_{ad}	Dubinin–Radushkevich isotherm constant (mol ² /kJ ²)		
K_D	Hill constant		
K_F	Freundlich isotherm constant (mg/g) (dm ³ /g) ⁿ related to adsorption capacity		
K_{FH}	Flory–Huggins isotherm equilibrium constant (L/g)		

2.2 Méthodes analytiques pour l'étude et la caractérisation des interactions

Différentes techniques analytiques peuvent être employées pour étudier les interactions antigènes / adjuvants.

2.2.1 Titration calorimétrique isotherme (ITC)

La titration calorimétrique isotherme (ITC) repose sur une mesure directe de la chaleur libérée ou absorbée durant un événement de liaison entre deux molécules.

2.2.1.1 Principe

Une solution contenant une molécule appelée substrat est titrée à l'aide d'une solution contenant une autre molécule appelée ligand. Le microcalorimètre comporte deux cellules, l'une servant de cellule de référence contient de l'eau ou une solution tampon, l'autre contient le substrat dans l'eau (ou le tampon). La cellule de référence et la cellule d'échantillon sont placées à une température constante voulue pendant le temps de la titration. Le microcalorimètre doit maintenir ces deux cellules à une température rigoureusement égale. Le ligand est chargé dans une seringue placée dans un dispositif d'injection permettant des ajouts contrôlés de ligand dans la cellule de travail contenant le substrat. A chaque ajout correspond une libération ou une absorption de chaleur caractéristique de l'interaction entre les partenaires d'interaction. La Figure 8 illustre les différents composants d'un appareil de titration calorimétrique isotherme.⁴⁷

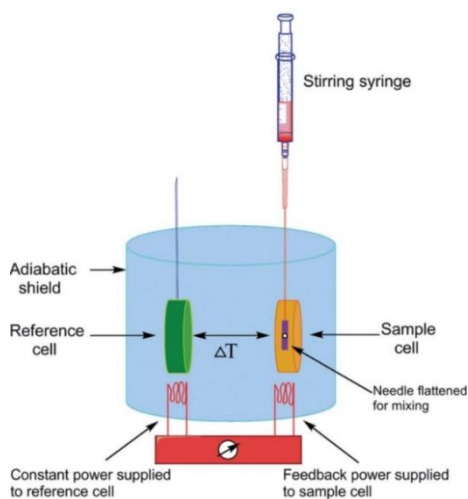


Figure 8 : Représentation schématique d'un appareil de titration calorimétrique isotherme.⁴⁸

A chaque ajout d'un aliquot de ligand les variations de chaleur sont détectées et mesurées. Le système de régulation diminue ou accentue la puissance de chauffe, de façon à maintenir la différence de température entre la cellule de référence et la cellule d'échantillon nulle. Cette puissance de chauffe présente, en fonction du temps, une série de pics correspondant à chacune des injections, dont les aires sont égales à la quantité de chaleur dégagée ou absorbée. Le diagramme représentant la variation de la puissance thermique au cours du temps est appelée thermogramme (voir Figure 9). Au cours de la titration, le substrat est progressivement saturé en ligand et la variation de chaleur commence à décroître jusqu'à ce que finalement la cellule d'échantillon contienne un excès de ligand par rapport au substrat. Une pseudo-isotherme décrivant l'interaction substrat-ligand, appelée diagramme de Wiseman, est obtenue en traçant la chaleur absorbée / dégagée par mole de l'agent titrant en fonction du ratio molaire des deux agents. La détermination des paramètres thermodynamiques d'interaction se fait par ajustement non linéaire des points expérimentaux du diagramme de Wiseman à un modèle mathématique adéquat. La Figure 9 représente un exemple de titration de copolymères statistiques d'acrylamide et de 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonate (PAMAMPS, 3 g/L) par de la polylysine linéaire (PLL, 17 g/L) à 25°C dans un tampon Tris 12 mM, HCl 10 mM et NaCl 1390 mM.

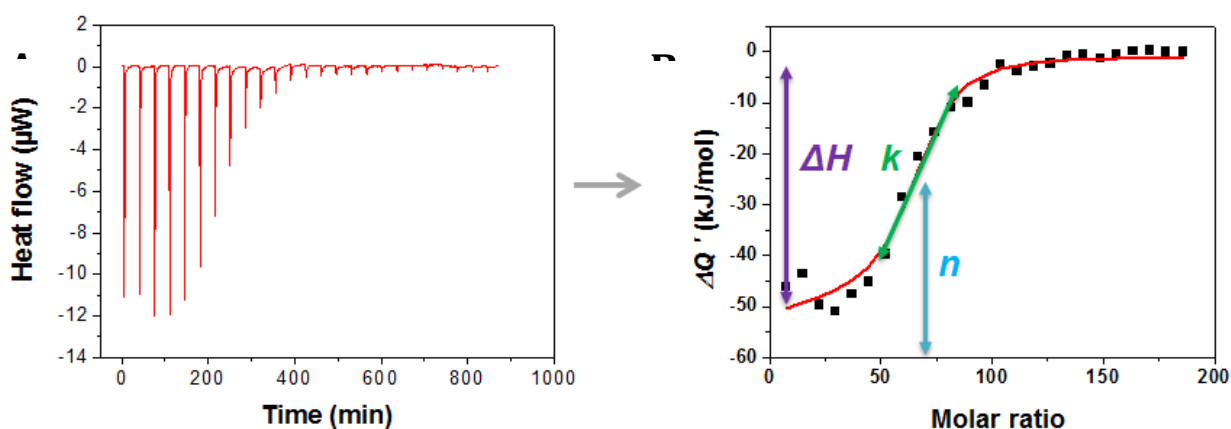


Figure 9 : Thermogramme représentant la chaleur dégagée à chaque injection en fonction du temps (A) et diagramme de Wiseman correspondant (B). Conditions expérimentales : titrage d'une solution de PLL (17 g/L) dans une solution de PAMAMPS (3 g/L) dans un tampon Tris 12 mM, HCl 10 mM et NaCl 1390 mM à pH 7,4 et 25 ° C. 25 injections de 10 µL chacune. Paramètres d'ajustement non-linéaire obtenus : $k = (1,95 \pm 0,51) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; $n = 65 \pm 1$ (PLL / PAMAMPS) et $\Delta H = -52 \pm 2 \text{ kJ/mol}$.⁴⁹

L'ajustement non linéaire du diagramme de Wiseman à l'aide des équations (54-56) donne accès aux paramètres suivants :

- La variation d'enthalpie (ΔH),
- la constante d'interaction (K_d),
- la stoechiométrie d'interaction (n)
- l'enthalpie libre ($\Delta G = -RT \ln K_d$), avec R la constante des gaz parfaits et T la température.
- l'entropie (ΔS) déterminée à partir de la relation $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

Le principal avantage de l'ITC réside dans sa capacité à fournir un profil thermodynamique complet en une seule expérience. De plus, l'ITC est une méthode qui ne nécessite aucun marquage, immobilisation ou modification chimique des molécules à étudier. Elle n'a pas non plus de limitation de masse molaire ou de taille.^{49,50} L'inconvénient majeur limitant l'utilisation de l'ITC est la quantité assez importante d'échantillon requise. D'autre part, les mesures sont relativement longues, le temps expérimental total est estimé à environ 30 h pour une isotherme d'adsorption, en duplicat.⁴⁹ De plus, l'étude de cinétiques lentes de complexation est compliquée et fastidieuse en raison du temps d'attente prolongé entre deux injections successives de ligand. Enfin, il n'est pas évident d'étudier l'effet de l'ordre d'ajout des deux partenaires (ligand et substrat) dans les mélanges sur les paramètres de liaison en ITC. L'ajout incrémental de substrat (plutôt que le ligand) représente en effet une expérience différente qu'il est difficile d'interpréter.

2.2.2 Résonance des plasmons de surface (SPR)

Un système de détection de résonance plasmonique de surface (en anglais *surface plasmon resonance* (SPR)) mesure les variations de l'indice de réfraction à la surface d'un capteur lorsqu'un récepteur se lie à un ligand ou se sépare de ce ligand. La résonance plasmonique de surface est un phénomène qui se produit dans les films conducteurs minces à l'interface entre deux milieux d'indice de réfraction différent. Dans les systèmes SPR, les deux milieux sont le verre du capteur et la solution d'échantillon, et le film conducteur est une fine couche d'or à la surface du capteur. L'approche consiste à fixer une molécule à la surface du capteur, puis à faire passer *via* un système d'écoulement micro-fluidique un échantillon contenant une ou plusieurs molécules d'intérêt sur la surface, permettant le contact entre les molécules d'intérêt, comme l'illustre la Figure 10. Des

modifications à la surface du capteur entraînent des modifications de l'indice de réfraction de la solution, mesurables et enregistrées sous forme d'unités de résonance (RU). La liaison des molécules à la surface du capteur génère une réponse proportionnelle à la masse molaire liée et, par conséquent, au nombre de molécules à la surface du capteur.

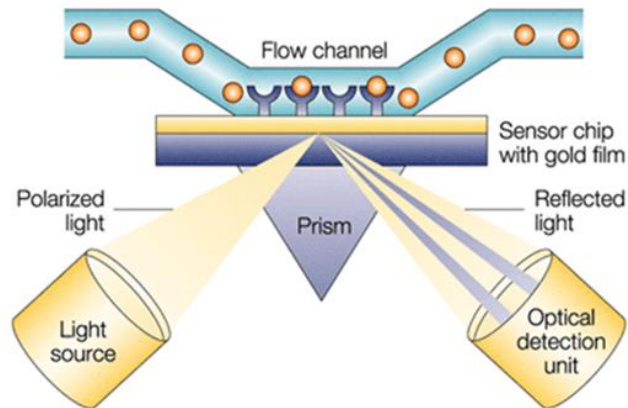


Figure 10 : Représentation schématique du principe de la résonance plasmonique de surface.⁵¹

Une mesure en continu des variations de l'angle de réfraction permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées dans la cellule de micro-fluidique. Les données obtenues permettent de tracer un « *sensogramme* » qui est une représentation graphique de la réponse de liaison exprimée en unités de résonance en fonction du temps, affichée et enregistrée au moment où un changement de masse se produit à la surface de la puce du capteur.⁵² La Figure 11 représente un sensogramme classique obtenu par SPR.

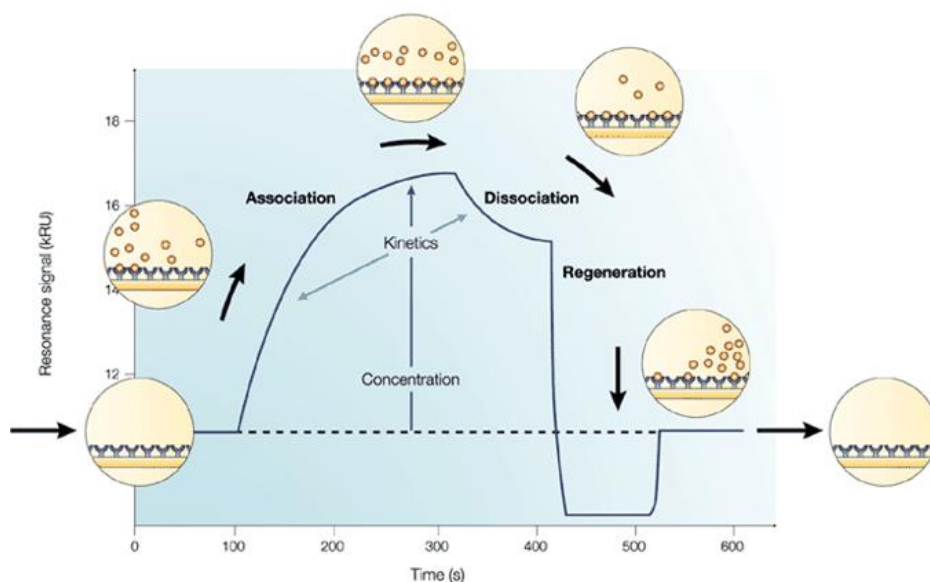


Figure 11 : Sensogramme : représentation schématique de la variation du signal de résonance en fonction du temps.⁵¹

Lorsque l'analyte se lie à la surface, l'indice de réfraction du milieu adjacent à la surface du capteur augmente, ce qui entraîne une augmentation du signal de résonance. Cette étape est appelée association. À l'équilibre, par définition, la quantité d'analyte qui s'associe et se dissocie avec le récepteur est égale. Lorsque la solution d'analyte est remplacée par le tampon seul, le complexe récepteur-analyte peut se séparer, ce qui entraîne une diminution du signal de résonance, cette étape est appelée dissociation. En fin d'analyse une solution de régénération est utilisée à pour rompre les liaisons et régénérer le récepteur libre.

L'analyse de la variation de l'angle de résonance en fonction du temps permet, avec l'utilisation d'un modèle mathématique adapté, de remonter aux constantes cinétiques d'association et de dissociation k_{on} et k_{off} , ainsi qu'à la constante d'équilibre K . La limitation principale de cette méthode réside dans la nécessité d'immobiliser l'un des partenaires de l'interaction.

2.2.3 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Le principe de la chromatographie d'exclusion stérique (en anglais *size exclusion chromatography* (SEC)) repose sur la différence des vitesses d'éluion des différentes (macro)molécules en fonction du volume hydrodynamique. L'échantillon est introduit dans une

phase mobile liquide et traverse une phase stationnaire solide. La phase stationnaire consiste en une matrice poreuse, généralement sous forme de billes ou de gels inertes. Le volume de phase mobile liquide comprend le volume interstitiel (volume hors des pores) et le volume poreux (à l'intérieur des pores). En raison de leur volume hydrodynamique et de l'exclusion aux parois des pores, les (macro)molécules ont des capacités différentes à explorer le volume poreux. Celles de grande taille ne peuvent pas rentrer dans tous les pores et sont éluées plus rapidement. Celles de plus petite taille rentrent dans de nombreux pores et sont donc éluées plus lentement. La Figure 12 illustre le principe de la chromatographie d'exclusion stérique. Lorsque la SEC est associée à des détecteurs d'indice de réfraction (RI), d'absorbance (UV), de diffusion de lumière (LS) et de viscosité (VIS), elle permet d'accéder à la masse molaire moyenne en poids (M_w), la masse molaire moyenne en nombre (M_n), l'indice de polydispersité (PDI), le rayon hydrodynamique (R_h) et à la viscosité intrinsèque ($[\eta]$).

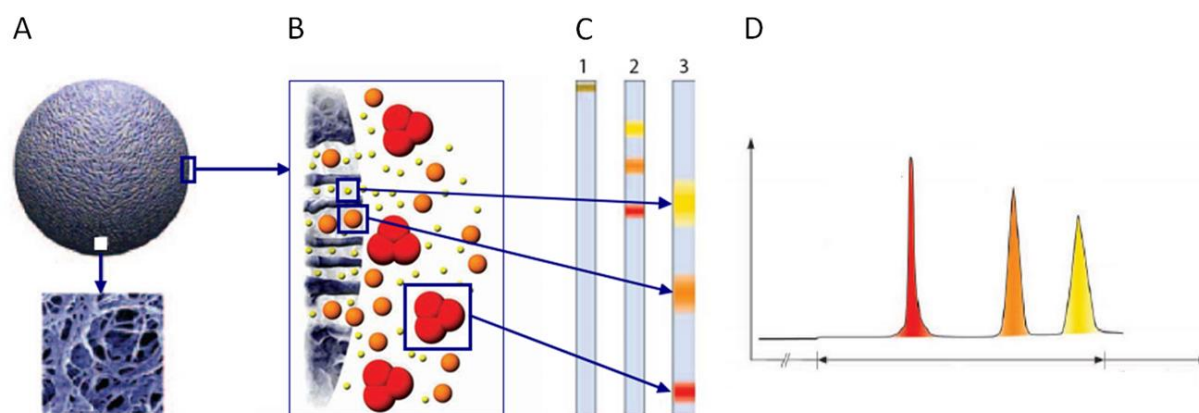


Figure 12 : Principe de la Chromatographie d'Exclusion Stérique. Diagramme agrandi d'une bille de phase mobile et de ses pores (A). Illustration de l'entrée sélective des particules dans les pores en fonction de leur volume hydrodynamique (B). Illustration de la différence des vitesses d'élué des différentes molécules en fonction du volume hydrodynamique (C). Chromatogramme obtenu (D). Adapté de⁵³.

2.2.4 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La Calorimétrie Différentielle à Balayage (en anglais *Differential Scanning Calorimetry* (DSC)) est une technique qui exploite la mesure de la variation de chaleur associée à la dénaturation thermique d'une molécule lorsque celle-ci est soumise à une rampe de température. Les macromolécules telles que les protéines peuvent former des structures tridimensionnelles bien

définies. Sous l'effet de la chaleur, les molécules subissent des changements structuraux qui se traduisent par une absorption de chaleur due à la redistribution des liaisons non covalentes. La DSC mesure la chaleur absorbée par un échantillon lors du déploiement des protéines, ce qui permet de caractériser la stabilité de la protéine. Deux méthodes de DSC sont connues : ⁵⁴

- La première technique est basée sur la différence des échanges de flux de chaleur.
- La seconde technique est basée sur le principe de la compensation de puissance.

2.2.4.1 DSC à flux de chaleur

En DSC à flux de chaleur, l'échantillon et la référence sont placés dans un même four. La température du four varie de façon programmée. Une sonde de platine permet d'enregistrer l'évolution de la température. Les différences de flux de chaleur entre l'échantillon et la référence pendant un cycle de température sont mesurées.

2.2.4.2 DSC à compensation de puissance

En DSC à compensation de puissance, l'échantillon et la référence sont placés dans deux unités de chauffage indépendantes présentes dans une même enceinte calorifique. Les températures de l'échantillon et de la référence sont maintenues égales et sont augmentées ou diminuées de manière linéaire. Les énergies absorbées ou dégagées par l'échantillon créent une différence avec la référence. La puissance nécessaire pour maintenir la température de l'échantillon égale à la température de référence est mesurée. La DSC à compensation de puissance a une sensibilité plus faible que la DSC à flux thermique, mais son temps de réponse est plus rapide et la résolution plus élevée.

Le résultat d'une expérience de DSC est une courbe représentant le flux de chaleur ou la capacité thermique en fonction de la température, cette courbe est nommée thermogramme. La Figure 13 représente un thermogramme classique pouvant être obtenu par DSC. La métrique principale générée par les mesures DSC est la température médiane de transition thermique (T_m). Ce point correspond à la température à laquelle les molécules natives et dénaturées sont présentes en quantités égales dans un échantillon. Une T_m plus élevée indique une plus grande stabilité. En

pratique, la T_m est facilement accessible à partir des données obtenues en DSC, car elle correspond à la température à laquelle un thermogramme affiche sa valeur maximale. L'enthalpie de dénaturation qui correspond à l'aire sous la courbe du pic peut, dans certains cas, également être calculée à partir du thermogramme. Il est possible pour certaines molécules d'obtenir plusieurs pics sur le thermogramme, chacun ayant sa propre T_m .

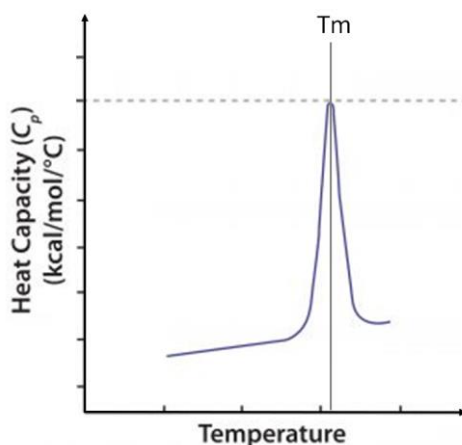


Figure 13 : Représentation d'un thermogramme classique pouvant être obtenu en DSC : la capacité thermique est tracée en fonction de la température. Adapté de⁵⁵.

Plus la température médiane de transition thermique est élevée, plus la molécule ou le complexe étudié est stable. Si un ligand se lie à un substrat avec une affinité élevée, le complexe substrat-ligand peut avoir une forte stabilité thermique, donc une T_m supérieure à celle du substrat libre. A l'inverse, un ligand peut aussi déstabiliser un substrat. Dans ce cas, la T_m du complexe sera inférieure à celle du substrat seul. Ainsi, la DSC peut être utilisée pour étudier la stabilité d'une molécule ou d'un complexe. La Figure 14 montre par exemple que l'utilisation d'un tampon citrate contenant du mannitol entraîne un déplacement positif de la température médiane de transition thermique d'une protéine notée « protéine X », par rapport à la température médiane de transition thermique obtenue pour cette même molécule dans un tampon citrate ne contenant pas de mannitol.⁵⁵ Cela montre que la protéine étudiée est plus stable dans le tampon citrate contenant du mannitol.

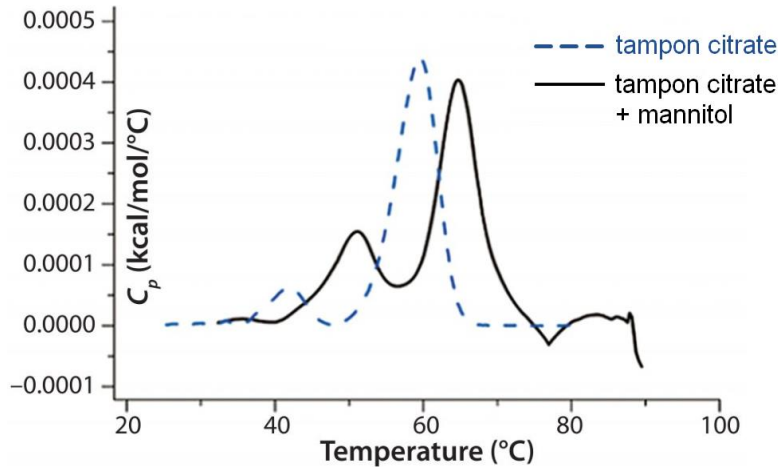


Figure 14 : Superposition de deux thermogrammes obtenus pour une même protéine dans deux tampons différents à pH 3,5.⁵⁵

La DSC permet de déterminer les énergies de liaison de complexes très étroitement associés et de complexes s'équilibrant très lentement. Cependant, la DSC ne permet pas d'analyser des mélanges complexes. En effet, le résultat obtenu est une température médiane de transition. Ainsi l'analyse d'un mélange contenant un grand nombre de molécules différentes ne pourra pas aboutir à des résultats exploitables.

2.2.5 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (en anglais *Dynamic Light Scattering* (DLS)) est une technique non destructive fondée sur l'analyse des fluctuations dans le temps de l'intensité de la lumière diffusée par les particules. Elle permet d'accéder à la taille des particules. La DLS est également parfois appelée diffusion quasi-élastique de la lumière. La DLS repose sur le principe selon lequel les particules en suspension dans un liquide se déplacent de manière aléatoire, c'est le mouvement brownien. Le mouvement des particules est décrit par l'équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta_s R_h} \quad (77)$$

où D est le coefficient de diffusion, k_B est la constante de Boltzmann, T est la température, η_s est la viscosité du fluide et R_h est le rayon hydrodynamique de la particule. Les particules de plus

grande taille, ayant le rayon hydrodynamique (R_h) le plus élevé, ont les coefficients de diffusion D les plus faibles. Le rayon hydrodynamique est le rayon d'une sphère pleine équivalente qui aurait le même coefficient de diffusion (et/ou le même coefficient de friction) que la particule considérée dans le solvant considéré. Dans un système DLS, un laser hélium-néon de longueur d'onde connue éclaire une cuvette contenant des particules en suspension dans un liquide. Une partie du faisceau traverse l'échantillon et une partie est diffusée par les particules. Le signal lumineux diffusé est mesuré par un détecteur placé à un angle θ . La Figure 15 illustre le montage d'un instrument de DLS.

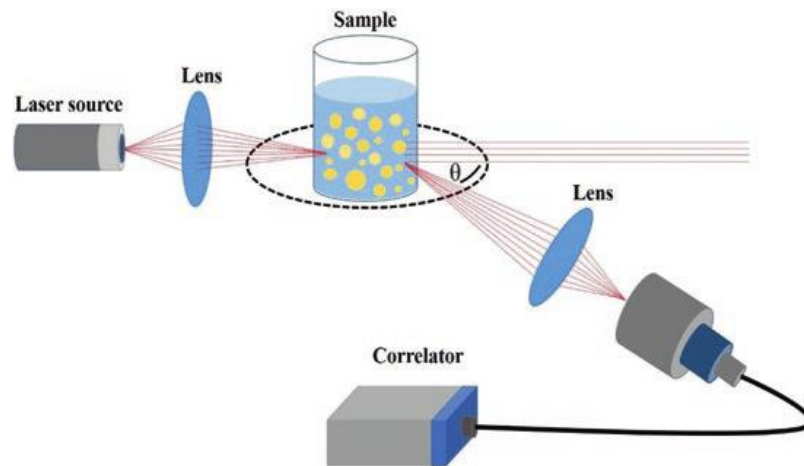


Figure 15 : Représentation schématique d'un système d'analyse par la diffusion dynamique de la lumière.⁵⁶

Avant d'atteindre le détecteur, la lumière diffusée par les particules individuelles subit des interférences provenant de celles diffusées par d'autres particules qui se déplacent toutes de manière aléatoire. Cela entraîne des fluctuations aléatoires dans le temps de l'intensité de la lumière diffusée. La Figure 16 montre un graphique typique de l'intensité de la lumière diffusée en fonction du temps pour deux tailles de particules. Les plus petites particules diffusent plus rapidement que les plus grosses et les fluctuations de l'intensité diffusée sont plus rapides. Pour déterminer le rayon hydrodynamique des particules, il est nécessaire de corrélérer l'intensité de la lumière diffusée au coefficient de diffusion des particules. Ceci est fait en utilisant une fonction d'autocorrélation.

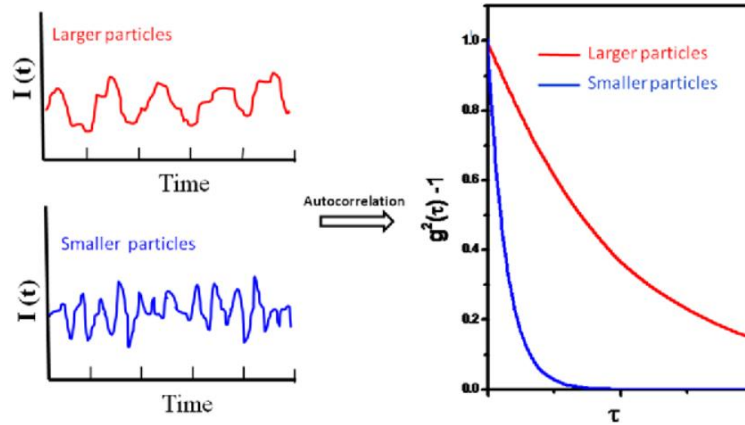


Figure 16 : Représentation schématique des fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée et des fonctions d'autocorrélation correspondantes à partir de suspensions de particules de différentes tailles.⁵⁷

Les particules de taille importante diffusent de manière bien plus importante que les particules de faible taille, l'intensité diffusée variant comme le rayon à la puissance 6. Ainsi, lors de l'analyse d'un mélange de particules de différentes tailles, la lumière diffusée par les grosses particules peut masquer la lumière des plus petites.

2.2.6 Microscopie électronique (EM)

En microscopie électronique un faisceau d'électrons est utilisé pour analyser un échantillon et obtenir une image de très haute résolution. Il existe plusieurs types de microscopie électronique. Les plus connus sont le microscope électronique en transmission et le microscope électronique à balayage.

2.2.6.1 Microscopie électronique en transmission (TEM)

La microscopie électronique en transmission (en anglais *Transmission Electron Microscopy* (TEM)) est une puissante technique d'obtention d'images de très haute résolution de coupes minces d'un échantillon. Un faisceau d'électrons est transmis à travers un échantillon très mince à l'intérieur d'une colonne placée sous vide. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon permettent la formation d'une image. Des électrons accélérés par une haute tension possèdent une longueur d'onde, et donc une résolution, de l'ordre du picomètre. En pratique, les aberrations des lentilles en limitent la résolution de l'ordre de l'angström. Les images obtenues proviennent essentiellement des électrons diffusés élastiquement. Ces images ne sont généralement

pas explicites et doivent être interprétées.^{58,59} Le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission est présenté sur le schéma de la Figure 17.

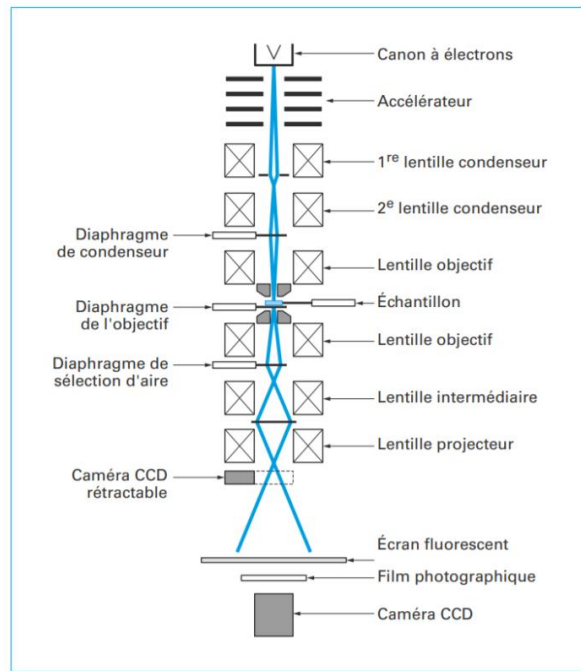


Figure 17 : Schéma d'un microscope électronique à transmission.⁶⁰

2.2.6.2 Microscope électronique à balayage (SEM)

Le microscope électronique à balayage (en anglais *Scanning Electron Microscopy* (SEM)) est une puissante technique d'observation de la topographie des surfaces. Un faisceau d'électrons primaires très fin balaye la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet principalement des électrons secondaires, mais aussi des électrons rétrodiffusés ainsi que des rayons X, et adsorbe certains électrons primaires. Ces particules sont analysées par plusieurs détecteurs d'électrons spécifiques et complétés par des détecteurs de photons. Les signaux caractéristiques obtenus permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface. Le principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage est représenté en Figure 18.

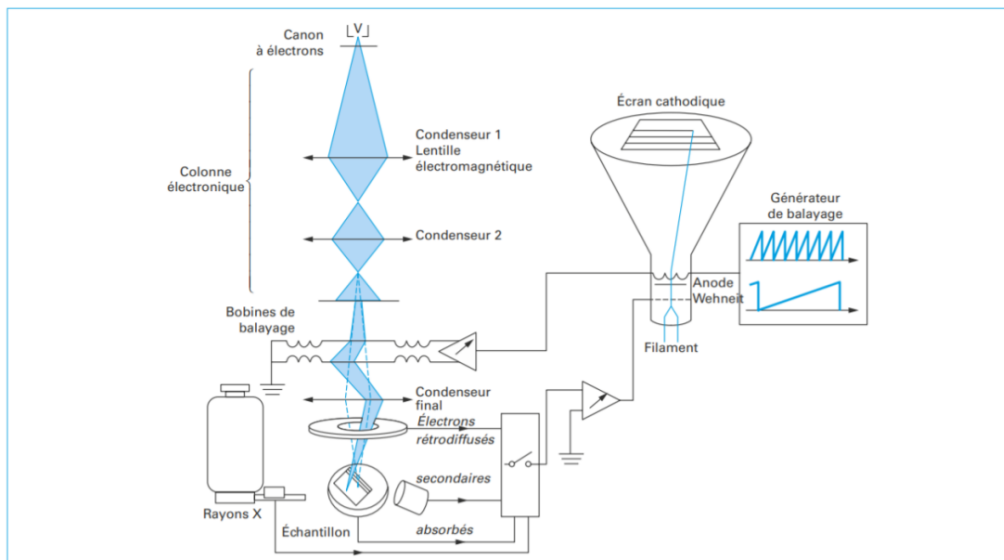


Figure 18 : Schéma d'un microscope électronique à balayage.⁶¹

Apparue plus récemment que les deux méthodes énoncées précédemment, la microscopie électronique à balayage environnementale permet d'observer la structure des échantillons dans leur état naturel sans traitement de déshydratation ou de métallisation préalable. Le principe de détection des électrons est différent de la microscopie électronique à balayage classique. Un gradient dégressif du vide dans la colonne, depuis le canon jusqu'à la chambre, est obtenu par un système de pompage différentiel. Dans cette chambre, les molécules de gaz percutées par les électrons jouent le rôle d'amplificateur du signal jusqu'au détecteur d'électrons secondaires en phase gazeuse qui est utilisé à la place du système de détection conventionnel. L'imagerie en contraste chimique par détection des électrons rétrodiffusés ou des cartographies élémentaires par détection des rayons X sont également possibles.⁶²

2.2.7 Electrophorèse capillaire (CE)

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative basée sur la migration différentielle d'espèces chargées sous l'influence d'un champ électrique. Elle est particulièrement adaptée pour l'étude des interactions entre deux espèces dont l'une, au moins, est chargée. Les appareils d'électrophorèse capillaire sont constitués d'un capillaire de séparation dont les extrémités sont immergées dans deux réservoirs d'électrolytes. La Figure 19 présente le montage classique d'une électrophorèse capillaire. Pour introduire l'échantillon, l'extrémité du capillaire est plongée dans le

flacon contenant l'échantillon, puis est replacée dans le réservoir électrolyte. En appliquant une différence de potentiel entre les deux électrodes, un champ électrique est généré à l'intérieur du capillaire. Ce champ électrique fait migrer les espèces chargées selon leur mobilité électrophorétique qui sont par la suite détectées au niveau de la fenêtre de détection. L'UV est le mode de détection le plus utilisé en électrophorèse capillaire. D'autres détecteurs tels que la fluorescence, la conductimétrie ou la spectrométrie de masse peuvent également être utilisés.

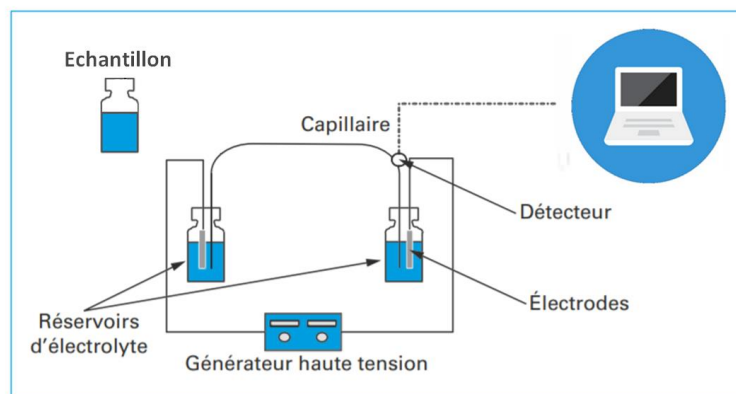


Figure 19 : Représentation schématique de l'appareillage d'électrophorèse capillaire. Adapté de⁶³.

Les sections suivantes présentent les différents modes utilisés en CE pour l'étude des interactions.

2.2.7.1 Injection directe en électrophorèse de zone (ID-CZE)

L'injection directe en électrophorèse de zone, également appelée électrophorèse hors équilibre de mélanges équilibrés (en anglais *Non Equilibrium Electrophoresis of Equilibrated Sample Mixtures*), consiste à injecter directement dans un capillaire rempli par un électrolyte, quelques nL d'un mélange pré-incubé de substrat (S) et de ligand (L), additionné ou non d'un marqueur (M). Dans le cas où les différentes espèces ont des mobilités électrophorétiques suffisamment différentes, la migration aboutit à la formation de pics représentatifs de la molécule de marqueur, du substrat libre, du complexe et du ligand libre. Un étalonnage de l'aire du pic de ligand libre, réalisé par injection du ligand seul, permet ensuite de déduire la concentration en ligand libre pour les différents mélanges substrat-ligand injectés. L'accès à la concentration en ligand libre permet ensuite, par l'écriture du modèle des équilibres successifs ou du modèle des

interactions multi-sites d'énergies identiques, de quantifier l'interaction. La Figure 20 représente schématiquement la mise en œuvre expérimentale de ce protocole.

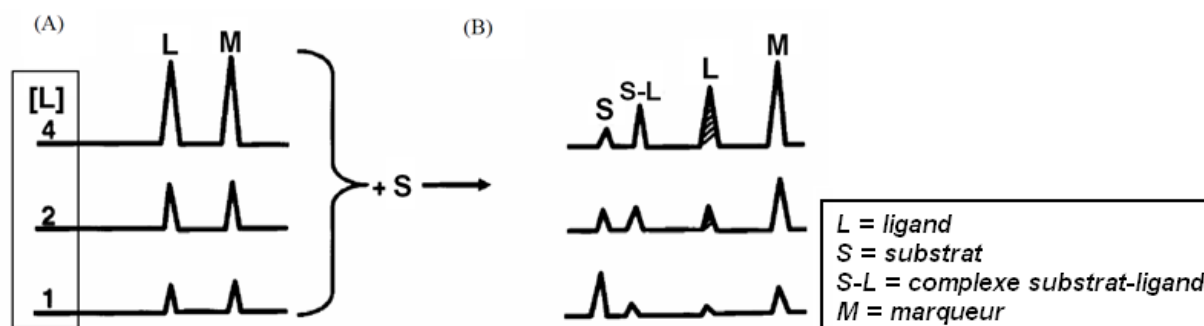


Figure 20 : Représentation schématique de la mise en œuvre expérimentale de la méthode de l'injection directe en CE. Etalonnage de l'aire du pic de ligand libre (L) (A). Mélanges substrat-ligand à différentes concentrations (B). Adapté de ⁴³.

L'injection directe nécessite de très faibles quantités en substrat et en ligand, puisque seulement quelques nL des deux partenaires sont injectés par essai. Ce mode opératoire peut également permettre de suivre la cinétique de complexation par injections répétées au cours du temps d'un mélange substrat-ligand. Pour être valide, la méthode de l'injection directe nécessite que les complexes formés soient suffisamment stables à l'échelle de temps de la migration électrophorétique (généralement, quelques minutes). En effet, l'aire du pic de ligand libre quantifiée par CE doit représenter la concentration de ligand libre à l'équilibre dans le mélange injecté. Par conséquent, la dissociation du complexe au cours de la migration doit être négligeable, c'est à dire cinétiquement lente par rapport au temps de migration.

Lorsque le complexe se dissocie au cours de la migration, les électrophérogrammes obtenus sont en forme de U, entre le pic du complexe et celui du soluté libre. La Figure 21 montre l'électrophérogramme obtenu pour un système ADN / protéine pour lequel le complexe analysé se dissocie au cours de la migration. Le rapport des aires obtenues permet d'évaluer la constante d'équilibre d'association K . Il est également possible de déterminer la constante de vitesse de dissociation du complexe.

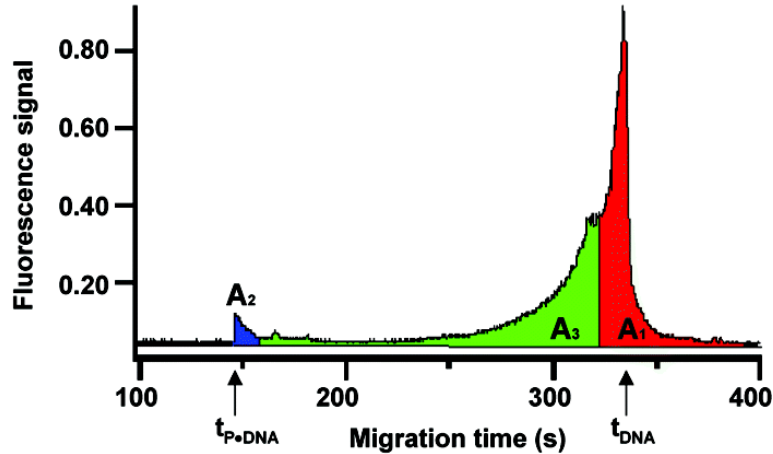


Figure 21 : Electrophérogramme d'un mélange ADN /protéine SSB (single-strand binding protein) par le protocole de l'injection directe. Identification : A1 = aire de l'ADN libre ; A3 = aire du monomère libre d'ADN résultant de la dissociation du complexe ADN-SSB ; A2 = aire du complexe. Conditions opératoires : non précisées. D'après⁶⁴ .

2.2.7.2 L'analyse frontale continue par électrophorèse capillaire (FACCE)

Les deux partenaires d'interactions sont préalablement mis en solution dans le tampon d'analyse et laissé en contact jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. Le capillaire est rempli avec le tampon seul, puis plongé dans le mélange substrat / ligand. Une tension est ensuite appliquée aux bornes du capillaire pour introduire le ligand libre par processus électrophorétique. L'échantillon est introduit électrocinétiquement en continu dans le capillaire. La Figure 22 illustre le principe de fonctionnement de la FACCE. Idéalement, seul le ligand libre doit entrer dans le capillaire, de façon à éviter toute dissociation potentielle du complexe dans le capillaire.

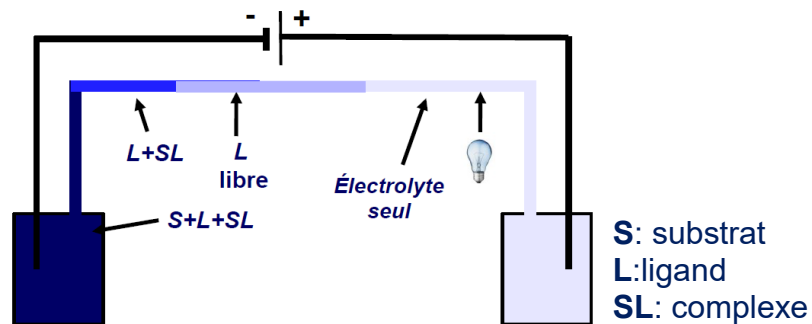


Figure 22 : Principe de fonctionnement de la FACCE.

La quantité de ligand libre introduite dans le capillaire donne lieu à des fronts d'absorbance dont la hauteur de plateau est proportionnelle à la concentration de l'espèce correspondante. Une courbe de calibration permet de déterminer la concentration en ligand libre et de tracer l'isotherme d'adsorption $\bar{n} = f([L])$ à partir de l'équation (78).

$$\bar{n} = \frac{[L]_0 - [L]}{[S]_0} = f([L]) \quad (78)$$

où $[L]$ est la concentration du ligand libre, $[S]_0$ est la concentration initiale du substrat et $[L]_0$ est la concentration initiale du ligand. Pour n sites indépendants de même énergie, la stœchiométrie d'interaction (n) et la constante de site de liaison (k) peuvent être obtenues à partir d'un ajustement non-linéaire de l'isotherme en utilisant l'équation (79).

$$\bar{n} = \frac{nk[L]}{1+k[L]} \quad (79)$$

La Figure 23 présente un exemple de plusieurs électrophérogrammes obtenus en FACCE dans le cas de l'interaction entre la poly (L-lysine) (PLL) avec des copolymères statistiques d'acrylamide et de 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonate (PAMAMPS), ainsi que l'isotherme d'adsorption associée.

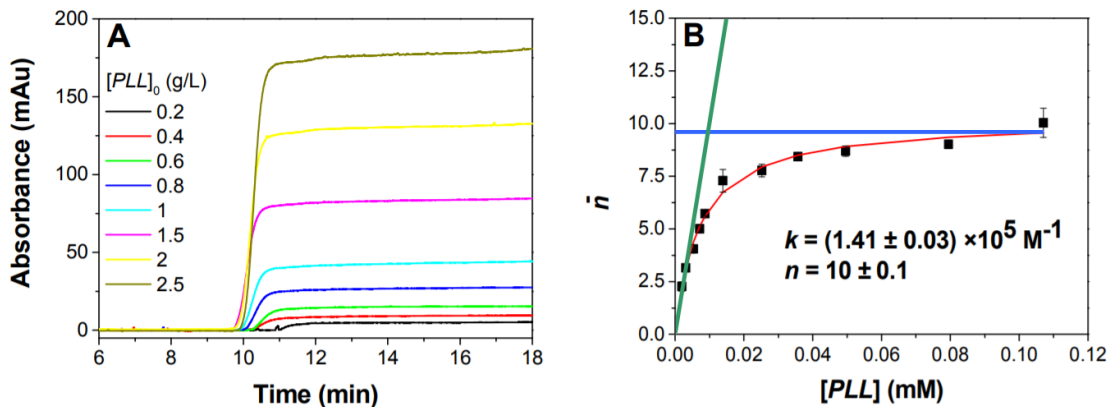


Figure 23 : Exemple de détermination de la stœchiométrie d'interaction (n) et de la constante de site (k) par FACCE pour l'interaction entre PLL100-PAMAMPS à 15% à une force ionique de 315 mM. Electrophérogrammes montrant les fronts de PLL libre (A) et isotherme d'adsorption associée (B). Conditions expérimentales: capillaire de 33,5 cm (8,5 cm au détecteur) x 50 μm i.d. revêtu de PDADMAC. Électrolyte: Tris 12 mM, HCl 10 mM, NaCl 305 mM, pH 7,4. Tension appliquée: +1 kV avec une compression hydrodynamique de +5 mbar. Détection à 200 nm. Adapté de⁶⁵.

Un des principaux avantages de la FACCE est que le complexe formé reste à l'équilibre au cours de l'analyse. En effet, la quantité de ligand libre injectée dans le capillaire est faible par rapport au volume de mélange substrat / ligand placé à l'entrée du capillaire. De plus, la FACCE est moins sensible aux problèmes de reproductibilité liés aux interactions entre le ligand et la paroi du capillaire, comparée aux autres modes électrophorétiques. Comme pour les autres méthodes électrophorétiques, la consommation d'échantillon de la FACCE est faible, de l'ordre de quelques μL . La FACCE permet d'étudier des cinétiques de formation lentes car les deux partenaires d'interaction sont mis en solution dans le tampon avant l'analyse. Cela permet également de facilement étudier l'effet de l'ordre d'addition des partenaires dans les mélanges. Enfin, le temps expérimental est généralement inférieur aux mesures réalisées par ITC. En effet, Lounis et al.⁴⁹ ont réalisé une étude comparant ces deux méthodes d'analyses. D'après les essais réalisés au cours de cette étude pour les interactions entre PLL et PAMAMPS, le tracé d'une isotherme d'adsorption dupliquée nécessite environ 30 h en ITC contre 16 h en FACCE. D'autre part, la FACCE en mode de détection par absorbance UV permet de calculer des constantes d'interaction comprises entre 10^3 et 10^8 M^{-1} . Pour des constantes supérieures à 10^8 M^{-1} , la concentration en ligand libre $[L]$ est trop faible pour obtenir des mesures précises par absorbance UV.

2.2.7.3 L'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE)

L'électrophorèse capillaire d'affinité (en anglais *mobility shift Affinity Capillary Electrophoresis* (ACE)) est basée sur la mesure de la variation de mobilité électrophorétique du substrat, sous l'effet de la variation de la concentration en ligand dans l'électrolyte. La méthode consiste à conditionner le capillaire avec un électrolyte contenant un des partenaires de l'interaction (généralement, le ligand) puis à injecter un faible volume du second partenaire d'interaction (généralement, le substrat) afin de déterminer sa mobilité électrophorétique en présence de ligand. Ainsi, une étude d'interaction par ACE s'effectue en injectant une quantité constante de substrat et en faisant varier la concentration du ligand à l'intérieur du capillaire. Sous l'effet de la complexation avec le ligand, une variation de la mobilité électrophorétique du substrat est observée. En l'absence du ligand, la mobilité électrophorétique du substrat μ_{ep} est égale à la mobilité apparente du substrat à l'état libre, μ_s . En présence de ligand, lorsque tout le substrat est complexé, la mobilité μ_{ep} est alors égale à la mobilité μ_c du substrat à l'état complexé. L'injection

du ligand dans un capillaire rempli de substrat peut également être réalisée. La Figure 24 illustre l'utilisation de l'électrophorèse capillaire d'affinité.

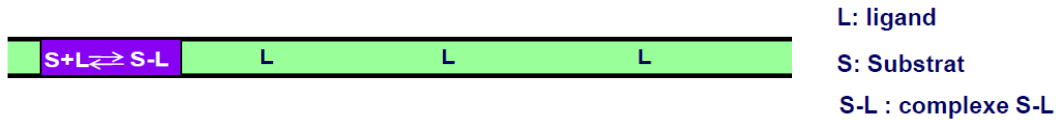


Figure 24 : Schéma illustrant le principe de l'électrophorèse capillaire d'affinité.

2.2.7.3.1 Cas des interactions de stœchiométrie 1:1

La mobilité électrophorétique apparente effective du substrat μ_{ep} est déterminée selon l'équation:

$$\mu_{ep} = \frac{l_{eff} \times L_{tot}}{t_m \times V} \quad (80)$$

où l_{eff} est la longueur effective du capillaire jusqu'au détecteur, L_{tot} est la longueur totale du capillaire, t_m est le temps de migration du substrat et V est la tension appliquée. La mobilité effective du substrat dans un capillaire rempli de ligand correspond à une combinaison linéaire des mobilités électrophorétiques entre le substrat libre μ_{S0} et complexé μ_{SL} , pondérées par leur fraction molaire :

$$\nu \mu_{ep} = \frac{[S]}{[S]_0} \mu_{S0} + \frac{[SL]}{[S]_0} \mu_{SL} \quad (81)$$

où ν est un terme correctif prenant en compte la variation de la viscosité de l'électrolyte lors de l'augmentation de la concentration en ligand. μ_{S0} est obtenu expérimentalement en mesurant la mobilité en absence de ligand dans l'électrolyte. Le terme correctif ν est déterminé par l'équation:

$$\nu = \frac{\eta_i}{\eta_0} \quad (82)$$

où η_i est la viscosité de l'électrolyte en présence de ligand, et η_0 est la viscosité de l'électrolyte en l'absence de ligand.

Dans le cas d'une interaction 1:1, la constante d'interaction s'écrit :

$$K = \frac{[SL]}{[S][L]} \quad (83)$$

Les équations de conservation de masse s'écrivent :

$$[S]_0 = [S] + [SL] \quad (84)$$

$$[L]_0 = [L] + [SL] \quad (85)$$

En combinant les équations (81), (83) et (84) on obtient :

$$v\mu_{ep} = \frac{1}{1 + K[L]} \mu_{s0} + \frac{K[L]}{1 + K[L]} \mu_{SL} = \frac{\mu_{s0} + K[L]\mu_{SL}}{1 + K[L]} \quad (86)$$

L'équation (86) représente une pseudo-isotherme d'adsorption et peut être ajustée de façon non-linéaire pour déterminer la constante d'interaction K . Elle peut aussi être écrite sous sa forme linéaire :

$$\frac{\mu_{s0} - v\mu_{ep}}{v\mu_{ep} - \mu_{SL}} = K[L] \quad (87)$$

Le tracé de $\frac{\mu_{s0} - v\mu_{ep}}{v\mu_{ep} - \mu_{SL}} = f([L])$ permet de déterminer la constante d'interaction à partir du

coefficient directeur de la droite. L'accès à la valeur expérimentale de $[L]$ dans la zone du substrat n'est pas possible. On suppose généralement que $[L] = [L]_0$, où $[L]_0$ est la concentration du ligand introduit dans le capillaire. Cela n'est vérifié que si le ligand est introduit dans l'électrolyte en excès par rapport à la concentration en substrat injecté, ou bien si la constante d'interaction est très faible. D'autres modes de linéarisation peuvent également être utilisés⁴⁵.

2.2.7.3.2 Cas des interactions de stœchiométrie d'ordre 1 :2

Dans le cas d'une interaction 1 : 2, la mobilité électrophorétique effective du substrat μ_{ep} doit tenir compte des mobilités des deux complexes SL et SL_2 . Elle peut être décrite en fonction de la concentration en ligand L selon l'équation :

$$v\mu_{ep} = \frac{\mu_{S_0} + K_1[L]\mu_{SL} + K_1K_2[L]^2\mu_{SL_2}}{1 + K_1[L] + K_1K_2[L]^2} \quad (88)$$

où K_1 et K_2 sont les constantes d'interactions successives et μ_{SL} et μ_{SL_2} sont respectivement les mobilités des complexes SL et SL_2 . L'équation obtenue est une équation du second degré. Le tracé de l'isotherme d'adsorption est alors complexe.

2.2.7.3.3 Cas des interactions de stœchiométries d'ordre supérieur

Dans le cas de complexation d'ordre supérieur, le système substrat–ligand forme des complexes successifs $SL, SL_2, SL_3... SL_n$. La mobilité effective du substrat doit alors tenir compte des mobilités des complexes correspondant aux équilibres successifs. L'ajustement non-linéaire de la pseudo-isotherme d'adsorption n'est alors plus réalisable compte-tenu du trop grand nombre de paramètres ($2n$ paramètres). Il est cependant possible d'étudier les interactions en étudiant le rapport de mobilités R défini selon l'équation suivante :

$$R = v \left[\frac{\mu_{Si}}{\mu_{S_0}} \right]_{pH} \quad (89)$$

où μ_{S_0} est la mobilité électrophorétique du substrat libre en absence de ligand et μ_{Si} est la mobilité électrophorétique du substrat en présence de ligand dans le capillaire.

Lorsque la mobilité électrophorétique du complexe est supérieure à celle du substrat libre, R augmente quand la constante d'interaction augmente. Le rapport de mobilités permet d'obtenir un classement quantitatif des interactions. En l'absence d'interaction, le rapport R est égal à 1. On remarque que le pH peut changer avec la concentration en ligand lorsque le ligand seul est utilisé

comme électrolyte (sans autre espèce tampon). La valeur de μ_{S0} doit alors être déterminée au même pH que la mesure de μ_{Si} pour prendre en compte et corriger les effets éventuels du pH sur l'ionisation du substrat. Il est nécessaire de corriger les mobilités électrophorétiques des effets de l'échauffement, de la viscosité (facteur correctif \square), et de l'état d'ionisation en travaillant à pH constant.

Ouadah N. et al.⁶⁶ se sont servis du rapport R pour étudier les interactions entre le chlorhydrate d'aluminium (ACH) et différentes protéines dans des conditions expérimentales proches des applications industrielles. La Figure 25 présente le rapport de mobilité R en fonction de la concentration en ACH. Il apparaît que les valeurs de R sont beaucoup plus élevées pour l'albumine de sérum bovin (BSA) que pour la lysozyme (Lys). En effet, R varie entre 4,4 et 9,7 pour la BSA et entre 0,7 et 1,6 pour la Lys. Cela montre que l'interaction de la BSA avec l'ACH est beaucoup plus forte que l'interaction de la Lys avec l'ACH. L'effet de la force ionique sur le rapport R est aussi discuté, sans être corrigé.

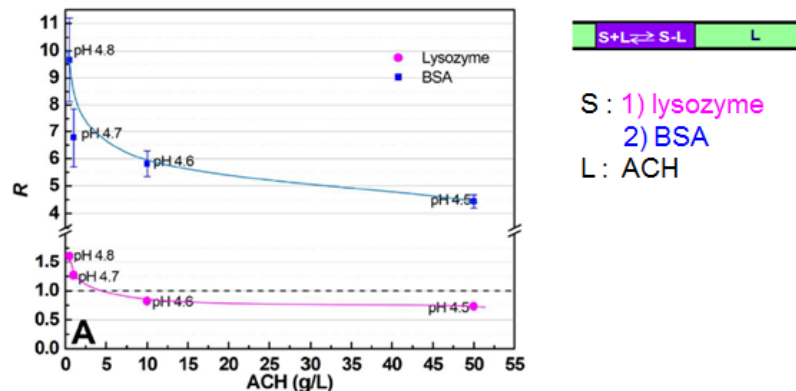


Figure 25: Variation du rapport de mobilité R en fonction de la concentration en ACH. Conditions expérimentales : capillaire en silice 50 μm I.D. \times 38,5 cm (longueur effective 30 cm) revêtement UltraTolTM LN. Tension appliquée : -10 kV. Injection hydrodynamique: 50 mbar, 5 s. Détection UV indirecte à 205 nm.⁶⁶

Un des principaux avantages de l'ACE est que le complexe n'est pas placé hors équilibre. De plus, l'analyse consomme une très faible quantité de substrat, quelques nL, et une faible quantité de ligand, quelques μL . Par ailleurs, le substrat n'a pas besoin d'être pur pour effectuer l'analyse. L'ACE nécessite néanmoins que les cinétiques d'association et de dissociation soient rapides, car le complexe se crée au cours de l'analyse.

2.2.8 Analyse de la dispersion de Taylor (TDA)

L'analyse de la dispersion de Taylor (en anglais *Taylor Dispersion Analysis* (TDA)) est une technique basée sur l'analyse de la dispersion du profil de concentration d'une bande d'échantillon injectée dans un flux laminaire. Cette mesure permet d'accéder au coefficient de diffusion D (ou rayon hydrodynamique) des molécules en solution. Quelques nL d'échantillon sont injectés dans un flux laminaire de tampon. La bande initiale d'analyte est dispersée sous l'action combinée de la diffusion du soluté et de la convection (profil de vitesse dispersif). La détection du profil de concentration, ou taylorgramme, est généralement obtenu par détection UV en ligne à travers le tube capillaire. Pour un échantillon monodisperse, le signal de détection $S(t)$ en fonction du temps t est donné par :

$$S(t) = \frac{S_0}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(\frac{-(t-t_0)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (90)$$

où t_0 est le temps moyen d'élution, σ^2 est la variance temporelle du profil d'élution et S_0 est une constante dépendant du facteur de réponse et de la quantité de soluté injectée. Le profil d'élution obtenu permet de calculer le coefficient de diffusion moléculaire D et le rayon hydrodynamique R_h des molécules en solution selon les relations suivantes :

$$D = \frac{R_c^2 t_0}{24\sigma^2} \quad (91)$$

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} = \frac{4\sigma^2 k_B T}{\pi\eta R_c^2 t_0} \quad (92)$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T est la température, R_c est le rayon interne du capillaire et η est la viscosité de l'éluant. Plus R_h est élevé, plus D est faible et plus le pic gaussien est large. La Figure 26 montre la dispersion de deux molécules de taille différente et les profils d'élution correspondants. Plus les solutés diffusent rapidement, plus ils moyennent rapidement le profil de vitesse, et moins le profil d'élution est dispersé. Contrairement à la 'self-diffusion', les solutés de plus petite dimension mènent aux plus faibles dispersions.

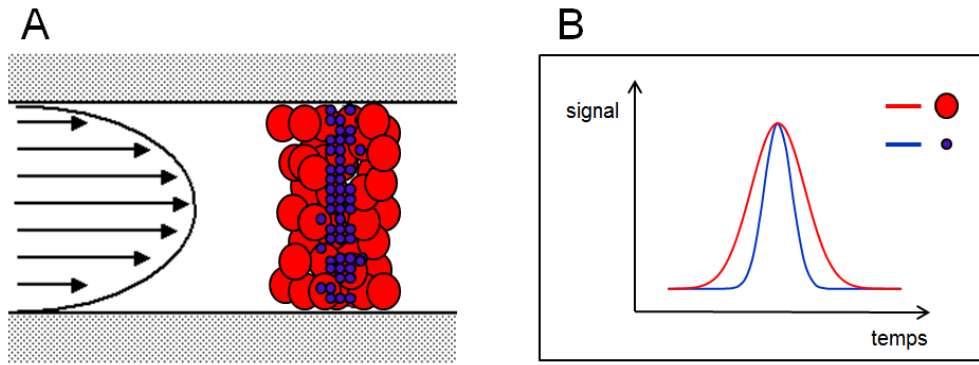


Figure 26 : Dispersion des molécules sous l’action de la diffusion et de la convection dans un écoulement laminaire (A). Illustration de la différence des profils d’éluion obtenus pour deux molécules de différente taille (B).

Pour augmenter la sensibilité de détection, la TDA peut également être mise en œuvre en mode frontal, comme l’illustre la Figure 27. Dans ce cas, l’échantillon est injecté de manière continue dans le capillaire, ce qui permet de détecter un front au lieu d’un pic.

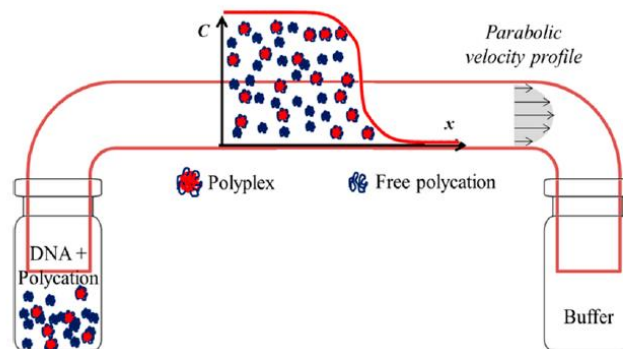


Figure 27 : Représentation schématique de l’analyse de dispersion de Taylor de polyplexes utilisant le mode frontal.⁶⁷

En analyse frontale, le signal de détection en fonction du temps est donné par :

$$\frac{S(t)}{S_0} = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{t - t_0}{\sigma \sqrt{2}} \right) \tag{93}$$

Cette expression mathématique correspond à l’intégrale de l’équation (90). Pour un mélange composé de deux populations de différente taille, l’équation (93) devient :

$$S(t) = \frac{S_1 + S_2}{2} + \frac{S_1}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{t - t_0}{\sigma_1 \sqrt{2}} \right) + \frac{S_2}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{t - t_0}{\sigma_2 \sqrt{2}} \right) \quad (94)$$

où S_1 et S_2 sont deux constantes dépendant du facteur de réponse et σ_1^2 et σ_2^2 sont les variances temporelles des profils d'élution.

Les équations (93) et (94) ne sont valables que si les deux conditions suivantes sont remplies :

- t_0 doit être beaucoup plus long que le temps de diffusion caractéristique du soluté dans la section transversale du capillaire, c'est-à-dire $t_0 \geq 1,25 R_c^2/D$, pour une erreur relative ε sur la détermination de D inférieure à 3%.
- La diffusion axiale doit être négligeable par rapport à la convection, c'est-à-dire $Pe = R_c u/D > 40$, pour une erreur relative ε sur la détermination de D inférieure à 3% avec u la vitesse moyenne de la phase mobile.⁶⁷

La TDA peut, dans certains cas, permettre de déterminer la concentration en ligand libre. Leclercq L. et al. (2015)⁶⁷ se sont intéressés à l'étude des interactions entre la polylysine PLL (DP 20) et l'ADN de saumon. Dans un premier temps, les rayons hydrodynamiques de l'ADN et de la polylysine seuls ont été étudiés. Un rayon hydrodynamique de 110 nm a été calculé pour l'ADN et un rayon de 0,9 nm pour la polylysine, comme le montre la Figure 28.

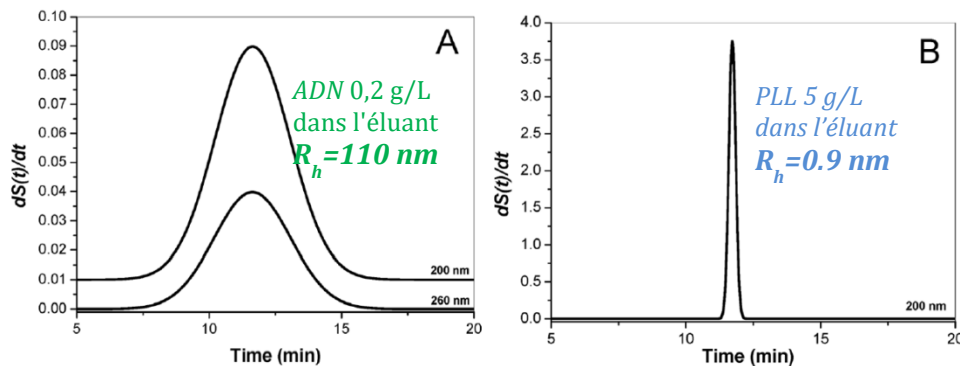


Figure 28 : Dérivée première du Taylorgramme obtenu en mode frontal pour l'ADN de saumon (A) et pour la polylysine (B). Conditions expérimentales : capillaire revêtu HPC, longueur totale 60 cm (51,5 cm au détecteur) x 50 μ m i.d. Eluant : TRIS 10 mM, HCl pH 7,4. Pression de mobilisation : 50 mbar. Détection UV : 200 et 260 nm. Température: 25 ° C.⁶⁷

Par la suite, une solution d'ADN et une solution de polylysine ont été mélangées pour former des polyplexes (complexes de polyélectrolytes). La caractérisation du mélange est présentée en Figure 29 par analyse en mode frontal. La dérivée première obtenue montre la somme de deux pics gaussiens à 200 nm. Le pic le plus large correspond au polyplexe formé et le pic plus fin correspond à la polylysine libre. En utilisant une courbe d'étalonnage pour la polylysine, le pourcentage de PLL libre a pu être calculé, il est égal à $83 \pm 1\%$ de la concentration introduite. Ce travail montre que la TDA peut donner accès facilement aux caractéristiques du complexe (stœchiométrie et rayon hydrodynamique) et permet de déterminer la concentration en ligand libre à l'équilibre. Cette méthodologie peut être appliquée à différents systèmes, pourvu que la taille du complexe soit différente de celle du ligand libre. On notera, pour que les ligands libres puissent être distingués des ligands liés, qu'il faut que les échanges entre ligands libres et liés soient lents à l'échelle de l'analyse (10-15 min dans le cas de la Figure 29), c'est-à-dire pour des cinétiques de dissociation assez lentes. La TDA est une méthode simple, directe et sans étalonnage qui utilise un faible volume d'échantillon, quelques nL .

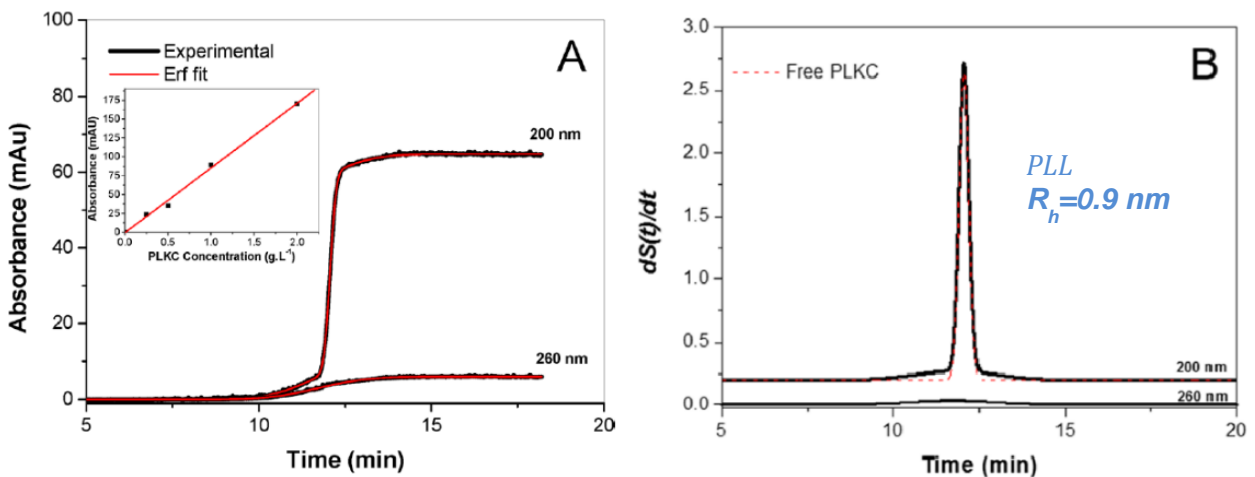


Figure 29 : Taylorgrammes obtenus pour le mélange PLL (0,6 g/L) / ADN (0,1 g/L) en mode frontal (A) et dérivées premières correspondantes (B). Conditions expérimentales : identiques à Figure 28.⁶⁷

2.3 Etat de l'art de la caractérisation des interactions antigènes-adjuvants

Cette partie présente plusieurs exemples de travaux de recherche ayant été effectués ces vingt dernières années sur la caractérisation des interactions antigènes-adjuvants pour les adjuvants polyacrylate et les sels d'aluminium.

2.3.1 Adjuvant polyacrylate

2.3.1.1 Etude des interactions PAA-BSA par SEC

Topuzogullari M. et al.⁶⁸ ont étudié la formation de complexes entre l'albumine de sérum bovin (BSA, $M_w = 70$ kDa) et l'acide polyacrylique (PAA, $M_w = 100$ kDa) à différents rapports molaires de mélange, $\gamma = n_{BSA}/n_{PAA}$. Bien que l'objectif de cette étude ne soit pas en lien direct avec les formulations vaccinales, l'étude des complexes PAA-BSA comme système modèle de libération de médicament, nous semble pertinente. Les complexes formés ont été caractérisés par chromatographie d'exclusion stérique couplée à quatre détecteurs : RI, UV, LS et VIS. Les mesures ont été effectuées dans une solution de chlorure de sodium à 0,15 M.

Une première étude a été réalisée à pH 7. En augmentant la quantité de BSA dans le mélange, le pic associé à la BSA libre augmente de manière linéaire. Il en a été déduit qu'à pH 7,0, les forces répulsives entre la protéine chargée négativement et le polyélectrolyte chargé négativement, empêchent la formation de complexes stables. La même expérience a été réalisée à pH 5 (voir Figure 30). Pour de faibles quantités de BSA introduites dans le mélange, il n'apparaît pas de pic de BSA libre sur les chromatogrammes. Un nouveau pic correspondant au complexe PAA-BSA apparaît. En augmentant progressivement la quantité de BSA présente dans le mélange, un pic correspondant à la BSA libre apparaît sur les chromatogrammes pour $n_{BSA}/n_{PAA} > 5$. La Figure 30 montre les chromatogrammes obtenus à pH 5.

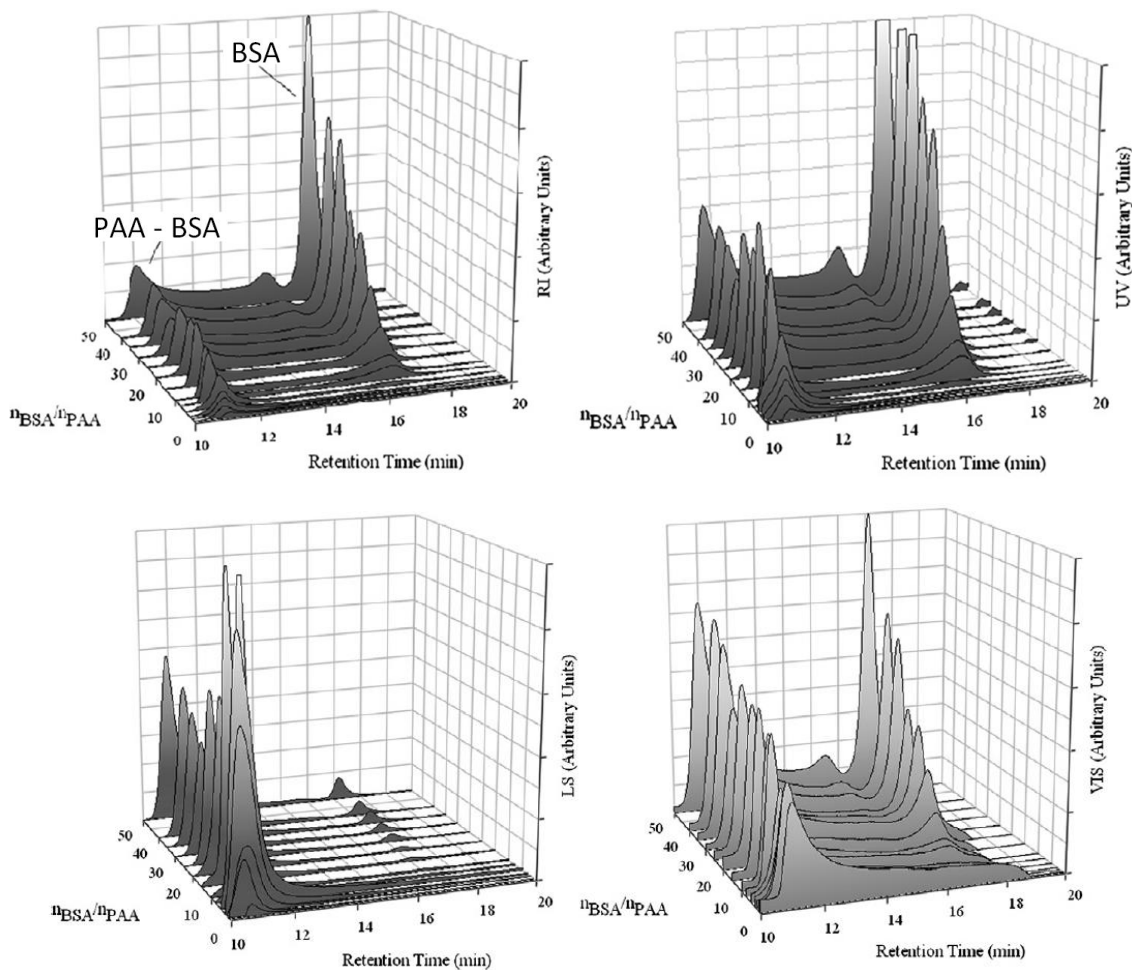


Figure 30 : Chromatogrammes RI et UV, LS et VIS obtenus pour des mélanges BSA-PAA à pH 5 en fonction du rapport molaire introduit n_{BSA} / n_{PAA} compris entre 0,5 à 50. Conditions expérimentales : colonne Shim-Pack Diol 300, longueur 500 mm, diamètre 7,9 mm. Eluant : tampon acétate 0.01 M CH₃COOH + 0,15 M NaCl (pH 5,0). Débit de 1.0 mL/min. Température : 25 ° C. BSA, $M_w = 70$ kDa ; PAA, $M_w = 100$ kDa.⁶⁸

Pour les complexes solubles formés, le nombre de molécules de BSA liées par chaîne de PAA a été exprimé par une équation de type Langmuir en fonction de la quantité libre de BSA existant dans la solution. Ces résultats ont permis d'obtenir les informations suivantes :

- le nombre maximal de molécules de BSA liées à une molécule de PAA est d'environ 30.
- sur un site d'interaction, une molécule de BSA est liée à environ 48 monomères d'acide acrylique.

La masse molaire moyenne en poids (M_w), la masse molaire moyenne en nombre (M_n) et le rayon de giration (R_g) des complexes de PAA–BSA à différents rapports molaires ont été déterminés en combinant les résultats obtenus par les détecteurs LS, VIS et RI. Il apparaît que la masse molaire moyenne en poids et en nombre, ainsi que le rayon de giration (R_g) des complexes BSA–PAA, passent par un maximum puis diminuent en fonction du rapport n_{BSA}/n_{PAA} introduit, comme l'illustre la Figure 31.

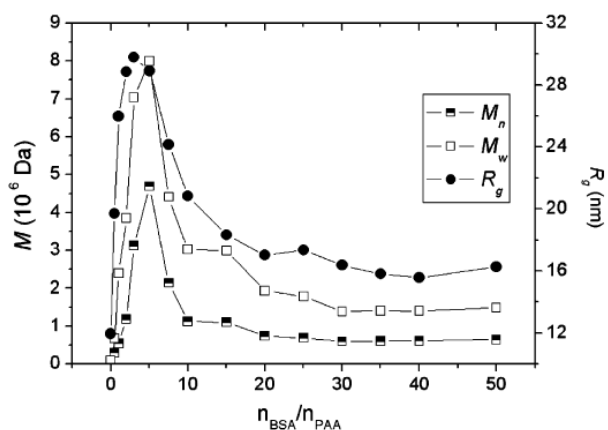


Figure 31 : Valeurs de la masse molaire moyenne en poids (M_w), de la masse molaire moyenne en nombre (M_n) et du rayon de giration (R_g) tracées en fonction du rapport molaire n_{BSA} / n_{PAA} introduit. Conditions expérimentales : identiques à celles de la Figure 30.⁶⁸

Les résultats de la Figure 31 permettent de constater que :

- pour $n_{BSA} / n_{PAA} > 5$, une augmentation de n_{BSA}/n_{PAA} entraîne une diminution des masses molaires et du rayon de giration des complexes BSA–PAA.
- La diminution des masses molaires et du rayon de giration pourrait s'expliquer par une dissociation du complexe BSA–PAA pour $n_{BSA} / n_{PAA} > 5$. En effet, lors de l'analyse le complexe est placé hors équilibre, il peut donc commencer à se dissocier au cours de l'analyse.

Cet exemple illustre la difficulté de l'interprétation des données expérimentales lorsque le système est placé hors équilibre ; ce qui est généralement le cas avec les méthodes séparatives (sauf dans le cas de la FACCE où seul le ligand libre est quantifié sans perturbation de l'équilibre).

2.3.1.2 Etude des interactions PAA–BSA par SPR

Akkilic N. et al.⁶⁹ ont étudié les interactions entre l'albumine de sérum bovin (BSA) et le poly(acide acrylique) (PAA), en temps réel, par résonance plasmonique de surface (SPR), à différents pH. L'objectif de ce travail est de pouvoir étudier les modifications structurelles des complexes BSA–PAA par SPR. Pour produire les mélanges de polymères et de protéines, différentes concentrations de la solution de BSA, dans des tampons phosphate ou acétate, ont été ajoutées au PAA. Dans le cas de cette étude, les complexes BSA–PAA sont formés en amont puis sont fixés à la surface du capteur. Il est ainsi possible d'observer les changements dans la structure des complexes BSA–PAA en temps réel, en changeant le pH de la solution présente dans le système d'écoulement microfluidique. La Figure 32 montre le sensogramme obtenu lors de l'analyse au rapport molaire $n_{BSA} / n_{PAA} = 1$.

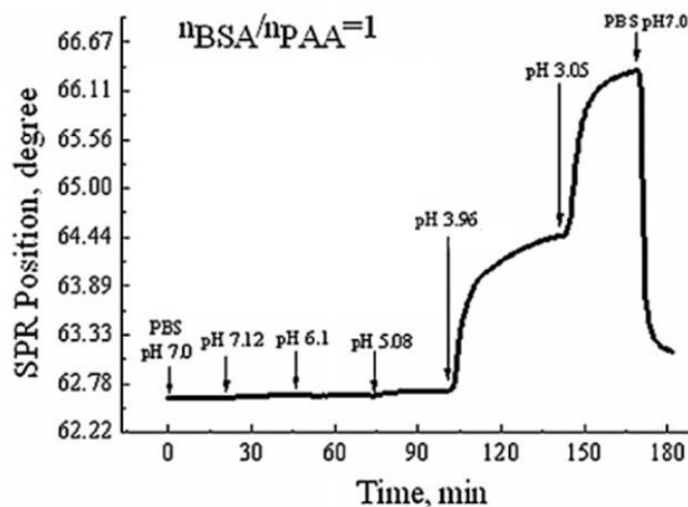


Figure 32 : Sensogramme du mélange PAA–BSA au rapport $n_{BSA}/n_{PAA} = 1$ lorsque le pH de la surcouche varie entre 7,0 et 3,05. (A) Conditions expérimentales : Dispositif SPR NanoSPR-321 (NanoSPR, USA). Lumière laser de 2 mW à 670 nm. Prisme de verre $N=1,61$. Débit de $15\mu\text{L}/\text{min}$. Tampon phosphate (50 mM phosphate, 150 mM NaCl) pH- 6,0-8,0 et tampon acétate (0,01M CH_3COOH , 0,15M NaCl) pH 3,0-5,0⁶⁹.

La Figure 32 montre que :

- la réponse SPR augmente lorsque le pH de la solution dans le système d'écoulement microfluidique diminue.
- la diminution du pH amène le PAA à adopter une conformation plus compacte en raison de la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires, ce qui entraîne une augmentation de la réponse SPR.

2.3.1.3 Etude des interactions PAA-BSA par DLS

Karahan M. et al.⁷⁰ ont étudié la formation de complexes entre l'albumine de sérum bovin (BSA, $M_w = 70$ kDa) et le poly(acide acrylique) (PAA, $M_w = 100$ kDa) en présence d'ions métalliques par diffusion dynamique de la lumière. L'objectif de cette étude est de caractériser les complexes antigènes-adjuvants et de développer des méthodes d'analyse pouvant être utilisées pour de nouveaux agents immunogènes synthétiques. Les solutions de PAA utilisées dans l'étude ont été préparées dans de l'eau ultra pure à 5°C sous agitation pendant 12 h. Des solutions de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ont été ajoutées au PAA dissous, puis agitées à 20°C pendant 24 h. La BSA a été dissoute dans de l'eau ultra pure, puis ajoutée à la solution comportant le complexe PAA-Cu. Le pH a été ajusté à 7 par ajout de NaOH.

Dans un premier temps la BSA seule et le PAA seul ont été analysés séparément. Puis le mélange des deux solutions en présence de Cu^{2+} a été analysé pour différents rapports molaires $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}$. La Figure 33 présente les courbes obtenues par DLS.

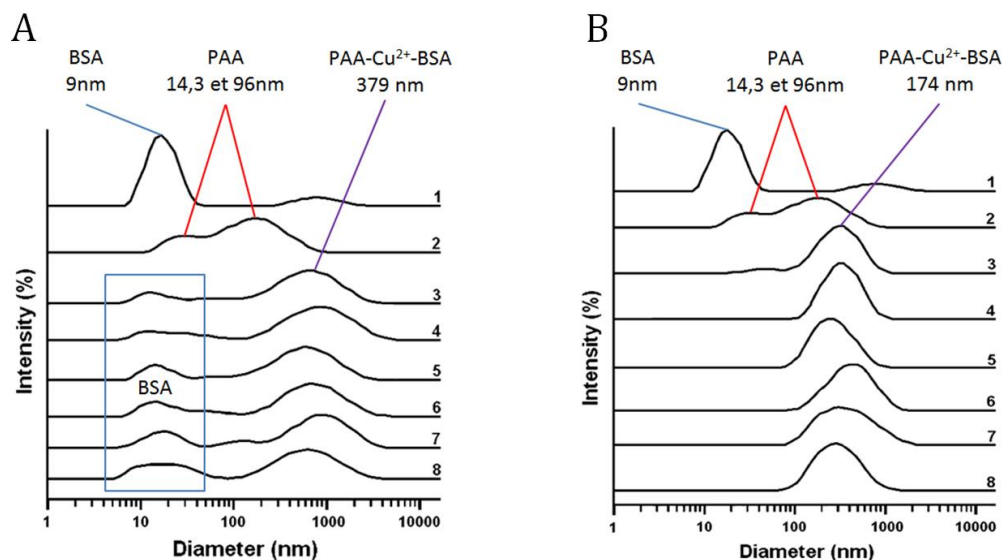


Figure 33 : Distributions en intensité diffusée des diamètres hydrodynamiques obtenues pour l'interaction PAA/BSA pour un rapport molaire $n\text{Cu}^{2+}/n\text{AA} = 0.1$ (A), $n\text{Cu}^{2+}/n\text{AA} = 0.4$ (B). Courbes : BSA seule (1) ; PAA seul (2) ; $n\text{BSA}/n\text{PAA} = 0.5$ (3) ; $n\text{BSA}/n\text{PAA} = 1.0$ (4) ; $n\text{BSA}/n\text{PAA} = 1.5$ (5) ; $n\text{BSA}/n\text{PAA} = 2.0$ (6) ; $n\text{BSA}/n\text{PAA} = 2.5$ (7) ; $n\text{BSA}/n\text{PAA} = 3.0$ (8). Conditions expérimentales : Zetasizer Nano ZS, laser He-Ne 633 nm à 25°C. Angle de détection 173°. Solvant : eau ultra pure ajustée à pH 7,0. Filtration sur filtre 0,2 μm avant analyse. BSA, $M_w = 70$ kDa ; PAA, $M_w = 100$ kDa. Adapté de⁷⁰.

A partir de la Figure 33, il apparaît que :

- la BSA seule a un diamètre hydrodynamique moyen de 9,3 nm (courbe 1).
- le PAA seul donne un large pic comportant deux sommets correspondant à des molécules ayant des diamètres hydrodynamiques moyens de 14,3 et 96,0 nm (courbe 2). Cette distribution bimodale du PAA serait due à l'agrégation intermoléculaire.
- pour $n\text{Cu}^{2+}/n\text{AA} = 0,1$ (Figure 33A), des complexes PAA- Cu^{2+} -BSA se forment avec un diamètre hydrodynamique moyen de 379 nm. Un pic correspondant à une molécule ayant un diamètre hydrodynamique de 9 nm est présent et correspond à la BSA libre.
- pour $n\text{Cu}^{2+}/n\text{AA} = 0,4$, un seul pic est observé aux alentours de 174 nm correspondant aux complexes PAA- Cu^{2+} -BSA. Il n'y a pas de pic correspondant à la BSA libre. La quantité de métal est suffisante pour lier toute la BSA au PAA. Ce résultat indique que des complexes ternaires solubles et stables sont formés à ce rapport molaire.

Ces résultats montrent que la solubilité et la stabilité des complexes peuvent être étudiées par DLS.

2.3.2 Les sels d'aluminium

2.3.2.1 Etude des interactions protéine-aluminium par dosage colorimétrique

Iyer S. et al.⁷¹ ont étudié l'effet du degré de substitution en phosphate de l'hydroxyde d'aluminium sur l'adsorption de protéines phosphorylées. Un adjuvant d'hydroxyde d'aluminium (AlOOH) a été prétraité avec six concentrations différentes de dihydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4) pour produire une série d'adjuvants avec divers degrés de substitution de phosphate ($Al_x(OH)_y(PO_4)_z$). Les adjuvants 1-6 ont été agités magnétiquement pendant 16 heures à température ambiante avant utilisation. Chaque adjuvant contient 1,7 mg Al/mL. La quantité de phosphate adsorbée par la phase solide a été déterminée en calculant la différence entre la quantité de phosphate initialement ajoutée et la quantité en phosphate analysée dans le surnageant (après centrifugation), comme le montre la Figure 34A. L'analyse du phosphate présent dans le surnageant a été réalisée par spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES, Plasma 400, Perkin Elmer, Norwalk, CT) à 396 nm. Afin de tracer les isothermes d'adsorption de l'ovalbumine sur les six formulations différentes d'adjuvants, des solutions ont été préparées en mélangeant 2,5 mL des formulations d'adjuvants à 2,5 mL d'une solution d'ovalbumine à différentes concentrations. La concentration en protéines dans le surnageant a été déterminée par la méthode BCA (en anglais *BiCinchoninic acid Assay*), qui est un dosage colorimétrique. La quantité de protéine adsorbée a été déterminée en calculant la différence entre la quantité de protéines ajoutée initialement au mélange et la quantité de protéines retrouvée dans le surnageant. La Figure 34B représente les isothermes d'adsorption obtenues.

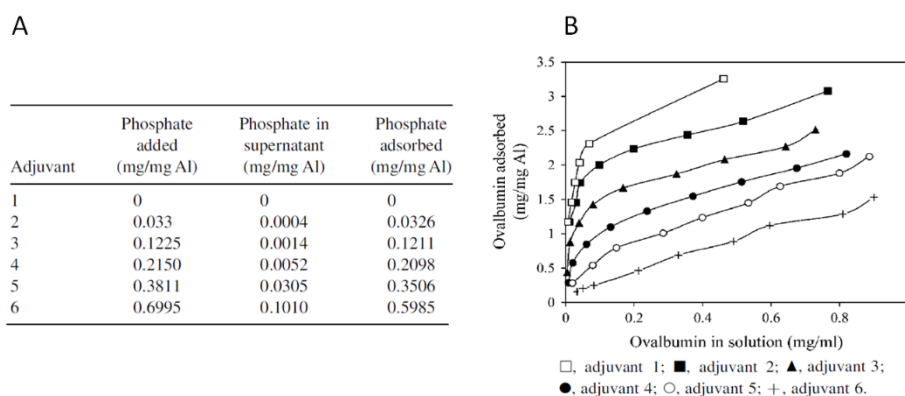


Figure 34: Adsorption du phosphate sur l'hydroxyde d'aluminium (A) pour la préparation des adjuvants. Isothermes d'adsorption de l'ovalbumine sur les adjuvants 1-6 (B). Conditions expérimentales : ICP-AES à 396 nm. Chaque adjuvant contient 1,7 mg Al/mL. BiCinchoninic acid Assay : 0,85 mg Al/mL. Solvant : eau doublement distillée + 0,1M NaOH (pH 7,4), 25°C.⁷¹

La capacité d'adsorption et le coefficient d'adsorption ont été calculés à partir de l'équation de Langmuir.

$$\bar{n} = Ads_{\max} \frac{K_{Ads}[L]}{1 + K_{Ads}[L]} \quad (95)$$

où Ads_{\max} est la capacité d'adsorption (mg/mg Al) et K_{Ads} est le coefficient d'adsorption (mL/mg).

Le Tableau 3 donne les résultats obtenus pour l'adsorption de l'ovalbumine sur les différentes formulations d'adjuvants. Il apparaît que la capacité d'adsorption et le coefficient d'adsorption de l'ovalbumine diminuent avec l'augmentation du degré de substitution en phosphate de l'hydroxyde d'aluminium. Ce comportement semble refléter la diminution du nombre d'atomes d'aluminium capables d'échanger un ligand avec l'ovalbumine. Les résultats de cette étude montrent l'impact que peut avoir l'exposition de l'hydroxyde d'aluminium au phosphate lors de la préparation d'un vaccin. Si un tampon phosphate est utilisé, il convient de faire une étude de l'impact du tampon sur la formulation. D'autre part, en observant les courbes de la Figure 34B, il apparaît que les isothermes d'adsorption ne semblent pas saturer. On peut se demander si l'équilibre est réellement atteint lors de ces expériences, ou si des multicouches de protéines se forment à la surface de l'adjuvant. Ainsi, l'utilisation du modèle de l'isotherme d'adsorption de Langmuir n'est peut-être pas le plus adapté.

Protein	Adjuvant	Adsorptive capacity (95% confidence interval) (mg/mg Al)	Adsorptive coefficient (mL/mg)	Correlation coefficient (R ²)
Ovalbumin	1	2.7 (2.1–3.2)	86	0.988
	2	2.4 (2.0–2.8)	62	0.998
	3	2.0 (1.8–2.1)	43	0.997
	4	1.7 (1.5–2.0)	19	0.989
	5	1.3 (0.7–1.9)	11	0.979
	6	0.8 (0.3–1.3)	7	0.945

Tableau 3 : Capacités d'adsorption et coefficients d'adsorption de l'ovalbumine sur les adjuvants hydroxyde d'Al (1-6) présentés dans la Figure 34.⁷¹

2.3.2.2 Etude des interactions protéine-aluminium par ITC et DSC

Jones L. S et al.⁷² ont étudié l'effet de l'adsorption de différentes protéines sur des sels d'aluminium. L'objectif de l'étude était de voir l'impact de l'adsorption sur la structure et la

stabilité des protéines étudiées. Des solutions de protéines et d'aluminium ont été préparées dans un tampon MOPS 10 mM (pH 7,4). Des volumes égaux de la solution mère d'aluminium à 3,4 mg Al / mL et des solutions de protéines à différentes concentrations ont été mélangées dans des tubes eppendorf® de 1,5 mL. L'adjuvant Alhydrogel® (gel d'aluminium hydroxide) a été utilisé avec des solutions d'ovalbumine, tandis que l'adjuvant Adju-Phos® (gel de phosphate d'aluminium) a été utilisé pour les solutions de lysozyme. Les solutions ont été mélangées pendant 15 à 30 min. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 14 000 g pendant 2 à 5 min. La concentration des protéines présentes dans le surnageant a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm. La quantité de protéine adsorbée a été déterminée en soustrayant la quantité de protéine analysée dans le surnageant à la quantité de protéine ajoutée initialement à la solution. La Figure 35 présente les isothermes d'adsorption obtenues pour la lysozyme (A) et l'ovalbumine (B) sur les hydroxydes d'Al.

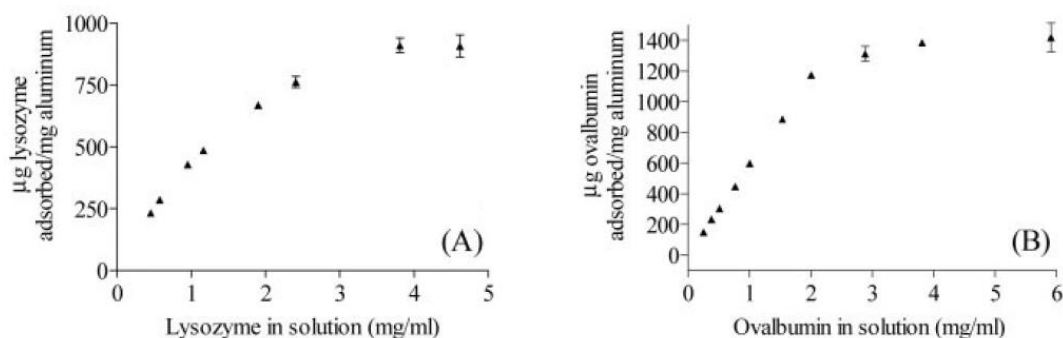


Figure 35 : Isothermes d'adsorption de la lysozyme sur l'Adju-Phos® (A) et de l'ovalbumine sur Alhydrogel® (B). Conditions expérimentales : Absorbance à 280 nm. 1,7 mg Al / mL. Tampon MOPS 10 mM (pH 7,4).⁷²

Les capacités d'adsorption et les coefficients d'adsorption ont pu être calculés à partir de l'équation de Langmuir. Le Tableau 4 présente les résultats obtenus. La valeur expérimentale de la capacité d'adsorption de l'ovalbumine est proche de celle calculée dans l'exemple précédent 0,8-2,7 mg/mg Al⁷¹ dans l'eau (pH 7,4) contre 1,4-1,6 mg/mg Al⁷² dans le tampon MOPS 10 mM (pH 7,4). Le coefficient d'adsorption expérimental obtenu est inférieur à celui de l'exemple précédent (effet du phosphate) : 0,47-1,6 mL/mg⁷² dans ce travail (tampon MOPS 10 mM, pH 7,4) contre 7-86 mL/mg⁷¹ dans l'exemple précédent (eau, pH 7,4).

Protein (pI)	Adjuvant	Ads _{max}	K _{Ads}
		<i>mg protein/mg aluminum</i>	<i>ml/mg</i>
Lysozyme (11.0)	Adju-Phos®	1.4 ± 0.1	0.47 ± 0.03
Ovalbumin (4.6)	Alhydrogel®	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.3

Tableau 4 : Capacités d'adsorption et coefficients d'adsorption. Conditions expérimentales: identiques à celles de la Figure 35.⁷²

Des essais complémentaires ont été réalisés par ITC. De l'ovalbumine à 13 mg/mL a été ajoutée à 1,8 mg d'aluminium/mL d'Alhydrogel®. Deux solutions de lysozyme ont été nécessaires, une solution à 13 mg/mL et une solution à 10 mg/mL. Les concentrations correspondantes d'Adju-Phos® étaient respectivement de 1,0 et 0,4 mg d'aluminium/mL. Tous les titrages ont été effectués à 25°C. Le volume d'injection utilisé était de 10 µL et l'échantillon était équilibré pendant 300 s entre deux injections. La suspension d'adjuvant dans la cellule de titration a été agitée à une vitesse constante de 300 tours/min. Les données pour chaque système protéine/adjuvant ont été ajustées à un modèle de n sites indépendants. Les paramètres d'interaction obtenus sont donnés dans le Tableau 5.

Protein	n	K _q	ΔH	ΔG	ΔS
	<i>mol protein/mol aluminum [mg/mg]</i>	<i>M⁻¹</i>	<i>kJ/mol</i>	<i>kJ/mol</i>	<i>J/mol K</i>
Ovalbumin	6.3e-4 ± 3e-5 [1.0]	5.1e5 ± 1.6e5	-46 ± 6	-33 ± 1	-44 ± 20
Lysozyme	2.1e-3 ± 7e-4 [1.12]	7.0e4 ± 2.7e4	-15 ± 6	-28 ± 1	42 ± 20

Tableau 5 : Paramètres d'interaction obtenus par ITC. Conditions expérimentales : calorimètre de titrage isotherme CSC modèle 4200. Ovalbumin : 13 mg/mL pour 1,8 mg Al/mL (Alhydrogel®). Lysozyme : 13 et 10 mg/mL pour 1,0 et 0,4 mg Al/mL respectivement en Adju-Phos®. Tampon MOPS 10 mM (pH 7,4), 25°C⁷².

Ces résultats démontrent que l'adsorption de l'ovalbumine sur l'Alhydrogel® est enthalpiquement dirigée et entropiquement défavorable. L'adsorption de lysozyme sur l'Adju-Phos® est à la fois favorable sur le plan enthalpique et entropique. Ces résultats révèlent des caractéristiques d'interaction différentes pour chaque système protéine-adjuvant.

La DSC a été utilisée pour déterminer les températures de transition thermique (T_m) de chaque protéine en solution et adsorbée sur un adjuvant de sel d'aluminium. Un calorimètre à balayage différentiel capillaire à haut débit (MicroCal LLC, Northampton, MA) a été utilisé pour les mesures. Des expériences de DSC ont été effectuées en utilisant du lysozyme et de l'ovalbumine

dans un tampon MOPS 10 mM (pH 7,4) à 0,5, 1,0 et 1,0 mg / mL. Une vitesse de balayage de 90°C / h a été utilisée pour balayer le lysozyme entre 10°C et 90°C et entre 10°C et 100°C pour l'ovalbumine. Les thermogrammes obtenus sont donnés en Figure 36. La T_m du lysozyme diminue de 10°C (de 73 à 59°C) lorsque la protéine est adsorbée sur l'Adju-Phos®. Les valeurs de T_m obtenues pour l'ovalbumine en solution et pour l'ovalbumine adsorbée sur l'Alhydrogel® sont très proches, mais l'aspect du profil de transition est significativement modifié.

Ces mesures montrent que les protéines adsorbées à la surface des sels d'aluminium ont des stabilités thermiques réduites par rapport aux protéines en solution. La déstabilisation observée pour les antigènes protéiques à la surface des adjuvants de sels d'aluminium soulève des inquiétudes quant à la stabilité du vaccin. Il est essentiel que la stabilité à long terme de l'antigène soit évaluée, non seulement en solution mais aussi en interaction avec l'adjuvant.

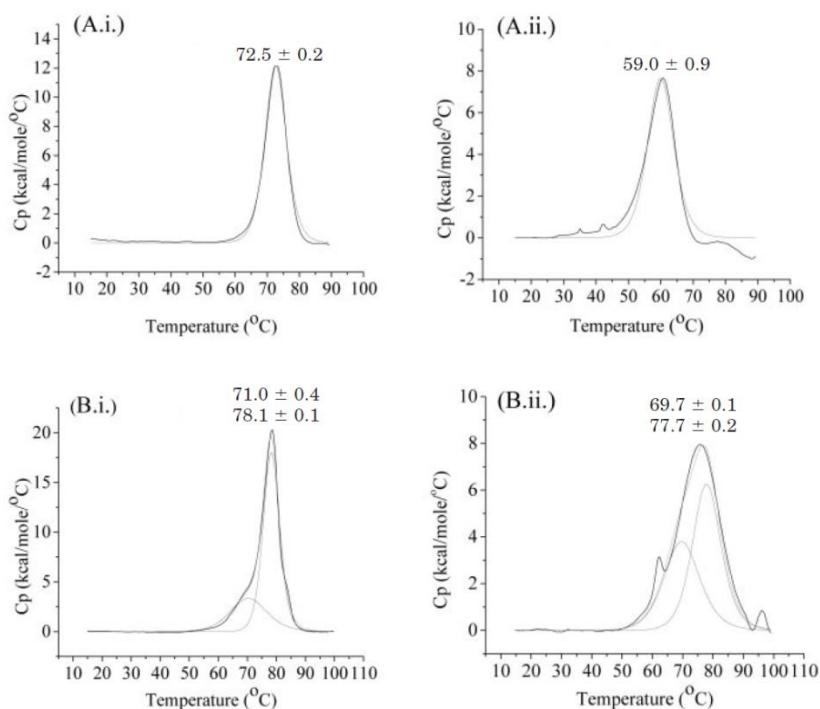


Figure 36 : Thermogrammes comparant les stabilités thermiques des protéines en solution aux protéines adsorbées. (A.i.), lysozyme en solution 7,4. 0,5, 1,0 et 1,0 mg/mL. (A.ii.), 0,5 mg/mL lysozyme adsorbé sur 1 mg Adju-Phos® (B.i.), ovalbumine en solution 7,4. 0,5, 1,0 et 1,0 mg/mL. (B.ii.), 1,0 mg/mL ovalbumine adsorbée sur 4 mg Alhydrogel®. Conditions expérimentales : calorimètre à balayage différentiel MicroCal LLC, Northampton, MA. Vitesse de balayage : 90°C/h. Tampon MOPS 10 mM (pH 7,4).⁷²

2.3.2.3 Développement d'une plateforme de criblage à haut débit (HTS) pour étudier la capacité d'adsorption d'antigènes sur des gels d'aluminium.

Jully V. et al.^{73,74} ont étudié les mécanismes d'adsorption d'antigènes sur un adjuvant d'hydroxyde d'aluminium en utilisant une plateforme de criblage à haut débit. Les solutions ont été préparées à l'aide d'une station de manipulation de liquides TECAN dans des plaques de polypropylène (PP) à 96 puits. Les mélanges ont été agités durant 2 h, puis centrifugés à 2000 tr/min durant 15 min. Les surnageants ont été transférés dans une plaque 96 puits transparente aux UV à l'aide d'un pipetteur 96 canaux. Enfin, l'analyse des surnageants a été effectuée par mesure d'absorbance à 280 nm. La Figure 37 représente les isothermes d'adsorption obtenues.

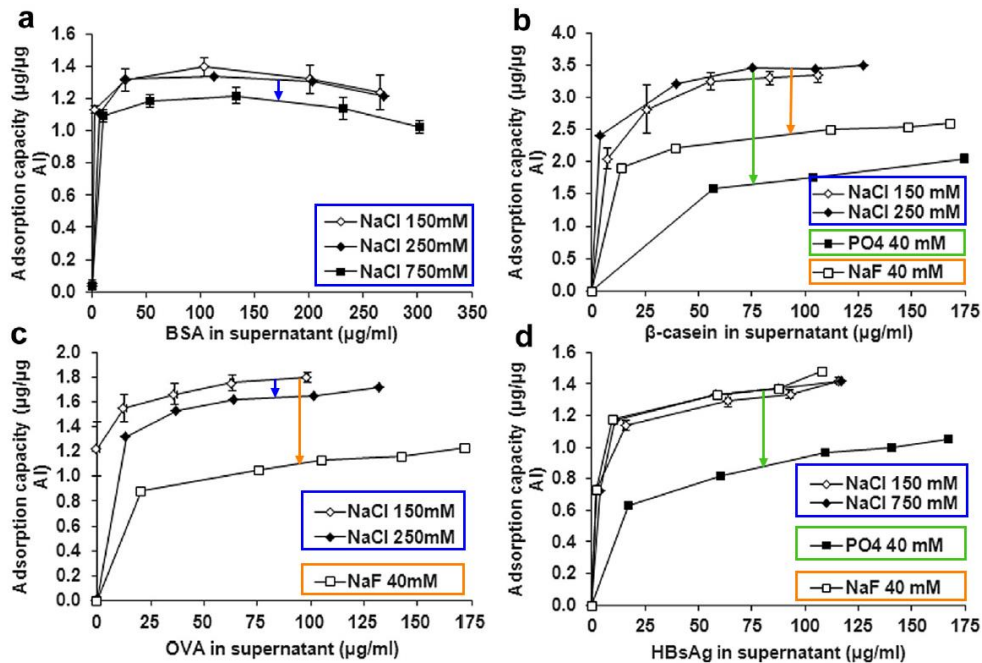


Figure 37 : Isothermes d'adsorption de protéines et d'antigènes adsorbés sur de l'hydroxyde d'aluminium. Isothermes d'adsorption de la BSA (a), de la \square -caséine (b), de l'OVA (c) et de l'HBsAg (d) sur de l'AH. Conditions expérimentales : absorbance à 280 nm (96x96 DPI). 170 µg/mL Al. Tampon MOPS 10 mM. pH 7,0. Adapté de⁷⁴.

Les résultats de la Figure 37 ont permis d'étudier l'impact de certains électrolytes sur la capacité d'adsorption de l'AH comme le montre le Tableau 6. Le Tableau 6 indique que la BSA (chargée négativement en milieu neutre) a été adsorbée sur l'AH (chargée positivement), principalement par des interactions électrostatiques, comme l'indique la diminution de la capacité d'adsorption lors de

l'augmentation de la force ionique sur la Figure 37. Il apparaît que les isothermes d'adsorption de la BSA en présence de tampon phosphate et de fluorure de sodium ne sont pas montrées car elles ne suivent pas le modèle de Langmuir. Ce modèle n'est peut-être pas approprié à l'étude de ces interactions. D'autre part, l'interprétation semble basée sur la hauteur du plateau à saturation, correspondant à la stœchiométrie n à saturation et non sur les constantes d'interaction k . Or, une stœchiométrie plus importante ne signifie pas forcément une interaction plus forte.

Protein	Electrostatic Interactions	Electrostatic Interactions and Ligand Exchange	Ligand Exchange	Predominant Adsorption Mechanism
	Sodium Chloride	Phosphate Buffer	Sodium Fluoride	
BSA	1.03 ↘	—	—	Electrostatic
β-Casein	3.56 =	2.35 ↘	2.68 ↘	Ligand exchange
OVA	1.78 =	—	1.30 ↘	Ligand exchange
HBsAg	1.45 =	1.15 ↘	1.47 =	Ligand exchange

↘, significant decrease; =, no significant change;

—, adsorptive capacity does not fit Langmuir model ($R^2 < 0.99$).

Tableau 6 : Impact de certains électrolytes sur la capacité d'adsorption de l'AH (mg/mg Al). Etude des mécanismes d'adsorption. Adapté de⁷⁴.

La β-caséine est une protéine également chargée négativement en milieu neutre. La capacité d'adsorption de la β-caséine sur l'AH reste inchangée avec l'augmentation de la force ionique. Cela indique que les interactions électrostatiques ne sont pas le mécanisme d'adsorption prédominant. La diminution de l'adsorption de la β-caséine après traitement au tampon phosphate et fluorure de sodium montre que l'échange phosphate-ligand est le mécanisme prédominant pour l'adsorption de la β-caséine sur l'AH.

L'OVA est également une protéine chargée négativement en milieu neutre. L'augmentation de la force ionique en augmentant la concentration en chlorure de sodium a un impact considéré faible sur l'adsorption de l'OVA. Cela montre que les interactions électrostatiques ne sont pas le seul mécanisme contribuant à l'adsorption de l'OVA sur l'AH. Le traitement au tampon phosphate a nettement désorbé l'OVA de l'AH, ce qui montre que l'adsorption de l'OVA sur l'AH est moins forte que celle de la β-caséine sur l'AH et que l'échange de ligand est également le mécanisme prédominant pour l'adsorption de l'OVA sur l'AH. Il semble cependant que les isothermes d'adsorption de l'OVA en présence de NaCl 750mM ne sont pas fournies sur la Figure 37. Cela

Chapitre I. Etude bibliographique

rend difficile d'estimer l'impact de la force ionique sur l'adsorption de façon équivalente aux autres antigènes, notamment la BSA.

Enfin, l'HBsAg est également chargé négativement en milieu neutre. L'adsorption de l'HBsAg sur l'AH diminue avec l'augmentation de la concentration en tampon phosphate. L'adsorption de HBsAg n'est pas affectée par le fluorure de sodium, ni par le chlorure de sodium. L'échange ligand-phosphate est identifié comme étant le mécanisme prédominant pour l'adsorption de l'HBsAg sur l'AH.

3 Caractérisation des formulations vaccinales ARNm-LNP

3.1 Différents types d'ARN

L'ARN messager (ARNm) ne représente qu'un type parmi les nombreux types d'ARN présent dans les cellules. Trois types d'ARN participent principalement à la formation d'une protéine. L'ARN messager transporte le code génétique, copié de l'ADN, aux ribosomes. L'ARN de transfert (ARNt) transfère les acides aminés aux ribosomes pendant la synthèse des protéines. Enfin, les ribosomes eux-mêmes sont en grande partie constitués de molécules d'ARN ribosomal (ARNr). Mais les ARN ne jouent pas seulement un rôle dans la synthèse des protéines. De nombreux types d'ARN effectuent des réactions biochimiques similaires aux enzymes et d'autres variétés d'ARN ont des fonctions de régulation dans les cellules.^{75,76} Les ARNm peuvent eux-mêmes être subdivisés en plusieurs sous catégories.

3.1.1 ARN non répliatif (ARNm)

Les ARN non répliatifs correspondent aux ARNm conventionnels. Les ARNm non répliatifs sont moins complexes à développer que les deux catégories suivantes.

3.1.2 ARN auto-répliatif (en anglais *self-amplifying*, saRNA)

Les saRNA sont semblables aux ARNm conventionnels mais ont, en plus, une capacité d'auto-amplification, augmentant ainsi la production de protéines.^{77,78} Les saRNA imitent une infection virale, mais sans la création de particules infectieuses. Ils utilisent partiellement la séquence d'un alphavirus ou d'un flavivirus qui ont la capacité de s'auto-répliquer. Par rapport à un ARN non répliatif codant pour une même protéine, la taille des saRNA est considérablement augmentée en raison de l'ajout de la machinerie de répliation virale.⁷⁹ L'utilisation de saRNA peut permettre de réduire la dose injectée nécessaire à la production des protéines en quantité suffisante.¹⁴ Cependant les saRNA sont moins stables que les ARNm non répliatifs et plus difficiles à synthétiser, purifier et produire à grande échelle.

3.1.3 ARN trans-réplicatif (en anglais *trans-amplifying*, taRNA)

Les taRNA sont semblables aux saRNA : la séquence provient d'un ARN auto-réplicatif, à partir duquel la réplicase a été supprimée. L'activité de réplication est cette fois-ci fournie par une deuxième molécule.⁸⁰ Les taRNA permettent la production d'antigènes à des taux supérieurs à ceux produits par des ARN non répliatifs.

Enfin, deux sous-catégories d'ARN font également l'objet d'un intérêt de recherche intense: les small interfering ARN (siRNA) et les microARN (miRNA). Les siRNA et les miRNA sont de petits ARN d'environ 20 à 26 nucléotides qui bloquent l'expression génique en s'appareillant aux ARN messager inhibant la traduction. La principale différence entre les deux catégories est que les siRNA sont très spécifiques avec une seule cible d'ARNm, tandis que les miRNA ont plusieurs cibles. Les siRNA et miRNA sont actuellement étudiés en tant que nouvelles classes d'agents thérapeutiques pour le traitement d'un large éventail de maladies, y compris de nombreux cancers.⁸¹

3.2 Synthèse des ARNm

Les vaccins à ARNm sont fabriqués à l'aide de processus définis représentés en Figure 38 :

- (1) un antigène cible est identifié,
- (2) la séquence de l'ARNm est conçue numériquement en utilisant un algorithme,
- (3) la synthèse de l'ARNm réalisée dans un système acellulaire par transcription *in vitro* (IVT) en utilisant un ADN plasmidique comme matrice, une ARN polymérase et des nucléosides. L'ARNm est coiffé à l'extrémité 5' puis purifié pour éliminer les impuretés générées pendant l'IVT en utilisant des techniques de chromatographie ou de purification par affinité.¹⁴ Enfin, l'ARNm est généralement encapsulé dans des nanoparticules lipidiques (LNP).
- (4) la production doit être adaptée à grande échelle et les contrôles de la qualité du produit doivent être effectués.

Ce processus en 4 étapes est le même quel que soit l'antigène codé par l'ARNm, ce qui permet d'avoir une plateforme commune pour la fabrication de plusieurs antigènes vaccinaux, simplifiant ainsi la production des vaccins, le contrôle qualité et les délais de développement.

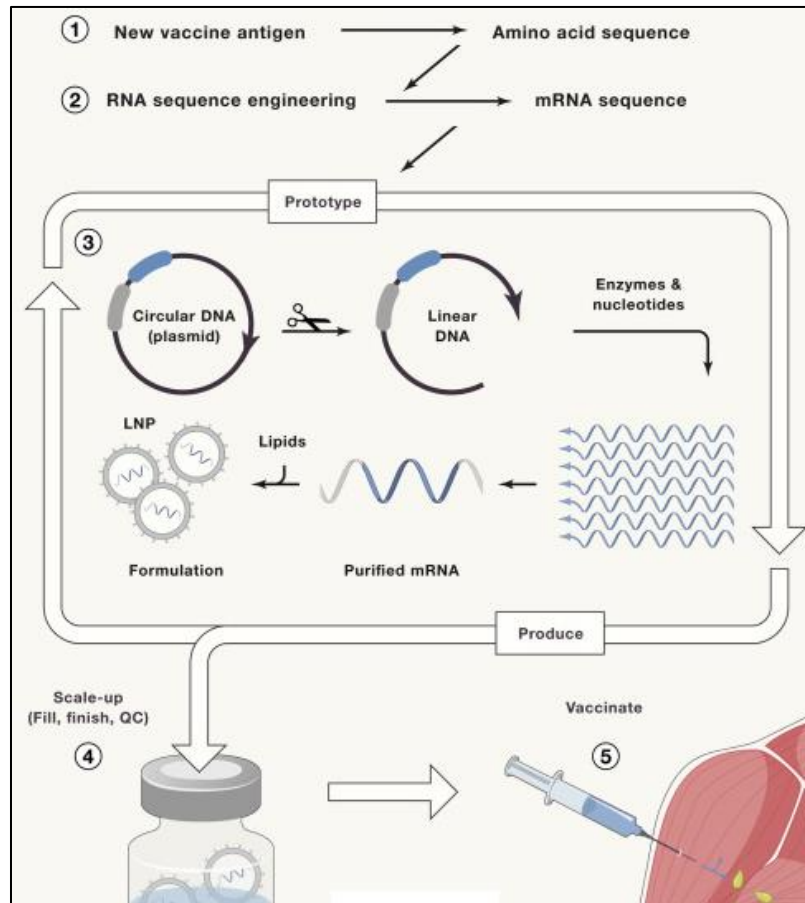


Figure 38. Schéma simplifié du processus de développement d'un vaccin à ARNm⁷⁹.

3.3 Éléments structurels

L'ARNm transcrit *in vitro* (IVT) est conçu pour ressembler structurellement aux ARNm naturellement présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes.⁸² Ainsi, l'ARNm est un simple brin avec une coiffe 5', une région non traduite (UTR= untranslated region) 5', un cadre de lecture ouvert (ORF) codant la protéine d'intérêt, une UTR 3' et une queue (Poly-A) 3', comme présenté en Figure 39.⁸³

Chacun de ces éléments est essentiel pour l'activité de l'ARNm et peut être modifié pour améliorer la stabilité de l'ARNm, l'efficacité de la traduction et la durée d'expression des protéines.

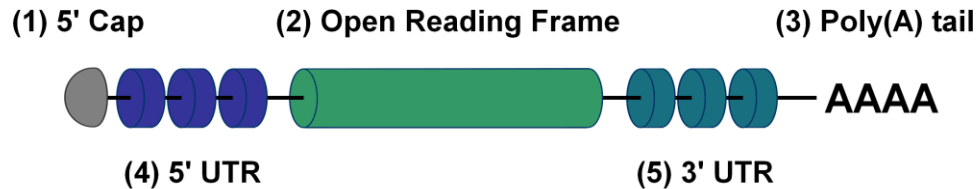


Figure 39 : Structure de l'ARNm IVT

3.3.1 Coiffe 5'

La coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm a plusieurs fonctions. Premièrement, elle empêche en partie que l'ARNm soit rapidement dégradé par les exonucléases. Deuxièmement, elle est essentielle pour l'initiation de la traduction des ARNm.⁸⁴ Les ARNm mal coiffés ne sont pas reconnus et ne peuvent pas être traduits. Une approche pour coiffer l'ARNm consiste à ajouter un analogue synthétique dans la réaction de transcription *in vitro* et donc à effectuer le coiffage et la transcription *in vitro* en une seule étape. L'autre approche, consiste à effectuer une deuxième étape, après la synthèse initiale, en utilisant des enzymes.^{82,84}

3.3.2 Open reading frame (ORF)

Le cadre de lecture ouvert code la protéine d'intérêt. La composition de l'ORF affecte l'efficacité de la traduction de l'ARNm. Le remplacement de codons rares par des codons plus courants synonymes peut améliorer grandement le rendement de la traduction⁸². En règle générale, les optimisations de codons sont effectuées en comparant la production de protéines à partir de la séquence initiale à la séquence optimisée. Cependant, certaines protéines nécessitent une traduction lente, qui est assurée par des codons rares, pour obtenir une bonne conformation spatiale⁸⁵.

3.3.3 Queue poly(A)

La queue poly(A) régule la stabilité et l'efficacité de traduction de l'ARNm en synergie avec la coiffe 5' et d'autres déterminants. La queue poly(A) est ajoutée soit directement dans la matrice à partir de laquelle l'ARNm est transcrit, soit par une réaction en deux étapes utilisant la poly(A) polymérase recombinante. La transcription *in vitro* de l'ARN à partir d'une matrice d'ADN donne un ARN avec une longueur de queue poly (A) bien définie, et est donc préférée, en particulier si

l'ARNm est destiné à des applications cliniques. Des analyses ont montré qu'une queue poly(A) proche de 120 nucléotides tend à augmenter l'expression des protéines.^{14,86}

3.3.4 UTRs 5' et 3'

Les nucléotides dans ces régions ne sont pas traduits en protéine. L'UTR 5' sert de point d'entrée au ribosome tandis que l'UTR 3' joue un rôle essentiel dans la terminaison de la traduction. Lors du choix des séquences UTR pour l'ARNm, la stratégie commune implique l'intégration d'UTR communs existants qui montrent naturellement des niveaux élevés de traduction et de stabilité.⁸ D'autre part, il a été montré que la longueur de la séquence UTR pouvait moduler la demi-vie de l'ARNm.⁸⁷

3.4 Systèmes de délivrance intracellulaire

3.4.1 Propriétés physiques et chimiques de l'ARNm

Avec une taille de 10^5 – 10^6 Da, l'ARNm est trois à quatre fois plus grand que les molécules qui diffusent facilement dans les cellules. De plus, sa charge négative repousse électrostatiquement les membranes cellulaires anioniques.⁸⁸ L'ARNm est également une molécule intrinsèquement instable qui est très sensible à la dégradation par les exonucléases et les endonucléases. Ainsi, différentes méthodologies ont été développées pour permettre à l'ARNm d'atteindre le cytoplasme.

3.4.2 Injection *in vivo* d'ARNm nu

Malgré les limitations, plusieurs études ont utilisé avec succès l'ARNm nu (sans système de délivrance/non encapsulé) pour des immunisations *in vivo*.^{89,90} Sahin U. et al. ont montré que des immunisations intranodales répétées avec de l'ARN nu codant pour des antigènes associés à une tumeur généraient des réponses immunitaires robustes.⁹¹ En 2018, le premier essai clinique chez l'homme avec un vaccin thérapeutique contre le VIH-1 contenant de l'ARNm nu a été mené et les résultats s'avèrent prometteurs.⁹² Le taux d'absorption cellulaire de l'ARNm nu reste certes globalement faible, mais le choix de la méthode d'administration peut permettre d'augmenter l'efficacité de l'absorption intracellulaire de l'ARNm.⁸²

3.4.3 Systèmes de délivrance physique

L'électroporation est l'un des plus anciens moyens de transfection. L'électroporation augmente la perméabilité de la membrane cellulaire aux acides nucléiques à l'aide d'un champ électrique.⁹³ Cette technique est utilisée pour la délivrance de l'ARNm nu dans diverses applications telles que l'immunothérapie contre le cancer et le remplacement de protéines.⁹⁴⁻⁹⁶ Une autre méthode de transfection est le *gene gun*, qui projette dans la cellule des particules métalliques (par exemple, de l'or) qui ont été recouvertes d'ARNm en surface, propulsées par un gaz porteur sous pression.^{97,98} Les *gene gun* ont été utilisés pour certaines des premières études thérapeutiques sur l'ARNm.⁹⁹ L'utilisation des méthodes de délivrance physique restent cependant limitée par une mort cellulaire accrue et un accès restreint aux cellules ou tissus cibles.

Bien que l'ARNm « nu » et les méthodes de délivrance physique aient connu quelques succès, la plupart des applications thérapeutiques nécessitent l'utilisation de vecteurs de délivrance intracellulaire. Les propriétés souhaitées de ces vecteurs sont : (1) la protection des acides nucléiques contre les nucléases, (2) la libération des acides nucléiques dans le cytoplasme avec un rendement de délivrance élevé, (3) une bonne innocuité, (4) une bonne stabilité, et (5) une sélectivité cellulaire et tissulaire.

3.4.4 Systèmes à base de lipides (LNPs)

Les vecteurs à base de lipides sont les vecteurs d'acides nucléiques non viraux les plus largement utilisés. Le composant principal des vecteurs lipidiques sont les lipides cationiques, qui sont capables d'interagir avec l'ARNm par des interactions électrostatiques, conduisant à la formation d'un complexe appelé lipoplexe.¹⁰⁰ Le DOTMA (1,2-di-O-octadecenyl-3-triméthylammonium propane) a été le premier lipide cationique synthétique largement utilisé pour complexer les ARNm IVT.¹⁰¹ Bien qu'attrayants du point de vue de l'efficacité de la délivrance, les systèmes à base de lipides cationiques présentent une toxicité non négligeable.

Comme alternative, des systèmes lipidiques ionisables ont été développés, qui réduisent la toxicité induite par les particules cationiques tout en conservant leurs caractéristiques de transfection avantageuses. Alors que les lipides cationiques présentent des groupes ammonium quaternaire

alkylés et conservent leur nature cationique quel que soit le pH, les lipides ionisables acquièrent des charges positives, en raison de la protonation des amines lorsque le pH diminue. Ces nouveaux lipides sont neutres à pH physiologique mais chargés positivement lorsque les valeurs de pH sont inférieures à leur pKa. En 2018, la Food and Drug Administration (FDA) et l'European Medicines Agency (EMA) ont approuvé ONPATRO® (patisiran) comme premier médicament commercial à base d'ARN pour le traitement de l'amylose à transthyréline avec polyneuropathie chez l'adulte. ONPATRO® (patisiran), utilise des siRNA formulés dans des LNP avec un lipide ionisable, le Dlin-MC3-DMA, souvent appelé MC3.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Suite à ce succès, plusieurs groupes ont utilisé des nanoparticules lipidiques avec ce même lipide ionisable comme vecteur de délivrance d'ARNm¹⁰⁵. En 2021, les nanovecteurs contenant des lipides ionisables sont au premier plan en tant que systèmes prometteurs de délivrance d'ARN.

Ces dernières années, de nouveaux systèmes de dérivés lipidiques, connus sous le nom de nanoparticules de type lipidique (LLN), ont également été développés pour la délivrance d'ARNm. Dans ce contexte, les O-TT3 LLNs sont des nanoparticules de type lipidique qui ont été reconnues pour augmenter de manière significative l'efficacité de la transfection de l'ARNm-luciférase.¹⁰⁶ Les TT LLNs sont constitués d'un cycle phényle, de trois groupes de liaison amide et de trois chaînes aminolipidiques. Enfin, les transporteurs lipidiques nanostructurés (NLCs) sont un autre type de LNP utilisé pour délivrer l'ARNm. Les NLCs sont des structures colloïdales composées d'un noyau contenant un mélange de lipides solides et liquides, résultant en une matrice lipidique non structurée¹⁰⁷. Erasmus et al ont travaillé sur l'administration d'ARN codant pour des antigènes du virus Zika formulés dans des NLCs ; les souris inoculées furent complètement protégées contre le virus. Cette réalisation représente l'une des approches les plus efficaces à ce jour contre le virus Zika¹⁰⁸.

3.4.5 Systèmes polypeptidiques

Les polypeptides sont constitués d'acides aminés et peuvent permettre de formuler des systèmes de délivrance biocompatibles et biodégradables. Les protamines sont une famille de peptides avec des séquences riches en arginine. L'arginine présente une charge positive, facilitant les interactions électrostatiques avec la charge négative des acides nucléiques.¹⁰⁹ La condensation

d'ARNm avec les protamines les protège contre la dégradation des nucléases. La technologie RNActive®, développée par CureVac, est basée sur des complexes protamine/ARNm et est actuellement en cours d'évaluation contre différents cancers¹¹⁰ et contre le virus de la grippe¹¹¹.

3.4.6 Systèmes polymériques

Les vecteurs à base de polymères sont un autre type de système de délivrance d'ARNm souvent utilisé. Les interactions entre les polymères cationiques et les acides nucléiques conduisent à la formation de polyplexes. Les systèmes de délivrance à base de polymères cationiques ont initialement présenté des problèmes de cytotoxicité, en raison de leur charge cationique.¹¹² Les premières tentatives de délivrance de gène reposaient en grande partie sur trois types de polymères synthétiques : la poly(éthylèneimine) (PEI), la poly(L-lysine) (PLL) et la poly(amidoamine) (PAMAM). L'ajout de chaînes de Polyethylene glycol (PEG) et autres groupements ont permis de réduire la cytotoxicité de ce type de vecteurs et a amélioré leur délivrance *in vivo*.¹¹³ Une autre préoccupation concernant la structure des polymères est leur biodégradabilité. Ainsi, les vecteurs d'ARNm à base de polymères ont évolué vers des vecteurs à base de polyesters comme les poly(bêta-amino esters) (PBAE), les poly(amine-co-esters) (PACE), les poly(acide lactiques) (PLA), les poly (acide lactique-co-glycolique) (PLGA) et les poly(2-diméthylaminoéthyl méthacrylate) (PDMAEMA). Enfin des dérivés de polymères naturels comme le chitosane et le dextrane sont également étudiés.¹¹⁴⁻¹¹⁶

3.4.7 Systèmes hybrides

Les systèmes hybrides sont constitués d'une combinaison de plusieurs types de vecteurs de délivrances. Les lipopolyplexes, composés d'un mélange de polymères et de lipides, ont été parmi les premiers systèmes hybrides utilisés pour la délivrance d'ADN et d'ARN.¹¹⁷ La combinaison de lipides cationiques et de peptides a également été étudiée pour améliorer la délivrance d'ARNm.¹¹⁸

3.5 Constituants des LNPs

La conception des LNP nécessite la recherche d'un équilibre entre le besoin de stabilité à pH physiologique et le besoin de déstabilisation à l'intérieur de la cellule cible pour libérer les ARNm.¹¹⁹

3.5.1 Lipides ionisables

Les lipides ionisables sont chargés positivement à faible pH (permettant la complexation de l'ARNm et la libération endosomale) et sont neutres à pH physiologique (réduisant les effets toxiques potentiels, par rapport aux lipides chargés positivement).¹²⁰ Jayaraman et al. ont montré que le pK_a optimal des lipides ionisables pour maximiser l'immunogénicité des LNP-siRNA se situe entre 6,2 et 6,5.¹²¹ Tandis que Hasset et al. ont montré que le pK_a optimal pour augmenter l'immunogénicité des LNP-ARNm se situe entre 6,6 et 6,9.¹²²

Le DLin-MC3-DMA (MC3) est l'un des lipides cationiques les plus utilisés pour la fabrication de nanoparticules lipidiques, servant souvent de référence.^{6,121,123,124} Cependant, le MC3 a une longue demi-vie plasmatique de 72 h, ce qui limite son administration chronique.¹²⁵ Par conséquent, des recherches se portent sur l'ajout de groupes fonctionnels biodégradables qui peuvent faciliter sa clairance.¹²⁶

Une façon d'augmenter la biodégradabilité est l'inclusion de groupes esters ou l'ajout de liaisons disulfure dans le squelette de la molécule.⁷⁷ Certains exemples de lipides biodégradables à base d'ester se sont déjà avérés être plus performants dans la délivrance de gènes que le MC3.^{125,126}

Enfin des molécules hybrides dérivées de lipides appelées lipidoïdes sont également utilisées pour former des LNPs et s'avèrent prometteuses. Dong et al. ont par exemple utilisé des nanoparticules lipopeptidiques avec du cKK-E12 comme système de délivrance d'acide nucléique efficace et hautement sélectif.¹²⁷⁻¹²⁹

3.5.2 Lipides PEGylants

L'incorporation d'un lipide PEGylant dans les LNPs augmente leur stabilité colloïdale et leur résistance à l'opsonisation et à la clairance *in vivo*.¹¹⁹ En effet, le PEG représente une barrière stérique empêchant la liaison des protéines plasmatiques (opsonines) qui entraîneraient autrement la clairance rapide des LNPs par le système réticuloendothélial. Ainsi, la PEGylation entraîne un temps de circulation plus long des LNPs. D'autre part, la quantité de PEG-lipide incorporée influence de manière significative la taille des particules.^{105,130}

Cependant, la PEGylation peut inhiber l'internalisation cellulaire et la libération endosomale en empêchant la déstabilisation de la membrane lorsque les LNPs sont absorbées par la cellule cible, ce qui entraîne une réduction de la délivrance intracellulaire et de l'activité biologique. De plus, des expériences ont révélé que lors d'administrations répétées, les LNPs PEGylés peuvent conduire à la formation d'anticorps anti-PEG. Les LNPs PEGylés perdent alors leur capacité à circuler sur de longues périodes dans la circulation sanguine, un phénomène connu sous le nom de clairance sanguine accélérée.¹³¹⁻¹³⁴

Différentes stratégies ont été utilisées pour résoudre ces limitations :

- L'utilisation d'un faible pourcentage de PEG (0,5-1,5%). Cela permet d'augmenter l'activité biologique.^{135,136}

- L'utilisation d'un agent PEGylant avec un ancrage faible, tel que le PEG-C-DMA¹³⁰, le PEG-CHOL¹³⁷, le PEG-DSG¹³⁸ ou le PEG-CS¹³⁸. L'agent PEGylant est ainsi progressivement perdu et la densité de PEGylation est réduite au fil du temps, facilitant l'interaction de la LNP avec les cellules cibles après l'endocytose.

- Le développement de polymères alternatifs qui imitent les propriétés physico-chimiques du PEG sans ses limitations.¹³³ Joh et al. ont par exemple utilisé le POEGMA pour minimiser la liaison des anticorps anti-PEG.¹³⁹ Les stratégies bioinspirées, telles que l'utilisation de glucides, lipides et protéines, sont étudiées comme alternatives pouvant fournir des effets de protection similaires au PEG. Les biomolécules présentent des avantages considérables par rapport à leurs homologues synthétiques : elles sont biocompatibles et biodégradables.¹⁴⁰ L'albumine sérique (SA) a par

exemple été utilisée comme alternative au PEG pour l'administration de nanoparticules à base de virus.^{141,142} Nogueira et al.¹⁴³ ont développé des LNP à base de polysarcosine (pSar) permettant une délivrance efficace d'ARNm sans PEG (brevet¹⁴⁴). Enfin, des polymères zwitterioniques ont aussi été évalués comme alternative au PEG pour la délivrance de nanoparticules.^{133,145}

3.5.3 Phospholipides

Les phosphatidylcholines (PC) sont des composants naturels des membranes biologiques. Les PC saturés, tels que la distearolyphosphatidylcholine DSPC, ont des températures de fusion élevées (T_m) et sont utilisés pour construire des LNPs hautement stables.¹¹⁹

Une préoccupation concernant les LNPs hautement stables est qu'elles ne facilitent pas la libération endosomale, ce qui peut avoir un effet néfaste sur l'efficacité globale. Les LNPs à base de DOPC sont plus stables que les formulations à base de DOPE mais sont moins stables que les formulations à base de DSPC ; la DOPC peut donc représenter un compromis raisonnable entre la stabilité et la libération endosomale.¹¹⁹ Concernant sa localisation, plusieurs études ont montré que la DSPC est principalement localisée à la surface des LNPs.^{105,146}

3.5.4 Cholestérol

Le cholestérol a un rôle structural et stabilisant en comblant les interstices entre les phospholipides dans les LNPs.¹⁴⁷ Il a également été démontré que l'inclusion de cholestérol dans les formulations de nanoparticules améliore l'efficacité, potentiellement en raison d'une fusion membranaire améliorée permettant la libération endosomale.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰

Patel et al.¹⁵¹ ont formulé des LNPs avec divers analogues naturels du cholestérol. Ils ont identifié une classe d'analogues du cholestérol (substitué par un alkyle en C-24) qui, lorsqu'ils sont incorporés à l'intérieur d'un LNP, peuvent entraîner une augmentation importante de la délivrance d'ARNm. L'utilisation d'analogues du cholestérol peut ainsi favoriser la déstabilisation des LNP et leur fusion avec la membrane endosomale.

3.6 Formulation des LNPs

Depuis les premiers liposomes développés dans les années 1960 par Bangham et al.¹⁵², de nombreuses méthodes ont été développées pour réaliser des nanoformulations lipidiques. Le mécanisme général de production de nanoparticules lipidiques est basé sur une augmentation rapide de la polarité lors de la dilution d'une phase éthanolique comprenant les lipides dans une phase aqueuse contenant l'ARNm, entraînant ainsi l'auto-assemblage des LNPs. Les nanoparticules s'organisent en une structure dans laquelle le noyau contient l'acide nucléique complexé avec les lipides ionisables, le cholestérol assurant l'intégrité structurelle. Le DSPC et les lipides-PEG se situent principalement à la surface avec une partie des lipides ionisables et du cholestérol, formant ainsi l'enveloppe des LNPs.¹⁵¹ La formation initiale des noyaux est dirigée par des interactions électrostatiques entre l'acide nucléique anionique et les lipides ionisables, tandis que des interactions hydrophobes entraînent la formation de l'enveloppe des LNPs.

3.6.1 Méthodes de formulation

3.6.1.1 Injection d'éthanol

L'injection d'éthanol est une technique simple et largement utilisée pour produire des liposomes. Cette technique consiste à injecter rapidement une solution d'éthanol contenant des lipides dans une phase aqueuse simplement à travers une fine aiguille sans appareillage.¹⁵³ Lorsque l'éthanol est dilué dans le tampon aqueux, les vésicules lipidiques s'auto-assemblent.¹⁵⁴ Cette méthode est facile à mettre en œuvre et l'équipement est peu coûteux, mais les résultats sont parfois difficilement reproductibles. De plus, cette méthode donne souvent des nanoparticules hétérogènes de grande taille avec une efficacité d'encapsulation d'ARNm faible.¹⁵⁵

3.6.1.2 Jonction en T

Un mélange rapide se produit lorsqu'une phase éthanolique rencontre une phase aqueuse dans une jonction en T, voir Figure 40 (A). Le mélangeur à jonction en T fournit un environnement de mélange contrôlé par rapport aux méthodes de mélange macroscopique, conduisant à une production reproductible de nanoformulations lipidiques.^{156,157} L'utilisation de cette méthode est limitée en recherche en raison des débits élevés nécessaires pour assurer un mélange rapide, ce qui

peut être difficile à concilier avec la fabrication de lots de faibles volumes. Néanmoins, le mélange par jonction en T est une méthode souvent adoptée pour la production de LNPs à grande échelle.¹⁵⁸

3.6.1.3 Focalisation hydrodynamique microfluidique

La focalisation hydrodynamique microfluidique (en anglais *Microfluidic Hydrodynamic Focusing*, MHF) est une technique à flux continu, où les lipides dissous dans l'éthanol sont focalisés de manière hydrodynamique à l'aide d'une phase aqueuse, voir Figure 40 (B).¹⁵⁹ Les techniques MHF peuvent être adaptées pour produire de faibles volumes mais aussi des volumes importants. L'écoulement à l'intérieur du système est laminaire, ce qui permet une interface bien définie entre les phases organique et aqueuse et permet de produire des particules peu polydisperses.¹⁶⁰

3.6.1.4 Staggered Herringbone Mixing (SHM)

Le mélange microfluidique par advection chaotique utilisant un SHM pour la production de LNPs a été mis au point par le groupe de Pieter Cullis et a ensuite été commercialisé par Precision Nanosystems sous le nom de Nanoassemblr™.^{130,161,162} Il existe actuellement plusieurs modèles commerciaux de mélangeur microfluidique SHM de différentes échelles. La caractéristique principale de cette technique est le mélange contrôlé en quelques millisecondes de l'éthanol et du tampon aqueux. La structure du mélangeur permet un enroulement efficace des fluides l'un autour de l'autre résultant en un élargissement exponentiel de l'interface entre les deux fluides et assurant un mélange rapide, voir Figure 40 (C).

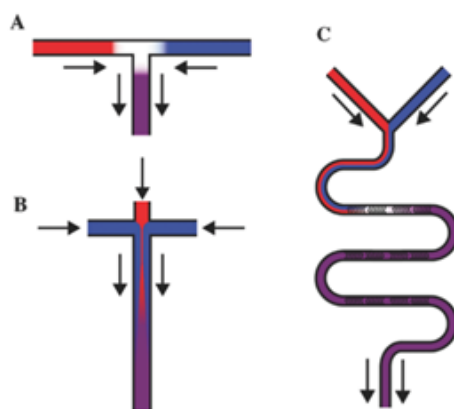


Figure 40 : Illustration schématique des méthodes de mélange microfluidique : A) mélange à jonction en T, B) Focalisation hydrodynamique microfluidique C) Staggered Herringbone Mixer. La phase aqueuse est illustrée en bleu, la phase organique en rouge et le mélange résultant contenant des particules en violet.¹⁵⁸

3.6.1.5 Paramètres impactant la formulation

Les paramètres opératoires de la formulation affectent les attributs physicochimiques des nanoformulations lipidiques, en particulier la taille et la distribution de taille.

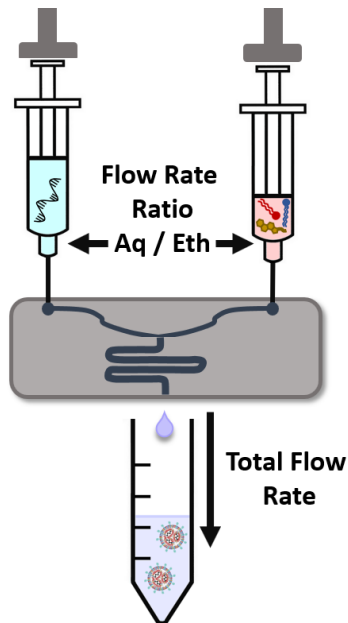


Figure 41 : Illustration schématique du Débit total (total flow rate, TFR) et rapport de débit (flow rate ratio, FRR) lors d'une formulation de LNPs

3.6.1.5.1 Rapport de débit (flow rate ratio, FRR) et débit total (total flow rate, TFR)

Le rapport de débit (FRR) est l'un des paramètres les plus importants à prendre en compte lors de la formulation de nanoparticules lipidiques par microfluidique. En effet, les LNPs se forment lors du mélange entre les phases organique et aqueuse, les lipides s'auto-assemblent pour réduire le contact de leurs chaînes hydrophobes avec la phase aqueuse, et se referment en vésicules sphériques, voir Figure 41. Plus le rapport de débit est élevé, plus la concentration d'alcool diminuera rapidement et moins les disques lipidiques auront du temps pour se rassembler et se stabiliser. Par conséquent, plus le FRR est élevé, plus les nanoparticules lipidiques sont petites.^{163,164} De même, une augmentation du TFR entraîne une dilution plus rapide et une diminution de la taille des LNPs.

3.6.1.5.2 *Température*

La température à laquelle la formulation est réalisée peut avoir un impact significatif sur la formation des complexes lipidiques.^{165,166} Arun Radhakrishnan et al. ont par exemple montré que des complexes cholestérol-phospholipide se forment à 13°C et non à température ambiante ce qui peut avoir un impact au moment de la formulation.¹⁶⁵

3.6.1.5.3 *Géométrie du dispositif*

La conception du micromélangeur tel que sa géométrie, la taille de ses microcanaux et l'orientation des canaux d'entrée ont également un impact significatif sur les tailles et la distribution des tailles des LNPs obtenues¹⁶⁷.

3.7 **Délivrance intracellulaire des LNPs**

Pour une vaccination efficace, l'ARNm doit atteindre le cytoplasme où il peut alors être traduit afin d'obtenir l'antigène d'intérêt, déclenchant ainsi une immunité contre cet antigène. L'entrée cellulaire des LNPs est principalement médiée par l'endocytose, qui est le mécanisme au cours duquel la membrane d'une cellule enveloppe et absorbe une particule, voir Figure 42.⁷⁷ L'endocytose est initiée par des interactions dynamiques non covalentes entre la membrane plasmique et la nanoparticule lipidique à proximité des cellules. Après l'endocytose, les nanoparticules internalisées sont transportées vers les endosomes précoces, suivis de la maturation en endosomes tardifs. Les endosomes tardifs progressent encore vers les lysosomes, où la plupart des nanotransporteurs sont dégradés par les enzymes digestives. En parallèle, une partie importante des nanoparticules internalisées sont éliminées par des voies de recyclage lors du trafic endolysosomal, limitant la délivrance dans le cytoplasme du matériel génétique¹⁶⁸.

Seul un très faible nombre de nanoparticules internalisées ne sont pas dégradées et permettent à l'ARNm d'atteindre le cytoplasme. Gilleron et al. ont démontré que seuls 1 à 2% des siRNA encapsulés dans des LNPs à base de MC3 parviennent à s'échapper vers le cytoplasme¹⁶⁹. Plus récemment, Sabnis et al. ont montré que les LNP à base de lipides ionisables MC3 et « lipide 5 » encapsulant de l'ARNm présentent respectivement des efficacités de délivrance endosomale de 2,5% et 15%.¹²⁵ Le processus de délivrance endosomale reste l'un des processus les moins connus

et l'un des plus importants obstacles à la réussite de la délivrance de gènes^{8,151}. Indépendamment du matériel de délivrance et du mécanisme mis en œuvre, l'efficacité de délivrance endosomale reste extrêmement faible, ce qui nécessite le développement de nouvelles méthodes pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu.

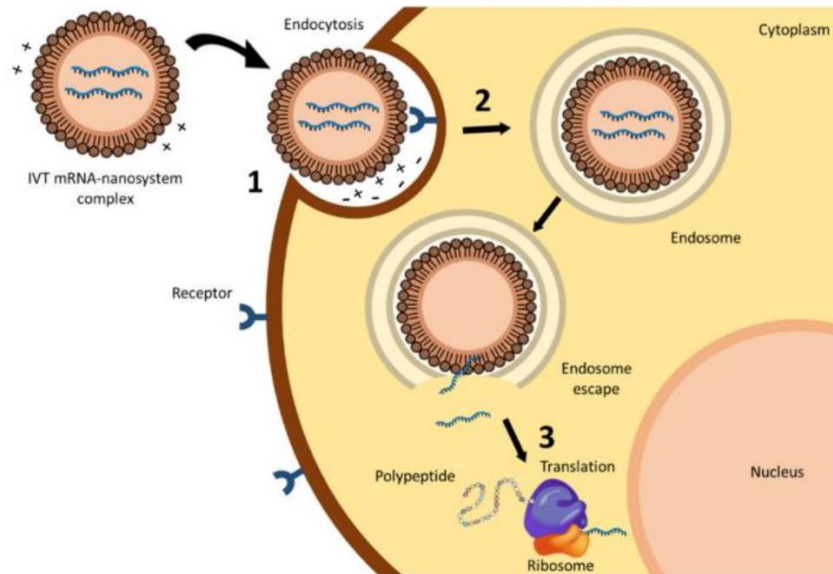


Figure 42 : Délivrance intracellulaire de l'ARNm : (1) Interaction entre le système de délivrance et la membrane cellulaire, (2) endocytose, (3) échappement endosomique et libération de l'ARNm pour démarrer le processus de traduction.¹⁰⁰

Le changement physicochimique le plus évident de la voie endolysosomale est la diminution du pH^{8,77,170}. Pour cette raison, la principale approche pour faciliter la fuite endosomale a été de rendre les nanotransporteurs sensibles à l'acidification des endosomes. À mesure que le pH endosomal diminue, les lipides ionisables dans les LNP deviennent chargés positivement, ce qui favorise les interactions électrostatiques avec la membrane endosomale chargée négativement et donc perturbe l'intégrité de la membrane et déclenche la libération d'acide nucléique dans le cytoplasme^{171,172}.

3.8 Caractéristiques physicochimiques affectant la délivrance intracellulaire

Les propriétés physicochimiques des nanovecteurs telles que leur taille, forme, charge et composition de surface, affectent la délivrance intracellulaire des ARNm.^{77,173}

3.8.1 Taille

La taille des nanovecteurs est connue pour affecter l'efficacité de la délivrance intracellulaire.^{174,175} La taille a une contribution significative à de nombreux paramètres fonctionnels, elle détermine la voie d'entrée des LNPs dans les cellules.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ La taille des LNP peut également être optimisée pour cibler spécifiquement certains organes.¹⁸⁰⁻¹⁸³ Les exigences de taille dépendent donc fortement de la voie d'administration et de l'organe cible.

Dans le cadre des vaccins ARNm, une taille de 10 à 200 nm est souvent recherchée pour une absorption cellulaire optimale. Les petites molécules de taille <10 nm sont absorbées par les capillaires sanguins drainant le site d'injection.¹⁸⁴ La limite de taille supérieure n'est pas strictement définie, mais rester en dessous de 200 nm permet une filtration stérile.¹⁵⁸ Des études récentes ont montré que le ciblage des cellules présentatrices d'antigène (APC, antigen-presenting cells) dans les ganglions lymphatiques pourrait être une stratégie efficace pour améliorer la réponse immunitaire.^{185,186} Dans ce cas une taille de 10 à 100 nm serait recommandée. Il est également intéressant de noter que la taille de nombreux virus se situe entre 20 et 100 nm.¹⁸⁷

Zhang et al.¹⁸⁸ et Gao et al.¹⁸⁹ ont développé des modèles théoriques pour déterminer la taille optimale de nanoparticules pour l'internalisation cellulaire par les cellules vivantes. Les deux études ont conclu que la taille optimale se situe entre 50 et 60 nm. D'autre part, Yyuan et al.¹⁹⁰ ont montré que les nanoparticules plus petites que 30 nm ne sont pas en mesure d'être enveloppées efficacement par la membrane lors de l'endocytose pour des raisons enthalpiques ; leur étude rapporte également une taille optimale pour une absorption maximale de 50 à 60 nm.

Cependant dans une étude récente Hassett et al.¹⁹¹ ont étudié plusieurs formulations de LNPs-ARNm de 60 à 200 nm avec la même composition lipidique et ont montré que toutes les tailles de particules testées ont donné une réponse immunitaire robuste chez les primates non humains (NHP). D'autre part, Bao et al.¹⁹² ont montré que l'activité des siRNA-LNPs de plus grande taille (~ 130 nm) avec 0,5 % mol de lipide-PEG donnent de meilleurs résultats que des LNP plus petits avec des quantités plus élevées de PEG ; cela a été attribué à une meilleure capacité de perturbation de la membrane de l'endosome une fois dans la cellule.

Enfin, il est également intéressant de noter que l'exposition des nanoparticules lipidiques à un milieu biologique provoque la formation de couronnes de protéines autour des LNPs, augmentant ainsi leur taille d'environ 20%.^{193,194} Enfin, la lyophilisation des nanoparticules peut entraîner une augmentation très importante de la taille des LNPs et peut également entraîner une réorganisation des lipides.^{195,196}

3.8.2 Charge

La charge des nanovecteurs joue un rôle déterminant, dictant le transport des objets à travers les barrières biologiques. En effet, la charge détermine la présence d'interactions électrostatiques entre les particules et la force de ces interactions. Elle impacte également la stabilité des particules.¹⁹⁷ La charge est contrôlée par les lipides présents dans les LNPs et par la composition et le pH du tampon aqueux.¹⁹⁸

Les nanoparticules anioniques peuvent difficilement entrer dans l'espace intracellulaire en raison de la charge négative des membranes cellulaires. Les vecteurs de délivrance cationiques peuvent eux entrer dans l'espace intracellulaire plus aisément mais ils montrent une cytotoxicité en raison d'associations non désirées avec des biomolécules chargées négativement.¹¹² Pour éviter cette cytotoxicité, les vecteurs de délivrance d'ARN ont évolué pour avoir une charge de surface relativement neutre. Cependant, la présence d'une charge de surface positive semble toujours nécessaire pour la libération endosomique de l'ARNm encapsulé, mais cette charge ne doit pas être persistante. Par conséquent, les nanovecteurs ont été conçus de manière à n'acquérir une charge positive qu'en entrant dans l'endosome.

Plusieurs études ont montré que la charge de surface des nanoparticules a un impact significatif sur leur mobilité et leur transport à travers différentes membranes et dans différents organes.^{199–201} Kranz et al. ont montré que les cellules dendritiques pouvaient par exemple être ciblées avec précision et efficacité *in vivo* en ajustant de manière optimale la charge nette des lipoplexes-ARN administrés par voie intraveineuse.²⁰² Cheng et al. ont développé une stratégie appelée ciblage sélectif des organes (en anglais *Selective Organ Targeting SORT*) dans laquelle l'ajustement de la charge interne des LNPs, par ajout de molécules supplémentaires dans la formulation, permet une délivrance spécifique de l'ARNm.²⁰³

3.8.3 Forme

La forme est une autre propriété essentielle des nanovecteurs qui joue un rôle important dans l'efficacité de l'internalisation cellulaire.²⁰⁴ Des modèles théoriques ont mis en évidence les avantages de l'utilisation de particules non sphériques pour améliorer la délivrance intracellulaire.^{205,206} Plusieurs études expérimentales ont confirmé l'impact de la forme des particules dans l'internalisation cellulaire.²⁰⁷⁻²⁰⁹ Cao et al. ont formulé les LNPs en forme d'étoile utilisant des phosphatidylcholines avec différentes longueurs de chaînes et ont montré que ces LNPs présentent une absorption cellulaire grandement améliorée par rapport aux LNPs sphériques.²¹⁰ En effet, la forme peut affecter les interactions avec l'environnement biologique et modifier la nature de ces interactions avec les membranes cellulaires et endosomales.⁷⁷

3.8.4 Composition de surface

L'efficacité de la délivrance intracellulaire de l'ARNm est également affectée par la composition de surface des nanovecteurs. Un exemple important de modification de surface est l'incorporation de PEG. La PEGylation des nanoparticules modifie le transport des nanovecteurs, permettant ainsi de prolonger leur demi-vie et d'améliorer leur délivrance intracellulaire²¹¹.

3.8.5 Taux d'encapsulation

Les molécules d'ARNm non encapsulées, libres, sont susceptibles d'être dégradées par des exo et endonucléases ; de plus, leur pénétration intracellulaire est extrêmement faible. Ainsi, le taux d'encapsulation est un paramètre clef impactant la délivrance intracellulaire des ARNm. L'objectif est d'obtenir un taux d'encapsulation le plus élevé possible pour augmenter les chances que l'ARNm rejoigne le cytoplasme.

3.9 Méthodes de caractérisation

Bien que les nanoparticules lipidiques présentent de nombreux avantages pour une administration d'acides nucléiques efficace, elles présentent de nombreux défis dans la caractérisation en raison de leurs propriétés physicochimiques complexes.

3.9.1 Taille

3.9.1.1 *Dynamic Light Scattering (DLS)*

La DLS est l'approche la plus courante pour l'analyse de la taille et la distribution en taille des nanoparticules ayant des diamètres de 1 à 1000 nm²¹². Les paramètres variables pour les mesures en DLS comprennent la température, la viscosité et l'indice de réfraction du solvant. Ces paramètres doivent être prédéterminés pour calculer avec précision la taille des particules. Plusieurs points peuvent cependant limiter la précision des résultats obtenus par DLS : les échantillons doivent souvent être fortement dilués, ce qui peut déstabiliser certaines formulations. La taille moyenne en intensité diffusée donne plus de poids aux grosses particules car elles diffusent plus de lumière que leurs homologues plus petites, ce qui peut introduire des biais de mesure.²¹² C'est pourquoi la DLS n'est recommandée que pour le contrôle d'échantillons avec des polydispersités relativement faibles. Enfin, les distributions de taille sont calculées en supposant un certain modèle de forme de particule, qui n'est pas toujours exact. Ainsi, le guide sur les formulations pharmaceutiques contenant des nanomatériaux de la U.S. FDA indique que pour remédier aux imprécisions liées aux techniques utilisées, il est recommandé d'utiliser plusieurs méthodes complémentaires pour mesurer la taille de nanoobjets.²¹³

3.9.1.2 *Transmission Electron microscopy (TEM)*

La taille des particules peut être directement visualisées par plusieurs techniques microscopiques.

La TEM à coloration négative (utilisant de l'acétate d'uranyle ou de l'acide phosphotungstique) peut être utilisée pour vérifier la taille des nanoparticules. Cependant, étant donné que les échantillons doivent être séchés avant la coloration, le processus de coloration peut provoquer un rétrécissement ou une agrégation des LNPs.²¹²

La microscopie électronique à cryotransmission (Cryo-TEM) est devenue la technologie de pointe pour l'imagerie d'échantillons biologiques à l'échelle nanométrique tels que les LNPs. En Cryo-TEM des films aqueux sont directement vitrifiés pour l'imagerie. La Cryo-TEM révèle la diversité de la taille des particules et peut permettre d'observer les couches lipidiques. Bien que l'analyse

Cryo-TEM présente des avantages évidents, l'adoption de la Cryo-TEM pour la caractérisation des nanoparticules a été entravée par plusieurs facteurs tels que le coût important des systèmes d'imagerie, la préparation complexe des échantillons et le faible débit d'acquisition et d'analyse d'images.²¹⁴ De plus, les images en Cryo-TEM souffrent d'un bruit de fond important, d'un éclairage parfois non uniforme et d'artefacts, ce qui rend l'identification des particules et leur analyse automatique difficile.

3.9.1.3 *Size exclusion chromatography (SEC)*

La SEC peut être utilisée pour déterminer la taille et la distribution en taille des LNPs. Des colonnes de gels de Sepharose (agarose à gros pores) et Sephadex (dextrane réticulé) ont été utilisées pour la SEC des nanoparticules lipidiques, mais leurs limites d'exclusion ne permettent pas de séparer les populations de particules de taille supérieure à 100 nm.²¹⁵ Alternativement, le Sephacryl S-1000 (copolymère allyl-dextran méthylène bisacrylamide) a été utilisé pour séparer des liposomes jusqu'à 200-300 nm de diamètre.²¹⁶ Enfin, des colonnes de gel TSK (polyéther hydroxylé semi-rigide) ont été développées, la colonne TSK-G6000PW montrant une haute résolution pour l'analyse des liposomes de 20 à 500 nm de diamètre.^{217,218} Pour mesurer la taille des particules à l'aide de la SEC, un étalonnage peut être effectué à l'aide de standards tels que des billes de latex, des virus ou des liposomes avec une taille bien définie. Cependant, lorsque la SEC est couplée à un détecteur viscosimétrique et un détecteur de concentration, la distribution peut être mesurée sans avoir besoin de standards, on parle dans ce cas de calibration universelle.²¹² La pré-saturation des colonnes SEC avec des LNPs vides peut être utile lorsque la quantité d'échantillon est faible. Cependant les pressions appliquées ainsi que les potentielles interactions avec la phase stationnaire peuvent entraîner une déformation des liposomes.

3.9.1.4 *Nanoparticle tracking analysis (NTA)*

La NTA est une méthode basée sur l'analyse de particules uniques. Des particules en suspension dans un liquide sont éclairées par un faisceau laser et le mouvement brownien des particules est mesuré. De nombreuses particules sont analysées individuellement et simultanément, leurs diamètres hydrodynamiques sont calculés en utilisant l'équation de Stokes-Einstein. La NTA permet également d'accéder à la concentration des particules basées sur le nombre.²¹⁹ Filipe et al. ont réalisé une étude comparative complète mesurant des particules de diamètre allant de 60 à 1000

nm par DLS et NTA, et ont trouvé que les résultats obtenus en NTA sont particulièrement utiles dans le cas de particules polydisperses et pour l'observation de la présence d'agrégats.²²⁰ Cependant, la NTA nécessite souvent des dilutions importantes pour que le champ d'observation ne soit pas trop encombré, ce qui peut déstabiliser les formulations. Enfin, comme en DLS, la NTA a également une résolution restreinte pour les petites particules.

3.9.1.5 *Asymmetric-flow field-flow fractionation (AF4)*

L'AF4 couplée à plusieurs détecteurs optiques en ligne (MD-AF4) est une approche polyvalente et robuste pour la caractérisation des nanoparticules. L'AF4 a été utilisée avec succès pour mesurer la taille, la polydispersité et la stabilité physique de nanoparticules lipidiques.²²¹

3.9.1.6 *Taylor dispersion analysis (TDA)*

La TDA est une autre méthode prometteuse pour l'analyse de la taille de LNPs.²²² La TDA permet la détermination de diamètres hydrodynamiques de 0,2 à 250 nm.²²³ La TDA a l'avantage de pouvoir être réalisée sans dilution et sans altération de l'échantillon.²²⁴ Franzen et al. ont utilisé l'analyse de la dispersion de Taylor pour déterminer la taille de formulations liposomales PEGylées.^{198,222}

3.9.2 Charge

3.9.2.1 *Laser Doppler electrophoresis (LDE)*

La charge des nanoparticules est le plus souvent déterminée par LDE et exprimée par le potentiel zêta, qui représente le profil de charge d'une particule associée à une couche diffuse. Les mesures de taille et de potentiel zêta sont généralement effectuées sur le même instrument par DLS et LDE. Le système mesure des mobilités électrophorétiques et calcule les potentiels zêta associés en utilisant généralement l'équation de Smoluchowski ou de Hückel.²²⁵ Plusieurs études ont indiqué que le potentiel zêta des nanoparticules lipidiques dépend fortement du pH, de la température et de la force ionique du milieu.^{226,227} Des potentiels zêta inférieurs à -30mV ou supérieurs à 30mV sont généralement conseillés pour les nanoparticules chargées afin de maintenir une répulsion inter-particules suffisante et une suspension stable.¹⁹⁷ L'ajout de PEG peut également permettre de stabiliser stériquement les formulations de nanoparticules lipidiques non chargées.²²⁸ Kumar et al. ont par ailleurs étudié l'effet de la densité du PEG sur les propriétés

physicochimiques des nanoparticules.²²⁹ La mesure du potentiel zêta a été réalisée à pH 5,5 (pH < pKa du lipide ionisable) pour assurer la protonation des lipides ionisables de surface, dans de l'eau déminéralisée pour éliminer l'écrantage de charge par les contre-ions et l'effet de force ionique. Le potentiel zêta a chuté de +32 mV (pour les LNPs avec 1,5% de lipide-PEG) à +24 (pour les LNPs avec 5% de lipide-PEG) et à +18 mV (pour les LNPs avec 10% de lipide-PEG).

3.9.2.2 *Capillary electrophoresis (CE)*

La CE peut également être utilisée pour la mesure de la charge de surface de nanoparticules lipidiques.¹⁹⁸ Les mobilités électrophorétiques déterminées par CE et par LDE ont été comparées dans le cas de liposomes PEGylés et les résultats se sont avérés concordants ($\mu_e = -4,14 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour la CE et $\mu_e = -3,08 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour la LDE).²²² Bien que ces résultats soient très proches, d'autres études sur différentes formulations de LNPs comparant ces deux techniques sont nécessaires.¹⁹⁸ La détermination des mobilités électrophorétiques par CE nécessite de faibles volumes d'échantillons et les analyses ont l'avantage d'être facilement automatisables. De plus, la CE est une méthode séparative permettant la séparation des différentes espèces chargées.

3.9.2.3 *Autres méthodes*

Le potentiel de surface absolu des liposomes peut également être mesuré par marquage fluorescent^{229,230} et par génération de seconde harmonique.²³¹

3.9.3 **Forme et structure**

3.9.3.1 *Cryogenic Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM)*

La cryo-TEM est devenue un outil indispensable pour la caractérisation des LNPs, en plus d'informations sur leur taille elle permet également d'étudier leur forme et leur structure en détail.²³² Eygeris et al. ont utilisé la cryo-TEM pour étudier la structure de LNPs contenant des dérivés naturels du cholestérol.²³³ Ils ont constaté que l'incorporation d'analogues du cholestérol affecte de manière significative la morphologie des LNPs et permettent d'améliorer l'absorption cellulaire. Une meilleure compréhension de la structure des LNPs peut conduire à de nouvelles conceptions permettant d'optimiser la délivrance cellulaire.

3.9.3.2 *Small-angle X-ray scattering (SAXS)*

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) est une technique expérimentale qui permet d'étudier les propriétés structurales des matériaux à une échelle allant de 1 à 100-150 nm. Cette technique se base sur l'interaction élastique des photons avec les nuages électroniques. Les photons sont diffusés en traversant l'échantillon et fournissent des informations sur la fluctuation des densités électroniques dans la matière hétérogène. La SAXS fournit non seulement des informations sur la forme et la taille des nanoparticules, mais également sur la structure interne. Arteta et al. et Kulkarni et al. ont utilisé la SAXS en combinaison avec la cryo-TEM pour étudier la structure interne d'ARNm-LNPs.^{105,234} De plus, SAXS permet d'obtenir des informations sur le nombre de bicouches lipidiques (lamellarité) des LNPs.

3.9.3.3 *Atomic force microscopy (AFM)*

La microscopie à force atomique est un type de microscopie à très haute résolution qui permet de créer des micrographies tridimensionnelles avec une résolution allant jusqu'à l'échelle nanométrique.²³⁵ L'AFM repose sur la détection de forces de surface répulsives ou attractives entre les atomes de l'échantillon et ceux de la pointe, qui balaye la surface de l'échantillon. L'AFM permet l'imagerie simultanée et la mesure de la rigidité des LNP individuels.²³⁶ De plus, l'AFM peut être utilisée pour examiner l'interaction des LNP avec des biomolécules ou cellules.

3.9.3.4 *Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)*

La spectroscopie RMN est une autre méthode de pointe permettant de sonder la structure et la morphologie d'assemblages lipidiques. Viger-Gravel et al. ont utilisé la spectroscopie RMN à polarisation nucléaire dynamique (DNP) pour déterminer la structure de nanoparticules lipidiques chargées et vides (LNPs).¹⁴⁶ De plus, les analyses RMN ont permis de déterminer l'emplacement des acides nucléiques encapsulés dans les LNPs. D'après l'étude, les LNPs présentent un noyau homogène avec une superposition de DSPC et lipide-PEG en surface.

3.9.4 Quantification de l'encapsulation

3.9.4.1 Fluorescence

Le réactif RNA RiboGreen® est un colorant d'acide nucléique fluorescent ultra-sensible très largement utilisé pour quantifier l'ARN en solution²³⁷. Pour déterminer l'efficacité d'encapsulation, la concentration en ARN libre est tout d'abord calculée en marquant la formulation de LNPs, puis les LNPs sont déformulées en utilisant un surfactant destructurant tel que le Triton, ce qui permet de calculer la quantité globale d'ARN. Enfin, le taux d'encapsulation est calculé par différence entre l'ARN non encapsulé et l'ARN total. Bien que l'utilisation du réactif RNA RiboGreen® est la méthode la plus utilisée pour déterminer le taux d'encapsulation d'ARNm dans des LNPs, d'autres méthodes pourraient s'avérer prometteuses.

3.9.4.2 High performance liquid chromatography (HPLC)

L'HPLC peut être utilisée pour déterminer le taux d'encapsulation de substances médicamenteuses dans des nanoparticules lipidiques. Itoh et al. ont montré que l'utilisation de colonne de silice monolithique permet l'analyse rapide de la quantité d'amphotéricine B et d'irinotécan encapsulés dans des nanoparticules. Ils ont également travaillé sur la modification de la surface de la silice avec différents polymères pour réduire l'adsorption des liposomes sur la phase stationnaire.^{238,239} Yamamoto et al.²⁴⁰ ont mis au point une méthode de mesure rapide de l'efficacité d'encapsulation de liposomes chargés en doxorubicine par HPLC. La doxorubicine non encapsulée a été mesurée en utilisant une colonne de nPEC modifiée par de la N-vinylpyrrolidone. Seulement 5 µL d'une suspension liposomale et un temps d'analyse de 3 min sont nécessaires pour la détermination de la quantité de doxorubicine non encapsulée. Cependant, ces études ne concernent pas directement la quantification de l'encapsulation d'ARNm par HPLC.

3.9.4.3 Capillary electrophoresis (CE) and Taylor dispersion analysis (TDA)

Plusieurs études montrent que l'électrophorèse capillaire peut être utilisée pour calculer le taux d'encapsulation et suivre la libération de médicaments.¹⁹⁸ Franzen et al. ont développé une méthode de CE pour caractériser une formulation liposomale encapsulant de l'oxaliplatine. La détermination des concentrations d'oxaliplatine libre et totale dans la formulation liposomale a été réalisée avec succès, permettant le calcul du taux d'encapsulation²⁴¹. Nguyen et al. ont étudié la stabilité d'une formulation de liposomes chargés de cisplatine dans le plasma par CE-ICP-MS. Ils

ont étudié simultanément la libération des médicaments et leur liaison aux protéines plasmatiques²⁴². Ansar et al. ont développé une méthode permettant de déterminer l'efficacité d'encapsulation de la doxorubicine dans des formulations liposomales par CE²⁴³. Enfin, Chamieh et al. ont étudié la libération de peptides à partir de nanovecteurs lipidiques par analyse de dispersion de Taylor²⁴⁴. Cependant, aucune de ces études ne s'est directement intéressée à l'encapsulation de l'ARNm.

3.9.4.4 Analytical ultracentrifugation (AUC)

L'AUC est également une technique qui permet de calculer le taux d'encapsulation de formulations médicamenteuses. Mehn et al. ont utilisé l'ultracentrifugation analytique pour mesurer le taux d'encapsulation de liposomes chargés en doxorubicine dans le sérum humain. Ils ont montré qu'en une seule analyse, il est possible de mesurer à la fois les quantités de médicaments libres, encapsulés dans les liposomes et liés aux protéines du serum²⁴⁵. Enfin, Henrickson et al. ont utilisé l'AUC pour mesurer le taux d'encapsulation d'acide nucléique dans des formulations de nanoparticules lipidiques²⁴⁶.

3.9.5 Stabilité

Les formulations de nanoparticules lipidiques doivent être à la fois physiquement et chimiquement stables :

- les nanoparticules doivent maintenir une distribution de taille homogène et un niveau constant d'encapsulation de l'ARNm
- les lipides et les ARNm ne doivent pas se dégrader.

3.9.5.1 Stabilité physique

Les nanoparticules lipidiques peuvent fusionner et former des particules plus grosses pendant le stockage. La fusion peut induire une séparation de phase qui entraîne une fuite des ARNm encapsulés. C'est pourquoi la taille et le taux d'encapsulation sont des paramètres qui doivent être contrôlés lors des études de stabilité.

3.9.5.2 Stabilité chimique

Les formulations de LNPs doivent retenir les ARNm chargés pendant leur stockage *in vitro* et durant leur circulation *in vivo* avant de le délivrer à la cellule cible. Selon les directives sur les formulations de doxorubicine liposomale de la FDA américaine, la libération du médicament encapsulé doit être testée dans : (1) 50% de plasma humain à 37 °C pendant 24 h pour mesurer la stabilité de la circulation sanguine ; (2) différents tampons de pH (7,5, 6,5 et 5,5) à 37 °C pendant 24 h pour imiter respectivement la libération de médicament dans les tissus normaux, les tissus cancéreux et les cellules ; (3) des températures élevées (43, 47, 52 et 57°C) pour évaluer les transitions de phase lipidique ; et (4) dans un environnement ultrasonore basse fréquence (20 kHz).²⁴⁷

Xu et coll. ont mis au point une méthode de dialyse inversée en deux étapes pour les tests de libération *in vitro* d'un produit médicamenteux liposomal. La première étape du test consiste à imiter la circulation des liposomes dans le corps, tandis que la deuxième étape consiste à imiter le processus de libération au niveau de la cellule cible.²⁴⁸ Alternativement, l'utilisation de microdialyses a été développée pour étudier la libération d'ARNm.^{249,250}

3.10 Applications thérapeutiques

3.10.1 Immunothérapie

L'induction d'une réponse immunitaire à l'aide d'ARNm a été l'une des principales applications parmi les thérapies à base d'ARNm. Un certain nombre de vaccins à ARNm sont actuellement évalués dans des essais cliniques contre des maladies infectieuses¹⁰⁰. D'autre part, l'immunisation passive par l'ARNm codant pour des anticorps monoclonaux présente également un grand intérêt biomédical. Compte-tenu de la croissance rapide du marché des anticorps monoclonaux thérapeutiques et du coût élevé de ce type de médicaments, l'industrie pharmaceutique est à la recherche d'approches alternatives. L'ARNm est considéré comme une bonne option, en raison de sa synthèse plus simple. Enfin, plusieurs études ont montré que les vaccins ARNm peuvent être utilisés pour prévenir les réactions allergiques de type 1^{251,252}.

3.10.2 Immunothérapie anticancéreuse

L'immunothérapie contre le cancer repose sur la génération d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Il existe deux principaux types d'immunothérapie anticancéreuse à ARNm. Le premier fonctionne au niveau cellulaire de la même manière qu'un vaccin à ARNm sauf que l'ARNm code pour des antigènes associés à une tumeur. La deuxième classe d'immunothérapie anticancéreuse dirigée par l'ARNm implique la modification des lymphocytes T avec des récepteurs antigéniques chimériques (CARs).^{8,253}

3.10.3 Remplacement de protéines

Certaines maladies sont caractérisées par une production insuffisante de protéines et nécessite une production plus importante, d'autres sont causées par une production aberrante de protéines et nécessite un remplacement.

Depuis la première étude préclinique concernant l'utilisation d'ARNm IVT pour le remplacement de protéines en 1992 par Jirikowski et al. sur le diabète⁴, l'ARNm a été utilisé pour produire plusieurs protéines. Kormann et al. ont testé l'utilisation de l'ARNm IVT dans le cas d'une maladie pulmonaire mortelle congénitale causée par le manque de protéine SPB. L'administration par aérosol d'ARNm de SPB dans les poumons deux fois par semaine a protégé les souris de l'insuffisance respiratoire et a prolongé leur durée de vie²⁵⁴. Les principales applications de cette thérapie sont les maladies génétiques et rares. L'ARNm IVT thérapeutique peut coder pour une protéine manquante ou sous-exprimée responsable de la maladie et associée à des anomalies génomiques¹⁰⁰.

3.10.4 Médecine régénérative et génie cellulaire

La médecine régénérative vise à réparer ou remplacer les cellules, organes ou tissus lésés ou perdus en rétablissant leur fonction²⁵⁵. Zangi et al. ont montré que l'injection intramyocardique d'ARNm codant pour le facteur de croissance endothélium vasculaire, améliore la fonction cardiaque et augmente la survie à long terme dans un modèle de souris d'infarctus du myocarde²⁵⁶.

3.11 Directives des agences règlementaires

3.11.1 FDA

L'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) a publié en 2018 un guide pour l'industrie concernant les produits pharmaceutiques utilisant des liposomes.²⁵⁷ Ce guide décrit les informations qui doivent être présentes pour toute soumission d'un nouveau produit pharmaceutique à base de liposomes. Bien que ce guide ne fournisse pas de recommandations spécifiques aux LNPs, de nombreuses spécifications décrites dans ce guide peuvent également s'appliquer à ces produits.

Les attributs de qualité critiques (CQAs) sont des caractéristiques chimiques, physiques, biologiques et microbiologiques qui doivent être définis, mesurés et contrôlés pour garantir la qualité des produits. Selon le guide de la FDA les CQAs des produits pharmaceutiques à base de liposomes sont :

- La taille et la distribution en taille
- La morphologie
- La charge nette
- La viscosité
- La température de transition de phase
- Les changements d'intégrité en réponse à des changements tels que la concentration en sel, le pH, la température ou l'ajout d'autres excipients
- Les caractéristiques de surface (ex : PEGylation)
- La structure (méthodes spectroscopiques ou autres méthodes analytiques)

Spécifications supplémentaires liées au produit médicamenteux :

- Quantité libre, quantité encapsulée, quantité totale
- Libération *in vitro* de la substance médicamenteuse dans des conditions expérimentales décrites
- Stabilité
- Produits de dégradation
- Solvants résiduels
- Stérilité et absence de pyrogènes ou d'endotoxines bactériennes

Spécifications supplémentaires des composants lipidiques :

- Test d'identité
- Teneur en lipides
- Stabilité
- Analyse des impuretés (acide gras trans, acide gras libre, peroxydes, lysophospholipides, solvants, catalyseurs)
- Teneur en contre-ions et limites sur les cations divalents
- Degré d'insaturation des chaînes latérales d'acides gras

3.11.2 EU

La commission européenne en collaboration avec la direction européenne de la qualité, du médicament & soins de santé (edqm) et de conseil de l'Europe ont également publié une directive concernant les vaccins à ARNm.²⁵⁸ Dans cette directive la liste suivante d'analyses est recommandée pour ces vaccins :

- apparence
- pH
- osmolalité
- taille des LNPs
- polydispersité des LNPs
- taux d'encapsulation d'ARN
- concentration en ARN
- concentration des composants des LNP
- impuretés (si applicable)
- identité des composant des LNP
- volume extractible
- identité de la séquence codée par l'ARN
- expression in vitro
- intégrité / pureté de l'ARN
- impuretés d'ARN (si applicable)
- solvants résiduels (si applicable)
- teneur en endotoxines
- test de stérilité

3.11.3 OMS

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a également publié des considérations réglementaires pour l'évaluation de la qualité, de l'innocuité et de l'efficacité des vaccins à ARN messenger pour la prévention des maladies infectieuses.²⁵⁹ Dans ce rapport la liste suivante d'analyses est recommandée pour les LNPs :

- identité, quantité et pureté des lipides
- taille et polydispersité des LNPs
- taux d'encapsulation d'ARN
- propriétés de surface (par exemple, la charge)
- rapport molaire des lipides

Dans son rapport l'OMS déclare également que la justification du choix des méthodes analytiques pour la détermination de divers paramètres doit être envisagée, en particulier lorsqu'un résultat différent peut être obtenu en utilisant des techniques alternatives - par exemple, la mesure de la taille des particules à l'aide de différentes méthodes. C'est pour cette raison que l'utilisation de méthodes orthogonales est recommandée. D'autre part il est précisé que certains aspects des LNP doivent être très soigneusement caractérisés tels que la taille des nanoparticules déterminée par différentes techniques analytiques.

4 Conclusion

Il est important d'étudier les interactions entre les antigènes et les adjuvants, car ces interactions peuvent avoir un impact significatif sur l'efficacité des vaccins. Très peu d'articles sont présents dans la littérature concernant l'étude des interactions entre antigènes et adjuvants dans les vaccins. Ces interactions sont difficiles à étudier en raison de la complexité de chacun des partenaires et de leur faible concentration dans les formulations vaccinales. Les méthodes électrophorétiques telles que la FACCE, la CZE et la TDA ont déjà fait leurs preuves pour l'analyse de protéines et l'étude des interactions entre de nombreux systèmes physico-chimiques différents. A notre connaissance, les techniques FACCE et TDA n'ont jamais été employées pour l'étude des interactions entre les antigènes et les adjuvants présents dans des vaccins. Mais ces méthodes semblent pouvoir être tout à fait adaptée à leur analyse.

Les vaccins à ARN messenger ont révélé leur potentiel durant la pandémie de COVID-19. Ces vaccins ont pu être développés à une vitesse record grâce au travail en amont de nombreux chercheurs qui ont pendant plusieurs décennies étudié les ARN messenger et leurs moyens de délivrance. Ces nouvelles technologies vaccinales ont soulevé un élan d'espoir pour la prévention et le traitement de nombreuses maladies pour lesquelles les solutions thérapeutiques sont actuellement encore limitées. Le développement de ces nouvelles technologies nécessite le développement de nouvelles méthodes analytiques pour étudier et caractériser les ARN messenger et les formulations vaccinales associées. De plus, le développement de méthodes orthogonales aux méthodes existantes est nécessaire pour mieux comprendre les limites des méthodes analytiques actuelles et les challenger. L'électrophorèse capillaire et l'analyse de la dispersion de Taylor ont leur rôle à jouer dans la caractérisation de ces nouveaux vaccins.

5 Références

- (1) Plotkin, S. L.; Plotkin, S. A. A Short History of Vaccination. In *Plotkin's Vaccines*; Elsevier, 2018; pp 1-15.e8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35761-6.00001-8>.
- (2) Riedel, S. Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. *Bayl. Univ. Med. Cent. Proc.* **2005**, *18* (1), 21–25. <https://doi.org/10.1080/08998280.2005.11928028>.
- (3) Wolff, L.; Flemming, J.; Schmitz, R.; Gröger, K.; Goso, C.; Müller-Goymann, C. Forces Determining the Adsorption of a Monoclonal Antibody onto an Aluminium Hydroxide Adjuvant: Influence of Interstitial Fluid Components. *Vaccine* **2009**, *27* (12), 1834–1840. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.037>.
- (4) Jirikowski, G.; Sanna, P.; Maciejewski-Lenoir, D.; Bloom, F. Reversal of Diabetes Insipidus in Brattleboro Rats: Intrahypothalamic Injection of Vasopressin MRNA. *Science* **1992**, *255* (5047), 996. <https://doi.org/10.1126/science.1546298>.
- (5) Schirmmayer, V.; Förg, P.; Dalemans, W.; Chlichlia, K.; Zeng, Y.; Fournier, P.; von Hoegen, P. Intra-Pinna Anti-Tumor Vaccination with Self-Replicating Infectious RNA or with DNA Encoding a Model Tumor Antigen and a Cytokine. *Gene Ther.* **2000**, *7* (13), 1137–1147. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301220>.
- (6) Ramaswamy, S.; Tonnu, N.; Tachikawa, K.; Limphong, P.; Vega, J. B.; Karmali, P. P.; Chivukula, P.; Verma, I. M. Systemic Delivery of Factor IX Messenger RNA for Protein Replacement Therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114* (10), E1941. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619653114>.
- (7) Pardi, N.; Serezo, A. J.; Shan, X.; Debonera, F.; Glover, J.; Yi, Y.; Muramatsu, H.; Ni, H.; Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Shaheen, F.; Collman, R. G.; Karikó, K.; Danet-Desnoyers, G. A.; Madden, T. D.; Hope, M. J.; Weissman, D. Administration of Nucleoside-Modified MRNA Encoding Broadly Neutralizing Antibody Protects Humanized Mice from HIV-1 Challenge. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 14630. <https://doi.org/10.1038/ncomms14630>.
- (8) Hajj, K. A.; Whitehead, K. A. Tools for Translation: Non-Viral Materials for Therapeutic MRNA Delivery. *Nat. Rev. Mater.* **2017**, *2* (10), 17056. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.56>.
- (9) Verbeke, R.; Lentacker, I.; De Smedt, S. C.; Dewitte, H. The Dawn of MRNA Vaccines: The COVID-19 Case. *J. Controlled Release* **2021**. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.03.043>.
- (10) Brian K. Nunnally, Vincent E. Turula, Robert D. Sitrin. *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control*; 2015.
- (11) Haynes, L. M. Progress and Challenges in RSV Prophylaxis and Vaccine Development. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208* (suppl 3), S177–S183. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit512>.
- (12) *Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols*; Fox, C. B., Springer Science+Business Media, Eds.; Springer protocols; Humana Press: New York, 2016.
- (13) Yadav, D. K.; Yadav, N.; Khurana, S. M. P. Chapter 26 - Vaccines: Present Status and Applications. In *Animal Biotechnology*; Verma, A. S., Singh, A., Eds.; Academic Press: San Diego, 2014; pp 491–508. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00026-2>.
- (14) Gebre, M. S.; Brito, L. A.; Tostanoski, L. H.; Edwards, D. K.; Carfi, A.; Barouch, D. H. Novel Approaches for Vaccine Development. *Cell* **2021**, *184* (6), 1589–1603. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.030>.
- (15) Anderson, R. J.; Schneider, J. Plasmid DNA and Viral Vector-Based Vaccines for the Treatment of Cancer. *Ther. Vaccines Cancer* **2007**, *25*, B24–B34. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.05.030>.
- (16) Liu, M. A.; Ulmer, J. B. Human Clinical Trials of Plasmid DNA Vaccines. In *Advances in Genetics*; Academic Press, 2005; Vol. 55, pp 25–40. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(05\)55002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(05)55002-8).
- (17) Clancy, S.; Brown, W. Translation: DNA to MRNA to Protein. *Nature Education*. 2008.
- (18) Garçon, N.; Friede, M. Evolution of Adjuvants Across the Centuries - Chapter 6. In *Plotkin's Vaccines*; 2018; pp 61–74.
- (19) Schijns, V. E.; Lavelle, E. C. Trends in Vaccine Adjuvants. *Expert Rev. Vaccines* **2011**, *10* (4), 539–550. <https://doi.org/10.1586/erv.11.21>.
- (20) Pasquale, A.; Preiss, S.; Silva, F.; Garçon, N. Vaccine Adjuvants: From 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines* **2015**, *3* (2), 320–343. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020320>.
- (21) Sivakumar, S. M.; Safhi, M. M.; Kannadasan, M.; Sukumaran, N. Vaccine Adjuvants – Current Status and Prospects on Controlled Release Adjuvancity. *Saudi Pharm. J.* **2011**, *19* (4), 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.06.003>.
- (22) Diamantstein, T.; Wagner, B.; Beyse, I.; Odenwald, M.V.; Schultz, G. Stimulation of Humoral Antibody Formation by Polyanions. The Effect of Polyacrylic Acid on the Primary Immune Response in Mice

- Immunized with Sheep Red Blood Cells. *Eur. J. Immunol.* **1971**, 335–340. <https://doi.org/10.1002/eji.1830010506>.
- (23) Parker, R.; Deville, S.; Dupuis, L.; Bertrand, F.; Aucouturier, J. Adjuvant Formulation for Veterinary Vaccines: Montanide™ Gel Safety Profile. *Procedia Vaccinol.* **2009**, *1* (1), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2009.07.026>.
- (24) Vialle, R.; Dupuis, L.; Deville, S.; Bertrand, F.; Gaucheron, J.; Aucouturier, J. Microgel Particulate Adjuvant: Characterisation and Mechanisms of Action. *Procedia Vaccinol.* **2010**, *2* (1), 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2010.03.003>.
- (25) Mumford, J. A.; Wilson, H.; Hannant, D.; Jessett, D. M. Antigenicity and Immunogenicity of Equine Influenza Vaccines Containing a Carbomer Adjuvant. *Epidemiol. Infect.* **1994**, *112* (02), 421–437. <https://doi.org/10.1017/S0950268800057848>.
- (26) Gelfi, J.; Pappalardo, M.; Claverys, C.; Peralta, B.; Guérin, J.-L. Safety and Efficacy of an Inactivated Carbopol-Adjuvanted Goose Haemorrhagic Polyomavirus Vaccine for Domestic Geese. *Avian Pathol.* **2010**, *39* (2), 111–116. <https://doi.org/10.1080/03079451003604647>.
- (27) Mustafaev, M. I.; Yücel, F.; Öztürk, S.; Çirakoğlu, B.; Bermek, E. Cu²⁺-Mediated Complex Formation between Polyacrylic Acid (PAA) and Bovine Serum Albumin. *J. Immunol. Methods* **1996**, *197* (1–2), 31–37. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00107-X](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00107-X).
- (28) Kabanov, V. A. From Synthetic Polyelectrolytes to Polymer-Subunit Vaccines. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76* (9), 1659–1677. <https://doi.org/10.1351/pac200476091659>.
- (29) KREUTER, J.; Haenzel, I. Mode of Action of Immunological Adjuvants: Some Physicochemical Factors Influencing the Effectivity of Polyacrylic Adjuvants. *INFECT IMMUN* **1978**, *19*, 9.
- (30) Lindblad, E. B. Aluminium Compounds for Use in Vaccines. *Immunol. Cell Biol.* **2004**, *82* (5), 497–505. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01286.x>.
- (31) Gołoś, A.; Lutyńska, A. ALUMINIUM-ADJUVANTED VACCINES – A REVIEW OF THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE. No. 4, 4.
- (32) Hasija, M. Guideline on the Use of Aluminum Based Adjuvants, Sanofi Pasteur. 2007.
- (33) Hem, S. L.; HogenEsch, H. Relationship between Physical and Chemical Properties of Aluminum-Containing Adjuvants and Immunopotentiality. *Expert Rev. Vaccines* **2007**, *6* (5), 685–698. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.5.685>.
- (34) Al-Shakhshir, R. H.; Regnier, F. E.; White, J. L.; Hem, S. L. Contribution of Electrostatic and Hydrophobic Interactions to the Adsorption of Proteins by Aluminium-Containing Adjuvants. *Vaccine* **1995**, *13* (1), 41–44. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)80009-3](https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)80009-3).
- (35) Soubeyrand, B. De la fabrication d'un vaccin à sa mise à disposition en pharmacie. *Rev. Mal. Respir.* **2018**, *35* (10), 1005–1019. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.07.003>.
- (36) Xiong, Q.; Wei, Y.; Xie, H.; Feng, Z.; Gan, Y.; Wang, C.; Liu, M.; Bai, F.; Xie, F.; Shao, G. Effect of Different Adjuvant Formulations on the Immunogenicity and Protective Effect of a Live Mycoplasma Hypopneumoniae Vaccine after Intramuscular Inoculation. *Vaccine* **2014**, *32* (27), 3445–3451. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.071>.
- (37) Madec, F.; Kobisch, M. Bilan Lésionnel Des Poumons Des Porcs Charcutiers à l'abattoir. 1982.
- (38) Fox, C. B.; Kramer, R. M.; Barnes V, L.; Dowling, Q. M.; Vedvick, T. S. Working Together: Interactions between Vaccine Antigens and Adjuvants. *Ther. Adv. Vaccines* **2013**, *1* (1), 7–20. <https://doi.org/10.1177/2051013613480144>.
- (39) Flower, D. R.; Macdonald, I. K.; Ramakrishnan, K.; Davies, M. N.; Doytchinova, I. A. Computer Aided Selection of Candidate Vaccine Antigens. *Immunome Res.* **2010**, *6* (Suppl 2), S1. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-6-S2-S1>.
- (40) Dey, A. K.; Malyala, P.; Singh, M. Physicochemical and Functional Characterization of Vaccine Antigens and Adjuvants. *Expert Rev. Vaccines* **2014**, *13* (5), 671–685. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.907528>.
- (41) Reed, S. G.; Orr, M. T.; Fox, C. B. Key Roles of Adjuvants in Modern Vaccines. *Nat. Med.* **2013**, *19* (12), 1597–1608. <https://doi.org/10.1038/nm.3409>.
- (42) Hansen, B.; Malyala, P.; Singh, M.; Sun, Y.; Srivastava, I.; Hogenesch, H.; Hem, S. L. Effect of the Strength of Adsorption of HIV 1 SF162dV2gp140 to Aluminum-containing Adjuvants on the Immune Response. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100* (8), 3245–3250. <https://doi.org/10.1002/jps.22555>.
- (43) Le Saux, T. Détermination Des Paramètres d'interaction Non-Covalente En Solution Par Les Méthodes Électrophorétiques Capillaires. Champ d'application et Performances. Rationalisation Des Protocoles, Ph.D. Dissertation, Pierre and Marie Curie University, Paris, 2004.

- (44) Lounis, F. M. Etude Des Interactions Entre Polyélectrolytes de Charges Opposées Par Électrophorèse Capillaire et Titration Calorimétrique Isotherme, Université Montpellier, 2016.
- (45) Sisavath, N. Etude Des Interactions En Solution Par Électrophorèse Capillaire : Application Au Cas Des Dendrimères Greffés de La Lysine, Ph.D. Dissertation, University of Montpellier, Montpellier, 2014.
- (46) Foo, K. Y.; Hameed, B. H. Insights into the Modeling of Adsorption Isotherm Systems. *Chem. Eng. J.* **2010**, *156* (1), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.09.013>.
- (47) Bruylants, G.; Bartik, K. Utilisation de la Calorimétrie à Titrage Isotherme pour l'étude des interactions entre (bio)molécules. *Chim. Nouv.* **2005**, *6*.
- (48) Song, C.; Zhang, S.; Huang, H. Choosing a Suitable Method for the Identification of Replication Origins in Microbial Genomes. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01049>.
- (49) Lounis, F. M.; Chamieh, J.; Leclercq, L.; Gonzalez, P.; Geneste, A.; Prelot, B.; Cottet, H. Interactions between Oppositely Charged Polyelectrolytes by Isothermal Titration Calorimetry: Effect of Ionic Strength and Charge Density. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (12), 2684–2694. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b11907>.
- (50) Baranauskienė, L.; Kuo, T.-C.; Chen, W.-Y.; Matulis, D. Isothermal Titration Calorimetry for Characterization of Recombinant Proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *55*, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.06.003>.
- (51) Cooper, M. A. Optical Biosensors in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (7), 515–528. <https://doi.org/10.1038/nrd838>.
- (52) Nagata K., Handa H. *Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions, Applications of BIACORE*, Springer., 2000.
- (53) Abidin, R. S. Murine Polyomavirus VLPs as a Platform for Cytotoxic T Cell Epitope-Based Influenza Vaccine Candidates, University of Queensland, 2016.
- (54) Kv, K.; Sr, A.; Pr, Y.; Ry, P.; Vu, B. Research and Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis. **2014**, *3* (3), 12.
- (55) Frasca, V. Exploiting Differential Scanning Calorimetry As a Process Development Tool. 3.
- (56) Choudhary, R. C.; Kumaraswamy, R. V.; Kumari, S.; Pal, A.; Raliya, R.; Biswas, P.; Saharan, V. Synthesis, Characterization, and Application of Chitosan Nanomaterials Loaded with Zinc and Copper for Plant Growth and Protection. In *Nanotechnology*; Prasad, R., Kumar, M., Kumar, V., Eds.; Springer Singapore: Singapore, 2017; pp 227–247. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4573-8_10.
- (57) Hassan, P. A.; Rana, S.; Verma, G. Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering. *Langmuir* **2015**, *31* (1), 3–12. <https://doi.org/10.1021/la501789z>.
- (58) Bran, J. Elaboration et Caractérisation de Nanostructures Cu-Co: Corrélation Avec Les Propriétés Magnétorésistives., Université de Rouen, 2012.
- (59) Fiawoo, M.-F. Etude Par Microscopie Électronique En Transmission de La Germination et de La Croissance Des Nanotubes de Carbone Synthétisés à Moyenne Température., Université Paris Sud, 2009.
- (60) KARLÍK, M.; JOUFFREY, B. Étude Des Métaux Par Microscopie Électronique En Transmission (MET)-Microscope, Échantillons et Diffraction. Techniques de l'ingénieur. 2008.
- (61) RUSTE, J. Techniques d'analyse Par Imagerie. Techniques de l'Ingénieur. 2017.
- (62) Mortier, E.; Jager, S.; Gerdolle, D.; Dahoun, A. La microscopie électronique à balayage environnementale : application à l'observation des tissus dentaires minéralisés. *Actual. Odonto-Stomatol.* **2011**, No. 255, 221–229. <https://doi.org/10.1051/aos/2011305>.
- (63) HAGÈGE, A.; HUYNH, T. N. S. Analyse Des Macromolécules Biologiques, Électrophorèse Capillaire-Appareillage. Techniques de l'ingénieur. 2013.
- (64) Berezovski, M.; Krylov, S. N. Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures – A Single Experiment Reveals Equilibrium and Kinetic Parameters of Protein–DNA Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (46), 13674–13675. <https://doi.org/10.1021/ja028212e>.
- (65) Lounis, F.; Chamieh, J.; Leclercq, L.; Gonzalez, P.; Cottet, H. The Effect of Molar Mass and Charge Density on the Formation of Complexes between Oppositely Charged Polyelectrolytes. *Polymers* **2017**, *9* (12), 50. <https://doi.org/10.3390/polym9020050>.
- (66) Ouadah, N.; Moire, C.; Brothier, F.; Kuntz, J.-F.; Malý, M.; Dubský, P.; Cottet, H. Mobility Shift Affinity Capillary Electrophoresis at High Ligand Concentrations: Application to Aluminum Chlorohydrate–Protein Interactions. *ACS Omega* **2018**, *3* (12), 17547–17554. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02326>.
- (67) Leclercq, L.; Reinhard, S.; Chamieh, J.; Döblinger, M.; Wagner, E.; Cottet, H. Fast Characterization of Polyplexes by Taylor Dispersion Analysis. *Macromolecules* **2015**, *48* (19), 7216–7221. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01824>.

- (68) Topuzoğulları, M.; Çimen, N. S.; Mustafaeva, Z.; Mustafaev, M. Molecular-Weight Distribution and Structural Transformation in Water-Soluble Complexes of Poly(Acrylic Acid) and Bovine Serum Albumin. *Eur. Polym. J.* **2007**, *43* (7), 2935–2946. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.04.025>.
- (69) Akkilic, N.; Mustafaev, M.; Chegel, V. Conformational Dynamics of Poly(Acrylic Acid)-Bovine Serum Albumin Polycomplexes at Different PH Conditions. *Macromol. Symp.* **2008**, *269* (1), 138–144. <https://doi.org/10.1002/masy.200850917>.
- (70) Karahan, M.; Mustafaeva, Z. Investigation of Ternary Complex Formations of Polyacrylic Acid with Bovine Serum Albumin in the Presence of Metal Ions by Fluorescence and Dynamic Light Scattering Measurements. *9*.
- (71) Iyer, S.; HogenEsch, H.; Hem, S. L. Effect of the Degree of Phosphate Substitution in Aluminum Hydroxide Adjuvant on the Adsorption of Phosphorylated Proteins: RESEARCH ARTICLE. *Pharm. Dev. Technol.* **2003**, *8* (1), 81–86. <https://doi.org/10.1081/PDT-120017526>.
- (72) Jones, L. S.; Peek, L. J.; Power, J.; Markham, A.; Yazzie, B.; Middaugh, C. R. Effects of Adsorption to Aluminum Salt Adjuvants on the Structure and Stability of Model Protein Antigens. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (14), 13406–13414. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500687200>.
- (73) Jully, V.; Moniotte, N.; Mathot, F.; Lemoine, D.; Pr at, V. Development of a High-Throughput Screening Platform to Study the Adsorption of Antigens onto Aluminum-Containing Adjuvants. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104* (2), 557–565. <https://doi.org/10.1002/jps.24256>.
- (74) Jully, V.; Mathot, F.; Moniotte, N.; Pr at, V.; Lemoine, D. Mechanisms of Antigen Adsorption Onto an Aluminum-Hydroxide Adjuvant Evaluated by High-Throughput Screening. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105* (6), 1829–1836. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.032>.
- (75) Clancy, S. RNA Functions. *Nat. Educ.* **2008**, *1* (1), 102.
- (76) Chatterjee, K.; Wan, Y. RNA. *Encyclopedia Britannica* 2018.
- (77) Kim, J.; Eygeris, Y.; Gupta, M.; Sahay, G. Self-Assembled mRNA Vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *170*, 83–112. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.014>.
- (78) Ballesteros-Briones, M. C.; Silva-Pilipich, N.; Herrador-Cañete, G.; Vanrell, L.; Smerdou, C. A New Generation of Vaccines Based on Alphavirus Self-Amplifying RNA. *Prev. Ther. Vaccines Viral Immunol.* **2020**, *44*, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.08.003>.
- (79) Gebre, M. S.; Brito, L. A.; Tostanoski, L. H.; Edwards, D. K.; Carfi, A.; Barouch, D. H. Novel Approaches for Vaccine Development. *Cell* **2021**, *184* (6), 1589–1603. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.030>.
- (80) Beissert, T.; Perkovic, M.; Vogel, A.; Erbar, S.; Walzer, K. C.; Hempel, T.; Brill, S.; Haefner, E.; Becker, R.; Türeci, Ö.; Sahin, U. A Trans-Amplifying RNA Vaccine Strategy for Induction of Potent Protective Immunity. *Mol. Ther.* **2020**, *28* (1), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.09.009>.
- (81) Lam, J. K. W.; Chow, M. Y. T.; Zhang, Y.; Leung, S. W. S. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2015**, *4*, e252. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.23>.
- (82) Sahin, U.; Karikó, K.; Türeci, Ö. mRNA-Based Therapeutics — Developing a New Class of Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (10), 759–780. <https://doi.org/10.1038/nrd4278>.
- (83) Pardi, N.; Hogan, M. J.; Porter, F. W.; Weissman, D. mRNA Vaccines — a New Era in Vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17* (4), 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>.
- (84) Zhong, Z.; Mc Cafferty, S.; Combes, F.; Huysmans, H.; De Temmerman, J.; Gitsels, A.; Vanrompay, D.; Portela Catani, J.; Sanders, N. N. mRNA Therapeutics Deliver a Hopeful Message. *Nano Today* **2018**, *23*, 16–39. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2018.10.005>.
- (85) Weissman, D. mRNA Transcript Therapy. *Expert Rev. Vaccines* **2015**, *14* (2), 265–281. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.973859>.
- (86) Holtkamp, S.; Kreiter, S.; Selmi, A.; Simon, P.; Koslowski, M.; Huber, C.; Türeci, Ö.; Sahin, U. Modification of Antigen-Encoding RNA Increases Stability, Translational Efficacy, and T-Cell Stimulatory Capacity of Dendritic Cells. *Blood* **2006**, *108* (13), 4009–4017. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015024>.
- (87) Orlandini von Niessen, A. G.; Poleganov, M. A.; Rechner, C.; Plaschke, A.; Kranz, L. M.; Fesser, S.; Diken, M.; Löwer, M.; Vallazza, B.; Beissert, T.; Bukur, V.; Kuhn, A. N.; Türeci, Ö.; Sahin, U. Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening. *Mol. Ther.* **2019**, *27* (4), 824–836. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.011>.
- (88) Hajj, K. A.; Whitehead, K. A. Tools for Translation: Non-Viral Materials for Therapeutic mRNA Delivery. *Nat. Rev. Mater.* **2017**, *2* (10), 17056. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.56>.
- (89) Selmi, A.; Vascotto, F.; Kautz-Neu, K.; Türeci, Ö.; Sahin, U.; von Stebut, E.; Diken, M.; Kreiter, S. Uptake of Synthetic Naked RNA by Skin-Resident Dendritic Cells via Macropinocytosis Allows Antigen Expression

- and Induction of T-Cell Responses in Mice. *Cancer Immunol. Immunother.* **2016**, *65* (9), 1075–1083. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1869-7>.
- (90) Kreiter, S.; Selmi, A.; Diken, M.; Koslowski, M.; Britten, C. M.; Huber, C.; Türeci, Ö.; Sahin, U. Intranodal Vaccination with Naked Antigen-Encoding RNA Elicits Potent Prophylactic and Therapeutic Antitumoral Immunity. *Cancer Res.* **2010**, *70* (22), 9031. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0699>.
- (91) Sahin, U.; Derhovanessian, E.; Miller, M.; Kloke, B.-P.; Simon, P.; Löwer, M.; Bukur, V.; Tadmor, A. D.; Luxemburger, U.; Schrörs, B.; Omokoko, T.; Vormehr, M.; Albrecht, C.; Paruzynski, A.; Kuhn, A. N.; Buck, J.; Heesch, S.; Schreeb, K. H.; Müller, F.; Ortseifer, I.; Vogler, I.; Godehardt, E.; Attig, S.; Rae, R.; Breitzkreuz, A.; Tolliver, C.; Suchan, M.; Martic, G.; Hohberger, A.; Sorn, P.; Diekmann, J.; Ciesla, J.; Waksman, O.; Brück, A.-K.; Witt, M.; Zillgen, M.; Rothermel, A.; Kasemann, B.; Langer, D.; Bolte, S.; Diken, M.; Kreiter, S.; Nemecek, R.; Gebhardt, C.; Grabbe, S.; Höller, C.; Utikal, J.; Huber, C.; Loquai, C.; Türeci, Ö. Personalized RNA Mutanome Vaccines Mobilize Poly-Specific Therapeutic Immunity against Cancer. *Nature* **2017**, *547* (7662), 222–226. <https://doi.org/10.1038/nature23003>.
- (92) Leal, L.; Guardo, A. C.; Morón-López, S.; Salgado, M.; Mothe, B.; Heirman, C.; Pannus, P.; Vanham, G.; van den Ham, H. J.; Gruters, R.; Andeweg, A.; Van Meirvenne, S.; Pich, J.; Arnaiz, J. A.; Gatell, J. M.; Brander, C.; Thielemans, K.; Martínez-Picado, J.; Plana, M.; García, F.; on behalf of the iHIVARNA consortium. Phase I Clinical Trial of an Intranodally Administered mRNA-Based Therapeutic Vaccine against HIV-1 Infection. *AIDS* **2018**, *32* (17).
- (93) Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P. H. Gene Transfer into Mouse Lyoma Cells by Electroporation in High Electric Fields. *EMBO J.* **1982**, *1* (7), 841–845. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>.
- (94) Smits, E.; Ponsaerts, P.; Lenjou, M.; Nijs, G.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N.; Van Tendeloo, V. F. I. RNA-Based Gene Transfer for Adult Stem Cells and T Cells. *Leukemia* **2004**, *18* (11), 1898–1902. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403463>.
- (95) Van Tendeloo, V. F. I.; Ponsaerts, P.; Lardon, F.; Nijs, G.; Lenjou, M.; Van Broeckhoven, C.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. Highly Efficient Gene Delivery by mRNA Electroporation in Human Hematopoietic Cells: Superiority to Lipofection and Passive Pulsing of mRNA and to Electroporation of Plasmid CDNA for Tumor Antigen Loading of Dendritic Cells. *Blood* **2001**, *98* (1), 49–56. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.1.49>.
- (96) Hashimoto, M.; Takemoto, T. Electroporation Enables the Efficient mRNA Delivery into the Mouse Zygotes and Facilitates CRISPR/Cas9-Based Genome Editing. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 11315. <https://doi.org/10.1038/srep11315>.
- (97) Klein, T. M.; Wolf, E. D.; Wu, R.; Sanford, J. C. High-Velocity Microprojectiles for Delivering Nucleic Acids into Living Cells. *Nature* **1987**, *327* (6117), 70–73. <https://doi.org/10.1038/327070a0>.
- (98) Mandl, C. W.; Aberle, J. H.; Aberle, S. W.; Holzmann, H.; Allison, S. L.; Heinz, F. X. In Vitro-Synthesized Infectious RNA as an Attenuated Live Vaccine in a Flavivirus Model. *Nat. Med.* **1998**, *4* (12), 1438–1440. <https://doi.org/10.1038/4031>.
- (99) Kofler, R. M.; Aberle, J. H.; Aberle, S. W.; Allison, S. L.; Heinz, F. X.; Mandl, C. W. Mimicking Live Flavivirus Immunization with a Noninfectious RNA Vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (7), 1951–1956. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307145101>.
- (100) Gómez-Aguado, I.; Rodríguez-Castejón, J.; Vicente-Pascual, M.; Rodríguez-Gascón, A.; Solinís, M. Á.; Del Pozo-Rodríguez, A. Nanomedicines to Deliver mRNA: State of the Art and Future Perspectives. *Nanomater. Basel Switz.* **2020**, *10* (2), 364. <https://doi.org/10.3390/nano10020364>.
- (101) Malone, R. W.; Felgner, P. L.; Verma, I. M. Cationic Liposome-Mediated RNA Transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86* (16), 6077. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6077>.
- (102) Zhang, X.; Goel, V.; Robbie, G. J. Pharmacokinetics of Patisiran, the First Approved RNA Interference Therapy in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *J. Clin. Pharmacol.* **2020**, *60* (5), 573–585. <https://doi.org/10.1002/jcph.1553>.
- (103) Urits, I.; Swanson, D.; Swett, M. C.; Patel, A.; Berardino, K.; Amgalan, A.; Berger, A. A.; Kassem, H.; Kaye, A. D.; Viswanath, O. A Review of Patisiran (ONPATTRO®) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Neurol. Ther.* **2020**, *9* (2), 301–315. <https://doi.org/10.1007/s40120-020-00208-1>.
- (104) Akinc, A.; Maier, M. A.; Manoharan, M.; Fitzgerald, K.; Jayaraman, M.; Barros, S.; Ansell, S.; Du, X.; Hope, M. J.; Madden, T. D.; Mui, B. L.; Semple, S. C.; Tam, Y. K.; Ciufolini, M.; Witzigmann, D.; Kulkarni, J. A.; van der Meel, R.; Cullis, P. R. The Onpattro Story and the Clinical Translation of Nanomedicines Containing

- Nucleic Acid-Based Drugs. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14* (12), 1084–1087. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>.
- (105) Yanez Arteta, M.; Kjellman, T.; Bartesaghi, S.; Wallin, S.; Wu, X.; Kvist, A. J.; Dabkowska, A.; Székely, N.; Radulescu, A.; Bergenholtz, J.; Lindfors, L. Successful Reprogramming of Cellular Protein Production through mRNA Delivered by Functionalized Lipid Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (15), E3351. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720542115>.
- (106) 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.; Dong, Y. An Orthogonal Array Optimization of Lipid-like Nanoparticles for mRNA Delivery in Vivo. *Nano Lett.* **2015**, *15* (12), 8099–8107. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b03528>.
- (107) Belouqui, A.; Solinís, M. Á.; Rodríguez-Gascón, A.; Almeida, A. J.; Préat, V. Nanostructured Lipid Carriers: Promising Drug Delivery Systems for Future Clinics. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12* (1), 143–161. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>.
- (108) Erasmus, J. H.; Khandhar, A. P.; Guderian, J.; Granger, B.; Archer, J.; Archer, M.; Gage, E.; Fuerte-Stone, J.; Larson, E.; Lin, S.; Kramer, R.; Coler, R. N.; Fox, C. B.; Stinchcomb, D. T.; Reed, S. G.; Van Hoeven, N. A Nanostructured Lipid Carrier for Delivery of a Replicating Viral RNA Provides Single, Low-Dose Protection against Zika. *Mol. Ther.* **2018**, *26* (10), 2507–2522. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.010>.
- (109) Amos, H. Protamine Enhancement of RNA Uptake by Cultured Chick Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1961**, *5* (1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(61\)90069-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(61)90069-9).
- (110) Kübler, H.; Scheel, B.; Gnad-Vogt, U.; Miller, K.; Schultze-Seemann, W.; vom Dorp, F.; Parmiani, G.; Hampel, C.; Wedel, S.; Trojan, L.; Jocham, D.; Maurer, T.; Rippin, G.; Fotin-Mleczek, M.; von der Mülbe, F.; Probst, J.; Hoerr, I.; Kallen, K.-J.; Lander, T.; Stenzl, A. Self-Adjuvanted mRNA Vaccination in Advanced Prostate Cancer Patients: A First-in-Man Phase I/IIa Study. *J. Immunother. Cancer* **2015**, *3* (1), 26. <https://doi.org/10.1186/s40425-015-0068-y>.
- (111) Petsch, B.; Schnee, M.; Vogel, A. B.; Lange, E.; Hoffmann, B.; Voss, D.; Schlake, T.; Thess, A.; Kallen, K.-J.; Stitz, L.; Kramps, T. Protective Efficacy of in Vitro Synthesized, Specific mRNA Vaccines against Influenza A Virus Infection. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30* (12), 1210–1216. <https://doi.org/10.1038/nbt.2436>.
- (112) Lv, H.; Zhang, S.; Wang, B.; Cui, S.; Yan, J. Toxicity of Cationic Lipids and Cationic Polymers in Gene Delivery. *J. Controlled Release* **2006**, *114* (1), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.014>.
- (113) Miyazaki, T.; Uchida, S.; Nagatoishi, S.; Koji, K.; Hong, T.; Fukushima, S.; Tsumoto, K.; Ishihara, K.; Kataoka, K.; Cabral, H. Polymeric Nanocarriers with Controlled Chain Flexibility Boost mRNA Delivery In Vivo through Enhanced Structural Fastening. *Adv. Healthc. Mater.* **2020**, *9* (16), 2000538. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000538>.
- (114) Jiang, Y.; Lu, Q.; Wang, Y.; Xu, E.; Ho, A.; Singh, P.; Wang, Y.; Jiang, Z.; Yang, F.; Tietjen, G. T.; Cresswell, P.; Saltzman, W. M. Quantitating Endosomal Escape of a Library of Polymers for mRNA Delivery. *Nano Lett.* **2020**, *20* (2), 1117–1123. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b04426>.
- (115) Jiang, Y.; Gaudin, A.; Zhang, J.; Agarwal, T.; Song, E.; Kauffman, A. C.; Tietjen, G. T.; Wang, Y.; Jiang, Z.; Cheng, C. J.; Saltzman, W. M. A “Top-down” Approach to Actuate Poly(Amine-Co-Ester) Terpolymers for Potent and Safe mRNA Delivery. *Biomaterials* **2018**, *176*, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.05.043>.
- (116) Coolen, A.-L.; Lacroix, C.; Mercier-Gouy, P.; Delaune, E.; Monge, C.; Exposito, J.-Y.; Verrier, B. Poly(Lactic Acid) Nanoparticles and Cell-Penetrating Peptide Potentiate mRNA-Based Vaccine Expression in Dendritic Cells Triggering Their Activation. *Biomaterials* **2019**, *195*, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.12.019>.
- (117) Mockey, M.; Bourseau, E.; Chandrashekar, V.; Chaudhuri, A.; Lafosse, S.; Le Cam, E.; Quesniaux, V. F. J.; Ryffel, B.; Pichon, C.; Midoux, P. mRNA-Based Cancer Vaccine: Prevention of B16 Melanoma Progression and Metastasis by Systemic Injection of MART1 mRNA Histidylated Lipopolyplexes. *Cancer Gene Ther.* **2007**, *14* (9), 802–814. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7701072>.
- (118) Hoerr, I.; Obst, R.; Rammensee, H.-G.; Jung, G. In Vivo Application of RNA Leads to Induction of Specific Cytotoxic T Lymphocytes and Antibodies. *Eur. J. Immunol.* **2000**, *30* (1), 1–7. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200001\)30:1<1::AID-IMMU1>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200001)30:1<1::AID-IMMU1>3.0.CO;2-#).
- (119) Cheng, X.; Lee, R. J. The Role of Helper Lipids in Lipid Nanoparticles (LNPs) Designed for Oligonucleotide Delivery. *Non-Antigen. Regul. Target. Imaging Ther.* **2016**, *99*, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.022>.
- (120) Let’s Talk about Lipid Nanoparticles. *Nat. Rev. Mater.* **2021**, *6* (2), 99–99. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00281-4>.

- (121) Jayaraman, M.; Ansell, S. M.; Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Chen, J.; Du, X.; Butler, D.; Eltepu, L.; Matsuda, S.; Narayanannair, J. K.; Rajeev, K. G.; Hafez, I. M.; Akinc, A.; Maier, M. A.; Tracy, M. A.; Cullis, P. R.; Madden, T. D.; Manoharan, M.; Hope, M. J. Maximizing the Potency of SiRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (34), 8529–8533. <https://doi.org/10.1002/anie.201203263>.
- (122) Hassett, K. J.; Benenato, K. E.; Jacquinet, E.; Lee, A.; Woods, A.; Yuzhakov, O.; Himansu, S.; Deterling, J.; Geilich, B. M.; Ketova, T.; Mihai, C.; Lynn, A.; McFadyen, I.; Moore, M. J.; Senn, J. J.; Stanton, M. G.; Almarsson, Ö.; Ciaramella, G.; Brito, L. A. Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2019**, *15*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.013>.
- (123) Akinc, A.; Maier, M. A.; Manoharan, M.; Fitzgerald, K.; Jayaraman, M.; Barros, S.; Ansell, S.; Du, X.; Hope, M. J.; Madden, T. D.; Mui, B. L.; Semple, S. C.; Tam, Y. K.; Ciufolini, M.; Witzigmann, D.; Kulkarni, J. A.; van der Meel, R.; Cullis, P. R. The Onpatro Story and the Clinical Translation of Nanomedicines Containing Nucleic Acid-Based Drugs. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14* (12), 1084–1087. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>.
- (124) Veiga, N.; Goldsmith, M.; Granot, Y.; Rosenblum, D.; Dammes, N.; Kedmi, R.; Ramishetti, S.; Peer, D. Cell Specific Delivery of Modified mRNA Expressing Therapeutic Proteins to Leukocytes. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 4493. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06936-1>.
- (125) Sabnis, S.; Kumarasinghe, E. S.; Salerno, T.; Mihai, C.; Ketova, T.; Senn, J. J.; Lynn, A.; Bulychev, A.; McFadyen, I.; Chan, J.; Almarsson, Ö.; Stanton, M. G.; Benenato, K. E. A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-Human Primates. *Mol. Ther.* **2018**, *26* (6), 1509–1519. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.03.010>.
- (126) Maier, M. A.; Jayaraman, M.; Matsuda, S.; Liu, J.; Barros, S.; Querbes, W.; Tam, Y. K.; Ansell, S. M.; Kumar, V.; Qin, J.; Zhang, X.; Wang, Q.; Panesar, S.; Hutabarat, R.; Carioto, M.; Hettlinger, J.; Kandasamy, P.; Butler, D.; Rajeev, K. G.; Pang, B.; Charisse, K.; Fitzgerald, K.; Mui, B. L.; Du, X.; Cullis, P.; Madden, T. D.; Hope, M. J.; Manoharan, M.; Akinc, A. Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. *Mol. Ther.* **2013**, *21* (8), 1570–1578. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.124>.
- (127) Dong, Y.; Love, K. T.; Dorkin, J. R.; Sirirungruang, S.; Zhang, Y.; Chen, D.; Bogorad, R. L.; Yin, H.; Chen, Y.; Vegas, A. J.; Alabi, C. A.; Sahay, G.; Olejnik, K. T.; Wang, W.; Schroeder, A.; Lytton-Jean, A. K. R.; Siegwart, D. J.; Akinc, A.; Barnes, C.; Barros, S. A.; Carioto, M.; Fitzgerald, K.; Hettlinger, J.; Kumar, V.; Novobrantseva, T. I.; Qin, J.; Querbes, W.; Kotliansky, V.; Langer, R.; Anderson, D. G. Lipopeptide Nanoparticles for Potent and Selective SiRNA Delivery in Rodents and Nonhuman Primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (11), 3955. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322937111>.
- (128) Rybakova, Y.; Kowalski, P. S.; Huang, Y.; Gonzalez, J. T.; Heartlein, M. W.; DeRosa, F.; Delcassian, D.; Anderson, D. G. mRNA Delivery for Therapeutic Anti-HER2 Antibody Expression In Vivo. *Mol. Ther.* **2019**, *27* (8), 1415–1423. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.05.012>.
- (129) Yin, H.; Song, C.-Q.; Suresh, S.; Wu, Q.; Walsh, S.; Rhym, L. H.; Mintzer, E.; Bolukbasi, M. F.; Zhu, L. J.; Kauffman, K.; Mou, H.; Oberholzer, A.; Ding, J.; Kwan, S.-Y.; Bogorad, R. L.; Zatsepin, T.; Kotliansky, V.; Wolfe, S. A.; Xue, W.; Langer, R.; Anderson, D. G. Structure-Guided Chemical Modification of Guide RNA Enables Potent Non-Viral in Vivo Genome Editing. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35* (12), 1179–1187. <https://doi.org/10.1038/nbt.4005>.
- (130) 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.; Hansen, C. L.; Cullis, P. R. Microfluidic Synthesis of Highly Potent Limit-Size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of SiRNA. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2012**, *1*, e37. <https://doi.org/10.1038/mtna.2012.28>.
- (131) Gomes-da-Silva, L. C.; Fonseca, N. A.; Moura, V.; Pedroso de Lima, M. C.; Simões, S.; Moreira, J. N. Lipid-Based Nanoparticles for SiRNA Delivery in Cancer Therapy: Paradigms and Challenges. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (7), 1163–1171. <https://doi.org/10.1021/ar300048p>.
- (132) Kozma, G. T.; Shimizu, T.; Ishida, T.; Szebeni, J. Anti-PEG Antibodies: Properties, Formation, Testing and Role in Adverse Immune Reactions to PEGylated Nano-Biopharmaceuticals. *Adv. Liposome Res.* **2020**, *154–155*, 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.024>.
- (133) Hoang Thi, T. T.; Pilkington, E. H.; Nguyen, D. H.; Lee, J. S.; Park, K. D.; Truong, N. P. The Importance of Poly(Ethylene Glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. *Polymers* **2020**, *12* (2), 298. <https://doi.org/10.3390/polym12020298>.

- (134) Abu Lila, A. S.; Shimizu, T.; Ishida, T. 3 - PEGylation and Anti-PEG Antibodies. In *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems*; Parambath, A., Ed.; Woodhead Publishing, 2018; pp 51–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101750-0.00003-9>.
- (135) Ryals, R. C.; Patel, S.; Acosta, C.; McKinney, M.; Pennesi, M. E.; Sahay, G. The Effects of PEGylation on LNP Based mRNA Delivery to the Eye. *PLOS ONE* **2020**, *15* (10), e0241006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241006>.
- (136) Chen, S.; Tam, Y. Y. C.; Lin, P. J. C.; Leung, A. K. K.; Tam, Y. K.; Cullis, P. R. Development of Lipid Nanoparticle Formulations of SiRNA for Hepatocyte Gene Silencing Following Subcutaneous Administration. *J. Controlled Release* **2014**, *196*, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.09.025>.
- (137) He, Z.-Y.; Chu, B.-Y.; Wei, X.-W.; Li, J.; Edwards, C. K.; Song, X.-R.; He, G.; Xie, Y.-M.; Wei, Y.-Q.; Qian, Z.-Y. Recent Development of Poly(Ethylene Glycol)-Cholesterol Conjugates as Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2014**, *469* (1), 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.04.056>.
- (138) Hattori, Y.; Tamaki, K.; Sakasai, S.; Ozaki, K.; Onishi, H. Effects of PEG Anchors in PEGylated SiRNA Lipoplexes on in Vitro Gene-silencing Effects and SiRNA Biodistribution in Mice. *Mol. Med. Rep.* **2020**, *22* (5), 4183–4196. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11525>.
- (139) Joh, D. Y.; Zimmers, Z.; Avlani, M.; Heggestad, J. T.; Aydin, H. B.; Ganson, N.; Kumar, S.; Fontes, C. M.; Achar, R. K.; Hershfield, M. S.; Hucknall, A. M.; Chilkoti, A. Architectural Modification of Conformal PEG-Bottlebrush Coatings Minimizes Anti-PEG Antigenicity While Preserving Stealth Properties. *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *8* (8), 1801177. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801177>.
- (140) Gulati, N. M.; Stewart, P. L.; Steinmetz, N. F. Bioinspired Shielding Strategies for Nanoparticle Drug Delivery Applications. *Mol. Pharm.* **2018**, *15* (8), 2900–2909. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00292>.
- (141) Pitek, A. S.; Jameson, S. A.; Veliz, F. A.; Shukla, S.; Steinmetz, N. F. Serum Albumin ‘Camouflage’ of Plant Virus Based Nanoparticles Prevents Their Antibody Recognition and Enhances Pharmacokinetics. *Biomaterials* **2016**, *89*, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.032>.
- (142) Gulati, N. M.; Pitek, A. S.; Czapar, A. E.; Stewart, P. L.; Steinmetz, N. F. The in Vivo Fates of Plant Viral Nanoparticles Camouflaged Using Self-Proteins: Overcoming Immune Recognition. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (15), 2204–2216. <https://doi.org/10.1039/C7TB03106H>.
- (143) Nogueira, S. S.; Schlegel, A.; Maxeiner, K.; Weber, B.; Barz, M.; Schroer, M. A.; Blanchet, C. E.; Svergun, D. I.; Ramishetti, S.; Peer, D.; Langguth, P.; Sahin, U.; Haas, H. Polysarcosine-Functionalized Lipid Nanoparticles for Therapeutic mRNA Delivery. *ACS Appl. Nano Mater.* **2020**, *3* (11), 10634–10645. <https://doi.org/10.1021/acsnm.0c01834>.
- (144) Barz, M.; Weber, B.; Haas, H.; Heller, P.; Nogueira, S.; Schlegel, A. Patent WO2020069718A1 Rna Particles Comprising Polysarcosine. 2018.
- (145) Ou, H.; Cheng, T.; Zhang, Y.; Liu, J.; Ding, Y.; Zhen, J.; Shen, W.; Xu, Y.; Yang, W.; Niu, P.; Liu, J.; An, Y.; Liu, Y.; Shi, L. Surface-Adaptive Zwitterionic Nanoparticles for Prolonged Blood Circulation Time and Enhanced Cellular Uptake in Tumor Cells. *Acta Biomater.* **2018**, *65*, 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.10.034>.
- (146) Viger-Gravel, J.; Schantz, A.; Pinon, A. C.; Rossini, A. J.; Schantz, S.; Emsley, L. Structure of Lipid Nanoparticles Containing SiRNA or mRNA by Dynamic Nuclear Polarization-Enhanced NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122* (7), 2073–2081. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b10795>.
- (147) Cheng, X.; Lee, R. J. The Role of Helper Lipids in Lipid Nanoparticles (LNPs) Designed for Oligonucleotide Delivery. *Non-Antigen. Regul. Target. Imaging Ther.* **2016**, *99*, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.022>.
- (148) Pozzi, D.; Marchini, C.; Cardarelli, F.; Amenitsch, H.; Garulli, C.; Bifone, A.; Caracciolo, G. Transfection Efficiency Boost of Cholesterol-Containing Lipoplexes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2012**, *1818* (9), 2335–2343. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.017>.
- (149) Tenchov, B. G.; MacDonald, R. C.; Siegel, D. P. Cubic Phases in Phosphatidylcholine-Cholesterol Mixtures: Cholesterol as Membrane “Fusogen.” *Biophys. J.* **2006**, *91* (7), 2508–2516. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.083766>.
- (150) Varsano, N.; Fargion, I.; Wolf, S. G.; Leiserowitz, L.; Addadi, L. Formation of 3D Cholesterol Crystals from 2D Nucleation Sites in Lipid Bilayer Membranes: Implications for Atherosclerosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (4), 1601–1607. <https://doi.org/10.1021/ja511642t>.
- (151) Patel, S.; Ashwanikumar, N.; Robinson, E.; Xia, Y.; Mihai, C.; Griffith, J. P.; Hou, S.; Esposito, A. A.; Ketova, T.; Welsher, K.; Joyal, J. L.; Almarsson, Ö.; Sahay, G. Naturally-Occurring Cholesterol Analogues

- in Lipid Nanoparticles Induce Polymorphic Shape and Enhance Intracellular Delivery of mRNA. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 983. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14527-2>.
- (152) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13* (1), 238-277. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6).
- (153) Pons, M.; Foradada, M.; Estelrich, J. Liposomes Obtained by the Ethanol Injection Method. *Int. J. Pharm.* **1993**, *95* (1), 51–56. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90389-W](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90389-W).
- (154) Batzri, S.; Korn, E. D. Single Bilayer Liposomes Prepared without Sonication. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1973**, *298* (4), 1015–1019. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90408-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90408-2).
- (155) Buschmann, M. D.; Carrasco, M. J.; Alishetty, S.; Paige, M.; Alameh, M. G.; Weissman, D. Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines. *Vaccines* **2021**, *9* (1), 65. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010065>.
- (156) Abrams, M. T.; Koser, M. L.; Seitzer, J.; Williams, S. C.; DiPietro, M. A.; Wang, W.; Shaw, A. W.; Mao, X.; Jadhav, V.; Davide, J. P.; Burke, P. A.; Sachs, A. B.; Stirdivant, S. M.; Sepp-Lorenzino, L. Evaluation of Efficacy, Biodistribution, and Inflammation for a Potent siRNA Nanoparticle: Effect of Dexamethasone Co-Treatment. *Mol. Ther.* **2010**, *18* (1), 171–180. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.208>.
- (157) Hirota, S.; de Ilarduya, C. T.; Barron, L. G.; Szoka, F. C. Simple Mixing Device to Reproducibly Prepare Cationic Lipid-DNA Complexes (Lipoplexes). *BioTechniques* **1999**, *27* (2), 286–290. <https://doi.org/10.2144/99272bm16>.
- (158) Evers, M. J. W.; Kulkarni, J. A.; van der Meel, R.; Cullis, P. R.; Vader, P.; Schifflers, R. M. State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Small Methods* **2018**, *2* (9), 1700375. <https://doi.org/10.1002/smt.201700375>.
- (159) Jahn, A.; Vreeland, W. N.; Gaitan, M.; Locascio, L. E. Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (9), 2674–2675. <https://doi.org/10.1021/ja0318030>.
- (160) Lu, M.; Ozcelik, A.; Grigsby, C. L.; Zhao, Y.; Guo, F.; Leong, K. W.; Huang, T. J. Microfluidic Hydrodynamic Focusing for Synthesis of Nanomaterials. *Nano Today* **2016**, *11* (6), 778–792. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.10.006>.
- (161) Zhigaltsev, I. V.; Belliveau, N.; Hafez, I.; Leung, A. K. K.; Huft, J.; Hansen, C.; Cullis, P. R. Bottom-Up Design and Synthesis of Limit Size Lipid Nanoparticle Systems with Aqueous and Triglyceride Cores Using Millisecond Microfluidic Mixing. *Langmuir* **2012**, *28* (7), 3633–3640. <https://doi.org/10.1021/la204833h>.
- (162) Maeki, M.; Kimura, N.; Sato, Y.; Harashima, H.; Tokeshi, M. Advances in Microfluidics for Lipid Nanoparticles and Extracellular Vesicles and Applications in Drug Delivery Systems. *Microfluid. Devices Drug Deliv. Syst.* **2018**, *128*, 84–100. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.008>.
- (163) Lou, G.; Anderluzzi, G.; Woods, S.; Roberts, C. W.; Perrie, Y. A Novel Microfluidic-Based Approach to Formulate Size-Tuneable Large Unilamellar Cationic Liposomes: Formulation, Cellular Uptake and Biodistribution Investigations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *143*, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.08.013>.
- (164) Roces, C. B.; Lou, G.; Jain, N.; Abraham, S.; Thomas, A.; Halbert, G. W.; Perrie, Y. Manufacturing Considerations for the Development of Lipid Nanoparticles Using Microfluidics. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111095>.
- (165) Radhakrishnan, A.; McConnell, H. M. Thermal Dissociation of Condensed Complexes of Cholesterol and Phospholipid. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (18), 4755–4762. <https://doi.org/10.1021/jp013932d>.
- (166) Zhao, X.; Liu, Y.; Song, J.; Yong, H.; Li, L.; Shen, Y.; Hubbard, R. D.; Kohlbrenner, W. E.; Zhou, J.; Cluff, K. D.; Skoug, J. W. Cationic Lipids Percentage and Processing Temperature Are Critical in Designing siRNA Lipid Nanoparticles. *J. Drug Target.* **2012**, *20* (3), 281–289. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.645160>.
- (167) Jahn, A.; Stavits, S. M.; Hong, J. S.; Vreeland, W. N.; DeVoe, D. L.; Gaitan, M. Microfluidic Mixing and the Formation of Nanoscale Lipid Vesicles. *ACS Nano* **2010**, *4* (4), 2077–2087. <https://doi.org/10.1021/nn901676x>.
- (168) Sahay, G.; Querbes, W.; Alabi, C.; Eltoukhy, A.; Sarkar, S.; Zurenko, C.; Karagiannis, E.; Love, K.; Chen, D.; Zoncu, R.; Buganim, Y.; Schroeder, A.; Langer, R.; Anderson, D. G. Efficiency of siRNA Delivery by Lipid Nanoparticles Is Limited by Endocytic Recycling. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31* (7), 653–658. <https://doi.org/10.1038/nbt.2614>.
- (169) Gilleron, J.; Querbes, W.; Zeigerer, A.; Borodovsky, A.; Marsico, G.; Schubert, U.; Manygoats, K.; Seifert, S.; Andree, C.; Stöter, M.; Epstein-Barash, H.; Zhang, L.; Kotliansky, V.; Fitzgerald, K.; Fava, E.; Bickle, M.; Kalaidzidis, Y.; Akinc, A.; Maier, M.; Zerial, M. Image-Based Analysis of Lipid Nanoparticle-Mediated

- SiRNA Delivery, Intracellular Trafficking and Endosomal Escape. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31* (7), 638–646. <https://doi.org/10.1038/nbt.2612>.
- (170) Let's Talk about Lipid Nanoparticles. *Nat. Rev. Mater.* **2021**, *6* (2), 99–99. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00281-4>.
- (171) Maugeri, M.; Nawaz, M.; Papadimitriou, A.; Angerfors, A.; Camponeschi, A.; Na, M.; Hölttä, M.; Skantze, P.; Johansson, S.; Sundqvist, M.; Lindquist, J.; Kjellman, T.; Mårtensson, I.-L.; Jin, T.; Sunnerhagen, P.; Östman, S.; Lindfors, L.; Valadi, H. Linkage between Endosomal Escape of LNP-MRNA and Loading into EVs for Transport to Other Cells. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 4333. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12275-6>.
- (172) Nguyen, J.; Szoka, F. C. Nucleic Acid Delivery: The Missing Pieces of the Puzzle? *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (7), 1153–1162. <https://doi.org/10.1021/ar3000162>.
- (173) Kim, J.; Narayana, A.; Patel, S.; Sahay, G. Advances in Intracellular Delivery through Supramolecular Self-Assembly of Oligonucleotides and Peptides. *Theranostics* **2019**, *9* (11), 3191–3212. <https://doi.org/10.7150/thno.33921>.
- (174) Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanoparticle-Mediated Cellular Response Is Size-Dependent. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3* (3), 145–150. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>.
- (175) Hoshyar, N.; Gray, S.; Han, H.; Bao, G. The Effect of Nanoparticle Size on in Vivo Pharmacokinetics and Cellular Interaction. *Nanomed.* **2016**, *11* (6), 673–692. <https://doi.org/10.2217/nnm.16.5>.
- (176) Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated Portals of Entry into the Cell. *Nature* **2003**, *422* (6927), 37–44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>.
- (177) Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. Size-Dependent Internalization of Particles via the Pathways of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis. *Biochem. J.* **2004**, *377* (Pt 1), 159–169. <https://doi.org/10.1042/BJ20031253>.
- (178) Petros, R. A.; DeSimone, J. M. Strategies in the Design of Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (8), 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
- (179) Andar, A. U.; Hood, R. R.; Vreeland, W. N.; DeVoe, D. L.; Swaan, P. W. Microfluidic Preparation of Liposomes to Determine Particle Size Influence on Cellular Uptake Mechanisms. *Pharm. Res.* **2014**, *31* (2), 401–413. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1171-8>.
- (180) Chauhan, V. P.; Jain, R. K. Strategies for Advancing Cancer Nanomedicine. *Nat. Mater.* **2013**, *12* (11), 958–962. <https://doi.org/10.1038/nmat3792>.
- (181) Le-Vinh, B.; Steinbring, C.; Wibel, R.; Friedl, J. D.; Bernkop-Schnürch, A. Size Shifting of Solid Lipid Nanoparticle System Triggered by Alkaline Phosphatase for Site Specific Mucosal Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**, *163*, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.03.012>.
- (182) Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.
- (183) Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33* (9), 941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>.
- (184) Trevaskis, N. L.; Kaminskis, L. M.; Porter, C. J. H. From Sewer to Saviour — Targeting the Lymphatic System to Promote Drug Exposure and Activity. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14* (11), 781–803. <https://doi.org/10.1038/nrd4608>.
- (185) Jiang, H.; Wang, Q.; Sun, X. Lymph Node Targeting Strategies to Improve Vaccination Efficacy. *28th KAST Int. Symp. Young Sci. Drug Deliv. - Redirecting Res. Field Dec. 7-8 2016 Seoul Korea* **2017**, *267*, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.009>.
- (186) Schudel, A.; Francis, D. M.; Thomas, S. N. Material Design for Lymph Node Drug Delivery. *Nat. Rev. Mater.* **2019**, *4* (6), 415–428. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0110-7>.
- (187) Osaki, F.; Kanamori, T.; Sando, S.; Sera, T.; Aoyama, Y. A Quantum Dot Conjugated Sugar Ball and Its Cellular Uptake. On the Size Effects of Endocytosis in the Subviral Region. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (21), 6520–6521. <https://doi.org/10.1021/ja048792a>.
- (188) Zhang, S.; Li, J.; Lykotrafitis, G.; Bao, G.; Suresh, S. Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (4), 419–424. <https://doi.org/10.1002/adma.200801393>.
- (189) Gao, H.; Shi, W.; Freund, L. B. Mechanics of Receptor-Mediated Endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (27), 9469. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503879102>.
- (190) Yuan, H.; Li, J.; Bao, G.; Zhang, S. Variable Nanoparticle-Cell Adhesion Strength Regulates Cellular Uptake. *Phys Rev Lett* **2010**, *105* (13), 138101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.105.138101>.

- (191) Hassett, K. J.; Higgins, J.; Woods, A.; Levy, B.; Xia, Y.; Hsiao, C. J.; Acosta, E.; Almarsson, Ö.; Moore, M. J.; Brito, L. A. Impact of Lipid Nanoparticle Size on mRNA Vaccine Immunogenicity. *J. Controlled Release* **2021**, *335*, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.021>.
- (192) Bao, Y.; Jin, Y.; Chivukula, P.; Zhang, J.; Liu, Y.; Liu, J.; Clamme, J.-P.; Mahato, R. I.; Ng, D.; Ying, W.; Wang, Y.; Yu, L. Effect of PEGylation on Biodistribution and Gene Silencing of SiRNA/Lipid Nanoparticle Complexes. *Pharm. Res.* **2013**, *30* (2), 342–351. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0874-6>.
- (193) Miao, L.; Lin, J.; Huang, Y.; Li, L.; Delcassian, D.; Ge, Y.; Shi, Y.; Anderson, D. G. Synergistic Lipid Compositions for Albumin Receptor Mediated Delivery of mRNA to the Liver. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 2424. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16248-y>.
- (194) Wang, W.; Huang, Z.; Li, Y.; Wang, W.; Shi, J.; Fu, F.; Huang, Y.; Pan, X.; Wu, C. Impact of Particle Size and PH on Protein Corona Formation of Solid Lipid Nanoparticles: A Proof-of-Concept Study. *Acta Pharm. Sin. B* **2021**, *11* (4), 1030–1046. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.10.023>.
- (195) Chauhan, H.; Mohapatra, S.; Munt, D. J.; Chandratre, S.; Dash, A. Physical-Chemical Characterization and Formulation Considerations for Solid Lipid Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* **2016**, *17* (3), 640–651. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0394-x>.
- (196) Zhao, P.; Hou, X.; Yan, J.; Du, S.; Xue, Y.; Li, W.; Xiang, G.; Dong, Y. Long-Term Storage of Lipid-like Nanoparticles for mRNA Delivery. *Bioact. Mater.* **2020**, *5* (2), 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.03.001>.
- (197) Fan, Y.; Marioli, M.; Zhang, K. Analytical Characterization of Liposomes and Other Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *192*, 113642. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>.
- (198) Franzen, U.; Østergaard, J. Physico-Chemical Characterization of Liposomes and Drug Substance–Liposome Interactions in Pharmaceuticals Using Capillary Electrophoresis and Electrokinetic Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1267*, 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.018>.
- (199) Huang, X.; Chau, Y. Investigating Impacts of Surface Charge on Intraocular Distribution of Intravitreal Lipid Nanoparticles. *Exp. Eye Res.* **2019**, *186*, 107711. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107711>.
- (200) Kim, H.; Robinson, S. B.; Csaky, K. G. Investigating the Movement of Intravitreal Human Serum Albumin Nanoparticles in the Vitreous and Retina. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (2), 329–337. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9745-6>.
- (201) Gan, L.; Wang, J.; Zhao, Y.; Chen, D.; Zhu, C.; Liu, J.; Gan, Y. Hyaluronan-Modified Core–Shell Liponanoparticles Targeting CD44-Positive Retinal Pigment Epithelium Cells via Intravitreal Injection. *Biomaterials* **2013**, *34* (24), 5978–5987. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.035>.
- (202) Kranz, L. M.; Diken, M.; Haas, H.; Kreiter, S.; Loquai, C.; Reuter, K. C.; Meng, M.; Fritz, D.; Vascotto, F.; Hefesha, H.; Grunwitz, C.; Vormehr, M.; Hüsemann, Y.; Selmi, A.; Kuhn, A. N.; Buck, J.; Derhovanesian, E.; Rae, R.; Attig, S.; Diekmann, J.; Jabulowsky, R. A.; Heesch, S.; Hassel, J.; Langguth, P.; Grabbe, S.; Huber, C.; Türeci, Ö.; Sahin, U. Systemic RNA Delivery to Dendritic Cells Exploits Antiviral Defence for Cancer Immunotherapy. *Nature* **2016**, *534* (7607), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature18300>.
- (203) Cheng, Q.; Wei, T.; Farbiak, L.; Johnson, L. T.; Dilliard, S. A.; Siegwart, D. J. Selective Organ Targeting (SORT) Nanoparticles for Tissue-Specific mRNA Delivery and CRISPR–Cas Gene Editing. *Nat. Nanotechnol.* **2020**, *15* (4), 313–320. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0669-6>.
- (204) Champion, J. A.; Katare, Y. K.; Mitragotri, S. Particle Shape: A New Design Parameter for Micro- and Nanoscale Drug Delivery Carriers. *Fourth Int. Nanomedicine Drug Deliv. Symp.* **2007**, *121* (1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.03.022>.
- (205) Decuzzi, P.; Ferrari, M. The Receptor-Mediated Endocytosis of Nonspherical Particles. *Biophys. J.* **2008**, *94* (10), 3790–3797. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120238>.
- (206) Decuzzi, P.; Ferrari, M. The Adhesive Strength of Non-Spherical Particles Mediated by Specific Interactions. *Biomaterials* **2006**, *27* (30), 5307–5314. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.05.024>.
- (207) Mitragotri, S.; Lahann, J. Physical Approaches to Biomaterial Design. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (1), 15–23. <https://doi.org/10.1038/nmat2344>.
- (208) Muro, S.; Garnacho, C.; Champion, J. A.; Leferovich, J.; Gajewski, C.; Schuchman, E. H.; Mitragotri, S.; Muzykantov, V. R. Control of Endothelial Targeting and Intracellular Delivery of Therapeutic Enzymes by Modulating the Size and Shape of ICAM-1-Targeted Carriers. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2008**, *16* (8), 1450–1458. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.127>.
- (209) Champion, J. A.; Mitragotri, S. Role of Target Geometry in Phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (13), 4930–4934. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600997103>.

- (210) Cao, S.; Liu, X.; Li, X.; Lin, C.; Zhang, W.; Tan, C. H.; Liang, S.; Luo, B.; Xu, X.; Saw, P. E. Shape Matters: Comprehensive Analysis of Star-Shaped Lipid Nanoparticles. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 539. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00539>.
- (211) Suk, J. S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L. M. PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery. *Non-Antigen. Regul. Target. Imaging Ther.* **2016**, *99*, 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>.
- (212) Fan, Y.; Marioli, M.; Zhang, K. Analytical Characterization of Liposomes and Other Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *192*, 113642. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>.
- (213) U.S. FDA. Drug Products, Including Biological Products, That Contain Nanomaterials-Guidance for Industry. 2017.
- (214) Crawford, R.; Dogdas, B.; Keough, E.; Haas, R. M.; Wepukhulu, W.; Krotzer, S.; Burke, P. A.; Sepp-Lorenzino, L.; Bagchi, A.; Howell, B. J. Analysis of Lipid Nanoparticles by Cryo-EM for Characterizing siRNA Delivery Vehicles. *Int. J. Pharm.* **2011**, *403* (1), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.025>.
- (215) Grabielle-Madelmont, C.; Lesieur, S.; Ollivon, M. Characterization of Loaded Liposomes by Size Exclusion Chromatography. *Size-Exclusion Chromatogr.* **2003**, *56* (1), 189–217. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(03\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(03)00059-9).
- (216) Zhang, J.; Pei, Y.; Zhang, H.; Wang, L.; Arrington, L.; Zhang, Y.; Glass, A.; Leone, A. M. Assessing the Heterogeneity Level in Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery: Size-Based Separation, Compositional Heterogeneity, and Impact on Bioperformance. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (1), 397–405. <https://doi.org/10.1021/mp3005337>.
- (217) Zhang, J.; Haas, R. M.; Leone, A. M. Polydispersity Characterization of Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery Using Multiple Detection Size-Exclusion Chromatography. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (14), 6088–6096. <https://doi.org/10.1021/ac3007768>.
- (218) Lesieur, S.; Grabielle-Madelmont, C.; Paternostre, M.-T.; Ollivon, M. Size Analysis and Stability Study of Lipid Vesicles by High-Performance Gel Exclusion Chromatography, Turbidity, and Dynamic Light Scattering. *Anal. Biochem.* **1991**, *192* (2), 334–343. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90545-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90545-5).
- (219) Fan, Y.; Sahdev, P.; Ochyl, L. J.; J. Akerberg, J.; Moon, J. J. Cationic Liposome–Hyaluronic Acid Hybrid Nanoparticles for Intranasal Vaccination with Subunit Antigens. *12th Int. Nanomedicine Drug Deliv. Symp. NanoDDS 2014* **2015**, *208*, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.010>.
- (220) Filipe, V.; Hawe, A.; Jiskoot, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharm. Res.* **2010**, *27* (5), 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>.
- (221) Mildner, R.; Hak, S.; Parot, J.; Hyldbakk, A.; Borgos, S. E.; Some, D.; Johann, C.; Caputo, F. Improved Multidetector Asymmetrical-Flow Field-Flow Fractionation Method for Particle Sizing and Concentration Measurements of Lipid-Based Nanocarriers for RNA Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**, *163*, 252–265. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.03.004>.
- (222) Franzen, U.; Vermehren, C.; Jensen, H.; Østergaard, J. Physicochemical Characterization of a PEGylated Liposomal Drug Formulation Using Capillary Electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* **2011**, *32* (6-7), 738–748. <https://doi.org/10.1002/elps.201000552>.
- (223) Chamieh, J.; Leclercq, L.; Martin, M.; Slaoui, S.; Jensen, H.; Østergaard, J.; Cottet, H. Limits in Size of Taylor Dispersion Analysis: Representation of the Different Hydrodynamic Regimes and Application to the Size-Characterization of Cubosomes. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (24), 13487–13493. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03806>.
- (224) Chamieh, J.; Merdassi, H.; Rossi, J.-C.; Jannin, V.; Demarne, F.; Cottet, H. Size Characterization of Lipid-Based Self-Emulsifying Pharmaceutical Excipients during Lipolysis Using Taylor Dispersion Analysis with Fluorescence Detection. *Int. J. Pharm.* **2018**, *537* (1), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.032>.
- (225) Sze, A.; Erickson, D.; Ren, L.; Li, D. Zeta-Potential Measurement Using the Smoluchowski Equation and the Slope of the Current–Time Relationship in Electroosmotic Flow. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *261* (2), 402–410. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00142-5).
- (226) Makino, K.; Yamada, T.; Kimura, M.; Oka, T.; Ohshima, H.; Kondo, T. Temperature- and Ionic Strength-Induced Conformational Changes in the Lipid Head Group Region of Liposomes as Suggested by Zeta Potential Data. *Biophys. Chem.* **1991**, *41* (2), 175–183. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(91\)80017-L](https://doi.org/10.1016/0301-4622(91)80017-L).

- (227) Fatouros, D. G.; Klepetsanis, P.; Ioannou, P. V.; Antimisiaris, S. G. The Effect of PH on the Electrophoretic Behaviour of a New Class of Liposomes: Arsonoliposomes. *Int. J. Pharm.* **2005**, *288* (1), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.09.016>.
- (228) Smith, M. C.; Crist, R. M.; Clogston, J. D.; McNeil, S. E. Zeta Potential: A Case Study of Cationic, Anionic, and Neutral Liposomes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (24), 5779–5787. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0527-z>.
- (229) Kumar, V.; Qin, J.; Jiang, Y.; Duncan, R. G.; Brigham, B.; Fishman, S.; Nair, J. K.; Akinc, A.; Barros, S. A.; Kasperkovitz, P. V. Shielding of Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery: Impact on Physicochemical Properties, Cytokine Induction, and Efficacy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2014**, *3* (11), e210–e210. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.61>.
- (230) Fernández, M. S. Determination of Surface Potential in Liposomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1981**, *646* (1), 23–26. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90266-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90266-2).
- (231) Liu, Y.; Yan, E. C. Y.; Zhao, X.; Eisenthal, K. B. Surface Potential of Charged Liposomes Determined by Second Harmonic Generation. *Langmuir* **2001**, *17* (7), 2063–2066. <https://doi.org/10.1021/la0011634>.
- (232) Kuntsche, J.; Horst, J. C.; Bunjes, H. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) for Studying the Morphology of Colloidal Drug Delivery Systems. *Adv. Charact. Tech.* **2011**, *417* (1), 120–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.001>.
- (233) Eygeris, Y.; Patel, S.; Jozic, A.; Sahay, G. Deconvoluting Lipid Nanoparticle Structure for Messenger RNA Delivery. *Nano Lett.* **2020**, *20* (6), 4543–4549. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386>.
- (234) Kulkarni, J. A.; Darjuan, M. M.; Mercer, J. E.; Chen, S.; van der Meel, R.; Thewalt, J. L.; Tam, Y. Y. C.; Cullis, P. R. On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA. *ACS Nano* **2018**, *12* (5), 4787–4795. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01516>.
- (235) Spyratou, E.; Mourelatou, E. A.; Makropoulou, M.; Demetzos, C. Atomic Force Microscopy: A Tool to Study the Structure, Dynamics and Stability of Liposomal Drug Delivery Systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, *6* (3), 305–317. <https://doi.org/10.1517/17425240902828312>.
- (236) Benne, N.; Lebourg, R. J. T.; Glandrup, M.; van Duijn, J.; Lozano Vigario, F.; Neustrup, M. A.; Romeijn, S.; Galli, F.; Kuiper, J.; Jiskoot, W.; Slütter, B. Atomic Force Microscopy Measurements of Anionic Liposomes Reveal the Effect of Liposomal Rigidity on Antigen-Specific Regulatory T Cell Responses. *J. Controlled Release* **2020**, *318*, 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.003>.
- (237) Jones, L. J.; Yue, S. T.; Cheung, C.-Y.; Singer, V. L. RNA Quantitation by Fluorescence-Based Solution Assay: RiboGreen Reagent Characterization. *Anal. Biochem.* **1998**, *265* (2), 368–374. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2914>.
- (238) Itoh, N.; Kimoto, A.; Yamamoto, E.; Higashi, T.; Santa, T.; Funatsu, T.; Kato, M. High Performance Liquid Chromatography Analysis of 100-Nm Liposomal Nanoparticles Using Polymer-Coated, Silica Monolithic Columns with Aqueous Mobile Phase. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1484*, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.080>.
- (239) Itoh, N.; Santa, T.; Kato, M. Rapid Evaluation of the Quantity of Drugs Encapsulated within Nanoparticles by High-Performance Liquid Chromatography in a Monolithic Silica Column. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (21), 6429–6434. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8805-0>.
- (240) Yamamoto, E.; Miyazaki, S.; Aoyama, C.; Kato, M. A Simple and Rapid Measurement Method of Encapsulation Efficiency of Doxorubicin Loaded Liposomes by Direct Injection of the Liposomal Suspension to Liquid Chromatography. *Int. J. Pharm.* **2018**, *536* (1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.035>.
- (241) Franzen, U.; Nguyen, T. T. N.; Vermehren, C.; Gammelgaard, B.; Østergaard, J. Characterization of a Liposome-Based Formulation of Oxaliplatin Using Capillary Electrophoresis: Encapsulation and Leakage. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *55* (1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.12.037>.
- (242) Nguyen, T. T. N.; Østergaard, J.; Stürup, S.; Gammelgaard, B. Determination of Platinum Drug Release and Liposome Stability in Human Plasma by CE-ICP-MS. *Int. J. Pharm.* **2013**, *449* (1), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.055>.
- (243) Ansar, S. M.; Jiang, W.; Mudalige, T. Direct Quantification of Unencapsulated Doxorubicin in Liposomal Doxorubicin Formulations Using Capillary Electrophoresis. *Int. J. Pharm.* **2018**, *549* (1), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.019>.
- (244) Chamieh, J.; Domènech Tarrat, A.; Doudou, C.; Jannin, V.; Demarne, F.; Cottet, H. Peptide Release from SEDDS Containing Hydrophobic Ion Pair Therapeutic Peptides Measured by Taylor Dispersion Analysis. *Int. J. Pharm.* **2019**, *559*, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.039>.

Chapitre I. Etude bibliographique

- (245) Mehn, D.; Capomaccio, R.; Gioria, S.; Gilliland, D.; Calzolari, L. Analytical Ultracentrifugation for Measuring Drug Distribution of Doxorubicin Loaded Liposomes in Human Serum. *J. Nanoparticle Res.* **2020**, *22* (6), 158. <https://doi.org/10.1007/s11051-020-04843-5>.
- (246) Henrickson, A.; Kulkarni, J. A.; Zaifman, J.; Gorbet, G. E.; Cullis, P. R.; Demeler, B. Density Matching Multi-Wavelength Analytical Ultracentrifugation to Measure Drug Loading of Lipid Nanoparticle Formulations. *ACS Nano* **2021**, *15* (3), 5068–5076. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c10069>.
- (247) FDA. Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride. **2018**, 5.
- (248) Xu, X.; Khan, M. A.; Burgess, D. J. A Two-Stage Reverse Dialysis in Vitro Dissolution Testing Method for Passive Targeted Liposomes. *Int. J. Pharm.* **2012**, *426* (1), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.030>.
- (249) Hitzman, C. J.; Wiedmann, T. S.; Dai, H.; Elmquist, W. F. Measurement of Drug Release from Microcarriers by Microdialysis. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94* (7), 1456–1466. <https://doi.org/10.1002/jps.20349>.
- (250) Michalowski, C. B.; Guterres, S. S.; Dalla Costa, T. Microdialysis for Evaluating the Entrapment and Release of a Lipophilic Drug from Nanoparticles. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *35* (5), 1093–1100. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.04.002>.
- (251) Roesler, E.; Weiss, R.; Weinberger, E. E.; Fruehwirth, A.; Stoecklinger, A.; Mostböck, S.; Ferreira, F.; Thalhamer, J.; Scheibelhofer, S. Immunize and Disappear—Safety-Optimized mRNA Vaccination with a Panel of 29 Allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *124* (5), 1070-1077.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.06.036>.
- (252) Weiss, R.; Scheibelhofer, S.; Roesler, E.; Ferreira, F.; Thalhamer, J. Prophylactic mRNA Vaccination against Allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *10* (6).
- (253) Miao, L.; Zhang, Y.; Huang, L. mRNA Vaccine for Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer* **2021**, *20* (1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01335-5>.
- (254) 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.; Griese, M.; Bittmann, I.; Handgretinger, R.; Hartl, D.; Rosenecker, J.; Rudolph, C. Expression of Therapeutic Proteins after Delivery of Chemically Modified mRNA in Mice. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29* (2), 154–157. <https://doi.org/10.1038/nbt.1733>.
- (255) Jo, J.; Gao, J.-Q.; Tabata, Y. Biomaterial-Based Delivery Systems of Nucleic Acid for Regenerative Research and Regenerative Therapy. *Regen. Ther.* **2019**, *11*, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.06.007>.
- (256) Zangi, L.; Lui, K. O.; von Gise, A.; Ma, Q.; Ebina, W.; Ptaszek, L. M.; Später, D.; Xu, H.; Tabebordbar, M.; Gorbатов, R.; Sena, B.; Nahrendorf, M.; Briscoe, D. M.; Li, R. A.; Wagers, A. J.; Rossi, D. J.; Pu, W. T.; Chien, K. R. Modified mRNA Directs the Fate of Heart Progenitor Cells and Induces Vascular Regeneration after Myocardial Infarction. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31* (10), 898–907. <https://doi.org/10.1038/nbt.2682>.
- (257) U.S. FDA. Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. 2018.
- (258) EU Official Control Authority. Official Control Authority Batch Release Of Pandemic COVID-19 Vaccine (MRNA). 2021.
- (259) World Health Organization. Evaluation of the Quality, Safety and Efficacy of Messenger RNA Vaccines for the Prevention of Infectious Diseases: Regulatory Considerations. 2021.

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par analyse frontale continue en électrophorèse capillaire (FACCE)

La première partie expérimentale de ce travail de thèse a consisté à développer une méthodologie d'analyse frontale continue en électrophorèse capillaire (FACCE) pour l'étude des interactions entre un adjuvant de type polyacrylate de sodium anionique et différentes protéines cationiques incluant un antigène en développement pour le traitement du staphylocoque doré. Les polymères d'acide acrylique ont déjà montré leur efficacité comme adjuvants dans plusieurs vaccins vétérinaires¹ et sont d'un grand intérêt pour le développement de nouveaux vaccins humains.² L'objectif de ce premier chapitre expérimental est de développer une nouvelle méthode d'analyse permettant d'étudier les interactions entre ce type d'adjuvant et des antigènes, et de pouvoir suivre l'impact de paramètres physicochimiques de la sur les interactions. La FACCE s'est déjà avérée prometteuse pour l'étude de différents systèmes de polyélectrolytes^{3,4}, mais n'a, à notre connaissance, jamais été appliquée à l'étude d'un couple antigène-adjuvant.

- (1) Charentantanakul, W. Adjuvants for Swine Vaccines: Mechanisms of Actions and Adjuvant Effects. *Vaccine* **2020**, *38* (43), 6659–6681. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.054>.
- (2) Cotte, J.-F.; Bouadam, A.; Sordoillet, A.; Jaudinaud, I.; Chambon, V.; Talaga, P. Determination of Molecular Size Parameters and Quantification of Polyacrylic Acid by High Performance Size-Exclusion Chromatography with Triple Detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (8), 2083–2092. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0155-z>.
- (3) Lounis, F. M.; Chamieh, J.; Leclercq, L.; Gonzalez, P.; Cottet, H. Modelling and Predicting the Interactions between Oppositely and Variously Charged Polyelectrolytes by Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis. *Soft Matter* **2016**, *12* (48), 9728–9737. <https://doi.org/10.1039/C6SM01811D>.
- (4) Sisavath, N.; Leclercq, L.; Le Saux, T.; Oukacine, F.; Cottet, H. Study of Interactions between Oppositely Charged Dendrigrift Poly-L-Lysine and Human Serum Albumin by Continuous Frontal Analysis Capillary Electrophoresis and Fluorescence Spectroscopy. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1289*, 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.016>.

Article 1. Study of interactions between antigens and polymeric adjuvants in vaccines by frontal analysis continuous capillary electrophoresis

Camille Malburet^{1,2}, Laurent Leclercq¹, Jean-François Cotte², Jérôme Thiebaud², Hervé Cottet^{1*}

¹ IBMM, University of Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

² Sanofi Pasteur, Analytical Sciences, 1541 avenue Marcel Mérieux, 69280, Marcy l'Etoile, France.

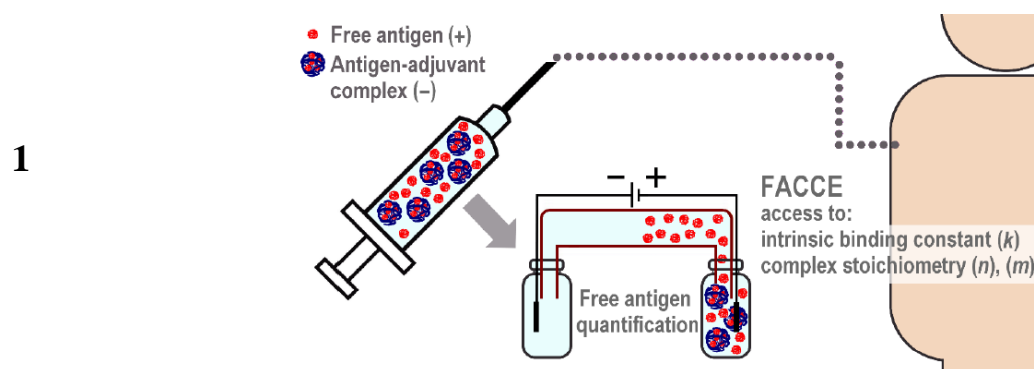
* Corresponding author: herve.cottet@umontpellier.fr

Biomacromolecules **2020**, 21, 8, 3364–3373

Abstract

Vaccine adjuvants are used to enhance the immune response induced by antigens that have insufficient immunostimulatory capabilities. The present work aims at developing frontal analysis continuous capillary electrophoresis (FACCE) methodology for the study of antigen-adjuvant interactions in vaccine products. After method optimization using three cationic model proteins, namely lysozyme, cytochrome C and ribonuclease A, FACCE was successfully implemented to quantify the free antigen and thus to determine the interaction parameters (stoichiometry and binding constant) between an anionic polymeric adjuvant (polyacrylic acid, SPA09), and a cationic vaccine antigen in development for the treatment of *Staphylococcus aureus*. The influence of the ionic strength of the medium on the interactions was investigated. A strong dependence of the binding parameters with the ionic strength was observed. The concentration of the polymeric adjuvant was also found to significantly modify the ionic strength of the formulation, the extent of which could be estimated and corrected.

Graphical abstract



Introduction

Vaccination combined with clean water access, improved hygiene practices and antibiotics allowed to drastically reduce mortality from infectious diseases during the last century¹. A report from the World Health Organization states that vaccines saves up to 2-3 million lives per year². In addition to preventing deaths, vaccines also massively reduce diseases and disabilities.

Despite huge advancement in vaccine development, many challenges remain, and the list of unmet medical needs is still long³. Moreover, epidemics caused by viral infections are emerging almost every year. Those outbreaks, characterized by their unpredictability, high morbidity, exponential spread, and significant social impact require a rapid development of new vaccines^{4,5}. In addition, the increasing spread of antibiotic resistance in bacterial pathogens is also a growing threat to public health^{6,7}. Thus, vaccines against antibiotic-resistant bacteria are being developed^{8,9}. Furthermore, vaccines have today the potential to prevent or treat not only communicable diseases, but also diseases considered noncommunicable such as cancer and neurodegenerative disorders¹⁰⁻¹⁴. Put together, some 240 vaccine candidates are currently under development¹⁵.

Adjuvants have a key role to play in the new vaccine developments, they are used to enhance and modulate the immunogenicity of antigens that have insufficient immunostimulatory capabilities^{16,17}. The strength of the antigen-adjuvant interaction has been shown to be able to increase or to decrease vaccines immunogenicity¹⁸⁻²⁰. In that respect, Hansen B. et al. showed that the antibody production can be reduced when the antigen is too strongly adsorbed on the adjuvant²¹⁻²³. Thus, the development of new analytical methods to characterize the antigen-adjuvant interactions is crucial to better understand the mode of action of adjuvants and their impact

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

on the immunogenicity^{24,25}. A better understanding of these interactions will allow to optimize vaccine efficacy and stability²⁶.

Among existing adjuvants, polymers including acrylic acid units have been used since the 1970s^{27,28}. Since then, many studies have confirmed the adjuvant activity of polyacrylic acid polymers and their derivatives²⁹⁻³³. Cross-linked polyacrylic acid polymers sold under the name Carbopol® are already used as effective adjuvants in several veterinary vaccines³⁴⁻³⁶. Polyacrylic acid polymers are also of great interest for the development of new human vaccines³⁷⁻³⁹. Indeed, the search for new vaccines antigens and more effective vaccines requires the search for new potent adjuvants^{40,41}. SPA09, a purified linear polyacrylic acid polymer, has in particular been identified as a new promising human adjuvant^{42,43}.

Some analytical techniques are already commonly used to study antigen-adjuvant interactions: Isothermal Titration Calorimetry (ITC) is based on the measurement of the heat released or absorbed during a binding event between two entities ITC gives access to the enthalpy changes (ΔH), the entropy change (ΔS), the binding site constant (k) and the interaction stoichiometry (n)⁴⁴⁻⁴⁶. Differential Scanning Calorimetry (DSC) gives access to the melting temperature (T_m) by measuring the heat variation associated with the thermal denaturation of a molecule or a complex when it is subjected to a temperature ramp. Thus, DSC can give information on the presence or absence of interaction as well as on the structure and stability of antigen-adjuvant complexes^{47,48}. More recently, Surface Plasmon Resonance (SPR) and Bio Layer Interferometry (BLI) have become methods of great interest for interactions studies. SPR and BLI measure the changes in refractive index and the shift of the interference pattern, respectively, when a receptor binds to or separates from a ligand immobilized at the surface of a biosensor⁴⁹. SPR and BLI allows to access to the kinetic constants of association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) and to the equilibrium dissociation constant (K_d).

However, none of these methods gives direct access to the free ligand concentration, which is the parameter of choice to determine the isotherm of adsorption, and consequently, by curve fitting, the parameters of interaction (namely, the intrinsic binding constant and the stoichiometry of interaction).

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

Conversely, Frontal analysis continuous capillary electrophoresis (FACCE) is a straightforward technique allowing to quantify the free ligand concentration at equilibrium in a ligand/substrate mixture⁵⁰. FACCE has been applied to many different systems such as oppositely charged polyelectrolytes⁵¹, small molecule-polyelectrolyte⁵²⁻⁵⁴, protein-polyelectrolyte⁵⁵⁻⁶⁰ or protein-drug⁶¹⁻⁶⁷ binding. However, to our knowledge, this promising technique has never been used for the study of antigen-adjuvant interactions in vaccines. The principle of FACCE consists in applying a continuous voltage in the substrate-ligand equilibrated mixture, in order to selectively introduce in the capillary and to quantify the free ligand concentration. Generally, the analytical strategy is to limit as much as possible the entrance of the interacting complex in the capillary in order to: (i) avoid any complex dissociation in the capillary; and (ii) avoid the occurrence of undesirable adsorption onto the capillary wall. Since the amount of free ligand which selectively enter in the capillary is very low compared to the total ligand amount contained in the inlet vial, the equilibrium is not perturbed. Among the main advantages of this technique which seems attractive for the study of antigen-adjuvant interactions, one can cite: (i) the interaction study in conditions close to the conditions of formulation and/or biologically relevant; (ii) the possibility to wait for the equilibrium of the mixture before analysis; (iii) the relatively low volume/quantity of material required (nL injected, dozens of μL prepared per mixtures).

The present study aims at developing FACCE methodology under physiological conditions for the study of interactions between an anionic vaccine adjuvant SPA09 and a cationic vaccine antigen in development for the treatment of *Staphylococcus aureus* (PrSA). *Staphylococcus aureus* is a common human commensal organism which is a major cause of nosocomial infections worldwide. The method was first optimized using three cationic model proteins lysozyme, cytochrome c (Cyt C) and ribonuclease A (RNase A). From an analytical point of view, the challenge was to find the suitable experimental conditions allowing to avoid any interaction of the partners on the capillary wall during the FACCE analysis ensuring good reliability of the results. The final objective is to determine the binding parameters, i.e. the intrinsic binding constant (k), the first successive binding constant (K_1), and the stoichiometry of the antigen-adjuvant complex at saturation (n). The influence of the ionic strength and the adjuvant concentration on the antigen-adjuvant interactions were also thoroughly investigated, since they are strongly related parameters which can be varied in the final vaccine formulation.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

SPA09⁴² (polyacrylic acid, $M_w = 590$ kDa, $PDI = 2.2$) was provided by Sanofi Pasteur (Marcy-l'Étoile, France) at 17.8 g/L in phosphate-buffered saline buffer (PBS) (ionic strength 165 mM, pH = 7.4). PrSA (peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase from *Staphylococcus aureus*, $M_w = 35$ kDa, $pI = 9$) at 2.5 g/L in tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) buffer (ionic strength 165 mM, pH = 7.4) was provided by Sanofi-Pasteur (Marcy-l'Étoile, France). Lysozyme from chicken egg white ($M_w = 14$ kDa, $pI = 11$), Cyt C from bovine heart (cytochrome c, $M_w = 12$ kDa, $pI = 10$), RNase A from bovine pancreas (ribonuclease A, $M_w = 14$ kDa, $pI = 9$), TRIS ((CH₂OH)₃CNH₂, $M_w = 121$ g/mol) and polybrene (PB, hexadimethrine bromide, $M_w = 15$ kDa) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). PAA190 (polyacrylic acid, $M_w = 190$ kDa, $PDI = 1.2$) was purchased from Polymer Source, Inc. (Montreal, Canada). Deionized water was further purified with a Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France). The SPA09 provided by Sanofi-Pasteur was dialyzed against Milli-Q water in order to eliminate the PBS buffer using Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 3 500 M_wCO (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), and then freeze-dried. All the other chemicals were used without any further treatment.

2.2 Sample preparation

Stock solutions of SPA09, lysozyme, Cyt C and RNase A were prepared in TRIS buffer (80 mM TRIS, 68 mM HCl, 97 mM NaCl) at pH 7.4. The stock solution concentration of SPA09 was set at 2 g/L, lysozyme at 1.6 g/L, Cyt C and RNase A at 3.2 g/L. PrSA was already in solution in TRIS buffer at 2.5g/L. All the stock solutions were subsequently diluted to the desired concentrations in TRIS buffer. These solutions were used for the calibration curves and for the preparation of the antigen-adjuvant mixtures. These mixtures were obtained by mixing 150 μ L of antigen solution and 150 μ L of adjuvant solution. Final solutions were homogenized by manual agitation before analysis by FACCE.

2.3 FACCE

In the case of lysozyme, Cyt C and RNase A, FACCE experiments were carried out on a 7100 CE Agilent system (Waldbronn, Germany). This system is equipped with a diode array detector. Bare fused silica capillaries were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, USA). Capillaries of 50 μm i.d. \times 33.5 cm total length (8.5 cm to the detector) were used. To reduce the migration times, the sample was introduced from the short-end (8.5 cm to the detection point). The temperature of the capillary cartridge was set at 25°C. The capillary was coated with polybrene using successive flushes of: 0.5 % (w/w) polybrene in water (7 min), Milli-Q water (1 min), and background electrolyte composed of 80 mM TRIS buffer (1 min). The capillary was flushed with a 0.5 M NaOH containing 2 M NaCl mixture to remove the polybrene coating from the capillary (7 min), and then coated again using the previous protocol between each analysis. FACCE experiments were performed by applying a voltage of - 7.5 kV and a co-pressure of - 30 mbar (as stated in the chemstation software, i.e. from the long-end side of the capillary) to permit the entrance and the quantification of the (cationic) free protein, while avoiding the entrance of the negatively charged adjuvant and the protein-adjuvant complex. Free proteins were continuously and electrokinetically introduced into the capillary.

In the case of PrSA, FACCE experiments were carried out on a PA800 CE system from SCIEX (Framingham, USA). Bare fused silica capillaries were purchased from SCIEX (Framingham, USA). Capillaries of 50 μm i.d. \times 30 cm total length (10 cm to the detector) were used. Analyzes were performed on PB-coated capillaries using the same coating and rinsing procedures as described in the previous paragraph.

All FACCE experiments were performed in triplicates.

3 Theoretical background

3.1 Isotherm of adsorption

A straightforward way to study antigen-adjuvant interactions is to plot the isotherm of adsorption associated to these interactions^{68,69}. In this study, the polymeric adjuvant SPA09 is

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

considered as the substrate (S) and the protein model or the vaccine antigen is considered as the ligand (L). The isotherm of adsorption of the ligands onto the substrate is defined as the graphical representation of the average number of bound ligands per substrate \bar{n} versus the free ligand concentration $[L]$. \bar{n} can be obtained experimentally from the determination by FACCE of the free ligand concentration in different equilibrated ligand / substrate mixtures, according to equation (1):

$$\bar{n} = \frac{[L]_{bound}}{[S]_0} = \frac{[L-s]}{[S]_0} = \frac{[L]_0 - [L]}{[S]_0} \quad (1)$$

where $[L]_{bound}$ is the concentration of bound ligand, $[S]_0$ is the initial substrate concentration introduced in the mixture and $[L]_0$ is the initial ligand concentration introduced in the mixture. The adjustment of the curve $\bar{n} = f([L])$ using a suitable mathematical model gives access to the desired binding parameters.

3.2 Model of n independent sites of equal energy

In the model of n independent sites of equal energy, we assume that the substrate (S) contains n independent sites ($-s$) of equal energy. The occupation of one site does not influence the occupation of the other sites. The interaction between one site ($-s$) on the substrate and the ligand (L) is described by the equilibrium (2):



The intrinsic binding site constant k related to this equilibrium is defined by equation (3):

$$k = \frac{[L-s]}{[-s][L]} \quad (3)$$

where $[L-s]$ is the concentration of occupied sites, $[-s]$ is the concentration of free sites and $[L]$ is the concentration of free ligands. In the framework of this model, the isotherm of adsorption is described by the Langmuir model according to equation (4):

$$\bar{n} = n \frac{k[L]}{1+k[L]} \quad (4)$$

where n and k can be obtained by nonlinear curve fitting of the experimental isotherm of adsorption. When the entire isotherm can be obtained experimentally, the maximum number of interacting sites n corresponds to the value of \bar{n} at saturation of the isotherm. If, for any experimental reason, the saturating part of isotherm is not accessible, the slope at the origin of the isotherm can give access to the first successive binding constant $K_1 = n \times k$ as demonstrated by the first derivative of equation (4):

$$\lim_{[L] \rightarrow 0} \frac{d\bar{n}}{d[L]} = \lim_{[L] \rightarrow 0} \frac{nk}{(1+k[L])^2} = nk = K_1 \quad (5)$$

The intrinsic binding constant k should not be confused with the first successive binding constant K_1 defined as:



3.3 Scatchard representation

The model of n independent sites of equal energy can be linearized for an easier determination of the binding parameters. The Scatchard representation is one method of linearization of the Langmuir adsorption isotherm which consists in plotting $\frac{\bar{n}}{[L]}$ as a function of

\bar{n} according to equation (7):

$$\frac{\bar{n}}{[L]} = nk - k\bar{n} \quad (7)$$

The slope of the line gives access to the binding constant k , while the y-intercept estimates $K_1 = n \times k$.

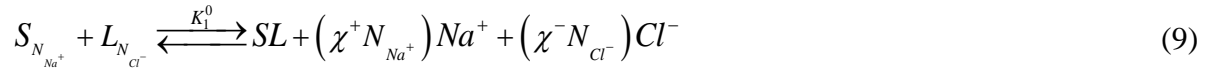
3.4 Free ligand concentration

Once the n and k parameters have been estimated/determined experimentally, it is then possible to calculate the free ligand concentration for any ligand-substrate mixing ratio, according to equation (8):

$$[L] = \frac{-(nk[S]_0 - k[L]_0 + 1) + \sqrt{(1 - k[L]_0 + nk[S]_0)^2 + 4k[L]_0}}{2k} \quad (8)$$

Ionic strength dependence of the binding constant

Taking into account the release of the counter-ions associated with the first successive equilibrium, the chemical equilibrium (6) can be written as (9):



where K_1^0 is the first interaction constant of the equilibrium which takes into account the release of counter-ions. N_{Na^+} and N_{Cl^-} are the number of counter-ions condensed onto the substrate and the ligand, respectively, before association. χ^+ and χ^- are the fractions of the counter-ions Na^+ and Cl^- released after the association.

The relationship between K_1 and K_1^0 is given by equation (10)⁵¹:

$$K_1^0 = K_1 \times [Na^+]^{\chi^+ N_{Na^+}} \times [Cl^-]^{\chi^- N_{Cl^-}} \quad (10)$$

which can be rewritten as equation (11):

$$\log K_1 = \log K_1^0 - (\chi^+ N_{Na^+} + \chi^- N_{Cl^-}) \log([I]) \quad (11)$$

where I represents the ionic strength of the medium, assuming that $[Na^+] = [Cl^-] = [I]$.

Equation (11) shows that a linear dependency is expected between the logarithm of the first successive interaction constant K_1 and the logarithm of the ionic strength $[I]$. The slope of this

linear dependence represents the number of the counter-ions that are released from the association of one ligand with the substrate.

4 Results and Discussion

4.1 Development and optimization of the FACCE methodology

Before studying interactions between vaccine antigens and SPA09 adjuvant, three model proteins were used to develop the FACCE method, namely, lysozyme, Cyt C and RNase A. These proteins are positively charged at pH 7.4 (see Table 1), and thus were supposed to interact, at least electrostatically, with the polymeric adjuvant which is negatively charged at pH 7.4. As the adjuvant charge density is much higher than the charge density of the proteins, the protein-adjuvant complexes are supposed to be negatively charged⁷⁰.

Table 1. Isoelectric point (pI), molar mass (M), weight-average hydrodynamic radius (R_h) and effective electrophoretic mobility (μ_{ep}) of the studied model proteins and vaccine antigens. Experimental conditions for R_h data (Taylor Dispersion Analysis): HPC-coated capillary of 58.5 cm total length (50 cm to the detector) \times 100 μm i.d. Buffer: 20 mM TRIS-HCl, 148 mM NaCl, pH 7.4. Co-hydrodynamic pressure: 20 mbar. Experimental conditions for μ_{ep} data: PB-coated capillary of 33.5 cm total length (8.5 cm to the detector) \times 50 μm i.d. Buffer: 20 mM TRIS-HCl, 148 mM NaCl, pH 7.4. Applied voltage: -7.5 kV. Co-hydrodynamic pressure: -30 mbar. ^aTheoretical pI according to the protein sequence.

	pI	M (kDa)	R_h (nm)	μ_{ep} ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Lysozyme	11 ⁷¹	14	2.0	10.6
Cyt C	10 ⁷²	12	1.8	8.8
RNase A	9 ⁷³	14	2.1	3.5
PrSA	9 ^a	35	3.5	3.6

The goal of the FACCE methodology is to quantify the free antigen concentration in various equilibrated antigen/adjuvant mixtures in order to plot the isotherm of adsorption at physiological pH 7.4 and 165 mM ionic strength. For that, the antigen/adjuvant mixture was placed at the outlet end of the capillary to reduce the analysis time, and the free antigen is electrokinetically and continuously introduced in the capillary (frontal mode). As shown in Figure 1A, the positively

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

charged free antigen migrates to the negative pole, whereas the negatively charged antigen-adjuvant complexes remain at the positive pole in the outlet vial. The effective electrophoretic mobilities of the proteins studied in this work are given in Table 1. To get repeatable results, the nature of the capillary coating, the capillary rinsing protocol and the composition of the electrolyte were carefully investigated. Lysozyme is well-known to be particularly difficult to analyze because it strongly adsorbs on the capillary walls even with capillary coatings⁷⁴. Therefore, lysozyme was used to test different capillary coatings to limit adsorption phenomena on the capillary wall. Neutral and cationic coatings were compared: Hydroxypropylcellulose (HPC), Ultratrol® LN, Polydiallyldimethylammonium chloride (PDADMAC), hexadimethrine bromide (polybrene, PB), a multilayer coating PB- Polystyrene sulfonate (PSS) -PB capillary and two ready-to-use capillaries from Agilent Technologies μ -SIL FC and DB-WAX were tested. The best results in term of baseline stability and repeatability on migration times were obtained with the cationic PB coating. Lysozyme exhibited non-negligible absorption on all the neutral capillaries coatings tested leading to drift of the UV plateau in FACCE.

With a cationic coating, a co-pressure was applied to compensate the electroosmotic flow and to allow the protein migration to the detection window. The applied co-pressure was a crucial parameter which was carefully investigated to obtain stable baseline and repeatable measurements, as presented in detail in Figure SI1. The applied co-pressure should be neither too low nor too high to avoid the migration of the negatively charged complexes into the capillary. The selected co-hydrodynamic pressure giving the best results was - 30 mbars.

The capillary rinsing steps were also very important to avoid baseline drift, as presented in Figure SI2. So, the concomitant use of 0.5 M NaOH and 2 M NaCl allows a complete removing of the PB coating and the possibly adsorbed proteins from the capillary surface, within a minimum of time. The washed capillary can then be re-coated by PB for subsequent analysis. The overall rinsing protocol between analysis is about 16 min, while the electrophoretic step lasts about 4 min, leading to a total analysis time of 20 min for one equilibrated mixture and a total analysis time of 12 hours to achieve a 12-points adsorption isotherm in triplicate.

Seeking to improve the method repeatability, a variation of pH in the 300 μ L equilibrated mixture during the FACCE experiment was observed due to the electrolysis reactions in the sample vial

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

and due to the relatively low volume of sample used for the FACCE experiments. As shown in Table 2, in the case of 20 mM TRIS buffer in a 300 μ L sample volume, the pH drops from 7.4 to 4.4 in 15 minutes under 224 V/cm electric field, which corresponds to the separation time required to perform three repetitions of the same sample. pH variations modify the charge of the ligand and the substrate and can thus impact the interactions. TRIS concentration was thus increased up to 80 mM to limit the pH drift to about \sim 0.1 pH unit (see Table 1). For those who would be interested in working with lower sample volume (i.e. 150 μ L), increasing the TRIS concentration was not sufficient unless setting very high concentrations (200 mM, see Table 1), it is preferable to switch to HEPES buffer which has a higher buffer capacity than TRIS at pH 7.4. In the case of the present study, TRIS buffer was still chosen as it most commonly used in vaccines formulations.

Table 2. Variation of the pH of the buffer as a function of the exposure duration at 224 V/cm electric field. Applied voltage: -7.5 kV on 33.5 cm capillary length. Buffers: TRIS HCl or HEPES NaOH at various concentrations as indicated in the Table + NaCl to set the ionic strength at 165 mM. Temperature: 22°C. Sample volume: 0.15 mL or 0.3 mL as indicated in the Table. The sample vials were only filled with the buffers and did not contained antigen-adjuvant mixtures. $n = 3$ repetitions for TRIS 80 mM and $n = 1$ for the others.

Buffer (mM)	Volume (μ L)	Duration under electric field					Δ pH for 15 min
		0 min	5 min	10 min	15 min		
TRIS 20	300	7.4	7.2	6.9	4.4	-3.0	
TRIS 60	300	7.4	7.4	7.3	7.2	-0.2	
TRIS 80	300	7.4	7.4	7.3	7.3	-0.1	
TRIS 20	150	7.5	6.9	3.4	2.6	-4.9	
TRIS 100	150	7.4	7.3	7.2	7.1	-0.3	
TRIS 200	150	7.4	7.4	7.3	7.3	-0.1	
HEPES 100	150	7.4	7.4	7.3	7.3	-0.1	

The optimized FACCE experimental conditions led to flat and repeatable fronts for the three model proteins and for the vaccine antigen. The method was first used to make calibration curves with the proteins alone. Very good linearities (R^2 between 0.98 and 1.00) were obtained for the three model

proteins and the vaccine antigen. In all protein / adjuvant mixtures, the SPA09 concentration remains constant fixed at 1g/L and the protein concentration varies. As only the free protein migrates into the capillary, the height of the fronts obtained allows the quantification of the free protein. For instance, Figure 1B displays the electropherograms obtained in triplicate for the different equilibrated lysozyme / SPA09 mixtures. One can observe that the three measurements performed for each mixture overlap very well reflecting good repeatability of the method.

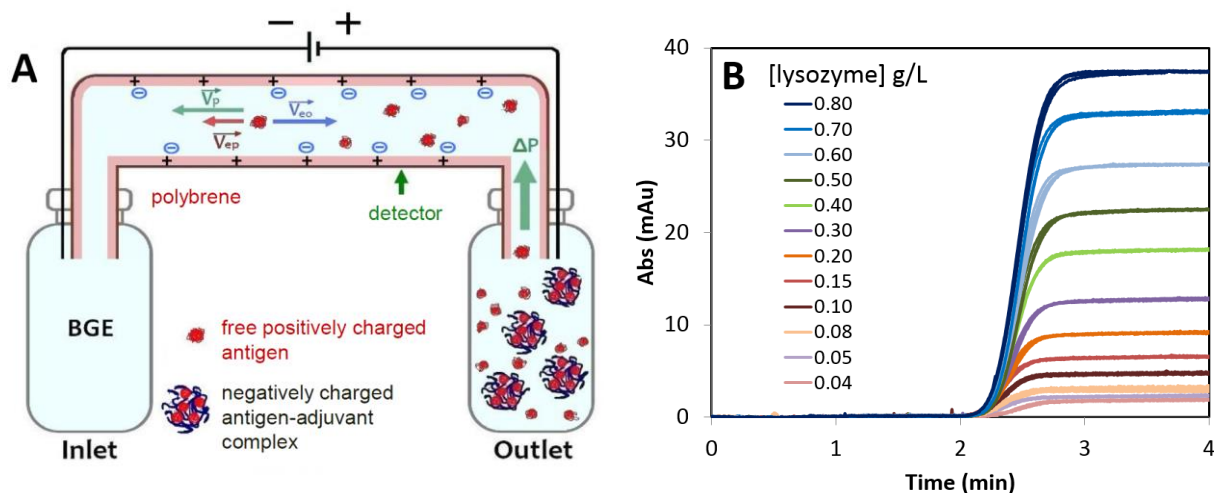


Figure 1. Schematic representation of the free antigen migration by FACCE (A) and the corresponding electropherograms (B) obtained for the detection of the free protein in different equilibrated protein/adjuvant mixtures (Lysozyme/SPA09). V_{eo} represents the velocity of the electroosmotic flow, V_{ep} is the velocity due to the effective electrophoretic mobility of free antigen and V_p is the velocity due to the applied co-pressure. Experimental conditions: PB-coated capillary of 33.5 cm total length (8.5 cm to the detector) \times 50 μ m i.d. Buffer: 80 mM TRIS-HCl, 97 mM NaCl, pH 7.4 (167 mM ionic strength). Applied voltage: -7.5 kV (from inlet). Co-hydrodynamic pressure: -30 mbar (from inlet). UV detection: 214 nm. Temperature: 25 $^{\circ}$ C. Samples (300 μ L) were prepared in the background electrolyte and placed at the outlet end of the capillary. SPA09 concentration in the final mixtures: 1 g/L. Protein concentration in the final mixtures: see the inset.

4.2 Adsorption isotherms

From the quantification of the free protein, the average number of bound proteins per adjuvant, \bar{n} , can be calculated using equation (1) and the adsorption isotherm can be plotted. If the mixtures are at equilibrium, the addition order should not modify the results⁷⁰. The adsorption isotherms between SPA09 and lysozyme were plotted for both addition orders: SPA09 added into lysozyme and lysozyme added into SPA09. As shown in Figure SI2, the addition order did not

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

influence the results. Therefore, it was assumed that the equilibrium in the sample mixture was reached. It is worth noting that the incubation time did not change the results that were obtained.

Based on this FACCE methodology, the adsorption isotherms of the three model proteins (lysozyme, Cyt C and RNase A) were plotted in the basis of triplicates for 12 different concentrations, as displayed in Figure 2A. It can be observed that the three adsorption isotherms do not display any saturation plateau. Higher protein concentrations could not be reached experimentally due to protein solubilization limitations and precipitation concerns. For that reason, the n value could not be directly obtained from the \bar{n} value at saturation. To determine the binding parameters (k and n) in the framework of the model of independent site of equal energy, the first successive interaction constants K_I were obtained from the slope at the origin of the isotherm (see equation (5)). This experimental determination allows a first ranking of the interactions: $K_I_{\text{Cyt C}} \approx K_I_{\text{RNase A}} > K_I_{\text{Lysozyme}}$. K_I represents the $n \times k$ product. To get the n and k values independently, the Scatchard representation was used to linearize the adsorption isotherm. A straight line was obtained, and the corresponding slope gave the intrinsic binding site constant k , as shown in Figure 2B. The obtained k values varied between $6.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ for lysozyme up to $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for RNase A. Knowing K_I , it was possible to estimate the number of independent interaction sites of the equal energy (n) which varied between 75 for lysozyme and 149 for Cyt C. At saturation, this stoichiometry corresponds to $m = 2.2 \text{ g}$ for lysozyme and 3.0 g for Cyt C of protein per g of adjuvant. By replacing n and k in the expression of the Langmuir equation (4), the fits of the isotherms were represented by the dotted lines in Figure 2A, showing very good agreement with the experimental points.

Using the n and k experimental values, the free protein concentration can be calculated for any initial concentrations of protein and adjuvant introduced in the mixtures, using equation (8). For typical vaccine formulation having an initial antigen concentration of 0.4 g/L and an adjuvant concentration of 1 g/L , the free protein concentrations were determined for each model protein (expressed in percentage of the free form relative to the introduced concentration) and varied between 33% and 55%, see Table 3. The average number of proteins \bar{n} with these initial conditions are also given in Table 3 and varied between 6 and 13 proteins per polymer chain for lysozyme and Cyt C, respectively. Of course, this stoichiometry depends on the molar mass of the

polymer chain, and it is convenient to express it in mass ratio \bar{m} corresponding to 0.18 to 0.26 g of protein per g of adjuvant for lysozyme and Cyt C, respectively.

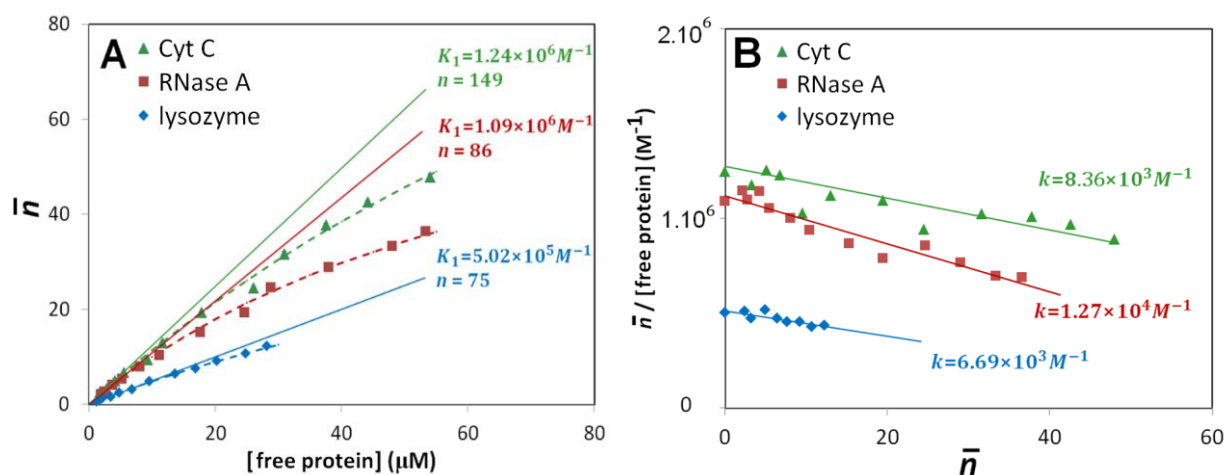


Figure 2. Isotherms of adsorption obtained by FACCE for the interaction between three model cationic proteins (lysozyme, RNase A, Cyt C) and anionic SPA09 ($M_w = 583$ kDa) adjuvant (A) and the corresponding Scatchard plots (B). Fitting curves (dotted lines) were plotted with the k and n values reported in Table 2 using the model of independent sites of equal energy (equation (4)). Experimental conditions: SPA09 concentration in the final mixtures: 1 g/L. Cyt C and RNase A concentrations in the final mixtures: 0.08; 0.10; 0.15; 0.20; 0.30; 0.40; 0.60; 0.80; 1.00; 1.20; 1.40 and 1.60 g/L. Lysozyme concentrations in the final mixtures: 0.04; 0.05; 0.08; 0.10; 0.15; 0.20; 0.35; 0.40; 0.50; 0.60; 0.70 and 0.80 g/L. Other experimental conditions as in Figure 1. Each experimental data point was obtained in triplicate. Error bars are \pm one SD (generally too small to be seen). The tangent to the origin of the isotherms are represented in Figure 2A, the slope of which are related to K_I .

4.3 Impact of the ionic strength on antigen-adjuvant interactions

A strong dependence of protein/polyelectrolyte interactions with the ionic strength has been reported in the literature⁷⁵⁻⁷⁷. To study the impact of the ionic strength on the interaction, five buffers were prepared at pH 7.4, with different ionic strengths ranging from 118 to 268 mM. The different ionic strengths were obtained by varying the NaCl concentration while keeping the TRIS concentration fixed at 80 mM. The calibration curves obtained with the five buffers had good linearities (R^2 between 0.98 and 1.00). For an equivalent lysozyme (0.4 g/L) / SPA09 (1g/L) mixture: less than 17% free lysozyme was detected at 118 mM ionic strength while more than 93% was detected at 268 mM ionic strength. These results show the strong impact of the ionic strength on the interaction. This strong dependency can be visualized by the decreasing of the slope of the

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

tangent at the origin (representing the first successive interactions constants K_I) in Figure 3A. Indeed, Figure 3A shows that at 118 mM ionic strength $K_I = 3.15 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, while at 268 mM ionic strength $K_I = 5.18 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. By plotting K_I against the ionic strength I in double logarithmic scales (see Figure 3B), the slope of the line obtained is an estimation of the number of released counter-ions during the association of one protein onto an adjuvant chain (see equation (11)). In the case of lysozyme/SPA09 interaction, a -5 power law was obtained:

$$K_I = aI^{-b} = 4.90 \times 10^{16} I^{-5} \quad (12)$$

where K_I is expressed in M^{-1} and I in mM.

This means (see equation 11) that 5 counter-ions are released during the association of the first protein onto the adjuvant. A maximum in the protein/polyelectrolyte binding constant has been reported in the literature at 10-50 mM ionic strength⁷⁵⁻⁷⁷. This maximum was explained by the balance between repulsive and attractive electrostatic forces due to the dipolar nature of proteins having positive and negative patches⁷⁵. In our study, it would have been difficult to observe this maximum because the K_I binding constant would be too high to be measurable around 10-50 mM ionic strength and below.

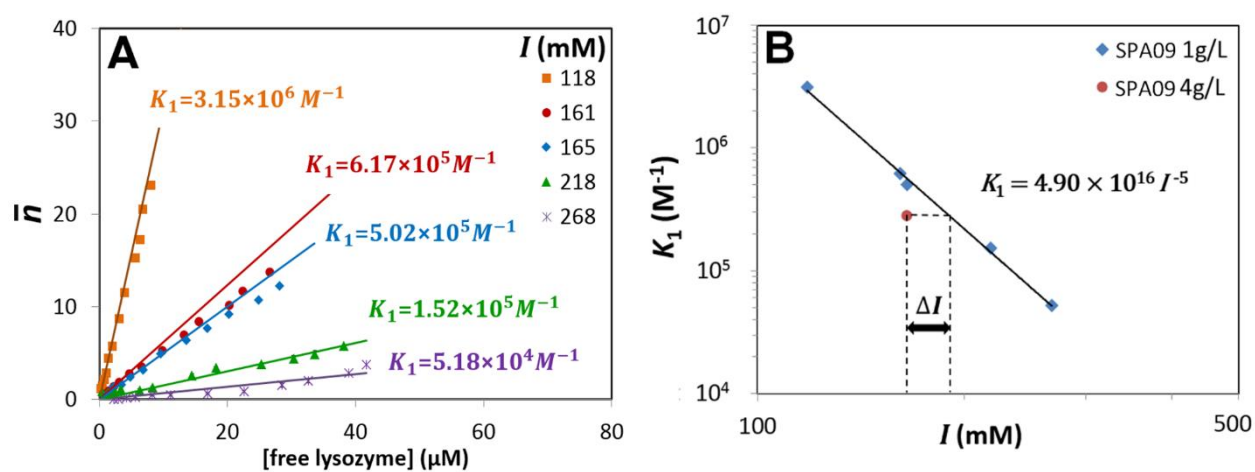


Figure 3. Impact of the ionic strength of the buffer on the isotherms of adsorption of lysozyme onto SPA09 (A) and the corresponding dependence of K_1 with the ionic strength (B). Experimental conditions: PB-coated capillary of 33.5 cm total length (8.5 cm to the detector) \times 50 μ m i.d. Buffer: 80 mM TRIS-HCl, pH 7.4, with various NaCl concentrations to set the ionic strength as indicated on the graphs. Applied voltage: -7.5 kV. Co-hydrodynamic pressure: -30 mbar. UV detection: 214 nm. Temperature: 25 $^{\circ}$ C. Samples were prepared in the background electrolyte by 50/50 (v/v) dilutions of SPA09 and lysozyme stock solutions. SPA09 concentration in the final mixtures: 1 g/L. Lysozyme concentrations in the final mixtures: 0.04; 0.05; 0.08; 0.10; 0.15; 0.20; 0.35; 0.40; 0.50; 0.60; 0.70 and 0.80 g/L.

4.4 Impact of the adjuvant concentration on the interactions

Theoretically, the adjuvant concentration should not affect the adsorption isotherm since the isotherm of adsorption should be valid whatever the initial concentrations in protein and adjuvant introduced in the mixtures, as far as the mixture remains at equilibrium. As the adjuvant concentration is a parameter which is often modified and adjusted during the formulation of a vaccine it is interesting to look at the results obtained with another adjuvant concentration. Two adsorption isotherms were plotted at 1 g/L and 4 g/L of SPA09 in the mixture and at 165 mM ionic strength (see Figure 4). However, by plotting the two adsorption isotherms at 1g/L and 4g/L of SPA09 in the mixture at 165 mM, no overlapping was observed, as shown in Figure 4. This discrepancy can be explained by the change in ionic strength brought by the polymeric adjuvant itself, since this contribution was not taken into account in the calculation of the ionic strength. In order to estimate the ionic strength increment provided by the difference in SPA09 concentration

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

of 3 g/L, the K_I value obtained experimentally at 4 g/L SPA09 was represented in Figure 3, and the increment of ionic strength ΔI can be directly estimated from the ionic strength dependence obtained in the previous section (see Figure 3) according to:

$$\Delta I = \left(\frac{K_1^{at PAA=4 g/L}}{a} \right)^{-\frac{1}{b}} - I_{BGE} \quad (13)$$

where I_{BGE} is the ionic strength of the BGE without taking into account the SPA09 contribution (here 165 mM). Taking $K_1^{at PAA=4 g/L} = 2.78 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and $I_{BGE} = 165 \text{ mM}$ in equation (13) leads to the conclusion that an addition of 3 g/L SPA09 is equivalent to an increase in the ionic strength of $\Delta I \sim 26 \text{ mM}$. To confirm this result, a buffer solution with an ionic strength of $165 - 26 = 139 \text{ mM}$ was then prepared to determine the isotherm of adsorption of lysozyme with 4 g/L SPA09. Figure 4 shows that the adsorption isotherm describing the interactions between lysozyme and SPA09 at 4 g/L in a 139 mM ionic strength buffer is very close to the adsorption isotherm using SPA09 at 1 g/L in a 165 mM ionic strength buffer, with difference in slope less than 2%. These results validate both the ionic strength dependence found in the previous section and the way to experimentally estimate the SPA09 adjuvant contribution to the ionic strength.

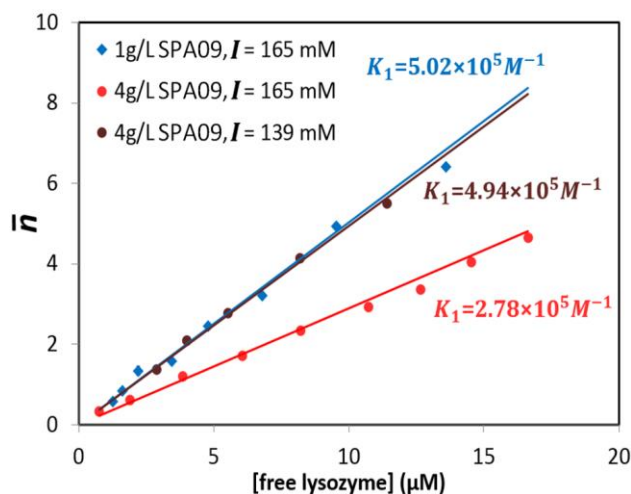


Figure 4. Influence of the SPA09 concentration on the isotherm of adsorption of lysozyme on SPA09. Experimental conditions: PB-coated capillary of 33.5 cm total length (8.5 cm to the detector) \times 50 μm i.d. Buffer: 80 mM TRIS-HCl, pH 7.4, with various NaCl concentrations to the ionic strength indicated on the graph (SPA09 contribution to the ionic strength is not considered). Applied voltage: -7.5 kV. Co-hydrodynamic pressure: -30 mbar. UV detection: 214 nm. Temperature: 25 $^{\circ}\text{C}$. SPA09 concentration in the final mixtures: 1 g/L or 4 g/L. Lysozyme concentrations in the final mixtures: 0.04; 0.05; 0.08; 0.10; 0.15; 0.20; 0.35 and 0.40 g/L for the isotherm obtained with SPA09 at 1 g/L, 0.08; 0.10; 0.20; 0.30; 0.40; 0.70 and 0.80 g/L for the isotherm obtained with SPA09 at 4 g/L.

4.5 Impact of the adjuvant molar mass

The results obtained with SPA09 adjuvant provided by Sanofi-Pasteur (polyacrylic acid, $M_w = 590$ kDa) were compared to those obtained with a polyacrylic acid of lower molar mass (PAA190, $M_w = 190$ kDa) purchased from Polymer Source. The adsorption isotherms of lysozyme, Cyt C and RNase A are plotted in Figure 5 for the two polyacrylic acids. The isotherms were distinct when the stoichiometry \bar{n} was expressed in mol/mol (Figure 5A), which was expected since longer polyacrylic acid chain can interact with more proteins. In contrast, the differences between isotherms vanished when \bar{n} was replaced by \bar{m} expressed in g/g (Figure 5B). These results demonstrate that the parameters of interaction determined with a polyacrylic acid of given molar mass can be used for various polyacrylic acid as far as the isotherm of adsorption is expressed in g/g; and can be recalculated in mol/mol if the average molar mass of the polyacrylic acid is known.

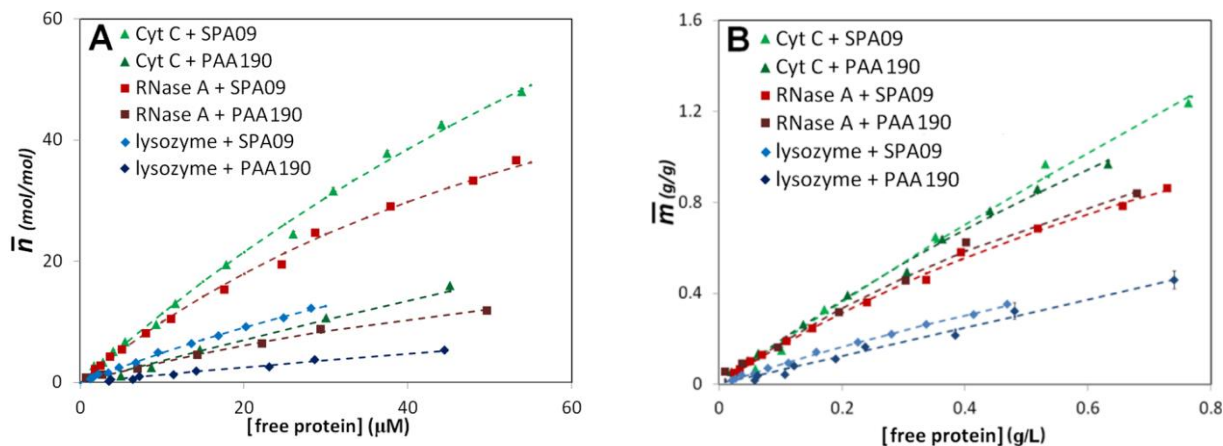


Figure 5. Influence of the adjuvant molar mass on the isotherm of adsorption of lysozyme onto polyacrylic acid for stoichiometries expressed in mol/mol (A) or in g/g (B). Experimental conditions as in Figure 1.

4.6 The case of the vaccine antigen in development

The same FACCE method was applied to study interactions of SPA09 adjuvant with a vaccine antigen in development for the treatment of *Staphylococcus aureus* (PrSA). The calibration curve showed very good linearity ($R^2 = 1.00$). As expected, due to the positive protein charge at pH 7.4, less than 40% free PrSA was quantified on the concentration range studied, confirming the presence of PrSA – SPA09 interactions. The adsorption isotherm was plotted with triplicate measurements for each experimental point, as shown in Figure 6. The binding parameters were determined as described in previous section, leading to $K_I = 1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n = 28$, and $k = 5.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, see Table 3. Comparing these results to the previously obtained results, it appears that the interaction parameters K_I and k obtained for PrSA are both higher to those obtained for the three model proteins while the maximum stoichiometry is in the order $n_{\text{Cyt C}} > n_{\text{lysozyme}} \approx n_{\text{RNase A}} > n_{\text{PrSA}}$. The ranking of the number of independent interaction sites (n) is inversely proportional to the proteins size (see Table 1), which can be partly explained by the steric hindrance. Nevertheless, if we consider the maximum stoichiometry expressed in g of protein per g of adjuvant (m) the results are much closer, around 2 g of protein per g of adjuvant.

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

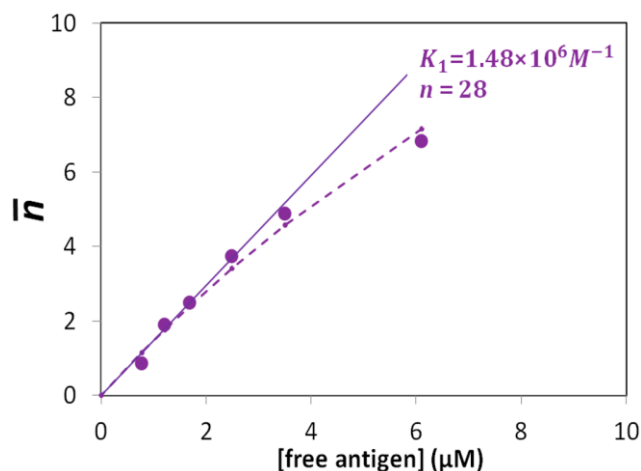


Figure 6. Isotherm of adsorption obtained by FACCE for the interaction between PrSA antigen and anionic SPA09 adjuvant. Experimental conditions: SPA09 concentration in the final mixtures: 1 g/L. PrSA concentrations in the final mixtures: 0.08; 0.15; 0.20; 0.30; 0.40 and 0.60 g/L. Fitting curve using the model of independent sites of equal energy is represented in dotted lines. Other experimental conditions as in Figure 1.

Table 3. Binding parameters (k , n) determined from the adsorption isotherms (see Figure 2) using the model of independent sites of equal energy. $K_1 = n \times k$ is the first successive interaction constant and was determined from the slope at the origin of the isotherms. k was obtained using the Scatchard representation (from the slopes of the lines in Figure 2B). Experimental conditions as in Figure 1. ^a $[\text{antigen}]_0 = 0.4 \text{ g/L}$, $[\text{adjuvant}]_0 = 1 \text{ g/L}$.

	Cyt C	RNase A	Lysozyme	PrSA
% free antigen in formulation ^a	33.9 ± 1.0	38.1 ± 1.4	55.2 ± 0.2	29.2 ± 0.7
\bar{n} (mol/mol) in formulation ^a	13.0 ± 0.2	10.4 ± 0.2	6.4 ± 0.1	4.9 ± 0.1
\bar{m} (g/g) in formulation ^a	$(2.6 \pm 0.1) \times 10^{-1}$	$(2.5 \pm 0.1) \times 10^{-1}$	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^{-1}$	$(2.9 \pm 0.1) \times 10^{-1}$
K_1 (M^{-1})	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^6$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^6$	$(5.0 \pm 0.6) \times 10^5$	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^6$
k (M^{-1})	$(8.4 \pm 2.1) \times 10^3$	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^4$	$(6.7 \pm 1.6) \times 10^3$	$(5.2 \pm 2.0) \times 10^4$
n (mol/mol)	149 ± 51	86 ± 12	75 ± 26	28 ± 12
m (g/g)	3.0 ± 1.0	2.0 ± 0.3	2.2 ± 0.7	1.7 ± 0.7

5 Conclusion

This work showed the suitability of FACCE method to study antigen-adjuvant interactions in vaccine products. FACCE gives a rapid and direct access to the percentage of free antigens and to the average number of bound antigens per adjuvant in vaccine formulations. Mathematical models allowed to further determine the maximum stoichiometry and the intrinsic binding constant, which are key parameters characterizing the interactions. FACCE method can also be used to follow vaccines stability and to optimize vaccines formulations, by monitoring the impact of the physicochemical parameters (excipients, adjuvant concentration, pH, ionic strength) on the interaction stoichiometry and intrinsic binding constant. Ionic strength was found to be a crucial parameter having a considerable impact on the interaction parameters. It was also shown that the polymeric adjuvant itself significantly contributes to the ionic strength of the medium, and therefore, to the strength of the interactions. Its contribution could be estimated and corrected when formulating a vaccine product.

Regarding its limitations, the methodology developed in this work is well suited for the study of non-specific interactions with intrinsic binding site constant k in the order of $10^3 - 10^6 \text{ M}^{-1}$. For higher affinity binding site constant, a fluorescent detector would be required (with fluorescent antigen / protein) to lower the limit of quantification. Moreover, this methodology is only applicable when the free antigen/protein and the complex have significantly different electrophoretic mobilities. This methodology could also be used to study negatively charged antigens or other types of charged polymer adjuvants (cationic or neutral), but the method should be adapted especially by changing the capillary coating to avoid any undesirable adsorptions. FACCE methodology is, of course, not limited to antigen / adjuvant interaction, and can be applied for other applications in biomacromolecular science.

The study of antigen-adjuvant interactions can allow a better understanding of adjuvants mode of action and their impact on the immunogenicity. Understanding antigen-adjuvant interactions at molecular level is necessary for the development of new adjuvants which goes hand in hand with the development of new vaccines.

6 Supporting information

6.1 Influence of the co-hydrodynamic pressure on the adsorption

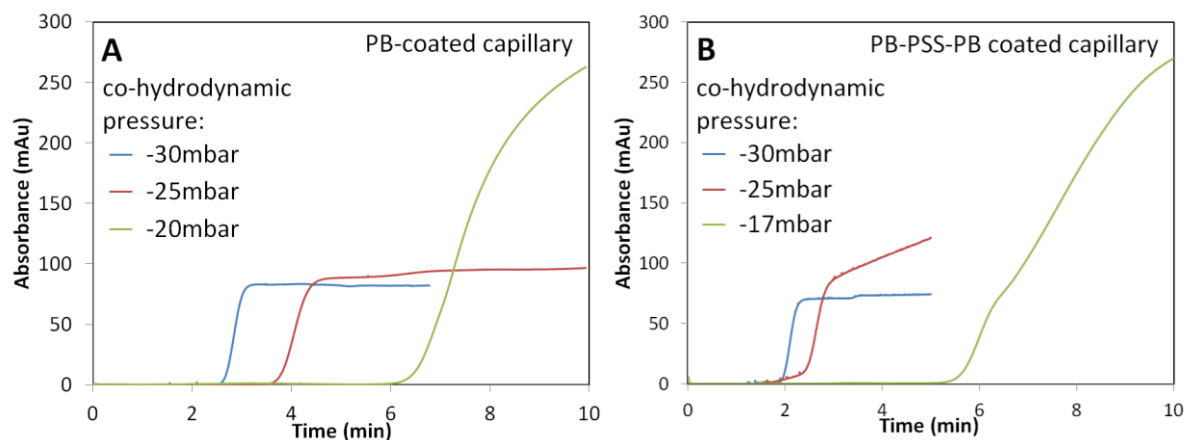


Figure SI 1. Influence of the co-hydrodynamic pressure on the adsorption. Same sample was analyzed three times at different co-hydrodynamic pressures: see the inset. PB-coated capillary (A). PB-PSS-PB-coated capillary (B). Experimental conditions: capillary of 33.5 cm total length (8.5 cm to the detector) \times 50 μ m i.d. Buffer: 20 mM TRIS, HCl, 148 mM NaCl, pH 7.4. Applied voltage: -7,5 kV. UV detection: 214 nm. Temperature: 25 °C. Lysozyme concentration: 1 g/L.

6.2 Optimization of the capillary washing conditions

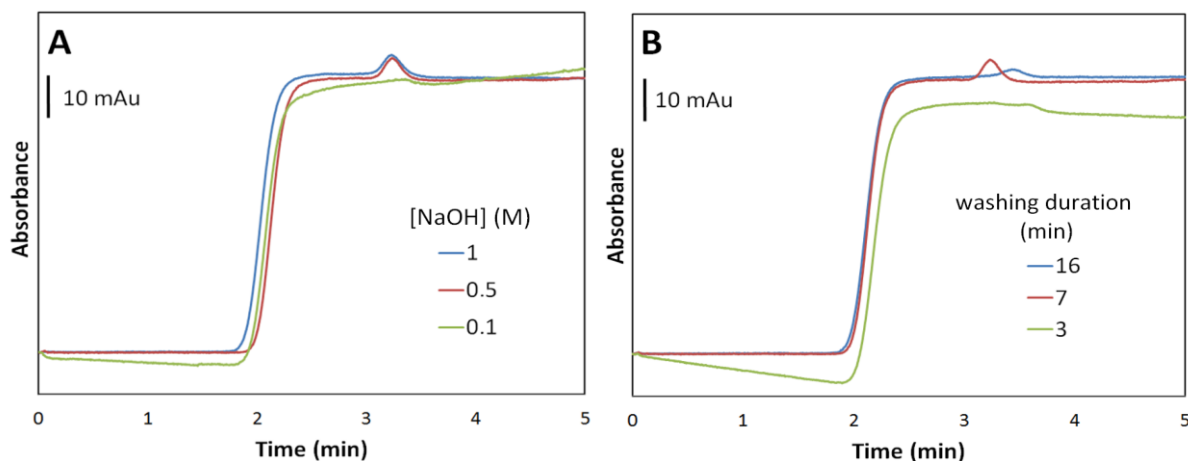


Figure SI 2. Optimization of the capillary washing conditions. 10 min washing duration with various NaOH-NaCl mixtures, concentrations: NaCl 2M, NaOH see the inset (A). Various washing durations (3, 7 or 16 min) with NaOH 0.5 – NaCl 2M mixture (B). Experimental conditions: PB-coated capillary of 33.5 cm total length (8.5 cm to the detector) \times 50 μ m i.d. Buffer: 20 mM TRIS, HCl, 148 mM NaCl, pH 7.4. Applied voltage: -7.5 kV. UV detection: 214 nm. Temperature: 25 °C. Lysozyme concentration in the sample: 1 g/L.

6.3 Adsorption isotherms of lysozyme on SPA09 for both addition orders

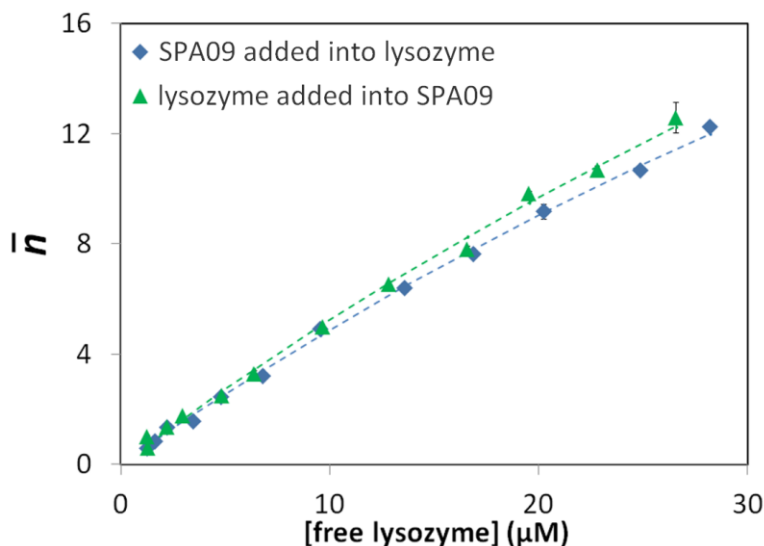


Figure SI 3. Adsorption isotherms of lysozyme on SPA09 for both addition orders (SPA09 added into lysozyme and lysozyme added into SPA09). Experimental conditions: PB-coated capillary of 33.5 cm total length (8.5 cm to the detector) \times 50 μ m i.d. Buffer: 80 mM TRIS-HCl, 97 mM NaCl, pH 7.4 (167 mM ionic strength). Applied voltage: - 7.5 kV (from inlet). Co-hydrodynamic pressure: -30 mbar (from inlet). UV detection: 214 nm. Temperature: 25 °C. Samples (300 μ L) were prepared in the background electrolyte and placed at the outlet end of the capillary. SPA09 concentration in the final mixtures: 1 g/L. Lysozyme concentration in the final mixtures: 0.04; 0.05; 0.08; 0.10; 0.15; 0.20; 0.30; 0.40; 0.50; 0.60; 0.70 and 0.80 g/L. Other experimental conditions as in Figure 1. Error bars are \pm one standard deviation on 3 repetitions.

7 References

- (1) Rappuoli, R.; Pizza, M.; Del Giudice, G.; De Gregorio, E. Vaccines, New Opportunities for a New Society. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (34), 12288–12293. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402981111>.
- (2) WHO. Better Supply Systems Key to Reach All Children with Life-Saving Vaccines [Online], 2013. <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/worldimmunizationweek20130418en> Accessed March 24 2020.
- (3) Piot, P.; Larson, H. J.; O'Brien, K. L.; N'kengasong, J.; Ng, E.; Sow, S.; Kampmann, B. Immunization: Vital Progress, Unfinished Agenda. *Nature* **2019**, *575* (7781), 119–129. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1656-7>.
- (4) Maruggi, G.; Zhang, C.; Li, J.; Ulmer, J. B.; Yu, D. mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. *Mol. Ther.* **2019**, *27* (4), 757–772. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.01.020>.
- (5) Rothan, H. A.; Byrareddy, S. N. The Epidemiology and Pathogenesis of Coronavirus Disease (COVID-19) Outbreak. *J. Autoimmun.* **2020**, *102433*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102433>.
- (6) He, Y.; Yuan, Q.; Mathieu, J.; Stadler, L.; Senehi, N.; Sun, R.; Alvarez, P. J. J. Antibiotic Resistance Genes from Livestock Waste: Occurrence, Dissemination, and Treatment. *Npj Clean Water* **2020**, *3* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0051-0>.
- (7) Hwang, W.; Yoon, S. S. Virulence Characteristics and an Action Mode of Antibiotic Resistance in Multidrug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37422-9>.

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

- (8) Scoffone, V. C.; Barbieri, G.; Buroni, S.; Scarselli, M.; Pizza, M.; Rappuoli, R.; Riccardi, G. Vaccines to Overcome Antibiotic Resistance: The Challenge of Burkholderia Cenocepacia. *Trends Microbiol.* **2020**, *28* (4), 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.12.005>.
- (9) Buchy, P.; Ascioğlu, S.; Buisson, Y.; Datta, S.; Nissen, M.; Tambyah, P. A.; Vong, S. Impact of Vaccines on Antimicrobial Resistance. *Int. J. Infect. Dis.* **2020**, *90*, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.10.005>.
- (10) Yang, F.; Shi, K.; Jia, Y.; Hao, Y.; Peng, J.; Qian, Z. Advanced Biomaterials for Cancer Immunotherapy. *Acta Pharmacol. Sin.* **2020**, *0*, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0372-z>.
- (11) Behzadi, E.; Halabian, R.; Hosseini, H. M.; Fooladi, A. A. I. Bacterial Toxin's DNA Vaccine Serves as a Strategy for the Treatment of Cancer, Infectious and Autoimmune Diseases. *Microb. Pathog.* **2016**, *100*, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.09.017>.
- (12) Solinas, C.; Aiello, M.; Migliori, E.; Willard-Gallo, K.; Emens, L. A. Breast Cancer Vaccines: Heeding the Lessons of the Past to Guide a Path Forward. *Cancer Treat. Rev.* **2020**, *84*, 101947. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101947>.
- (13) Jahanafrooz, Z.; Baradaran, B.; Mosafer, J.; Hashemzaei, M.; Rezaei, T.; Mokhtarzadeh, A.; Hamblin, M. R. Comparison of DNA and mRNA Vaccines against Cancer. *Drug Discov. Today* **2020**, *25* (3), 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.003>.
- (14) Liu, T.-Y.; Hussein, W. M.; Jia, Z.; Ziora, Z. M.; McMillan, N. A. J.; Monteiro, M. J.; Toth, I.; Skwarczynski, M. Self-Adjuvanting Polymer–Peptide Conjugates As Therapeutic Vaccine Candidates against Cervical Cancer. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (8), 2798–2806. <https://doi.org/10.1021/bm400626w>.
- (15) Kaslow, D. C.; Black, S.; Bloom, D. E.; Datla, M.; Salisbury, D.; Rappuoli, R. Vaccine Candidates for Poor Nations Are Going to Waste. *Nature* **2018**, *564* (7736), 337–339. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07758-3>.
- (16) Pasquale, A.; Preiss, S.; Silva, F.; Garçon, N. Vaccine Adjuvants: From 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines* **2015**, *3* (2), 320–343. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020320>.
- (17) Garçon, N.; Friede, M. Evolution of Adjuvants Across the Centuries - Chapter 6. In *Plotkin's Vaccines*; 2018; pp 61–74.
- (18) Watkinson, A.; Soliakov, A.; Ganesan, A.; Hirst, K.; LeButt, C.; Fleetwood, K.; Fusco, P. C.; Fuerst, T. R.; Lakey, J. H. Increasing the Potency of an Alhydrogel-Formulated Anthrax Vaccine by Minimizing Antigen-Adjuvant Interactions. *Clin. Vaccine Immunol.* **2013**, *20* (11), 1659–1668. <https://doi.org/10.1128/CVI.00320-13>.
- (19) Visan, L.; Sanchez, V.; Kania, M.; de Montfort, A.; de la Maza, L. M.; Ausar, S. F. Phosphate Substitution in an ALOOH - TLR4 Adjuvant System (SPA08) Modulates the Immunogenicity of Serovar E MOMP from Chlamydia Trachomatis. *Hum. Vaccines Immunother.* **2016**, *12* (9), 2341–2350. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1168958>.
- (20) Egan, P. M.; Belfast, M. T.; Giménez, J. A.; Sitrin, R. D.; Mancinelli, R. J. Relationship between Tightness of Binding and Immunogenicity in an Aluminum-Containing Adjuvant-Adsorbed Hepatitis B Vaccine. *Vaccine* **2009**, *27* (24), 3175–3180. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.054>.
- (21) Hansen, B.; Sokolovska, A.; HogenEsch, H.; Hem, S. L. Relationship between the Strength of Antigen Adsorption to an Aluminum-Containing Adjuvant and the Immune Response. *Vaccine* **2007**, *25* (36), 6618–6624. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.06.049>.
- (22) Hansen, B.; Belfast, M.; Soung, G.; Song, L.; Egan, P. M.; Capen, R.; HogenEsch, H.; Mancinelli, R.; Hem, S. L. Effect of the Strength of Adsorption of Hepatitis B Surface Antigen to Aluminum Hydroxide Adjuvant on the Immune Response. *Vaccine* **2009**, *27* (6), 888–892. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.078>.
- (23) Hansen, B.; Malyala, P.; Singh, M.; Sun, Y.; Srivastava, I.; Hogenesch, H.; Hem, S. L. Effect of the Strength of Adsorption of HIV 1 SF162dV2gp140 to Aluminum-containing Adjuvants on the Immune Response. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100* (8), 3245–3250. <https://doi.org/10.1002/jps.22555>.
- (24) Dey, A. K.; Malyala, P.; Singh, M. Physicochemical and Functional Characterization of Vaccine Antigens and Adjuvants. *Expert Rev. Vaccines* **2014**, *13* (5), 671–685. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.907528>.
- (25) Reed, S. G.; Orr, M. T.; Fox, C. B. Key Roles of Adjuvants in Modern Vaccines. *Nat. Med.* **2013**, *19* (12), 1597–1608. <https://doi.org/10.1038/nm.3409>.
- (26) Fox, C. B.; Kramer, R. M.; Barnes, V. L.; Dowling, Q. M.; Vedvick, T. S. Working Together: Interactions between Vaccine Antigens and Adjuvants. *Ther. Adv. Vaccines* **2013**, *1* (1), 7–20. <https://doi.org/10.1177/2051013613480144>.
- (27) Diamantstein, T.; Wagner, B.; Beyse, I.; Odenwald, M. V.; Schultz, G. Stimulation of Humoral Antibody Formation by Polyanions. The Effect of Polyacrylic Acid on the Primary Immune Response in Mice

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

- Immunized with Sheep Red Blood Cells. *Eur. J. Immunol.* **1971**, 335–340. <https://doi.org/10.1002/eji.1830010506>.
- (28) Kreuter, J.; Haenzel, I. Mode of Action of Immunological Adjuvants: Some Physicochemical Factors Influencing the Effectivity of Polyacrylic Adjuvants. *Infect. Immun.* **1978**, *19* (2), 667–675. <https://doi.org/10.1128/IAI.19.2.667-675.1978>.
- (29) Hilgers, L. A. Th.; Nicolas, I.; Lejeune, G.; Dewil, E.; Strebelle, M.; Boon, B. Alkyl-Esters of Polyacrylic Acid as Vaccine Adjuvants. *Vaccine* **1998**, *16* (16), 1575–1581. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00047-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00047-4).
- (30) Hilgers, L. A. T.; Ghenne, L.; Nicolas, I.; Fochesato, M.; Lejeune, G.; Boon, B. Alkyl-Polyacrylate Esters Are Strong Mucosal Adjuvants. *Vaccine* **2000**, *18* (28), 3319–3325. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00114-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00114-6).
- (31) Kabanov, V. A. From Synthetic Polyelectrolytes to Polymer-Subunit Vaccines. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76* (9), 1659–1677. <https://doi.org/10.1351/pac200476091659>.
- (32) Parker, R.; Deville, S.; Dupuis, L.; Bertrand, F.; Aucouturier, J. Adjuvant Formulation for Veterinary Vaccines: Montanide™ Gel Safety Profile. *Procedia Vaccinol.* **2009**, *1* (1), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2009.07.026>.
- (33) Vialle, R.; Dupuis, L.; Deville, S.; Bertrand, F.; Gaucheron, J.; Aucouturier, J. Microgel Particulate Adjuvant: Characterisation and Mechanisms of Action. *Procedia Vaccinol.* **2010**, *2* (1), 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2010.03.003>.
- (34) Mumford, J. A.; Wilson, H.; Hannant, D.; Jessett, D. M. Antigenicity and Immunogenicity of Equine Influenza Vaccines Containing a Carbomer Adjuvant. *Epidemiol. Infect.* **1994**, *112* (02), 421–437. <https://doi.org/10.1017/S0950268800057848>.
- (35) Gelfi, J.; Pappalardo, M.; Claverys, C.; Peralta, B.; Guérin, J.-L. Safety and Efficacy of an Inactivated Carbopol-Adjuvanted Goose Haemorrhagic Polyomavirus Vaccine for Domestic Geese. *Avian Pathol.* **2010**, *39* (2), 111–116. <https://doi.org/10.1080/03079451003604647>.
- (36) Zhang, J.; Wang, M.; Zhou, N.; Shen, Y.; Li, Y. Evaluation of Carbopol as an Adjuvant on the Effectiveness of Progressive Atrophic Rhinitis Vaccine. *Vaccine* **2018**, *36* (30), 4477–4484. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.023>.
- (37) Cotte, J.-F.; Bouadam, A.; Sordoillet, A.; Jaudinaud, I.; Chambon, V.; Talaga, P. Determination of Molecular Size Parameters and Quantification of Polyacrylic Acid by High Performance Size-Exclusion Chromatography with Triple Detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (8), 2083–2092. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0155-z>.
- (38) Dey, A. K.; Burke, B.; Sun, Y.; Hartog, K.; Heeney, J. L.; Montefiori, D.; Srivastava, I. K.; Barnett, S. W. Use of a Polyanionic Carbomer, Carbopol971P, in Combination with MF59, Improves Antibody Responses to HIV-1 Envelope Glycoprotein. *Vaccine* **2012**, *30* (17), 2749–2759. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.027>.
- (39) Wegmann, F.; Moghaddam, A. E.; Schiffner, T.; Gartlan, K. H.; Powell, T. J.; Russell, R. A.; Baart, M.; Carrow, E. W.; Sattentau, Q. J. The Carbomer-Lecithin Adjuvant Adjuvax Has Potent Immunoactivating Properties and Elicits Protective Adaptive Immunity against Influenza Virus Challenge in Mice. *Clin. Vaccine Immunol.* **2015**, *22* (9), 1004–1012. <https://doi.org/10.1128/0736-14>.
- (40) Bonam, S. R.; Partidos, C. D.; Halmuthur, S. K. M.; Muller, S. An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38* (9), 771–793. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.06.002>.
- (41) Nevagi, R. J.; Skwarczynski, M.; Toth, I. Polymers for Subunit Vaccine Delivery. *Eur. Polym. J.* **2019**, *114*, 397–410. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.03.009>.
- (42) Rigaut, G.; Parisot, A.; De Luca, K.; Andreoni, C.; Remolue, L.; Garinot, M.; Cotte, J.-F.; Probeck-Quellect, P.; Haensler, J.; Chambon, V.; Talaga, P. Novel Immunogenic Formulations Comprising Linear or Branched Polyacrylic Acid Polymer Adjuvants. Patent WO/2017/218819 2017.
- (43) Bommier, E.; Chapat, L.; Guiot, A. L.; Hilaire, F.; Cariou, C.; Poulet, H.; Pialot, D.; De Luca, K. Multivariate Analysis of the Immune Response to Different Rabies Vaccines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2020**, *220*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109986>.
- (44) O'Brien, R.; Frasca, V.; Arsenaault, M.; Wojtusik, M. J. Aluminum Phosphate Adsorption of Proteins Using Isothermal Titration Calorimetry. *Biophys. J.* **2011**, *100* (3), 553a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.3220>.

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

- (45) Kim, K. H.; Lee, E. K. Biothermodynamic Analysis of BSA Adsorption to Alum Gel Using Isothermal Titration Calorimetry. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2007**, *12* (4), 366. <https://doi.org/10.1007/BF02931058>.
- (46) Lounis, F. M.; Chamieh, J.; Leclercq, L.; Gonzalez, P.; Geneste, A.; Prelot, B.; Cottet, H. Interactions between Oppositely Charged Polyelectrolytes by Isothermal Titration Calorimetry: Effect of Ionic Strength and Charge Density. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (12), 2684–2694. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b11907>.
- (47) Yang, Y.; Zhao, Q.; Li, Z.; Sun, L.; Ma, G.; Zhang, S.; Su, Z. Stabilization Study of Inactivated Foot and Mouth Disease Virus Vaccine by Size-Exclusion HPLC and Differential Scanning Calorimetry. *Vaccine* **2017**, *35* (18), 2413–2419. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.037>.
- (48) Wei, Y.; Xiong, J.; Larson, N. R.; Iyer, V.; Sanyal, G.; Joshi, S. B.; Volkin, D. B.; Middaugh, C. R. Effect of 2 Emulsion-Based Adjuvants on the Structure and Thermal Stability of Staphylococcus Aureus Alpha-Toxin. *J. Pharm. Sci.* **2018**, *107* (9), 2325–2334. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.05.019>.
- (49) Siguier, J. P.; Major, M.; Baland, O. Development of a New Method to Characterize (SMBV™) Antigen Formulations Using Surface Plasmon Resonance Technology. *Int. J. Pharm.* **2002**, *242* (1–2), 411–415. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00227-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00227-2).
- (50) Seyrek, E.; Hattori, T.; Dubin, P. L. Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis for Protein-Polyelectrolyte Binding Studies. In *Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides*; Strega, M. A., Lagu, A. L., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2004; pp 217–228. <https://doi.org/10.1385/1-59259-798-X:217>.
- (51) Lounis, F. M.; Chamieh, J.; Leclercq, L.; Gonzalez, P.; Cottet, H. Modelling and Predicting the Interactions between Oppositely and Variously Charged Polyelectrolytes by Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis. *Soft Matter* **2016**, *12* (48), 9728–9737. <https://doi.org/10.1039/C6SM01811D>.
- (52) Zou, T.; Oukacine, F.; Le Saux, T.; Cottet, H. Neutral Coatings for the Study of Polycation/Multicharged Anion Interactions by Capillary Electrophoresis: Application to Dendrigrft Poly- L -Lysines with Negatively Multicharged Molecules. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (17), 7362–7368. <https://doi.org/10.1021/ac101473g>.
- (53) Østergaard, J.; Khanbolouki, A.; Jensen, H.; Larsen, C. Complexation between Low-Molecular-Weight Cationic Ligands and Negatively Charged Polymers as Studied by Capillary Electrophoresis Frontal Analysis. *Electrophoresis* **2004**, *25* (1819), 3168–3175. <https://doi.org/10.1002/elps.200406051>.
- (54) Jensen, H.; Østergaard, J.; Thomsen, A. E.; Hansen, S. H. CE Frontal Analysis Based on Simultaneous UV and Contactless Conductivity Detection: A General Setup for Studying Noncovalent Interactions. *Electrophoresis* **2007**, *28* (3), 322–327. <https://doi.org/10.1002/elps.200600365>.
- (55) Gao, J. Y.; Dubin, P. L.; Muhoherac, B. B. Measurement of the Binding of Proteins to Polyelectrolytes by Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (15), 2945–2951. <https://doi.org/10.1021/ac970026h>.
- (56) Hattori, T.; Hallberg, R.; Dubin, P. L. Roles of Electrostatic Interaction and Polymer Structure in the Binding of β -Lactoglobulin to Anionic Polyelectrolytes: Measurement of Binding Constants by Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis. *Langmuir* **2000**, *16* (25), 9738–9743. <https://doi.org/10.1021/la000648p>.
- (57) Sisavath, N.; Leclercq, L.; Le Saux, T.; Oukacine, F.; Cottet, H. Study of Interactions between Oppositely Charged Dendrigrft Poly-L-Lysine and Human Serum Albumin by Continuous Frontal Analysis Capillary Electrophoresis and Fluorescence Spectroscopy. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1289*, 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.016>.
- (58) Sisavath, N.; Le Saux, T.; Leclercq, L.; Cottet, H. Effect of Dendrimer Generation on the Interactions between Human Serum Albumin and Dendrigrft Polylysines. *Langmuir* **2014**, *30* (15), 4450–4457. <https://doi.org/10.1021/la5002144>.
- (59) Cooper, C. L.; Dubin, P. L.; Kayitmazer, A. B.; Turksen, S. Polyelectrolyte-Protein Complexes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2005**, *10* (1–2), 52–78. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.05.007>.
- (60) Gao, J. Y.; Dubin, P. L.; Muhoherac, B. B. Capillary Electrophoresis and Dynamic Light Scattering Studies of Structure and Binding Characteristics of Protein-Polyelectrolyte Complexes. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (28), 5529–5535. <https://doi.org/10.1021/jp980507k>.
- (61) Jia, Z.; Ramstad, T.; Zhong, M. Determination of Protein-Drug Binding Constants by Pressure-Assisted Capillary Electrophoresis (PACE)/Frontal Analysis (FA). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30* (3), 405–413. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00223-6](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00223-6).
- (62) Østergaard, J.; Heegaard, N. H. H. Capillary Electrophoresis Frontal Analysis: Principles and Applications for the Study of Drug-Plasma Protein Binding. *Electrophoresis* **2003**, *24* (17), 2903–2913. <https://doi.org/10.1002/elps.200305526>.

Chapitre II. Etude des interactions antigènes/adjuvants par FACCE

- (63) Le Saux, T.; Varenne, A.; Perreau, F.; Siret, L.; Duteil, S.; Duhau, L.; Gareil, P. Determination of the Binding Parameters for Antithrombin–Heparin Fragment Systems by Affinity and Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1132* (1–2), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.092>.
- (64) Sun, H.; He, P. Characterization of Interaction between Doxycycline and Human Serum Albumin by Capillary Electrophoresis-Frontal Analysis. *Electrophoresis* **2009**, *30* (11), 1991–1997. <https://doi.org/10.1002/elps.200800470>.
- (65) Østergaard, J.; Schou, C.; Larsen, C.; Heegaard, N. H. H. Evaluation of Capillary Electrophoresis-Frontal Analysis for the Study of Low Molecular Weight Drug-Human Serum Albumin Interactions. *Electrophoresis* **2002**, *23* (17), 2842–2853. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200209\)23:17<2842::AID-ELPS2842>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200209)23:17<2842::AID-ELPS2842>3.0.CO;2-B).
- (66) Østergaard, J.; Schou, C.; Larsen, C.; Heegaard, N. H. H. Effect of Dextran as a Run Buffer Additive in Drug–Protein Binding Studies Using Capillary Electrophoresis Frontal Analysis. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (2), 207–214. <https://doi.org/10.1021/ac0261146>.
- (67) Hattori, T.; Kimura, K.; Seyrek, E.; Dubin, P. L. Binding of Bovine Serum Albumin to Heparin Determined by Turbidimetric Titration and Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **2001**, *295* (2), 158–167. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5129>.
- (68) Le Saux, T. Détermination Des Paramètres d’interaction Non-Covalente En Solution Par Les Méthodes Électrophorétiques Capillaires. Champ d’application et Performances. Rationalisation Des Protocoles, Ph.D. Dissertation, Pierre and Marie Curie University, Paris, 2004.
- (69) Sisavath, N. Etude Des Interactions En Solution Par Électrophorèse Capillaire : Application Au Cas Des Dendrimères Greffés de La Lysine, Ph.D. Dissertation, University of Montpellier, Montpellier, 2014.
- (70) Lounis, F. M.; Chamieh, J.; Gonzalez, P.; Cottet, H.; Leclercq, L. Prediction of Polyelectrolyte Complex Stoichiometry for Highly Hydrophilic Polyelectrolytes. *Macromolecules* **2016**, *49* (10), 3881–3888. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b00463>.
- (71) Wu, F.-G.; Jiang, Y.-W.; Sun, H.-Y.; Luo, J.-J.; Yu, Z.-W. Complexation of Lysozyme with Sodium Poly(Styrenesulfonate) via the Two-State and Non-Two-State Unfoldings of Lysozyme. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (45), 14382–14392. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b07277>.
- (72) Dubey, S.; Kalia, Y. N. Non-Invasive Iontophoretic Delivery of Enzymatically Active Ribonuclease A (13.6kDa) across Intact Porcine and Human Skins. *J. Controlled Release* **2010**, *145* (3), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.020>.
- (73) Łapińska, U.; Saar, K. L.; Yates, E. V.; Herling, T. W.; Müller, T.; Challa, P. K.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J. Gradient-Free Determination of Isoelectric Points of Proteins on Chip. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (34), 23060–23067. <https://doi.org/10.1039/C7CP01503H>.
- (74) Girardot, M. Aptamères et Électrophorèse Capillaire : Caractérisation Physico-Chimique d’aptamères Libres En Solution Ou Greffés Sur Des Nanoparticules, et Étude de Leur Affinité Avec Une Cible Protéique En Vue de Leur Emploi Pour Des Méthodes Sensibles de Diagnostic, Ph.D. Dissertation, Pierre and Marie Curie University, Paris, 2010.
- (75) Seyrek, E.; Dubin, P. L.; Tribet, C.; Gamble, E. A. Ionic Strength Dependence of Protein-Polyelectrolyte Interactions. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (2), 273–282. <https://doi.org/10.1021/bm025664a>.
- (76) Qin, L.; Xu, Y.; Han, H.; Liu, M.; Chen, K.; Wang, S.; Wang, J.; Xu, J.; Li, L.; Guo, X. β -Lactoglobulin (BLG) Binding to Highly Charged Cationic Polymer-Grafted Magnetic Nanoparticles: Effect of Ionic Strength. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *460*, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.08.056>.
- (77) Wang, X.; Zheng, K.; Si, Y.; Guo, X.; Xu, Y. Protein–Polyelectrolyte Interaction: Thermodynamic Analysis Based on the Titration Method †. *Polymers* **2019**, *11* (1), 82. <https://doi.org/10.3390/polym11010082>.

Chapitre III. Etude des interactions antigens / adjuvants par analyse de dispersion de Taylor : caractérisation de la taille et paramètres de liaison

Le couple antigène-adjuvant étudié dans le chapitre 1 a été, dans un second temps, étudié par analyse de la dispersion de Taylor (TDA). Dans le cas d'un mélange composé de deux populations de taille différente (antigène libre et antigène lié à l'adjuvant), si les échanges sont lents entre les antigènes libres et complexés, la TDA permet d'obtenir le rayon hydrodynamique des deux populations individuelles constituant le mélange.¹ D'autre part, il a été montré que la TDA peut également permettre de quantifier l'antigène libre à l'équilibre contenu dans le mélange.² L'accès à la concentration en antigène libre permet de tracer une isotherme d'adsorption et d'accéder aux paramètres d'interactions (stœchiométrie, constante d'interaction). A notre connaissance, aucune étude n'est allée jusqu'à la détermination des paramètres d'interaction entre deux espèces de charges opposées par TDA. L'objectif de ce travail est d'utiliser la TDA pour obtenir simultanément la taille des complexes antigène/adjuvant et des informations sur les paramètres d'interaction.

- (1) Cottet, H.; Biron, J.-P.; Cipelletti, L.; Matmour, R.; Martin, M. Determination of Individual Diffusion Coefficients in Evolving Binary Mixtures by Taylor Dispersion Analysis: Application to the Monitoring of Polymer Reaction. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (5), 1793–1802. <https://doi.org/10.1021/ac902397x>.
- (2) Leclercq, L.; Reinhard, S.; Chamieh, J.; Döblinger, M.; Wagner, E.; Cottet, H. Fast Characterization of Polyplexes by Taylor Dispersion Analysis. *Macromolecules* **2015**, *48* (19), 7216–7221. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01824>.

Article 2. Antigen-adjuvant interactions in vaccines by Taylor dispersion analysis: size characterization and binding parameters

Camille Malburet^{1,2}, Laurent Leclercq¹, Jean-François Cotte², Jérôme Thiebaud², Sergio Marco², Marie-Claire Nicolai², Hervé Cottet^{1*}

¹ IBMM, University of Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

² Sanofi Pasteur, Analytical Sciences, 1541 avenue Marcel Mérieux, 69280, Marcy l'Etoile, France.

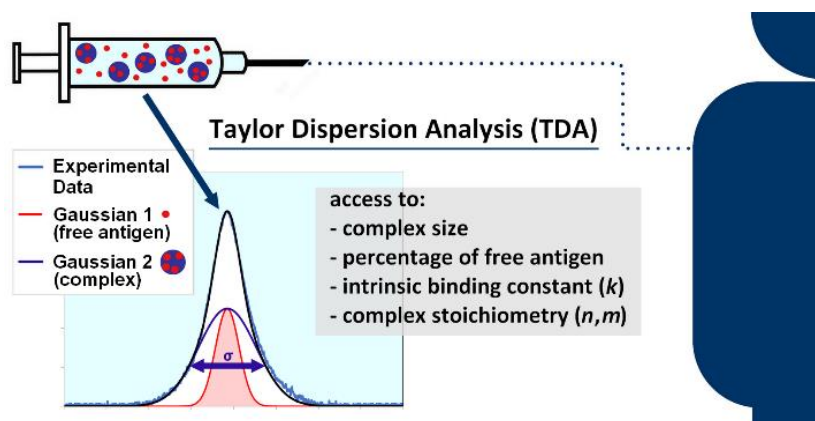
* Corresponding author: herve.cottet@umontpellier.fr

Analytical Chemistry **2021**, 93, 16, 6508–6515

Abstract

Vaccine adjuvants are immunostimulatory substances used to improve and modulate the immune response induced by antigens. A better understanding of the antigen-adjuvant interactions is necessary to develop future effective vaccine. In this study, Taylor dispersion analysis (TDA) was successfully implemented to characterize the interactions between a polymeric adjuvant (poly(acrylic acid), SPA09) and a vaccine antigen in development for the treatment of *Staphylococcus aureus*. TDA allowed to rapidly determine both (i) the size of the antigen-adjuvant complexes under physiological conditions, and (ii) the percentage of free antigen in the adjuvant/antigen mixture at equilibrium, and finally get the interaction parameters (stoichiometry and binding constant). The complex sizes obtained by TDA were compared to the results obtained by transmission electron microscopy (TEM) and the binding parameters were compared to results previously obtained by frontal analysis continuous capillary electrophoresis (FACCE).

Graphical abstract



1 Introduction

Used for over 100 years, vaccination remains one of the most impactful developments of modern medicine, allowing today to prevent several infections that once plagued humanity¹. Yet, many infectious diseases are still lacking effective treatment and new diseases are emerging every year. Furthermore, vaccines have now the potential to not only prevent infectious diseases but also treat diseases such as cancer and neurodegenerative disorders²⁻⁴.

Most vaccines in development are based on well-defined purified antigens. However, the immune response induced by these purified antigens alone is often insufficient^{5,6}. The induction of an immune response of sufficient magnitude and duration may require the co-administration of an adjuvant. An adjuvant is an immunostimulatory substance used to modulate and enhance the immune response induced by an antigen⁷. Therefore, the development of new adjuvants goes hand in hand with the development of new vaccines. Choosing a suitable adjuvant to increase the immune response of a new antigen is often complex since knowledge about adjuvant activity is still limited⁸. Ideally, future vaccines should be developed with adjuvants of predictable activity. To reach that goal, the development of new analytical methods allowing to characterize antigen-adjuvant interactions is crucial to better understand the mode of action of the adjuvants and to improve the effectiveness of future vaccines.

Among other parameters, the size of the antigen-adjuvant complexes has been shown to have a significant impact on the immunity^{9,10}. Some analytical techniques are already commonly used to study the size of proteins and their complexes with adjuvants: dynamic light scattering (DLS), size exclusion chromatography (SEC) coupled with multiple detections, analytical ultracentrifugation (AUC) and direct visualization techniques, such as transmission electron microscopy (TEM). However, all of these techniques have their own limitations, as the sensitivity to small quantities of larger molecules or dusts for DLS, the expensive cost of the instrumentation for AUC or TEM, the undesirable interactions with stationary phase and abnormal elution profiles for SEC and the long duration of analysis.

Taylor dispersion analysis (TDA) has recently paid more and more attention and appears as a competitive and alternative technique for the determination of diffusion coefficients and

Chapitre III. Etude des interactions antigènes/adjuvants par TDA

hydrodynamic *radii* of proteins, macromolecules, nanoparticles, and their assemblies¹¹⁻¹⁷. TDA is an absolute method based on the analysis of the dispersion of a solute plug in a capillary under a laminar Poiseuille flow, due to the combined action of convection and molecular diffusion. From the elution profile, it is possible to determine the molecular diffusion coefficient (D) and therefore the hydrodynamic radius (R_h) of solutes ranging from angstroms to submicrons^{18,19}. In the case of mixtures composed of two populations of different sizes, which are both stable at the time scale of the analysis, TDA signal is the sum of two Gaussian peaks. The fitting of the elution profile allows to get the hydrodynamic radius of the two individual populations constituting the mixture and their relative proportions^{20,21}. The access to the free ligand proportion allows to determine the isotherm of adsorption, and by curve fitting, the parameters of interaction (intrinsic binding constant and stoichiometry of interaction)²². TDA can also be used to study substrate/ligand interactions at equilibrium, when the two entities in interaction are in fast exchange at the time scale of the analysis. Due to fast kinetics of exchange, the taylorgram is a simple Gaussian peak which can be fitted to determine the binding constant by monitoring the change in diffusivity (or size) according to the ligand concentration introduced into the capillary²³⁻²⁷.

Polymers including acrylic acid units have been used as vaccine adjuvant since the 1970s²⁸. Since then, high molecular weight, crosslinked polyacrylic acid polymers are used as effective adjuvants in several veterinary vaccines^{29,30} and are studied for the development of new human vaccines^{31,32}. SPA09 is a purified linear polyacrylic acid (PAA) polymer, which has been identified as a promising human adjuvant^{33,34}. *Staphylococcus aureus* is the most frequently isolated bacterial pathogen from patients with hospital-acquired infections³⁵. Treatment of *Staphylococcus aureus* infections is challenging as the strains are increasingly resistant to antibiotics. To counter antibiotic resistance new treatment strategies need to be developed with a focus on vaccine development^{36,37}. After a method optimization using three model proteins (Cyt C, RNase A and BSA), TDA was successfully implemented to determine the size of the complexes and the interaction parameters between a polymeric adjuvant (SPA09) and a vaccine antigen in development for the treatment of *Staphylococcus aureus* (PrSA).

2 Experimental section

2.1 Chemicals and Materials

SPA09³³ (PAA, $M_w = 590$ kDa, $PDI = 2.2$) at 17.8 g/L and PrSA (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase from *S. aureus*, $M_w = 35$ kDa, $pI = 9$) at 1.6 g/L were provided by Sanofi Pasteur (Marcy-l'Étoile, France) in phosphate-buffered saline buffer (PBS). Cytochrome C from bovine heart (Cyt C, $M_w = 12$ kDa, $pI = 10$), ribonuclease A from bovine pancreas (RNase A, $M_w = 14$ kDa, $pI = 9$), bovine serum albumin (BSA, $M_w = 66$ kDa, $pI = 5$), TRIS ((CH₂OH)₃CNH₂, $M_w = 121$ g/mol), hydroxypropyl cellulose (HPC, $M_w = 1 \times 10^5$ g/mol), phosphoric acid (H₃PO₄, $M_w = 98$ g/mol) and monobasic sodium phosphate (NaH₂PO₄, $M_w = 120$ g/mol) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Dimethylformamide (DMF, $M_w = 73$ g/mol) was purchased from Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, France). Bare fused silica capillaries were purchased from Molex Polymicro Technologies (Phoenix, USA). Polyvinyl Alcohol (PVA) and Polyethylene glycol (DB-WAX) coated capillaries were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Deionized water was further purified with a Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France). The SPA09 provided by Sanofi-Pasteur was dialyzed against Milli-Q water in order to eliminate the PBS buffer using Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 3 500 M_wCO (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), and then freeze-dried. All the other chemicals were used without any further treatment.

2.2 Sample preparation

Stock solutions of Cyt C, RNase A and BSA were prepared at 3.2 g/L in TRIS buffer (20 mM TRIS, 148 mM NaCl) at pH 7.4. PrSA was provided at 1.6 g/L in PBS buffer (10 mM PBS, 150 mM NaCl) at pH 7.2. Two stock solutions of SPA09 at 2 g/L were prepared: one in TRIS buffer at pH 7.4 and one in PBS buffer at pH 7.2. All the stock solutions were subsequently diluted to the desired concentrations in TRIS or PBS buffer. The antigen-adjuvant mixtures ($\times 1$) were obtained by mixing 150 μ L of antigen solution and 150 μ L of adjuvant solution. The diluted mixtures ($\times 0.75$) were prepared by taking 150 μ L of the mixtures ($\times 1$) and adding 50 μ L of the analysis buffer. Final solutions were homogenized by manual agitation before analysis.

2.3 Capillary coating

Bare fused silica capillaries of 100 μm i.d. \times 58.5 cm total length (50 cm to the detector) were used. Capillaries coatings were performed based on a previously published protocol³⁸. HPC was dissolved in water at room temperature to a final concentration of 5% (w/w). The capillaries were flushed 30 min with the polymer solution using the capillary electrophoresis system and then heated in a gas chromatography oven (GC-14 A, Shimadzu, France) under a nitrogen stream of 30 kPa. The temperature program was: 60°C for 10 min, then a 5°C/min gradient from 60°C to 140°C and finally, 140°C for 20 min. Before use and between two samples, the coated capillaries were rinsed 4 min with water and then 4 min with the analysis buffer.

2.4 TDA

All experiments were carried out on a 7100 CE Agilent system (Waldbronn, Germany). This system is equipped with a diode array detector (DAD). The temperature of the capillary cartridge was set at 25°C. TDA experiments were performed in triplicates using 12 mbar mobilization pressure in the frontal mode (continuous injection of the sample in a capillary prefilled with the background electrolyte). The fronts obtained by TDA experiment were derived using Origin software (version 6.0). In case of antigen-adjuvant mixtures analysis, the first derivative of the elution profile was then fitted with two Gaussian functions having the same maximum at a time t_0 corresponding to the maximum of the derived signal, using a home-developed Excel spreadsheet and the Excel solver. The curve fitting was done only on the left part of the first derivative of the elution front, as residual adsorption can distort the right side of the signal. More details about the theoretical background on TDA are given in section 1 of the supporting information.

2.5 Transmission electron microscopy (TEM)

Solutions of RNase A and SPA09 were prepared at 8 mg/L and 20 mg/L respectively in TRIS buffer (20 mM TRIS, 150 mM NaCl) at pH 7.4. Antigen-adjuvant mixture was prepared by diluting in TRIS buffer a 50/50 (v/v) mixture of RNase A and SPA09 initially at 0.4 g/L and 1 g/L respectively, to a concentration of 8 mg/L and 20 mg/L respectively.

Chapitre III. Etude des interactions antigènes/adjuvants par TDA

3 μL of the samples were adsorbed onto a carbon continuous coated 300 mesh copper grid (EM Sciences, USA) and incubated for 1 min, the copper grid was previously ionized 90 s with an ELMO ionizer (Cordouan, France). The excess of solutions was removed with filter paper. Then the samples were negatively stained using 2% uranyl acetate. The samples were subsequently air-dried prior to imaging. Electron microscopy data were acquired on a FEI Tecnai G20 (ThermoFisher Scientific, USA) transmission electron microscope operated at 200 kV with a magnification of 50000 \times . All micrographs were recorded at electron doses between 10 and 15 $\text{e}^-/\text{\AA}^2$ using a Ultrascan 4k x 4k slow-scan CCD camera (Gatan, USA).

Micrographs statistical analysis was performed using ImageJ processing program³⁹ by using an automatic thresholding and ellipse fitting to determine minimum and maximum ellipse diameters. The following procedure was used to compare TEM measurements to Taylor diffusion values: (i) minor and major ellipse diameter frequency distributions were calculated between 0 and 72 nm with a 2 nm step; (ii) the frequency distribution of circular objects was determined as the product of the probability of occurrence of a given diameter for each axis of the ellipse; (iii) each frequency was weighted by the total sum of the values; (iv) diameter values were transformed in radius.

3 Results and discussion

3.1 Development and optimization of TDA for the study of antigen/adjuvant interactions

In a first series of experiments, SPA09 adjuvant, the model proteins and PrSA were analyzed separately. TDA analyses were carried out in frontal mode and the first derivatives were fitted according to equation (S1), (see section S1). Compared to plug mode, frontal mode showed a better sensitivity of detection, a better repeatability of the elution profiles and a better symmetry of the elution profile. An hydrodynamic radius (R_h) of 23 ± 3 nm was determined for SPA09, 1.8 ± 0.1 nm for Cyt C, 2.1 ± 0.1 nm for RNase A and 3.5 ± 0.2 nm for PrSA (see Table 1), according to equations (S-3 and S-4). The results obtained for the model proteins Cyt C and RNase A are consistent with the values found in literature^{40,41}. In a second set of experiments, Cyt C-SPA09 interactions were studied by injecting a mixture of 0.8 g/L Cyt C and 1 g/L SPA09 in 20 mM TRIS,

Chapitre III. Etude des interactions antigènes/adjuvants par TDA

148 mM NaCl, pH 7.4 (thereafter called TRIS buffer). The signal obtained by the first derivative of the elution profile was not symmetrical, as seen in Figure 1A. As the size of the Cyt C / SPA09 complexes was not known, this asymmetrical shape could suggest a partial non-Taylor regime, which can occur for large entities when the analysis time is close or smaller than the characteristic diffusion time in the cross-section of the capillary (i.e. when equation (S6) is not verified)¹⁹. Thus, different hydrodynamic pressures have been tested to observe the evolution of the peak shape and symmetry, and different capillary coatings have been also tested to verify that the peak deformation was not due to interactions onto the capillary wall. Figure S2 shows that whatever the hydrodynamic pressure applied, the selected capillary coating (DBWAX, PVA, HPC) or the capillary i.d (50, 75, 100 μm); a deformation of the peak symmetry was observed. These results suggested that the peak deformation was not due to adsorption, nor to convective non-Taylor conditions (i.e. large solutes) since the deformation was still observed for smaller capillary i.d. Lastly, we found that this deformation was due to the difference in composition between the analyzed sample mixture that is continuously introduced in the capillary and the buffer that pre-fill the capillary before injection. As a matter of fact, the addition of SPA09 significantly modifies the viscosity and the ionic strength of the buffer. Moreover, the Cyt C-SPA09 complex is out of equilibrium in the front of the elution profile by dilution effect due to the inherent dispersion during the Taylor analysis. To avoid this effect, and notably to limit the perturbation of the equilibrium, the capillary was first filled with a diluted Cyt C-SPA09 mixture ($\times 0.75$ dilution with the buffer) before injecting the non-diluted ($\times 1$) Cyt C-SPA09 mixture, as shown in Figure 1B. The derivative of the second front obtained is symmetrical and can be subsequently used to determine the size of the constituents of the mixture.

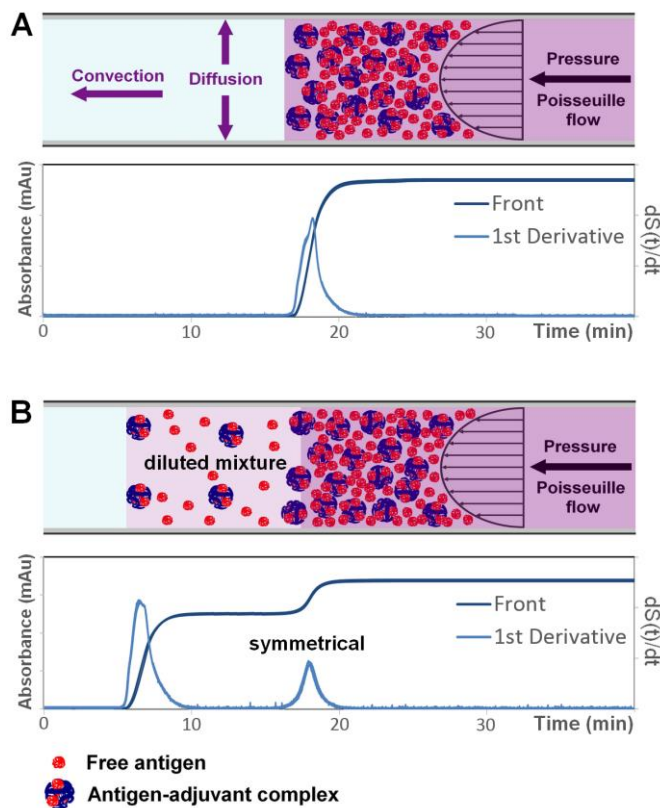


Figure 1: Schematic representation of the Taylor dispersion analysis of antigen-adjvant mixtures in frontal mode (up) and the corresponding experimental UV traces (down) (triplicate overlays). The capillary is previously filled with the buffer before injection of the concentrated front ($\times 1$) (A). A first front of the diluted mixture ($\times 0.75$) is injected before the injection of the concentrated antigen-adjvant mixture ($\times 1$) (B). Experimental conditions: HPC-coated capillary of 58.5 cm total length (50 cm to the UV detector) \times 100 μm i.d. Buffer: 20 mM TRIS, 148 mM NaCl, pH 7.4. Mobilization pressure: 12 mbar. UV detection: 214 nm. Temperature: 25°C. Concentration in the final mixture ($\times 1$): 0.8 g/L Cyt C, 1 g/L SPA09 in the TRIS/NaCl buffer.

3.2 Determining the complex size and the free antigen concentration

Two Gaussian curves were required at 214 nm to get a good fitting of the first derivative of the frontal elution profile obtained between ($\times 0.75$) and ($\times 1$) Cyt C-SPA09 mixtures (see Figure 2A and 2B). This bimodal distribution corresponds to the coexistence of Cyt C-SPA09 complex and free Cyt C antigen, as SPA09 does not absorb at 214 nm. The detection of two distinct peaks for each population proves that the kinetics of dissociation of the complex is slow compared to the time scale of the analysis (~ 15 -20 min). Regarding the sizes of the components in the mixture, one of the two Gaussian peaks led to a hydrodynamic radius of 1.8 ± 0.1 nm, which corresponds to the size of the free Cyt C (see Table 1). The second Gaussian peak led to a size of 12.5 ± 0.2 nm for

the Cyt C-SPA09 complex. The fit is only performed on the left side of the Taylorgrams as the right side may be disturbed by adsorption. Fitting the right part of the Taylorgram could lead to overestimated R_h .

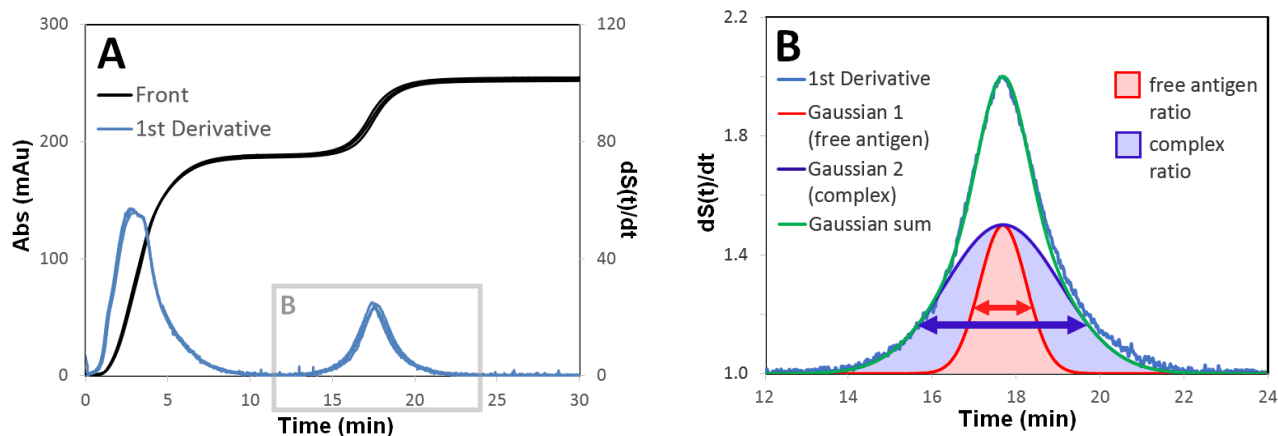


Figure 2: Frontal mode Taylorgram and its first derivative (triplicate overlays) obtained for the successive continuous injection of a ($\times 0.75$) and ($\times 1$) Cyt C-SPA09 mixture (A) and the corresponding zoom (B). Graph (B) shows the fit of the first derivative of the Taylorgram with two Gaussian functions according to equation (S2). Experimental conditions as in Figure 1.

It is worth to highlight that the determination of the hydrodynamic radius R_h was obtained using the Stokes–Einstein relation (see equation (S4)), and thus requires the bulk viscosity. This macroscopic viscosity increases of about 1.5 times due to the presence of 1 g/L SPA09 polymer adjuvant in the buffer ($\eta_{\text{TRIS}} = 0.90$ cP; $\eta_{\text{SPA09}(\times 0.75)} = 1.26$ cP; $\eta_{\text{SPA09}(\times 1)} = 1.37$ cP). Therefore, the question arises about which apparent viscosity value should be used for the application of the Stokes-Einstein equation in the case of frontal TDA analysis between ($\times 0.75$) and ($\times 1$) diluted sample mixtures. To answer that question, the size determination of two test molecules (BSA and DMF) was performed in both TRIS buffers with and without SPA09 (see Figure S3). Indeed at pH 7.4, these test molecules do not interact with SPA09 as DMF is a small neutral molecule and BSA is negatively charge ($pI = 4.8-5.6^{42}$) as SPA09. The results demonstrate that the size of BSA and DMF obtained in TRIS (3.5 nm and 0.25 nm, respectively) are recovered in the presence of SPA09 in the medium with the viscosity value of the diluted mixture ($\times 0.75$), i.e. the mixture which is first introduced in the capillary (see Table S1). Taking the viscosity of the ($1\times$) diluted mixture would lead to about 10% lower R_h values than the expected one. Reversely, taking the viscosity of the TRIS buffer would overestimate the R_h value by a factor of +40%.

Chapitre III. Etude des interactions antigènes/adjuvants par TDA

The same methodology was applied to the RNase A-SPA09 mixture and to the PrSA-SPA09 mixture. Knowing the size of the antigens alone, the temporal variance of one Gaussian was fixed in order to reduce the number of degrees of freedom for the curve fitting. The Peclet number (P_e) and the characteristic time (τ) were calculated to check the validity of the TDA calculations. As detailed in Table 1, the calculations were validated since $\tau > 1.25$ and $P_e > 40$ ^{43,44} (see equations (S5) and (S6)). The hydrodynamic radius of the antigen-adjuvant complexes, the percentage of free antigen in the mixtures and the average number (resp. mass) of antigen bound per adjuvant molecule (\bar{n}) (resp. \bar{m}), for 0.4 g/L antigen / 1 g/L SPA09 mixtures are reported in Table 1. The average number of bound antigens per adjuvant molecule \bar{n} was calculated using the free antigen concentration $[L]$ at equilibrium in the mixture, according to equation (1):

$$\bar{n} = \frac{[L]_{bound}}{[S]_0} = \frac{[L]_0 - [L]}{[S]_0} = \frac{[L]_0 \left(1 - \frac{A_1}{A_1 + A_2}\right)}{[S]_0} \quad (1)$$

where $[L]_{bound}$ is the molar concentration of the bound antigen, $[S]_0$ is the initial SPA09 molar concentration in the mixture, $[L]_0$ is the initial molar antigen concentration in the mixture, A_1 is the free antigen peak area and A_2 the complexed antigen peak area obtained from the Taylorgram fitting (see equation (S2)). At equilibrium, in these mixtures in physiological conditions, an average number of about $\bar{n} = 11-13$ antigens per adjuvant SPA09 molecule ($\bar{m} \sim 3$ g antigen per g of SPA09) was determined for RNase A and Cyt C, while 5 PrSA antigens were quantified per SPA09 molecule ($\bar{m} \sim 3$ g antigen per g of SPA09). The sizes of the complexes were similar for the three antigens (~ 12 nm). The percentage of free antigen determined was similar for Cyt C and RNase A ($\sim 33\%$) and lower for PrSA ($\sim 21\%$).

Chapitre III. Etude des interactions antigènes/adjuvants par TDA

Table 1: Molar mass (M), weight-average hydrodynamic radius (R_h) of the antigens and of the antigen-adjuvant complexes, percentage of free antigen in the mixtures, the average number (resp. mass) of bound antigens per adjuvant molecule (\bar{n}) (resp. \bar{m}), characteristic time (τ) and Peclet number (P_e) calculated for free antigen and complex, determined from the fitting of the first derivative of the frontal elution profile with two Gaussians (see Figure 2B). Experimental conditions: Buffer: 20 mM TRIS, 148 mM NaCl, pH 7.4 for Cyt C and RNase A. 10 mM PBS, 150 mM NaCl, pH 7.4 for PrSA. Concentrations in the final mixture: 0.4 g/L antigen, 1g/L SPA09. Other experimental conditions as in Figure 1. Experiments were performed in triplicates (error bars = \pm one SD).

	Cyt C+SPA09	RNase A+SPA09	PrSA+SPA09
Free antigen M (kDa)	12	14	35
Free antigen R_h (nm)	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.1	3.5 ± 0.2
Complex R_h (nm)	12.5 ± 0.2	12.3 ± 0.5	11.8 ± 1.9
% free antigen	32.8 ± 2.3	33.1 ± 0.8	21.4 ± 2.7
\bar{n} (mol/mol)	13.3 ± 0.8	11.3 ± 0.1	5.3 ± 0.2
\bar{m} (g/g)	$(2.7 \pm 0.2) \times 10^{-1}$	$(2.7 \pm 0.1) \times 10^{-1}$	$(3.2 \pm 0.1) \times 10^{-1}$
τ (antigen)	41 ± 1	35 ± 1	20 ± 1
P_e (antigen)	317 ± 2	368 ± 4	610 ± 4
τ (complex)	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 1
P_e (complex)	2176 ± 4	2145 ± 8	2045 ± 9

3.3 Size comparison between TDA and TEM

Transmission electron microscopy (TEM) was used as an orthogonal method to compare with the results obtained by TDA. Figure 3A-C shows the micrographs obtained by TEM for RNase A, SPA09 and the mixture of the two components. Figure 3D shows the results of the statistical analysis and gives the distribution of the *radii* of the measured objects. RNase A present a large predominant peak at 2 nm in radius with some larger objects between 4 and 6 nm, which may correspond to groups of dimers-trimers RNase A molecules. These results are consistent with those observed in TDA, giving an average hydrodynamic radius of 2.1 ± 0.1 nm for RNase A (see Table 1). Three peaks are observed for SPA09 on Figure 3D at 13, 17 and 22 nm. These values, taking into account possible artifacts induced by negative staining approach, can be considered close to the average hydrodynamic radius determined by TDA of 23 ± 3 nm. For the RNase A-SPA09 complexes, a peak ranging from 7 to 16 nm with a maximum centered on 12 nm is observed on

Chapitre III. Etude des interactions antigènes/adjuvants par TDA

Figure 3D. These results are in agreement with TDA, giving an average hydrodynamic radius of 12.3 ± 0.5 nm for the same RNase A/SPA09 ratio. In addition to these major forms, large micrometric aggregates in small numbers have been observed by TEM. Overall, the results obtained by the two orthogonal methods are consistent and TEM confirmed that the *radii* of RNase A-SPA09 complexes tend to be smaller than the radius of SPA09 alone, as observed for polyplex formation²¹. The TEM data obtained should however be taken with caution as structural artifacts due to staining, dehydration and imaging under a non-native environment may affect particle size distribution. TEM methodology remains useful and continues to be widely used^{45,46}.

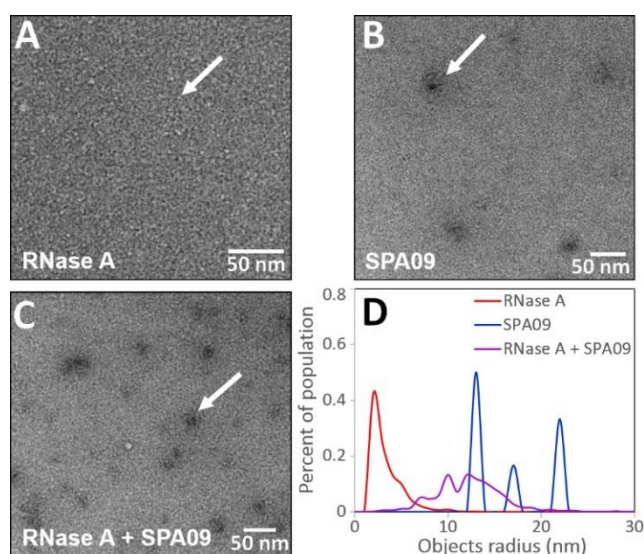


Figure 3: TEM micrographs of RNase A (A), SPA09 (B) and RNase A-SPA09 mixture (C). Chart (D) shows the *radii* distribution of automatic selected objects. Experimental conditions: Samples were prepared in TRIS buffer (20 mM TRIS, 150 mM NaCl) at pH 7.4. RNase A concentration alone (A) and in the mixture (C) is 8 mg/L. SPA09 concentration alone (B) and in the mixture (C) is 20 mg/L. Samples were stained with uranyl acetate. TEM was operated at 200 kV, magnification of 50000 \times , electron doses between 10 and 15 $e^-/\text{\AA}^2$. Arrows point to a selected object example.

3.4 Adsorption isotherms

The access to the percentage of free antigen owing to TDA methodology allows to calculate the average number of bound antigens per adjuvant for different introduced antigen/adjuvant ratios and to plot the adsorption isotherm of the antigens onto the adjuvant. The adsorption isotherm is the graphical representation of the average number of bound antigens per adjuvant \bar{n} as a function of the free antigen concentration $[L]$. Adsorption isotherms of the two model proteins (Cyt C and

Chapitre III. Etude des interactions antigènes/adjuvants par TDA

RNase A) and the vaccine antigen PrSA on SPA09 were plotted in the basis of triplicates analysis on different antigen/adjuvant ratios (see Figure 4A). The raw data (taylorgrams) are displayed in Figure S4. BSA-SPA09 mixtures were also analyzed as a control for the absence of interaction. As expected, 100% of free BSA has been detected in the mixture (single Gaussian curve fitting due to the absence of interaction). For the other antigens, all the taylorgrams were fitted with two Gaussian curves according to equation (S2).

Langmuir adsorption model was used to fit the obtained isotherm. In Langmuir model, it is assumed that the substrate (or adjuvant, S) contains n independent interaction sites of equal energy and the occupation of one site does not influence the occupation of the other. In the framework of this model, the adsorption isotherm is described by equation (2):

$$\bar{n} = \frac{nk[L]}{1+k[L]} \quad (2)$$

where k is the intrinsic binding site constant and n the maximum number of interacting sites. n and k can be obtained by nonlinear curve fitting of the experimental isotherm (see dotted lines in Figure 4A).

When the entire isotherm can be obtained experimentally, the best way to get the interaction parameters is a nonlinear curve fitting. The maximum number of interacting sites n corresponds to the value of \bar{n} at saturation of the isotherm. It can be observed on Figure 4A that the three adsorption isotherms obtained do not display any saturation plateau on the concentration range studied. It is worth noting that it was not possible to further increase the antigen concentration, and thus reach the saturation plateau, due to solubility issues. Thus, the n value could not be directly obtained from the isotherm plateau. However, the slope at the origin of the isotherm can give access to the first successive binding constant $K_I = n \times k$ as demonstrated by the first derivative of equation (3):

$$\lim_{[L] \rightarrow 0} \frac{d\bar{n}}{d[L]} = \lim_{[L] \rightarrow 0} \frac{nk}{(1+k[L])^2} = nk \quad (3)$$

The experimental determination of $K_I = n \times k$ allows a first ranking of the interactions: $K_{I\text{PrSA}} > K_{I\text{Cyt C}} \approx K_{I\text{RNase A}}$, (see Table 2). It should be noted that K_I represents the equilibrium constant

Chapitre III. Etude des interactions antigènes/adjuvants par TDA

between a free substrate (or adjuvant) and a substrate interacting with only one antigen (whatever the position of the antigen on the adjuvant). It should not be confused with k the intrinsic binding site constant, which is the equilibrium constant associated to one interacting site (free vs occupied interacting site). An estimation of the k value, can be derived from the slope of the Scatchard representation which consists in plotting $\frac{\bar{n}}{[L]}$ as a function of \bar{n} according to equation (4):

$$\frac{\bar{n}}{[L]} = nk - k\bar{n} \quad (4)$$

The Scatchard representation obtained for the Cyt C-SPA09, RNase A-SPA09 and PrSA-SPA09 mixtures are presented in Figure 4B. The obtained k values varied between 5.2×10^3 and 8.8×10^4 M^{-1} and ranked as followed: $k_{PrSA} > k_{RNase A} > k_{Cyt C}$. Knowing K_I and k , allows to estimate the total number of interaction sites (n) which varied between 27 for PrSA and 250 for Cyt C. By replacing n and k in the expression of the Langmuir model equation (1), the fits of the isotherms were represented by the dotted lines in Figure 4A, showing good agreement with the experimental points.

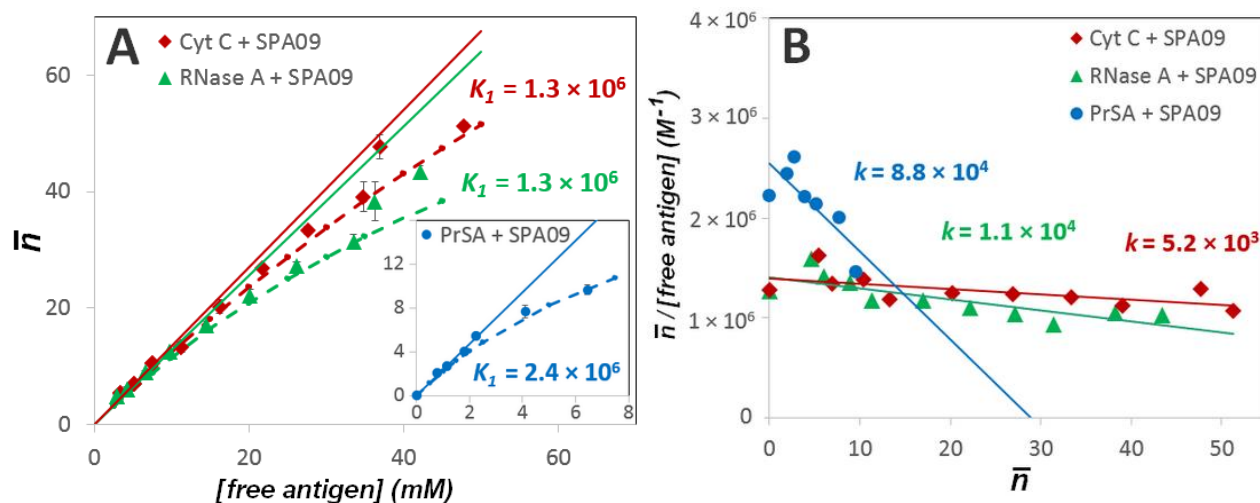


Figure 4: Isotherms of adsorption obtained by TDA for the interaction between Cyt C, RNase A and PrSA and SPA09 adjuvant (A) and the corresponding Scatchard plots (B). The first successive interaction constant $K_1=nk$ is determined from the slope at the origin of the isotherm in Figure 4A. The intrinsic binding site constant k was obtained from the slopes of the Scatchard representation in Figure 4B. Fitting curves (dotted lines represented in Figure 4A) were plotted with the k and n values using Langmuir model of independent sites of equal energy (equation (9)). Introduced concentrations in the mixtures: 1g/L SPA09, Cyt C and RNase A: 0.15; 0.20; 0.30; 0.40; 0.60; 0.80; 1.00; 1.20; 1.40 and 1.60 g/L, PrSA: 0.15; 0.20; 0.35; 0.40; 0.50; 0.60; 0.70 and 0.80 g/L. Other experimental conditions as in Figure 1.

3.5 TDA / FACCE comparison

The interactions between Cyt C, RNase A, PrSA and SPA09 have already been studied in a previous work by frontal analysis continuous capillary electrophoresis (FACCE)²². The binding parameters determined by TDA in this work are compared with those previously obtained by FACCE in Table 2. The percentage of free antigen, the average number of bound antigen per adjuvant molecule \bar{n} and the average mass of bound antigen per g of adjuvant \bar{m} for a 0.4 g/L antigen + 1g/L SPA09 mixture, and the first successive interaction constant K_1 measured by TDA and FACCE were in very good agreement. The values obtained for the intrinsic binding site constant k and the stoichiometry at saturation (expressed in number (n) or in mass (m)) obtained by TDA and FACCE were also comparable even if larger discrepancies could be observed for the n (or m) values, notably for Cyt. C, due to the uncertainty of the determination by extrapolation / linearization. These values nevertheless remained of the same order of magnitude between the two methods.

Chapitre III. Etude des interactions antigènes/adjuvants par TDA

The analyses carried out allows to highlight the advantages and disadvantages of each methodology. One advantage of the FACCE methodology is that it gives direct access to the concentration of free antigen by the measurement of the height of the front. Data analysis is therefore easier and faster. Moreover, in the case of the FACCE it is not necessary to pre-fill the capillary with a diluted fraction (0.75×) of the mixture and thus the sensitivity of detection is better in FACCE. On the other side, TDA gives not only access to the binding parameters (\bar{n} , n , k) but also to the constituents' size (including the complex size), which is not accessible by FACCE. TDA is also more straightforward and more robust, since there is no electric field to apply, no possible electroosmotic flow fluctuations and no redox reactions at the electrodes (i.e. no pH alteration of the analysis sample). In addition, TDA is an absolute method which does not require calibration (neither for the size determination, nor for the ligand free proportion).

Table 2: Comparison of the percentage of free antigen, the average number (resp. mass) of bound antigens per adjuvant molecule (\bar{n} , resp. \bar{m}), the first successive interaction constant K_I , the intrinsic binding site constant k and the stoichiometry of the interaction at saturation expressed in number of interaction sites (n) and in mass ratio (m) obtained by TDA and by FACCE using Langmuir model of independent sites of equal energy. ^a Concentration in the final mixture: 0.4 g/L antigen, 1g/L SPA09. ^b 20 mM TRIS, 148 mM NaCl, pH 7.4^c. 10 mM PBS, 150 mM NaCl, pH 7.2.

	Cyt C+SPA09		RNase A+SPA09		PrSA+SPA09	
	FACCE ^b	TDA ^b	FACCE ^b	TDA ^b	FACCE ^b	TDA ^c
% free antigen ^a	33.9 ± 1.0	32.8 ± 4.3	38.1 ± 1.4	33.1 ± 0.8	29.2 ± 0.7	21.4 ± 2.7
\bar{n} (mol/mol) _a	13.0 ± 0.2	13.3 ± 0.8	10.4 ± 0.2	11.3 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.3 ± 0.2
\bar{m} (g/g) ^a	(2.6 ± 0.1) × 10 ⁻¹	(2.7 ± 0.2) × 10 ⁻¹	(2.5 ± 0.1) × 10 ⁻¹	(2.7 ± 0.1) × 10 ⁻¹	(2.9 ± 0.1) × 10 ⁻¹	(3.2 ± 0.1) × 10 ⁻¹
$K_I = nk$ (M ⁻¹)	(1.2 ± 0.1) × 10 ⁶	(1.3 ± 0.1) × 10 ⁶	(1.1 ± 0.1) × 10 ⁶	(1.3 ± 0.1) × 10 ⁶	(1.5 ± 0.1) × 10 ⁶	(2.4 ± 0.1) × 10 ⁶
k (M ⁻¹)	(8.4 ± 2.1) × 10 ³	(5.2 ± 2.2) × 10 ³	(1.3 ± 0.1) × 10 ⁴	(1.1 ± 0.3) × 10 ⁴	(5.2 ± 2.0) × 10 ⁴	(8.8 ± 2.9) × 10 ⁴
n (mol/mol)	149 ± 51	250 ± 125	86 ± 12	116 ± 42	28 ± 12	27 ± 10
m (g/g)	3.0 ± 1.0	5.1 ± 2.6	2.0 ± 0.3	2.7 ± 1.0	1.7 ± 0.7	1.6 ± 0.6

4 Conclusions

The aim of this work was to develop a new methodology to characterize the interactions between vaccine antigens and adjuvants. TDA method was found to be an excellent way to simultaneously determine the size of the antigen-adjuvant complexes, and the percentage of free antigen in the mixture, under physiological conditions. The determination of percentage of free antigen allowed to plot the adsorption isotherms and determine the binding constants and stoichiometry of the interaction using Langmuir model of independent sites of equal energy. The average hydrodynamic radius of the antigen-adjuvant complexes obtained by TDA were confirmed by TEM measurements (both ~12 nm). The binding parameters (k and n) were compared to those obtained in a previous study by FACCE and were in relatively good agreement. The same methodology could be used with fluorescently labeled antigens to study lower concentrations and stronger binding constant. Due to its simplicity, the absence of size calibration, the low sample consumption and the high degree of automation, TDA has the potential to be a method of reference to characterize antigen-adjuvant interactions in future vaccines.

5 Supporting information

5.1 Theoretical background on TDA

TDA is based on the analysis of the dispersion of a solute plug in a capillary under a laminar Poiseuille flow. Because of the parabolic velocity profile, molecules move along the capillary with different velocities depending to their positions in the tube cross section. The molecules are redistributed along the capillary cross-section owing to molecular diffusion. The combined action of convection and molecular diffusion results in a special form of elution profile named Taylor-Aris dispersion^{47,48}. The temporal variance of the elution profile σ^2 makes it possible to calculate the molecular diffusion coefficient D and therefore the hydrodynamic radius R_h ⁴⁹ of the injected molecules. The elution profile is generally obtained by online UV detection through the capillary at a certain distance from the injection point. σ^2 can be calculated by fitting the elution peak by a Gaussian function, using equation (S1):

$$S(t) = \frac{A_0}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (\text{S1})$$

Chapitre III. Etude des interactions antigènes/adjuvants par TDA

where $S(t)$ is the absorbance signal, t_0 the average elution time, σ^2 the temporal variance and A_0 a constant that depends on the response factor and the injected quantity of solute. t_0 , σ_0^2 and A_0 are the three adjusting parameters obtained by nonlinear least square regression.

For mixtures composed of populations of two different sizes, it is possible to fit the global signal $S(t)$ by the sum of the two Gaussian curves, equation (S1) becomes:

$$S(t) = \frac{A_1}{\sigma_1\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma_1^2}\right) + \frac{A_2}{\sigma_2\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma_2^2}\right) \quad (\text{S2})$$

This fit involves five unknown parameters, namely t_0 , σ_1 , σ_2 , A_1 and A_2 . In the case of an antigen / adjuvant mixture, it is possible to reduce the number of unknown parameters since σ_1 can be measured through a first Taylor experiment with a solution containing only the antigen alone. Also, t_0 is generally directly obtained from the position of the maximum absorbance.

The diffusion coefficient D_i of each solute is related to σ_i^2 by equations (S3):

$$D_i = \frac{R_c^2 t_0}{24\sigma_i^2} \quad (\text{S3})$$

where R_c is the capillary radius. The hydrodynamic radius $R_{h,i}$ is further obtained using the Stokes–Einstein equation (S4):

$$R_{h,i} = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_i} \quad (\text{S4})$$

where k_B is the Boltzmann constant, T the temperature, and η the viscosity of the eluent.

The previous equations (S1-S4) are valid when the conditions (S5) and (S6) are fulfilled, for a relative error on the determination of D lower than 3%^{43,44,50}. The first condition states that the axial diffusion is negligible compared to Taylor dispersion, which leads to equation (S5):

$$P_e = \frac{uR_c}{D} \geq 40 \quad (\text{S5})$$

were P_e is the Peclet number and u is the linear mobile phase velocity. The second condition states that the average elution time must be much longer than the characteristic time of diffusion of the analyte in the cross section of the capillary, which leads to equation (S6):

$$\tau = \frac{Dt_0}{R_c^2} \geq 1.25 \quad (\text{S6})$$

where τ is an adimensional parameter proportional to the characteristic time.

5.2 Gaussian fit of the first derivative of the elution front

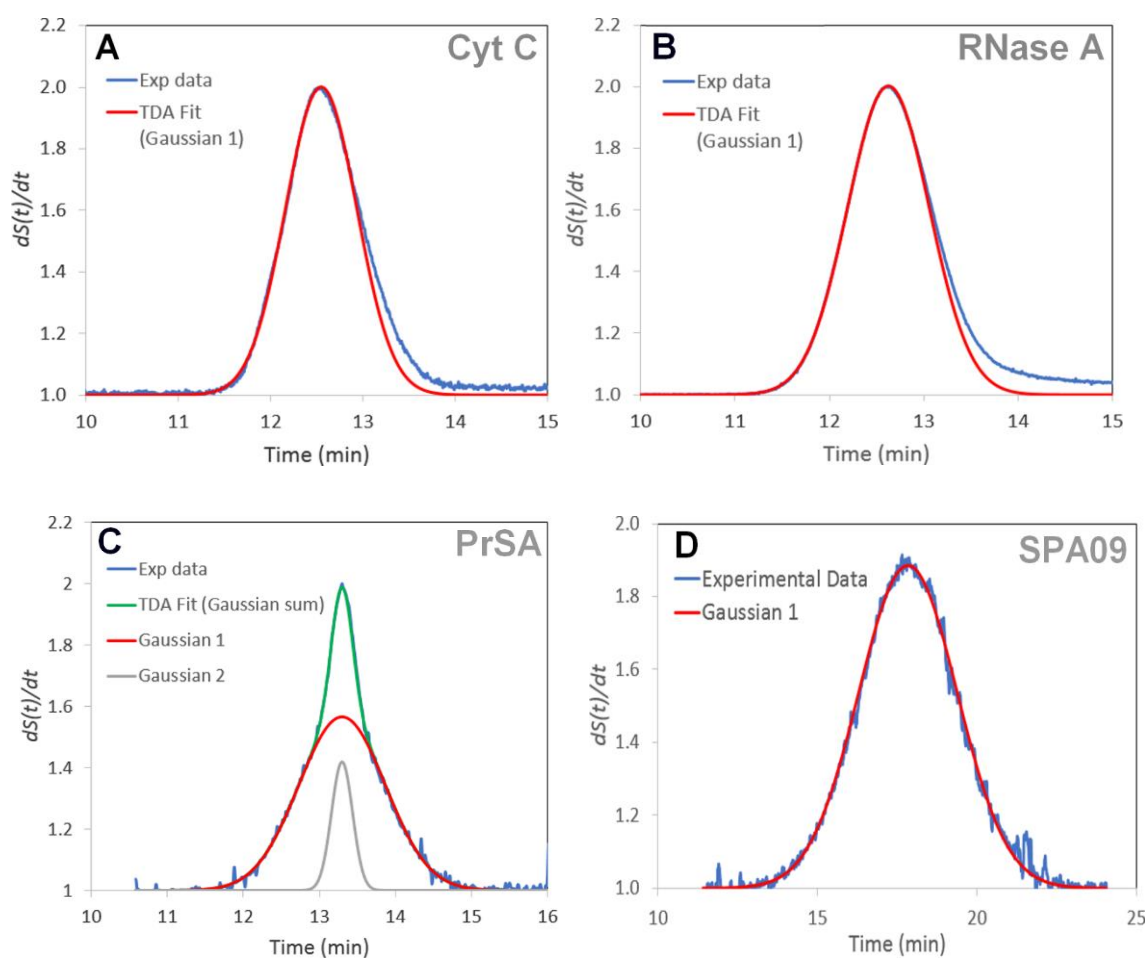


Figure S1. First derivative of the elution front obtained by TDA and gaussian fit for Cyt C (A), RNase A (B), PrSA (C) and SPA09 (D). Experimental conditions: HPC-coated capillary of 58.5 cm total length (50 cm to the UV detector) \times 100 μm i.d. Buffer: 20 mM TRIS, 148 mM NaCl, pH 7.4 for Cyt C, RNase A and SPA09. 10 mM PBS, 150 mM NaCl, pH 7.4 for PrSA. Mobilization pressure: 12 mbar. UV detection: 194 nm for SPA09 and 214 nm for Cyt C, RNase A and PrSA. Temperature: 25°C. Protein concentrations in buffers: SPA09 at 1 g/L; Cyt C, RNase A and PrSA at 0.8 g/L.

5.3 Influence of capillary coatings and mobilization pressures

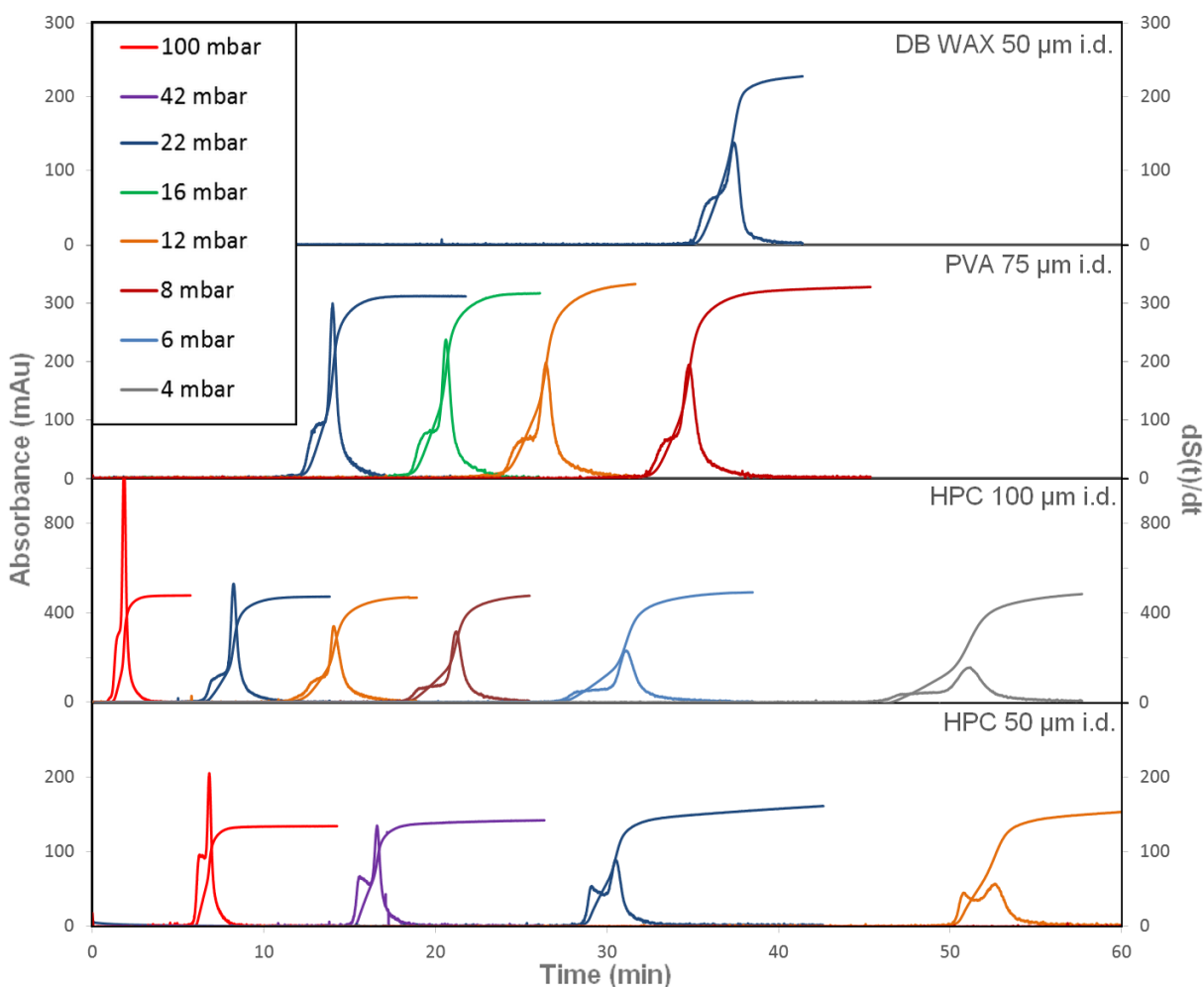


Figure S2. First derivative of the elution front obtained by TDA for the continuous injection of Cyt C-SPA09 mixtures on different capillaries and at different mobilization pressures. Experimental conditions: Capillaries of 58.5 cm total length (50 cm to the UV detector) with capillary coating as indicated on the graph. Buffer: 20 mM TRIS, 148 mM NaCl, pH 7.4. Mobilization pressure: see the graph. UV detection: 194 nm. Temperature: 25°C. Concentrations in the mixture: Cyt C 0.8g/L, SPA09 1 g/L in 20 mM TRIS, 148 mM NaCl, pH 7.4.

5.4 Study of viscosity impact

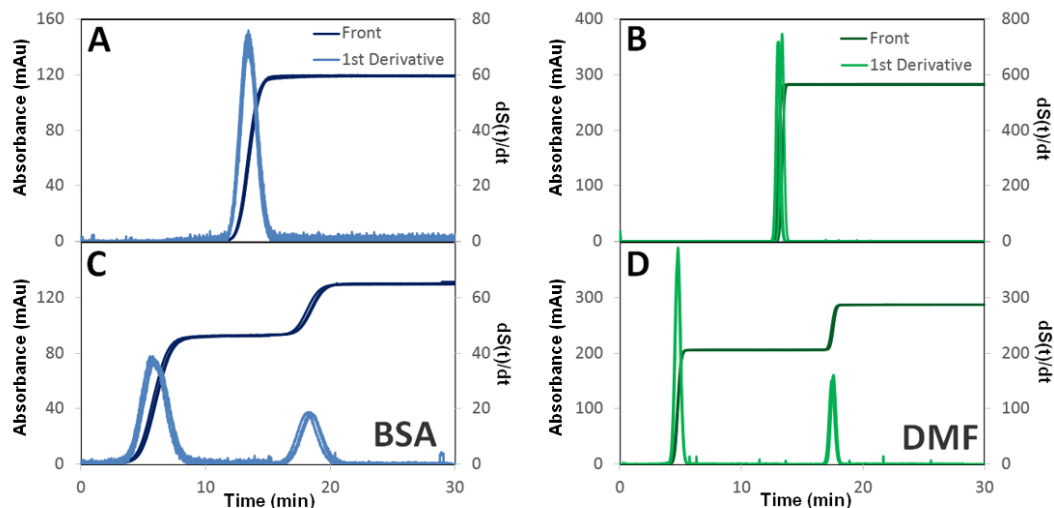


Figure S3. Frontal mode Taylorgrams and their first derivatives (triplicate overlays) obtained for BSA in TRIS buffer alone (A) or in presence of SPA09 (C) and for DMF in TRIS buffer alone (B) or in presence of SPA09 (D). In C and D, a first front of the diluted BSA/DMF-SPA09 mixtures ($\times 0.75$) is injected before the injection of the more concentrated mixtures ($\times 1$). Experimental conditions: HPC-coated capillary of 58.5 cm total length (50 cm to the UV detector) \times 100 μm i.d. Mobilization pressure: 12 mbar. UV detection: 214 nm. Temperature: 25°C. Concentration in the final mixture ($\times 1$): SPA09 1g/L, BSA 0.8 g/L, DMF 0.04 g/L.

Solutes	Injection of solute in TRIS vs TRIS	Injection of solute in SPA09 ($\times 1$) vs solute is SPA09 ($\times 0.75$)		
	Viscosity η used for TDA calculation (Pa.s)			
	$\eta_{TRIS} = 0.90 \times 10^{-3}$	$\eta_{TRIS} = 0.90 \times 10^{-3}$	$\eta_{SPA09(\times 0.75)} = 1.26 \times 10^{-3}$	$\eta_{SPA09(\times 1)} = 1.37 \times 10^{-3}$
BSA	3.55 ± 0.34 nm	4.85 ± 0.42 nm	3.46 ± 0.31 nm	3.19 ± 0.28 nm
DMF	0.25 ± 0.01 nm	0.35 ± 0.02 nm	0.25 ± 0.02 nm	0.23 ± 0.02 nm

Table S1. Size determination of BSA and DMF in TRIS buffer without SPA09 and in TRIS buffer with SPA09. Experimental conditions: HPC-coated capillary of 58.5 cm total length (50 cm to the UV detector) \times 100 μm i.d. Capillary pre-filled with BGE: 20 mM TRIS, 148 mM NaCl, pH 7.4 or SPA09 at 0.75 g/L in TRIS as indicated in the Table. Mobilization pressure: 12 mbar. Continuous injection of the solute (BSA at 0.8 g/L or DMF at 0.04 g/l) in TRIS or SPA09 as indicated in the Table. UV detection: 214 nm. Temperature: 25°C. The experimental Taylorgrams are presented in SI 3. The first derivatives of the frontal Taylorgrams were fitted according to equation (S-1).

5.6 Taylorgrams obtained for the isotherm of adsorption

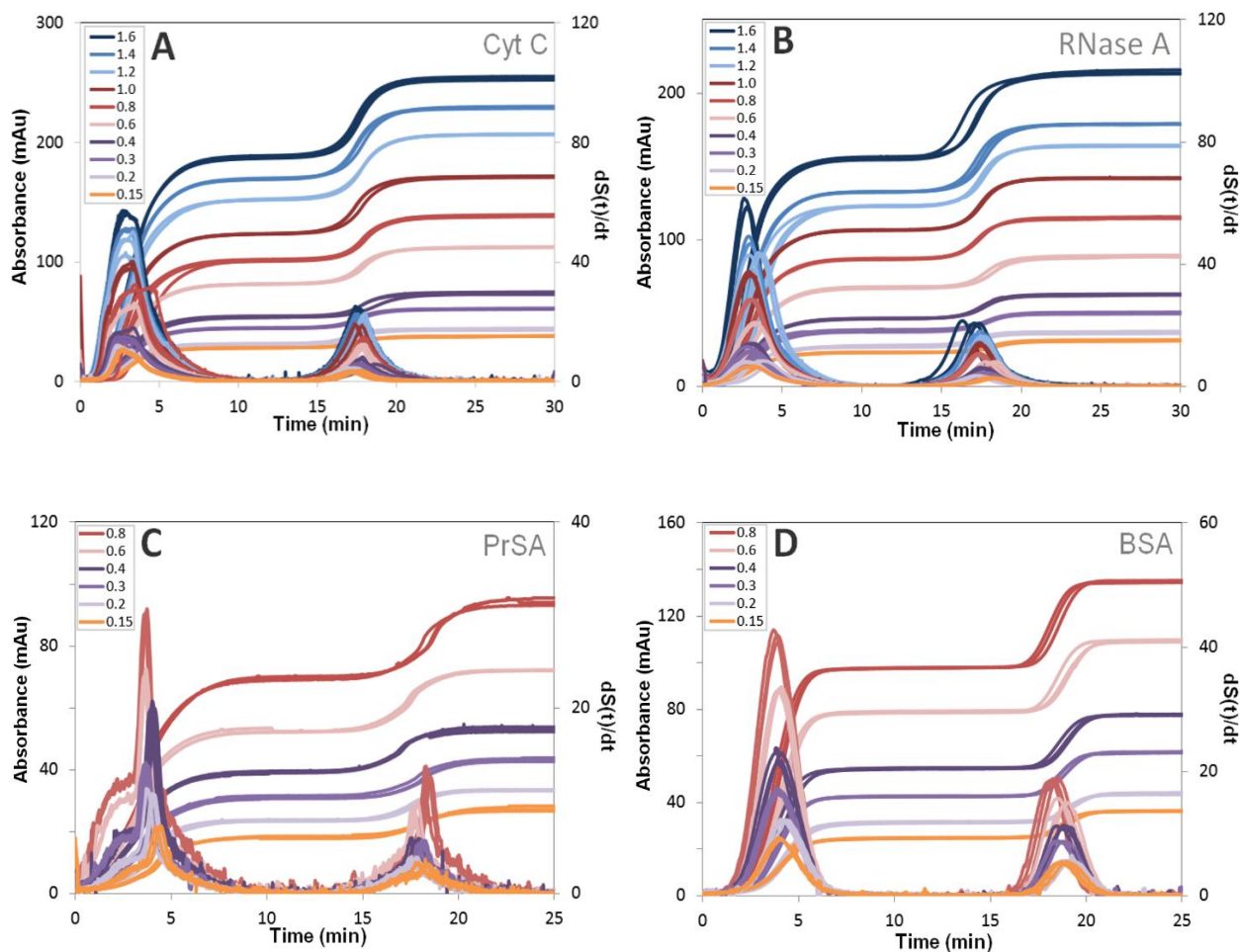


Figure S4: Frontal mode Taylorgrams and their first derivatives (triplicate overlays) obtained for the successive continuous injection of a ($\times 0.75$) Cyt C / SPA09 mixture followed by a ($\times 1$) Cyt C / SPA09 mixture (A), RNase A / SPA09 mixture (B), PrSA / SPA09 mixture (C), BSA / SPA09 mixture (D). Experimental conditions: HPC-coated capillary of 58.5 cm total length (50 cm to the UV detector) \times 100 μ m i.d. Mobilization pressure: 12 mbar. UV detection: 214 nm. Temperature: 25°C. Concentration in the final mixture ($\times 1$): SPA09 1g/L, antigens: see insets for the initial antigen concentration in g/L.

6 References

- (1) Veve, M. P.; Athans, V. Vaccines - Chapter 30. In *Side Effects of Drugs Annual*; Ray, S. D., Ed.; Elsevier, 2019; Vol. 41, pp 351–372. <https://doi.org/10.1016/bs.seda.2019.07.016>.
- (2) Rappuoli, R.; Pizza, M.; Del Giudice, G.; De Gregorio, E. Vaccines, New Opportunities for a New Society. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (34), 12288–12293. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402981111>.
- (3) Burke, E. E.; Kodumudi, K.; Ramamoorthi, G.; Czerniecki, B. J. Vaccine Therapies for Breast Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **2019**, *28* (3), 353–367. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2019.02.004>.
- (4) Marciani, D. J. New Th2 Adjuvants for Preventive and Active Immunotherapy of Neurodegenerative Proteinopathies. *Drug Discov. Today* **2014**, *19* (7), 912–920. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.02.015>.
- (5) Reed, S. G.; Orr, M. T.; Fox, C. B. Key Roles of Adjuvants in Modern Vaccines. *Nat. Med.* **2013**, *19* (12), 1597–1608. <https://doi.org/10.1038/nm.3409>.
- (6) HogenEsch, H.; O'Hagan, D. T.; Fox, C. B. Optimizing the Utilization of Aluminum Adjuvants in Vaccines: You Might Just Get What You Want. *Npj Vaccines* **2018**, *3* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0089-x>.
- (7) Garçon, N.; Friede, M. Evolution of Adjuvants Across the Centuries - Chapter 6. In *Plotkin's Vaccines*; 2018; pp 61–74.
- (8) Schijns, V. E. J. C. Vaccine Adjuvants' Mode of Action: Unraveling “the Immunologist's Dirty Little Secret” - Chapter 1. In *Immunopotentiators in Modern Vaccines*; O'Hagan, D. T., Ed.; Academic Press, 2017; pp 1–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00001-3>.
- (9) Yan, S.; Gu, W.; Xu, Z. P. Re-Considering How Particle Size and Other Properties of Antigen-Adjuvant Complexes Impact on the Immune Responses. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *395*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.11.061>.
- (10) Oyewumi, M. O.; Kumar, A.; Cui, Z. Nano-Microparticles as Immune Adjuvants: Correlating Particle Sizes and the Resultant Immune Responses. *Expert Rev. Vaccines* **2010**, *9* (9), 1095–1107. <https://doi.org/10.1586/erv.10.89>.
- (11) Pedersen, M. E.; Gad, S. I.; Østergaard, J.; Jensen, H. Protein Characterization in 3D: Size, Folding, and Functional Assessment in a Unified Approach. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (8), 4975–4979. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00537>.
- (12) Leclercq, L.; Saetear, P.; Rolland-Sabaté, A.; Biron, J.-P.; Chamieh, J.; Cipelletti, L.; Bornhop, D. J.; Cottet, H. Size-Based Characterization of Polysaccharides by Taylor Dispersion Analysis with Photochemical Oxidation or Backscattering Interferometry Detections. *Macromolecules* **2019**, *52* (12), 4421–4431. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b00605>.
- (13) Urban, D. A.; Milosevic, A. M.; Bossert, D.; Crippa, F.; Moore, T. L.; Geers, C.; Balog, S.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A. Taylor Dispersion of Inorganic Nanoparticles and Comparison to Dynamic Light Scattering and Transmission Electron Microscopy. *Colloid Interface Sci. Commun.* **2018**, *22*, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2017.12.001>.
- (14) Chamieh, J.; Biron, J. P.; Cipelletti, L.; Cottet, H. Monitoring Biopolymer Degradation by Taylor Dispersion Analysis. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (12), 3945–3951. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01260>.
- (15) Ibrahim, A.; Meyrueix, R.; Pouliquen, G.; Chan, Y. P.; Cottet, H. Size and Charge Characterization of Polymeric Drug Delivery Systems by Taylor Dispersion Analysis and Capillary Electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (16), 5369–5379. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6972-4>.
- (16) Liu, T.; Oukacine, F.; Collet, H.; Commeyras, A.; Vial, L.; Cottet, H. Monitoring Surface Functionalization of Dendrigraft Poly-L-Lysines via Click Chemistry by Capillary Electrophoresis and Taylor Dispersion Analysis. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1273*, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.074>.
- (17) Hulse, W.; Forbes, R. A Taylor Dispersion Analysis Method for the Sizing of Therapeutic Proteins and Their Aggregates Using Nanolitre Sample Quantities. *Int. J. Pharm.* **2011**, *416* (1), 394–397. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.06.045>.
- (18) Chamieh, J.; Cottet, H. Size-Based Characterisation of Nanomaterials by Taylor Dispersion Analysis - Chapter 9. In *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*; Ohshima, H., Makino, K., Eds.; Elsevier, 2014; pp 173–192. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62614-1.00009-0>.
- (19) Chamieh, J.; Leclercq, L.; Martin, M.; Slaoui, S.; Jensen, H.; Østergaard, J.; Cottet, H. Limits in Size of Taylor Dispersion Analysis: Representation of the Different Hydrodynamic Regimes and Application to the Size-Characterization of Cubosomes. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (24), 13487–13493. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03806>.

Chapitre III. Etude des interactions antigènes/adjuvants par TDA

- (20) Cottet, H.; Biron, J.-P.; Cipelletti, L.; Matmour, R.; Martin, M. Determination of Individual Diffusion Coefficients in Evolving Binary Mixtures by Taylor Dispersion Analysis: Application to the Monitoring of Polymer Reaction. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (5), 1793–1802. <https://doi.org/10.1021/ac902397x>.
- (21) Leclercq, L.; Reinhard, S.; Chamieh, J.; Döblinger, M.; Wagner, E.; Cottet, H. Fast Characterization of Polyplexes by Taylor Dispersion Analysis. *Macromolecules* **2015**, *48* (19), 7216–7221. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01824>.
- (22) Malburet, C.; Leclercq, L.; Cotte, J.-F.; Thiebaud, J.; Cottet, H. Study of Interactions between Antigens and Polymeric Adjuvants in Vaccines by Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (8), 3364–3373. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00782>.
- (23) Høgstvedt, U. B.; Schwach, G.; van de Weert, M.; Østergaard, J. Taylor Dispersion Analysis as a Promising Tool for Assessment of Peptide-Peptide Interactions. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *93*, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.07.015>.
- (24) Quinn, J. G. Evaluation of Taylor Dispersion Injections: Determining Kinetic/Affinity Interaction Constants and Diffusion Coefficients in Label-Free Biosensing. *Anal. Biochem.* **2012**, *421* (2), 401–410. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.11.023>.
- (25) Jensen, H.; Østergaard, J. Flow Induced Dispersion Analysis Quantifies Noncovalent Interactions in Nanoliter Samples. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (12), 4070–4071. <https://doi.org/10.1021/ja100484d>.
- (26) Bielejewska, A.; Bylina, A.; Duszczak, K.; Fiałkowski, M.; Hołyst, R. Evaluation of Ligand-Selector Interaction from Effective Diffusion Coefficient. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (13), 5463–5469. <https://doi.org/10.1021/ac1008207>.
- (27) Jensen, H.; Larsen, S. W.; Larsen, C.; Østergaard, J. Physicochemical Profiling of Drug Candidates Using Capillary-Based Techniques. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2013**, *23* (4), 333–345. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(13\)50050-5](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(13)50050-5).
- (28) Diamantstein, T.; Wagner, B.; Beyse, I.; Odenwald, M.V.; Schultz, G. Stimulation of Humoral Antibody Formation by Polyanions. The Effect of Polyacrylic Acid on the Primary Immune Response in Mice Immunized with Sheep Red Blood Cells. *Eur. J. Immunol.* **1971**, 335–340. <https://doi.org/10.1002/eji.1830010506>.
- (29) Mumford, J. A.; Wilson, H.; Hannant, D.; Jessett, D. M. Antigenicity and Immunogenicity of Equine Influenza Vaccines Containing a Carbomer Adjuvant. *Epidemiol. Infect.* **1994**, *112* (02), 421–437. <https://doi.org/10.1017/S0950268800057848>.
- (30) Mair, K. H.; Koinig, H.; Gerner, W.; Höhne, A.; Bretthauer, J.; Kroll, J. J.; Roof, M. B.; Saalmüller, A.; Stadler, K.; Libanova, R. Carbopol Improves the Early Cellular Immune Responses Induced by the Modified-Life Vaccine Ingelvac PRRS® MLV. *Vet. Microbiol.* **2015**, *176* (3), 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.001>.
- (31) Cotte, J.-F.; Bouadam, A.; Sordoillet, A.; Jaudinaud, I.; Chambon, V.; Talaga, P. Determination of Molecular Size Parameters and Quantification of Polyacrylic Acid by High Performance Size-Exclusion Chromatography with Triple Detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (8), 2083–2092. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0155-z>.
- (32) Krashias, G.; Simon, A.-K.; Wegmann, F.; Kok, W.-L.; Ho, L.-P.; Stevens, D.; Skehel, J.; Heeney, J. L.; Moghaddam, A. E.; Sattentau, Q. J. Potent Adaptive Immune Responses Induced against HIV-1 Gp140 and Influenza Virus HA by a Polyanionic Carbomer. *Vaccine* **2010**, *28* (13), 2482–2489. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.01.046>.
- (33) Rigaut, G.; Parisot, A.; De Luca, K.; Andreoni, C.; Remolue, L.; Garinot, M.; Cotte, J.-F.; Probeck-Quellect, P.; Haensler, J.; Chambon, V.; Talaga, P. Novel Immunogenic Formulations Comprising Linear or Branched Polyacrylic Acid Polymer Adjuvants. Patent WO/2017/218819 2017.
- (34) Bommier, E.; Chapat, L.; Guiot, A. L.; Hilaire, F.; Cariou, C.; Poulet, H.; Pialot, D.; De Luca, K. Multivariate Analysis of the Immune Response to Different Rabies Vaccines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2020**, *220*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109986>.
- (35) Daum, R. S. Staphylococcus Aureus Vaccines. In *Vaccines (Sixth Edition)*; Plotkin, S. A., Orenstein, W. A., Offit, P. A., Eds.; 2013; pp 1161–1168. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00060-4>.
- (36) Hajjighahramani, N.; Eslami, M.; Negahdaripour, M.; Ghoshoon, M. B.; Dehshahri, A.; Erfani, N.; Heidari, R.; Gholami, A.; Nezafat, N.; Ghasemi, Y. Computational Design of a Chimeric Epitope-Based Vaccine to Protect against Staphylococcus Aureus Infections. *Mol. Cell. Probes* **2019**, *46*, 101414. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.06.004>.

Chapitre III. Etude des interactions antigènes/adjuvants par TDA

- (37) O'Brien, E. C.; McLoughlin, R. M. Considering the 'Alternatives' for Next-Generation Anti-Staphylococcus Aureus Vaccine Development. *Trends Mol. Med.* **2019**, *25* (3), 171–184. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.12.010>.
- (38) Shen, Y.; Smith, R. D. High-Resolution Capillary Isoelectric Focusing of Proteins Using Highly Hydrophilic-Substituted Cellulose-Coated Capillaries. *J. Microcolumn Sep.* **2000**, *12* (3), 135–141. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-667X\(2000\)12:3<135::AID-MCS2>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-667X(2000)12:3<135::AID-MCS2>3.0.CO;2-5).
- (39) Abramoff, M. D.; Magelhaes, P. J.; Ram, S. J. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **2004**, *volume 11* (issue 7), 36–42.
- (40) Ghosh, C.; Asif Amin, M. D.; Jana, B.; Bhattacharyya, K. Size and Structure of Cytochrome-c Bound to Gold Nano-Clusters: Effect of Ethanol. *J. Chem. Sci.* **2017**, *129* (7), 841–847. <https://doi.org/10.1007/s12039-017-1239-9>.
- (41) Nöppert, A.; Gast, K.; Müller-Frohne, M.; Zirwer, D.; Damaschun, G. Reduced-Denatured Ribonuclease A Is Not in a Compact State. *FEBS Lett.* **1996**, *380* (1–2), 179–182. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00048-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00048-8).
- (42) Barbosa, L. R. S.; Ortore, M. G.; Spinozzi, F.; Mariani, P.; Bernstorff, S.; Itri, R. The Importance of Protein-Protein Interactions on the PH-Induced Conformational Changes of Bovine Serum Albumin: A Small-Angle X-Ray Scattering Study. *Biophys. J.* **2010**, *98* (1), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.056>.
- (43) Bello, M. S.; Rezzonico, R.; Righetti, P. G. Use of Taylor-Aris Dispersion for Measurement of a Solute Diffusion Coefficient in Thin Capillaries. *Science* **1994**, *266* (5186), 773–776. <https://doi.org/10.1126/science.266.5186.773>.
- (44) Cottet, H.; Biron, J.-P.; Martin, M. On the Optimization of Operating Conditions for Taylor Dispersion Analysis of Mixtures. *Analyst* **2014**, *139* (14), 3552–3562. <https://doi.org/10.1039/C4AN00192C>.
- (45) De Carlo, S.; Harris, J. R. Negative Staining and Cryo-Negative Staining of Macromolecules and Viruses for TEM. *Micron* **2011**, *42* (2), 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.06.003>.
- (46) Harris, J. R.; Roos, C.; Djalali, R.; Rheingans, O.; Maskos, M.; Schmidt, M. Application of the Negative Staining Technique to Both Aqueous and Organic Solvent Solutions of Polymer Particles. *Micron* **1999**, *30* (4), 289–298. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00034-7](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00034-7).
- (47) Taylor, G. I. Dispersion of Soluble Matter in Solvent Flowing Slowly through a Tube. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.* **1953**, *219* (1137), 186–203. <https://doi.org/10.1098/rspa.1953.0139>.
- (48) Aris, R.; Taylor, G. I. On the Dispersion of a Solute in a Fluid Flowing through a Tube. *Proc. R. Soc. Lond.* **1956**, *235* (1200), 67–77. <https://doi.org/10.1098/rspa.1956.0065>.
- (49) Østergaard, J.; Jensen, H. Simultaneous Evaluation of Ligand Binding Properties and Protein Size by Electrophoresis and Taylor Dispersion in Capillaries. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (20), 8644–8648. <https://doi.org/10.1021/ac901419x>.
- (50) Taylor, G. I. Conditions under Which Dispersion of a Solute in a Stream of Solvent Can Be Used to Measure Molecular Diffusion. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.* **1954**, *225* (1163), 473–477. <https://doi.org/10.1098/rspa.1954.0216>.

Chapitre IV. Séparation de trois souches de poliovirus par électrophorèse capillaire et étude de leur interaction avec l'oxyhydroxyde d'aluminium.

Dans un troisième temps, les interactions entre un mélange d'antigènes et l'oxyhydroxyde d'aluminium (AlOOH) ont été étudiées. Les sels d'aluminium sont des adjuvants utilisés depuis une centaine d'années, et sont présents dans plus d'une centaine de vaccins homologués et ont été administrés à des milliards de personnes.¹ Ces adjuvants sont efficaces avec de nombreux antigènes et sont amenés à être utilisés dans de futures combinaisons vaccinales. Les combinaisons vaccinales permettent de lutter contre plusieurs maladies différentes ou plusieurs souches d'une même maladie en une seule injection. Il s'agit d'un outil puissant pour limiter les contraintes associées aux injections multiples. En effet, réduire le nombre d'injections permet de gagner du temps en réduisant les visites vaccinales, d'augmenter la couverture vaccinale et de réduire les coûts associés liés au stockage, au transport des vaccins et aux salaires du personnel médical.² L'objectif de cette étude est donc de développer une méthode permettant d'analyser simultanément les interactions de plusieurs antigènes avec l'AlOOH. Les méthodes immuno-enzymatiques utilisées classiquement demandent souvent un temps de préparation important et nécessitent des réactifs onéreux. L'électrophorèse capillaire de zone (CZE) peut être une méthode alternative de choix pour l'analyse simultanée de plusieurs antigènes présents dans une combinaison vaccinale et l'étude des paramètres d'interaction.

- (1) HogenEsch, H.; O'Hagan, D. T.; Fox, C. B. Optimizing the Utilization of Aluminum Adjuvants in Vaccines: You Might Just Get What You Want. *Npj Vaccines* **2018**, *3* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0089-x>.
- (2) Lauer, K. B.; Borrow, R.; Blanchard, T. J. Multivalent and Multipathogen Viral Vector Vaccines. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **2017**, *24* (1), e00298-16. <https://doi.org/10.1128/CVI.00298-16>.

Article 3. Separation of three strains of polio virus by capillary zone electrophoresis and study of their interaction with aluminum oxyhydroxide.

Camille Malburet^{1,2}, Laurent Leclercq¹, Jean-François Cotte², Jérôme Thiebaud², Hervé Cottet^{1*}

¹ IBMM, University of Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

² Sanofi Pasteur, Analytical Sciences, 1541 avenue Marcel Mérieux, 69280, Marcy l'Etoile, France.

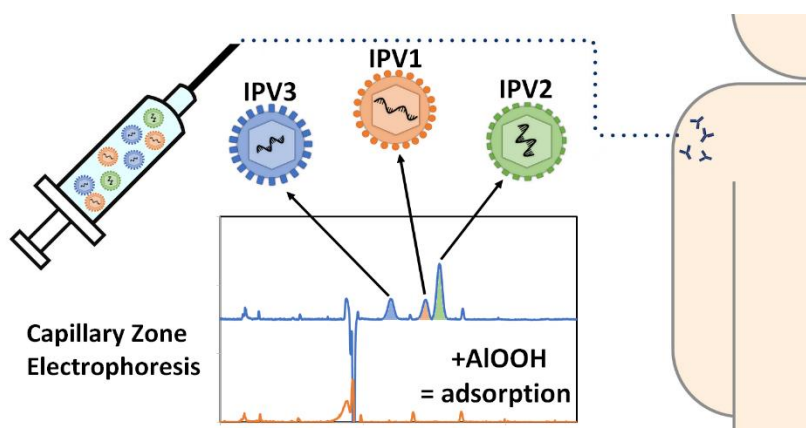
* Corresponding author: herve.cottet@umontpellier.fr

J. Chromatogr. A **2022**, 1667, 462838

Abstract

The development of combination vaccines is essential to reduce the number of injections, shorten vaccination schedules and increase vaccination coverage. Vaccine adjuvants are used to modulate and enhance the immune response induced by the antigens. To support the development of combination vaccines, the study of antigen-adjuvant interactions in the final vaccine formulations is required as interaction competitions may take place between the different antigens. In the present work, a capillary zone electrophoresis (CZE) methodology was firstly optimized on six model proteins, namely bovine serum albumin, β -lactoglobulin, myoglobin, ribonuclease A, cytochrome C and lysozyme. A cationic dynamic coating (polybrene) and a zwitterionic amino acid additive (β -alanine) in the background electrolyte were used to reduce the phenomena of protein adsorption on the inner wall of the capillary and thus optimize the separation efficiency of the proteins. The developed methodology was then used to separate three strains from inactivated polio virus, each strain being a whole virus composed of copies of 4 viral proteins and study their interaction with aluminum oxyhydroxide. The antigen-adjuvant interactions could be modulated by addition of phosphate ions playing the role of competitors for the poliovirus.

Graphical abstract



1 Introduction

Three centuries after the first formal vaccination trials by Edward Jenner, vaccination remains one of the most impactful developments in medicine, lengthen life, in particular by reducing infant mortality [1,2]. As the number of new vaccines increased, the immunization schedule became more and more challenging [3]. Combination vaccines are vaccines that are designed to protect against two or more diseases or against one disease caused by different strains or serotypes of the same organism. These vaccine are powerful tools to limit the burden associated with multiple vaccine injections [4]. Reducing the number of injections by combining multiple antigens of one or several pathogens into a single syringe allows to reduce vaccination visits and saves time for patients and doctors. The simplification of vaccination schedules allows to increase vaccine coverage, which decreases the risk of epidemic outbreaks. Combination vaccines also allow to reduce health costs, as a large proportion of vaccination costs arises from maintaining cold chains, storage, transport and salaries of medical staff [5]. As the number of medical needs without suitable treatment remains high and as new infectious diseases are periodically emerging, the development of new vaccines, as well as the optimization of existing vaccines, represent a significant medical need requiring new combination vaccines.

Vaccine antigens alone have sometimes insufficient immunostimulatory capabilities. Adjuvants are substances that are added into vaccine formulations to modulate and enhance the immune response induced by the antigen [6,7]. In 1926, Glenny et al. showed the potential of aluminum

Chapitre IV. Etude des interactions antigènes/adjuvants par CZE

salts to increase the production of antibodies [8]. Since then, aluminum salts have been the adjuvant of choice in more than 100 licensed vaccines, incorporated into billions of doses [9,10]. Aluminum adjuvants will continue to be used in future vaccines as they are known to be effective with many of the various antigens and present good track record of safety [11]. The strength of the interaction between antigens and adjuvants impacts the immune response [12–14]. A strong antigen-adjuvant interaction is not always desired as the immunogenicity can be reduced when the antigen is too strongly adsorbed on the adjuvant [15–17]. In the case of combination vaccines, interaction competitions may take place between the different antigens with the adjuvant. This is why interactions studies between antigens and adjuvant are important for the development of combination vaccines and have to be performed on the final formulations. The quantification of the free antigens is desired for the study of antigen-adjuvant interactions. However, accurate simultaneous quantification of multiple antigens in combination vaccines is crucial and challenging [18].

Capillary zone electrophoresis (CZE) is a technique largely used for the separation of proteins; it is simple, fast, automatic and requires only a few nanoliters of samples, with relatively low analytical costs [19–22]. Despite these advantages the use of CZE for the analysis of vaccine formulations is still limited [23–26]. An important issue concerning protein analysis by CZE is the possible adsorption onto the negatively charged surface of bare fused silica capillaries. Indeed, it is known that adsorption severely degrades separation performances due to peak broadening [27]. In order to reduce protein adsorption, an effective approach is to use coated capillaries. Capillary coatings can be categorized as dynamic (generally a polymeric or a surfactant additive added to the background electrolyte), semi-permanent (physically adsorbed modifier with a need for repeated flushing of the capillary with the coating agent) or permanent (strongly physically adsorbed or covalently bonded). Due to their ease of use, neutral semi-permanent coatings, such as hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) [28–30], hydroxypropylcellulose (HPC) [31–33], ultratrolTM LN [34], and polyethylene oxide (PEO) [35], or cationic semi-permanent coatings, such as polybrene (PB) [36,37] and polydiallyldimethylammonium chloride (PDADMAC) [38] can be used. Using ϵ -aminocaproic acid (EACA) as zwitterionic additive in the background electrolyte (BGE) was also reported to improve separation efficiency for the separation of monoclonal

antibodies (mAb) [39–42]. These two approaches reduce but do not eliminate adsorption [43] and can be combined to achieve good separation efficiency.

In this work, a CZE method, initially optimized for the separation of six model proteins (bovine serum albumin (BSA), β -lactoglobulin (BLG), myoglobin (MB), ribonuclease A (RNase A), cytochrome C (Cyt C) and lysozyme (LYZ)) was successfully applied to separate three inactivated poliomyelitis vaccine (IPV) strains, enabling the characterization of their interactions with aluminum oxyhydroxide. The impact of phosphate ions on the antigen / adjuvant interaction was also discussed.

2 Experimental section

2.1 Chemicals and Materials

Aluminum oxyhydroxide (AlOOH) and three inactivated poliomyelitis vaccine strains (IPV1, IPV2, IPV3) were provided by Sanofi Pasteur (Marcy-l'Étoile, France). Bovine serum albumin (BSA), β -lactoglobulin from bovine milk (BLG), myoglobin from equine skeletal muscle (MB), ribonuclease A from bovine pancreas (RNase A), cytochrome C from bovine heart (Cyt C), lysozyme from chicken egg white (LYZ), ϵ -aminocaproic acid (6-aminohexanoic acid, EACA), β -alanine (3-aminopropionic acid, β -ala), tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS), phosphate buffered saline (PBS), and polybrene (hexadimethrine bromide, PB) were purchased from Sigma-Aldrich (Merk, Darmstadt, Germany). Formic acid (HCOOH) was purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France). Bare fused silica capillaries were purchased from Molex Polymicro Technologies (Phoenix, USA). Deionized water was further purified on a Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France).

2.2 Sample preparation

Stock solutions of BSA, BLG, MB, RNase A, Cyt C and LYZ were prepared at 4 g/L in ultrapure water. Protein mixture at 0.67 g/L final concentration for each protein was then obtained by mixing an equivalent volume of each of these stock solutions. Protein mixture at 0.33 g/L for each protein was also prepared in the same way in TRIS buffer (10 mM TRIS, 8.5 mM HCl, 157

Chapitre IV. Etude des interactions antigènes/adjuvants par CZE

mM NaCl, pH 7.4). AlOOH solution was prepared at 1 g/L in TRIS buffer and also in PBS buffer (10 mM PBS, 157 mM NaCl, pH 7.4). A mixture of the three inactivated poliovirus strains (IPV123) at 0.1 g/L for IPV1 and IPV3 and 0.2 g/L for IPV2 was prepared in TRIS buffer and also in PBS buffer. TRIS (10 mM) and PBS (10 mM) are commonly used buffers in vaccine formulations. NaCl is added to the buffers to reach physiological ionic strength.

2.3 Capillary coating

Bare fused silica capillaries of 50 μm i.d. \times 50 cm or 75 cm total length were used. The capillaries were coated with polybrene using the following successive flushes: ultrapure water (1 min), 0.5 % (w/w) polybrene in water (7 min), ultrapure water (1 min), background electrolyte (1 min). The coated capillaries were systematically rinsed with a 0.5 M NaOH - 2 M NaCl mixture (7 min) and then coated again using the previous protocol before use and between two successive runs.

2.4 CE

Experiments were carried out on a 1600 CE Agilent system (Santa Clara, USA) (Figure 1 and 2), on a PA800 CE system from SCIEX (Framingham, USA) (Figure 2) and on a 7100 CE Agilent system (Santa Clara, USA) (Figure 4 and 5). The systems were equipped with diode array detectors (DAD). Capillaries dimensions and injections conditions are stated in the figures caption.

3. Results and discussion

3.1 Optimization of the separation of multiple proteins/antigens by CZE

The first step of this work was to develop a CZE method allowing to simultaneously analyze multiple antigens. A mixture of six model proteins (BSA, BLG, MB, RNase A, Cyt C and LYZ) in water was first used as model antigen mixture. The method has been implemented on proteins with a wide range of isoelectric points (pI) so that the method can be adapted for different antigens. Table 1 gathers the pI, molar mass and effective electrophoretic mobility (μ_{ep}) of the different studied proteins. A dynamic polybrene cationic coating was used to prevent protein adsorption onto

Chapitre IV. Etude des interactions antigènes/adjuvants par CZE

the capillary surface, leading to improved separation efficiencies and better migration time repeatabilities compared to bare fused silica capillaries. Analyses were carried out at pH below 4.7 in order to keep all the proteins positively charged and to avoid electrostatic interactions with the cationic capillary coating. Separations were performed in counter electroosmotic mode: proteins were detected in increasing order of their effective mobilities. The choice of the BGE constituents was also a key parameter to optimize for improved separation efficiencies. As shown in Figure 1A, the baseline resolution of the different proteins was poor at pH 2.6 in 50 mM HCOOH BGE. In contrast, Figure 1B displays a significantly improved separation of the same protein mixture analyzed at pH 4.6 in 175 mM HCOOH BGE containing 400 mM EACA. Indeed, EACA is known to reduce protein adsorption by competitive adsorption of the zwitterion EACA amino acid onto the capillary wall [39,44]. In the literature, EACA was often used at pH 4.6-6.0 [41], however at pH 4.6 the acidic group of EACA (pK_a : 4.4 (-COOH), 10.8 (-NH₂)) [45] becomes partially protonated leading to increased conductivity of the BGE (current intensity $\sim -70 \mu\text{A}$ at -20 kV) and lower proportion of zwitterionic forms. Alternatively, to work at pH 4.6, we propose to use β -alanine (pK_a : 3.6 (-COOH), 10.2 (-NH₂)) [46] instead of EACA, since its pI (6.9) is lower of about one pH unit compared to EACA. As shown in Figure 1C, the separation of the six proteins at pH 4.6 in 50 mM HCOOH with 400 mM β -ala was baseline resolved in a shorter time (within 10 min) than for EACA, due to lower conductivity (lower ionic strength, generated current of $-19 \mu\text{A}$ at -20 kV). Indeed, it is well known that the electroosmotic mobility increases faster with decreasing ionic strength compared to protein electrophoretic effective mobility [47,48]. It can be observed that the resolution of MB (peak 3) and RNase A (peak 4), was better in HCOOH – β -ala BGE than in HCOOH – EACA BGE. As a first conclusion, the use of β -ala allows to perform electrophoretic separation at lower pH than EACA, with reasonable BGE conductivity and modest Joule heating. Consequently, HCOOH – β -ala based electrolytes were retained for the following experiments.

Table 1. Isoelectric point (pI), molar mass (M) and effective electrophoretic mobility (μ_{ep}) of the model proteins. Experimental conditions for μ_{ep} determination: PB-coated capillary, 50 cm total length (41.5 cm to the detector) \times 50 μm i.d. BGE: HCOOH 50 mM + β -Ala 400 mM pH 4.6. Hydrodynamic injection: 42 mbar, 6 s. Applied voltage: -20 kV (from inlet). UV detection: 214 nm. Temperature: 25 $^{\circ}\text{C}$. Proteins concentration: 0.67 mg/mL in water.

	BSA	LGB	MB	RNase A	Cyt C	LYZ
M (kg/mol)	66.5	18.4	17.6	13.7	12.3	14.3
pI	4.7 – 5.6 [49]	5.1 – 5.5 [49]	6.5 – 7.2 [50]	8.9 – 9.6 [49]	9 – 10 [51]	10.7 [52]
μ_{ep} ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	2.2	5.8	10.1	10.7	13.9	14.8

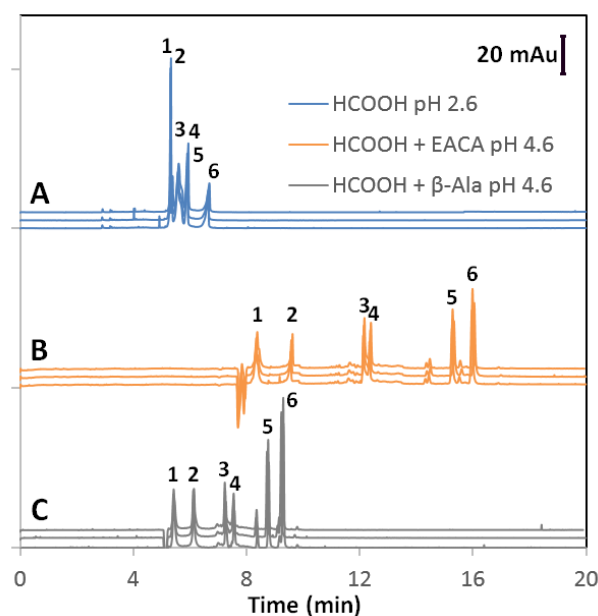


Figure 1: Influence of the addition of EACA or β -Ala on protein separation using a PB-coated capillary. Electropherograms obtained in: 50 mM HCOOH, pH 2.6 (A), 175 mM HCOOH + 400 mM EACA, pH 4.6 (B), 50 mM HCOOH + 400 mM β -Ala, pH 4.6 (C). Experimental conditions: PB-coated capillary, 50 cm total length (40 cm to the detector) \times 50 μm i.d. Hydrodynamic injection: 42 mbar, 6 s. Applied voltage: -20 kV (from inlet). UV detection: 214 nm. Temperature: 25 $^{\circ}\text{C}$. Proteins concentration: 0.67 mg/mL in water. Peak identification: BSA (1), LGB (2), MB (3), RNase A (4), Cyt C (5), LYZ (6).

Chapitre IV. Etude des interactions antigènes/adjuvants par CZE

The net charge of the proteins, and therefore their electrophoretic mobility, directly depends on the pH of the BGE and can change the selectivity of the separation. Mixtures of 400 mM β -Ala with different concentrations of HCOOH at pH below or equal to 4.7 have been tested (see Figure 2). At pH 4.7 the intensity of peaks 1 and 2 was low, most likely due to some protein adsorption. At pH lower than 4.6, the separation of peaks 3 and 4, and of peaks 5 and 6 decreased, leading to overlapping peaks. The pH was therefore set at 4.6, considered as the optimal value in the following.

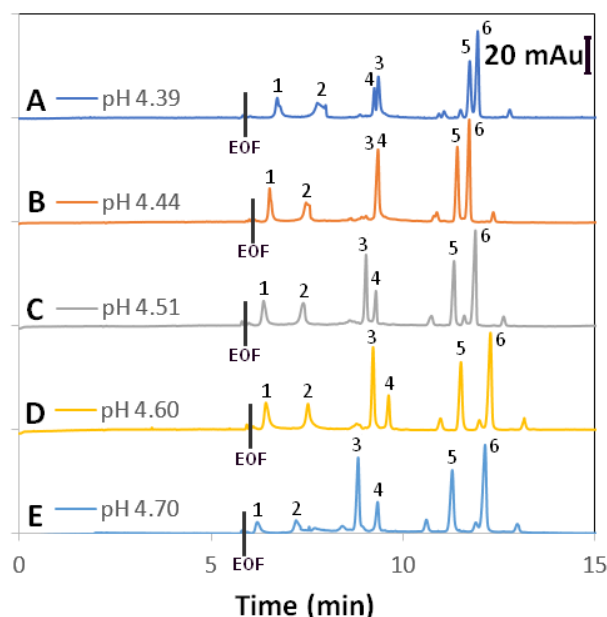


Figure 2: Influence of the pH of the BGE on the separation of six model proteins. Electropherograms obtained in: β -Ala 400 mM + HCOOH: 80 mM (A), 70 mM (B), 60 mM (C), 50 mM (D), 40 mM (E). Experimental conditions: PB-coated capillary, 51.6 cm total length (41.5 cm to the detector) \times 50 μ m i.d. capillary. Other experimental conditions as in Figure 1. Peak identification: BSA (1), LGB (2), MB (3), RNase A (4), Cyt C (5), LYZ (6).

Intra-capillary repeatability was investigated in Figure 3 using a PB coated capillary and two different rinsing conditions between successive runs. As shown in Figure 3A, when rinsing the capillary for 1 min with water and 4 min with BGE, migration times increased, and separation efficiency decreased with the repetitions. In contrast, when the rinsing protocol include a rinsing step with a mixture of NaOH 1 M and NaCl 2 M [49] followed with a PB coating of the capillary, the intra-capillary repeatability improved (from 14 % to 0.5 % for the RSD on migration times, $n=5$ repetitions).

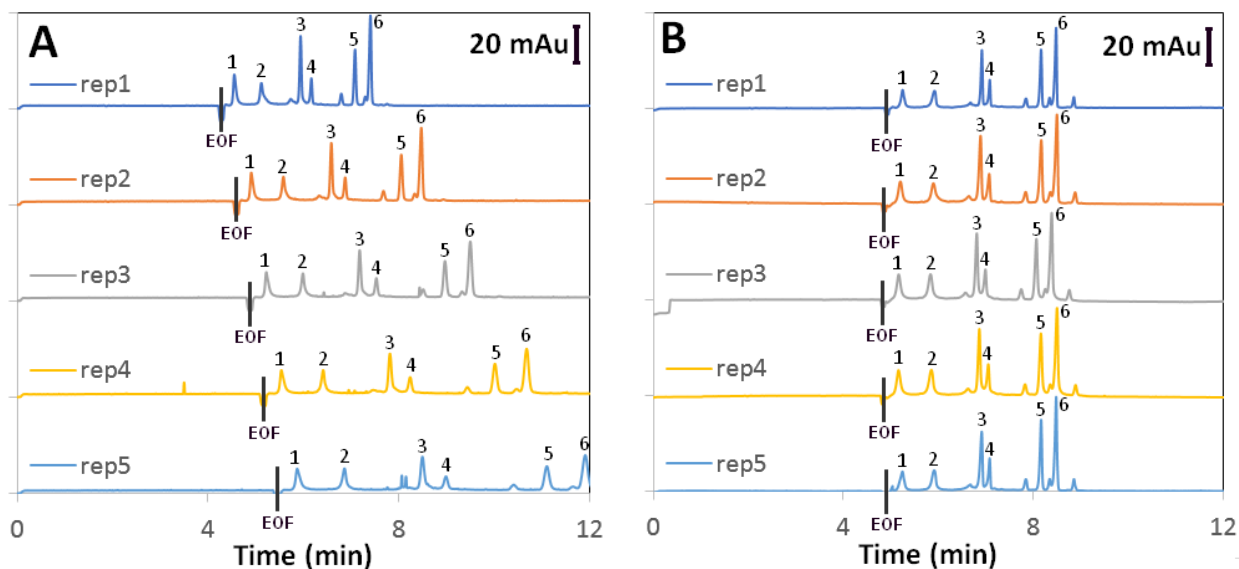


Figure 3: Influence of rinsing conditions between successive runs on the intra-capillary repeatability. Experimental conditions: PB coated capillary, 50 cm total length (41.5 cm to the detector) \times 50 μ m i.d. capillary. Rinsing steps: 1 min H₂O, 4 min BGE (A), 1 min H₂O, 7 min NaOH 0.5 M + NaCl 2 M, 1 min H₂O, 7 min PB, 1 min H₂O, 4 min BGE (B). BGE: HCOOH 50 mM + β -Ala 400 mM pH 4.6. Other experimental conditions as in Figure 1. Peak identification: BSA (1), LGB (2), MB (3), RNase A (4), Cyt C (5), LYZ (6).

3.2. Monitoring multiple protein interaction with aluminum oxyhydroxide by CE

The interactions between the six model proteins with aluminum oxyhydroxide were studied by injecting the protein mixture (initial concentration of 0.17 g/L for each protein) after two hours of contact with aluminum oxyhydroxide (0.5 g/L) in TRIS buffer at pH 7.4, and after centrifugation (see experimental part for more details). Figure 4A compares the electrophoretic separation of the protein's solution before (upper trace) and after (lower trace) interaction with AlOOH. In the latter case, the supernatant resulted from the centrifugation of the protein-AlOOH mixtures was injected. It is worth noting that centrifugation prevents the capillary from clogging with AlOOH. Figure 4B compares the protein peak area normalized to the area of the TRIS ion (noted T on the electropherogram) before and after interaction with AlOOH. The electropherogram of the supernatant shows that BSA (1) and LGB (2) peaks were not detected (Figure 4A), demonstrating a complete adsorption of these proteins on AlOOH. On the contrary, MB (3), RNase A (4), Cyt C (5) and LYZ (6) proteins did not interact with AlOOH since the peak area did not significantly

change before /after the AIOOH addition (see peak area ratio in Figure 4B). These results are in agreement with electrostatic interactions. Indeed, AIOOH (pI ~ 11 [50,51]) is positively charged at pH 7.4, while BSA and LGB are negatively charged (pI < 5.6), MB is almost neutral, and RNase A, Cyt C and LYZ are positively charged (pI > 8.9, see Table 1).

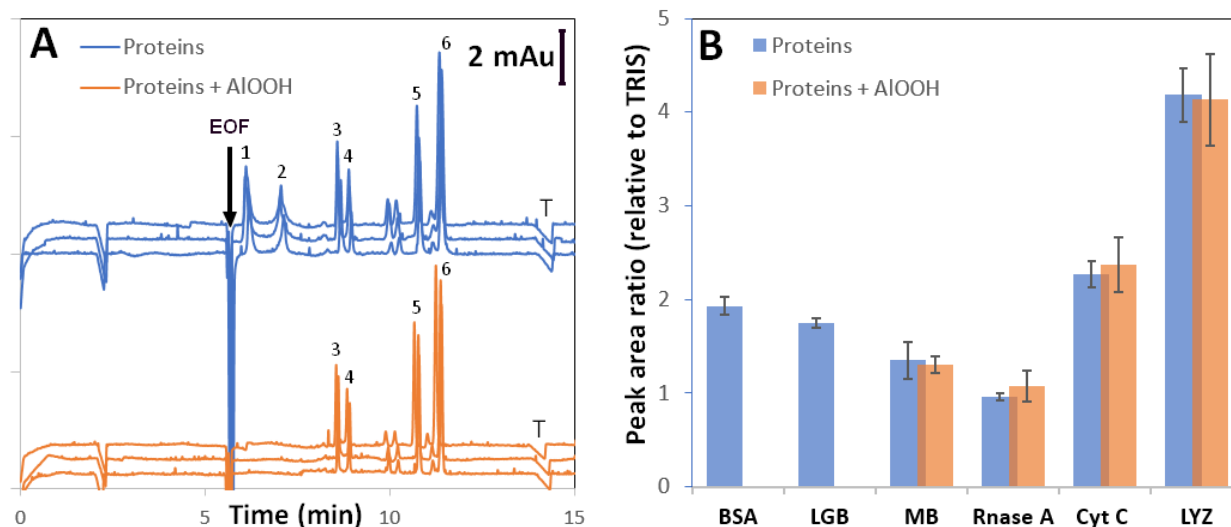


Figure 4: Monitoring multiple protein interactions with AIOOH. Electropherograms before and after addition of AIOOH (A) and the corresponding histograms of the normalized protein peak area relative TRIS (B). Experimental conditions: PB-coated capillary, 50 cm total length (41.5 cm to the detector) \times 50 μ m i.d. BGE: HCOOH 50 mM + β -Ala 400 mM pH 4.6. Hydrodynamic injection: 42 mbar, 6 s. Applied voltage: -20 kV (from inlet). UV detection: 214 nm. Temperature: 25 $^{\circ}$ C. Proteins concentration: 0.17 mg/mL in TRIS buffer. Peak identification: BSA (1), LGB (2), MB (3), RNase A (4), Cyt C (5), LYZ (6), TRIS ion (T).

3.3. Application to monitoring of interaction between inactivated poliovirus strains and aluminum oxyhydroxide by CE

The optimized method was next applied to the separation of three inactivated poliovirus strains (IPV1, IPV2 and IPV3), which are made up of several copies of four different viral proteins (VP1, VP2, VP3 and VP4). Keeping all the experimental parameters as previously defined for the separation of the six model proteins, the separation between polio strains 1 and 2 was not baseline resolved, as shown in Figure 5A (at -20 kV). Reducing the applied voltage to -10 kV led to a better separation of the three strains (Figure 5A) in good agreement with recent results showing that

Chapitre IV. Etude des interactions antigènes/adjuvants par CZE

reducing the separation voltage increased the separation efficiency of proteins even in the presence of very weak residual adsorption [43]. The capillary was also lengthened from 50 cm (41.5 cm to the detector) up to 75 cm (66.5 cm to the detector) to get baseline resolution between IPV1 and IPV2, as shown in Figure 5B.

The interaction between the three IPV strain and AlOOH was then investigated. The IPV-AlOOH mixing protocol was the same the one used for the model proteins. In the TRIS buffer (10 mM TRIS, 157 mM NaCl, pH 7.4), the polio strains were not detected after their contact with AlOOH, which can be explained by the fact that the three antigens are negatively charged at pH 7.4 (pI varying in the 6.1-6.4 range) and thus interacted with AlOOH. In contrast, when conducting the experiment in the PBS buffer (10 mM PBS, 157 mM NaCl, pH 7.4), the three IPV could be detected meaning that the interaction with AlOOH was suppressed in presence of phosphate ions which are known to strongly interact with AlOOH [52–54]. This example clearly demonstrates the interest of the developed method to study antigen / adjuvant interactions in vaccine formulations and the effect of excipients (nature of buffering ions, aminoacids, additives, preservatives...).

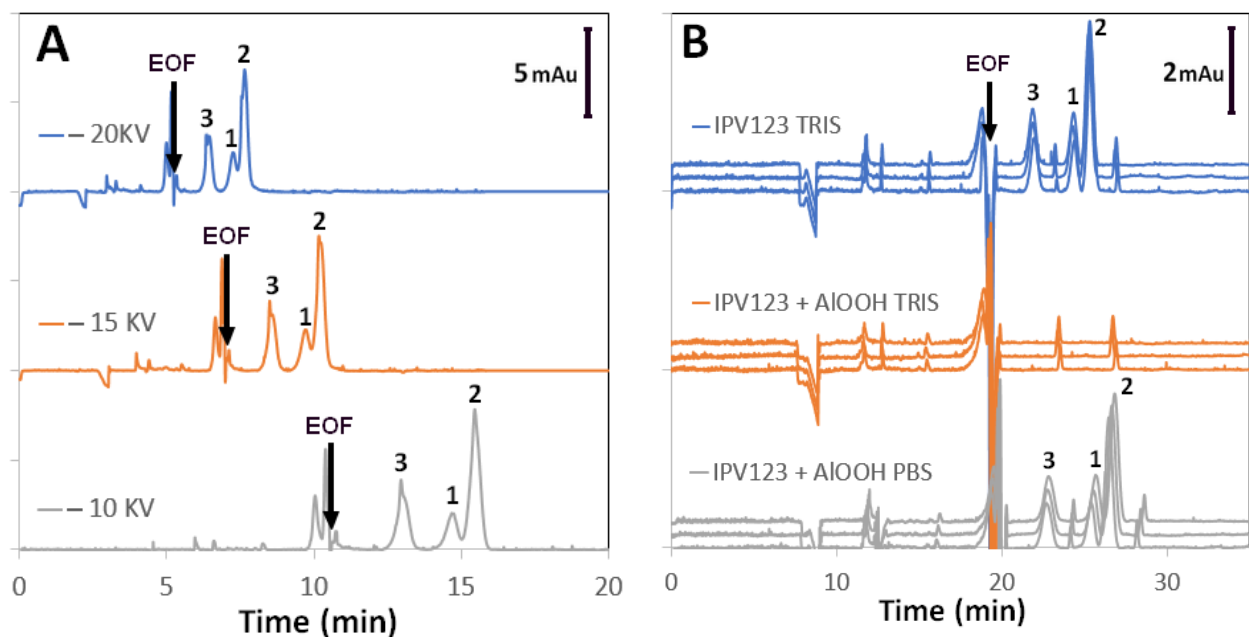


Figure 5: Electrophoretic separation of the three inactivated poliovaccine antigen (IPV). Electropherograms with different applied voltage (A) and before (upper trace) and after interacting with AlOOH (middle trace in TRIS buffer, lower trace in PBS buffer) (B). Experimental conditions: PB-coated capillary, 50 cm total length (41.5 cm to the detector) \times 50 μ m i.d. (A), 75 cm total length (66.5 cm to the detector) \times 50 μ m i.d. (B) Separation voltage: as indicated on the figure (A), -10 kV (B). Hydrodynamic injection: 42 mbar, 6 s. UV detection: 214 nm. Temperature: 25 $^{\circ}$ C. Peak identification: IPV3 (1), IPV1 (2), IPV2 (3).

4. Conclusions

A dynamic polybrene capillary coating was used in combination with β -alanine a zwitterionic amino acid additive to reduce protein adsorption on the capillary wall and to optimize separation efficiency. It has been shown that β -alanine can be advantageously used as an alternative to EACA in the background electrolyte to improve protein separation at lower pH ranges. The developed methodology led to baseline separation between the three poliovirus strains and allowed to individually study their interaction with aluminum oxyhydroxide adjuvant. By giving a rapid and direct access to the percentage of free antigens in a combination vaccine the methodology can be used to optimize vaccine formulations by monitoring the impact of the physico-chemical parameters on the interactions and to follow vaccine stability.

Chapitre IV. Etude des interactions antigènes/adjuvants par CZE

This work illustrates the suitability of capillary zone electrophoresis (CZE) to study interactions between antigens and adjuvants in the case of vaccines containing mixtures of several antigens. CZE is inexpensive, easily automated, and allows to work under physiological conditions using small amounts of sample. With regard to its limitations, CZE with UV detection has detection limits close to 0.01 g/L in antigen concentration. The protein concentrations studied in this work are in the high range of the concentrations usually used in vaccines products. A fluorescent detector with fluorescent responding antigens or stacking conditions at the injection step with UV detection, would be required to lower the antigen quantification limit.

The methodology developed allowed to analyze whole polioviruses without denaturation and could be applied to the analysis of viral vectors systems for gene therapy products.

5 References

- [1] S. Riedel, Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination, *Bayl. Univ. Med. Cent. Proc.* 18 (2005) 21–25. <https://doi.org/10.1080/08998280.2005.11928028>.
- [2] S.L. Plotkin, S.A. Plotkin, A Short History of Vaccination, in: *Plotkins Vaccines*, Elsevier, 2018: pp. 1-15.e8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35761-6.00001-8>.
- [3] D.A. Skibinski, B.C. Baudner, M. Singh, D.T. O’Hagan, Combination vaccines, *J. Glob. Infect. Dis.* 3 (2011) 63–72. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.77298>.
- [4] K. Maman, Y. Zöllner, D. Greco, G. Duru, S. Sendyona, V. Remy, The value of childhood combination vaccines: From beliefs to evidence, *Hum. Vaccines Immunother.* 11 (2015) 2132–2141. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1044180>.
- [5] K.B. Lauer, R. Borrow, T.J. Blanchard, Multivalent and Multipathogen Viral Vector Vaccines, *Clin. Vaccine Immunol. CVI.* 24 (2017) e00298-16. <https://doi.org/10.1128/CVI.00298-16>.
- [6] A. Pasquale, S. Preiss, F. Silva, N. Garçon, Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond, *Vaccines.* 3 (2015) 320–343. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020320>.
- [7] N. Garçon, M. Friede, Evolution of Adjuvants Across the Centuries, *Plotkins Vaccines - Chapter 6*. Elsevier (2018) 61–74.
- [8] A.T. Glenny, C.G. Pope, H. Waddington, U. Wallace, Immunological notes. XVII–XXIV, *J. Pathol. Bacteriol.* 29 (1926) 31–40. <https://doi.org/10.1002/path.1700290106>.
- [9] H. HogenEsch, D.T. O’Hagan, C.B. Fox, Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want, *Npj Vaccines.* 3 (2018) 51. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0089-x>.
- [10] H. Gogoi, R. Mani, A. Malik, P. Sehrawat, R. Bhatnagar, Co-Administration of Aluminium Hydroxide Nanoparticles and Protective Antigen Domain 4 Encapsulated Non-Ionic Surfactant Vesicles Show Enhanced Immune Response and Superior Protection against Anthrax, *Vaccines.* 8 (2020) 571. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040571>.
- [11] R.K. Gupta, Aluminum compounds as vaccine adjuvants, *Vaccine Adjuv.* 32 (1998) 155–172. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00008-8).
- [12] T. Clapp, P. Siebert, D. Chen, L. Jones Braun, Vaccines with aluminum-containing adjuvants: optimizing vaccine efficacy and thermal stability, *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 388–401. <https://doi.org/10.1002/jps.22284>.
- [13] C.B. Fox, R.M. Kramer, L. Barnes V, Q.M. Dowling, T.S. Vedvick, Working together: interactions between vaccine antigens and adjuvants, *Ther. Adv. Vaccines.* 1 (2013) 7–20. <https://doi.org/10.1177/2051013613480144>.

Chapitre IV. Etude des interactions antigènes/adjuvants par CZE

- [14] A.K. Dey, P. Malyala, M. Singh, Physicochemical and functional characterization of vaccine antigens and adjuvants, *Expert Rev. Vaccines*. 13 (2014) 671–685. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.907528>.
- [15] L. Lin, A.S. Ibrahim, V. Avanesian, J.E. Edwards Jr, Y. Fu, B. Baquir, R. Taub, B. Spellberg, Considerable differences in vaccine immunogenicities and efficacies related to the diluent used for aluminum hydroxide adjuvant, *Clin. Vaccine Immunol. CVI*. 15 (2008) 582–584. <https://doi.org/10.1128/CVI.00427-07>.
- [16] B. Hansen, M. Belfast, G. Soung, L. Song, P.M. Egan, R. Capen, H. HogenEsch, R. Mancinelli, S.L. Hem, Effect of the strength of adsorption of hepatitis B surface antigen to aluminum hydroxide adjuvant on the immune response, *Vaccine*. 27 (2009) 888–892. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.078>.
- [17] A. Watkinson, A. Soliakov, A. Ganesan, K. Hirst, C. LeButt, K. Fleetwood, P.C. Fusco, T.R. Fuerst, J.H. Lakey, Increasing the Potency of an Alhydrogel-Formulated Anthrax Vaccine by Minimizing Antigen-Adjuvant Interactions, *Clin. Vaccine Immunol.* 20 (2013) 1659–1668. <https://doi.org/10.1128/CVI.00320-13>.
- [18] Y. Song, Y. Yang, X. Lin, Q. Zhao, Z. Li, G. Ma, Z. Su, S. Zhang, On-line separation and quantification of virus antigens of different serotypes in multivalent vaccines by capillary zone electrophoresis: A case study for quality control of foot-and-mouth disease virus vaccines, *J. Chromatogr. A*. 1637 (2021) 461834. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461834>.
- [19] I. Oita, H. Halewyck, S. Pieters, B. Thys, Y.V. Heyden, B. Rombaut, Poliovirus separation from cell extracts using capillary electrophoresis: Potential use in vaccine production and control?, *J. Virol. Methods*. 185 (2012) 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.05.015>.
- [20] S. Liu, Z. Li, B. Yu, S. Wang, Y. Shen, H. Cong, Recent advances on protein separation and purification methods, *Adv. Colloid Interface Sci.* 284 (2020) 102254. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102254>.
- [21] S. Štěpánová, V. Kašička, Recent applications of capillary electromigration methods to separation and analysis of proteins, *Anal. Chim. Acta*. 933 (2016) 23–42. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.006>.
- [22] M. Dawod, N.E. Arvin, R.T. Kennedy, Recent advances in protein analysis by capillary and microchip electrophoresis, *Analyst*. 142 (2017) 1847–1866. <https://doi.org/10.1039/C7AN00198C>.
- [23] S. El Deeb, H. Wätzig, D. Abd El-Hady, C. Sängner-van de Griend, G.K.E. Scriba, Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis (2013–2015), *Electrophoresis*. 37 (2016) 1591–1608. <https://doi.org/10.1002/elps.201600058>.
- [24] M.-K. Hsieh, C.-H. Sung, P.-F. Hsieh, P.-F. Hsiao, B.-Y. Wu, C.-C. Chou, Identification and characterization of infectious bursal disease virus subviral particles by capillary zone electrophoresis: potential application for vaccine production and quality control, *Poult. Sci.* 98 (2019) 1658–1663. <https://doi.org/10.3382/ps/pey537>.
- [25] E. van Tricht, L. Geurink, F. Galindo Garre, M. Schenning, H. Backus, M. Germano, G.W. Somsen, C.E. Sängner – van de Griend, Implementation of at-line capillary zone electrophoresis for fast and reliable determination of adenovirus concentrations in vaccine manufacturing, *Electrophoresis*. 40 (2019) 2277–2284. <https://doi.org/10.1002/elps.201900068>.
- [26] M. Hamm, F. Wang, R.R. Rustandi, Development of a capillary zone electrophoresis method for dose determination in a tetravalent dengue vaccine candidate, *Electrophoresis*. 36 (2015) 2687–2694. <https://doi.org/10.1002/elps.201500186>.
- [27] C.A. Lucy, A.M. MacDonald, M.D. Gulcev, Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis, *50 Years J. Chromatogr.* 1184 (2008) 81–105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.114>.
- [28] Y. He, C. Isele, W. Hou, M. Ruesch, Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 548–555. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000719>.
- [29] C.E. Espinosa- de la Garza, F.C. Perdomo-Abúndez, J. Padilla-Calderón, J.M. Uribe-Wiechers, N.O. Pérez, L.F. Flores-Ortiz, E. Medina-Rivero, Analysis of recombinant monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*. 34 (2013) 1133–1140. <https://doi.org/10.1002/elps.201200575>.
- [30] B. Moritz, V. Schnaible, S. Kiessig, A. Heyne, M. Wild, C. Finkler, S. Christians, K. Mueller, L. Zhang, K. Furuya, M. Hassel, M. Hamm, R. Rustandi, Y. He, O.S. Solano, C. Whitmore, S.A. Park, D. Hansen, M. Santos, M. Lies, Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. B*. 983–984 (2015) 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.12.024>.
- [31] Y. Shen, R.D. Smith, High-resolution capillary isoelectric focusing of proteins using highly hydrophilic-substituted cellulose-coated capillaries, *J. Microcolumn Sep.* 12 (2000) 135–141. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-667X\(2000\)12:3<135::AID-MCS2>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-667X(2000)12:3<135::AID-MCS2>3.0.CO;2-5).

Chapitre IV. Etude des interactions antigènes/adjuvants par CZE

- [32] M. Biacchi, R. Gahoual, N. Said, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.-N. François, Glycoform Separation and Characterization of Cetuximab Variants by Middle-up Off-Line Capillary Zone Electrophoresis-UV/Electrospray Ionization-MS, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6240–6250. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00928>.
- [33] R.D. Sanzgiri, T.A. McKinnon, B.T. Cooper, Intrinsic charge ladders of a monoclonal antibody in hydroxypropylcellulose-coated capillaries, *Analyst.* 131 (2006) 1034–1043. <https://doi.org/10.1039/B603441A>.
- [34] R. Liyanage, S.M. Krylova, S.N. Krylov, Minimizing adsorption of histidine-tagged proteins for the study of protein–deoxyribonucleic acid interactions by kinetic capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1322 (2013) 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.001>.
- [35] Y. Shi, Z. Li, Y. Qiao, J. Lin, Development and validation of a rapid capillary zone electrophoresis method for determining charge variants of mAb, *J. Chromatogr. B.* 906 (2012) 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.08.022>.
- [36] R.W. Chiu, J.C. Jimenez, C.A. Monnig, High molecular weight polyarginine as a capillary coating for separation of cationic proteins by capillary electrophoresis, *Look. Future Anal. Chem.* — 1995. 307 (1995) 193–201. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)00557-3](https://doi.org/10.1016/0003-2670(94)00557-3).
- [37] E. Jaccoulet, C. Smadja, P. Prognon, M. Taverna, Capillary electrophoresis for rapid identification of monoclonal antibodies for routine application in hospital, *Electrophoresis.* 36 (2015) 2050–2056. <https://doi.org/10.1002/elps.201400603>.
- [38] R. Nehmé, C. Perrin, H. Cottet, M.-D. Blanchin, H. Fabre, Stability of capillaries coated with highly charged polyelectrolyte monolayers and multilayers under various analytical conditions—Application to protein analysis, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 3537–3544. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.040>.
- [39] Y. He, N.A. Lacher, W. Hou, Q. Wang, C. Isele, J. Starkey, M. Ruesch, Analysis of Identity, Charge Variants, and Disulfide Isomers of Monoclonal Antibodies with Capillary Zone Electrophoresis in an Uncoated Capillary Column, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3222–3230. <https://doi.org/10.1021/ac9028856>.
- [40] A.-L. Gassner, S. Rudaz, J. Schappler, Static coatings for the analysis of intact monoclonal antibody drugs by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis.* 34 (2013) 2718–2724. <https://doi.org/10.1002/elps.201300070>.
- [41] R. Gahoual, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.-N. François, Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products, *Anal. Charact. Biopharm.* 1032 (2016) 61–78. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.028>.
- [42] A. Lechner, J. Giorgetti, R. Gahoual, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.-N. François, Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016–2018, *J. Chromatogr. B.* 1122–1123 (2019) 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.05.014>.
- [43] L. Leclercq, C. Renard, M. Martin, H. Cottet, Quantification of Adsorption and Optimization of Separation of Proteins in Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 92 (2020) 10743–10750. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02012>.
- [44] M. He, K. Gao, L. Zhou, Z. Jiao, M. Wu, J. Cao, X. You, Z. Cai, Y. Su, Z. Jiang, Zwitterionic materials for antifouling membrane surface construction, *Zwitterionic Mater.* 40 (2016) 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.038>.
- [45] B. Moritz, V. Locatelli, M. Niess, A. Bathke, S. Kiessig, B. Entler, C. Finkler, H. Wegele, J. Stracke, Optimization of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of biopharmaceuticals using enhanced method development principles, *Electrophoresis.* 38 (2017) 3136–3146. <https://doi.org/10.1002/elps.201700145>.
- [46] W.M. Haynes, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 97th Edition (2016) 5–88.
- [47] H. Cottet, H. Wu, S.A. Allison, On the ionic strength dependence of the electrophoretic mobility: From 2D to 3D slope-plots, *Electrophoresis.* 38 (2017) 624–632. <https://doi.org/10.1002/elps.201600329>.
- [48] A. Ibrahim, S.A. Allison, H. Cottet, Extracting Information from the Ionic Strength Dependence of Electrophoretic Mobility by Use of the Slope Plot, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9422–9430. <https://doi.org/10.1021/ac302033z>.
- [49] C. Malburet, L. Leclercq, J.-F. Cotte, J. Thiebaud, H. Cottet, Study of Interactions between Antigens and Polymeric Adjuvants in Vaccines by Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis, *Biomacromolecules.* 21 (2020) 3364–3373. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00782>.

Chapitre IV. Etude des interactions antigènes/adjuvants par CZE

- [50] R. Al-Shakhshir, F. Regnier, J.L. White, S.L. Hem, Effect of protein adsorption on the surface charge characteristics of aluminium-containing adjuvants, *Vaccine*. 12 (1994) 472–474. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90127-9).
- [51] P. He, Y. Zou, Z. Hu, Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism, *Hum. Vaccines Immunother.* 11 (2015) 477–488. <https://doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026>.
- [52] H. HogenEsch, D.T. O’Hagan, C.B. Fox, Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want, *Npj Vaccines*. 3 (2018) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0089-x>.
- [53] R.B.D. Otto, K. Burkin, S.E. Amir, D.T. Crane, B. Bolgiano, Patterns of binding of aluminum-containing adjuvants to Haemophilus influenzae type b and meningococcal group C conjugate vaccines and components, *Biologicals*. 43 (2015) 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.06.008>.
- [54] V. Jully, F. Mathot, N. Moniotte, V. Pr eat, D. Lemoine, Mechanisms of Antigen Adsorption Onto an Aluminum-Hydroxide Adjuvant Evaluated by High-Throughput Screening, *J. Pharm. Sci.* 105 (2016) 1829–1836. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.032>.

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des nanoparticules lipidiques pour les vaccins à ARNm

Les vaccins à base d'ARN messenger ont récemment émergé comme une alternative prometteuse aux approches vaccinales classiques, notamment par la possibilité d'un développement rapide dans le cas d'épidémies. En effet, les vaccins à ARNm sont fabriqués en utilisant des procédés de fabrication définis, quel que soit l'antigène codé, ce qui permet de réduire les délais de développement et de mise sur le marché de ce type de vaccins.¹ Le développement des vaccins ARNm a longtemps été freiné par la difficulté de délivrer l'ARNm intact dans le cytoplasme des cellules. Des avancées récentes concernant les nanoparticules lipidiques (LNPs) comme vecteurs de délivrance d'ARNm ont permis de surmonter ces difficultés. La taille et la charge des LNPs sont des paramètres critiques impactant leur comportement *in vivo* et l'internalisation cellulaire.² Ainsi, l'objectif de cette partie est de développer de nouvelles méthodologies analytiques pour la caractérisation de la taille et de la charge des LNPs.

- (1) Gebre, M. S.; Brito, L. A.; Tostanoski, L. H.; Edwards, D. K.; Carfi, A.; Barouch, D. H. Novel Approaches for Vaccine Development. *Cell* **2021**, *184* (6), 1589–1603. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.030>.
- (2) U.S. FDA. Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. 2018.

Article 4. Size and charge characterization of lipid nanoparticles for mRNA vaccines

Camille Malburet^{1,2}, Laurent Leclercq¹, Jean-François Cotte², Jérôme Thiebaud², Emilie Bazin², Marie Garinot², Hervé Cottet^{1*}

¹ IBMM, University of Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

² Sanofi Pasteur, 1541 avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France

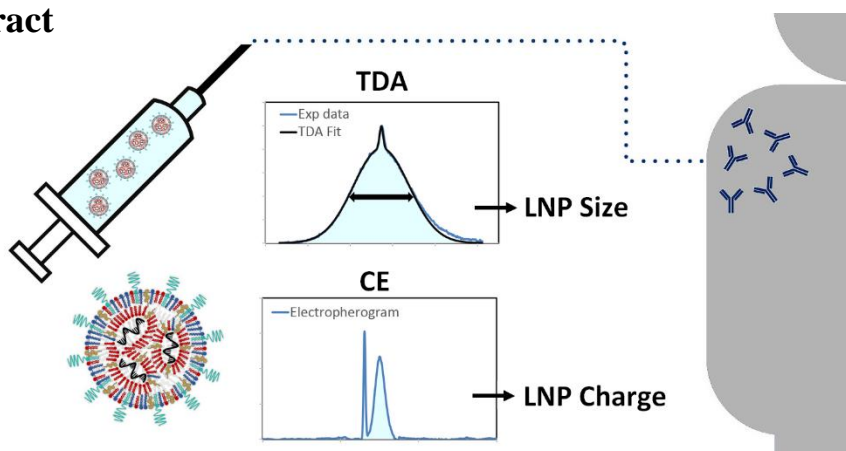
* Corresponding author: herve.cottet@umontpellier.fr

Analytical Chemistry **2022**, accepted

Abstract

Messenger RNA vaccines have come into the spotlight as a promising and adaptive alternative to conventional vaccine approaches. The efficacy of mRNA vaccines relies on the ability of mRNA to reach the cytoplasm of cells, where it can be translated into proteins of interest allowing to trigger the immune response. However, unprotected mRNA is unstable, susceptible to degradation by exo and endonucleases, and its negative charges are electrostatically repulsed by the anionic cell membranes. Therefore, mRNA needs a delivery system that protects the nucleic acid from degradation and allows it to enter into the cells. Lipid nanoparticles (LNPs) represent the non-viral leading vector for mRNA delivery. Physicochemical parameters of LNPs, including their size and their charge, directly impact their *in vivo* behavior and, therefore, their cellular internalization. In this work, Taylor Dispersion Analysis (TDA) was used as a new methodology for the characterization of the size and polydispersity of LNPs, and capillary electrophoresis (CE) was used for the determination of LNPs global charge. The results obtained were compared with those obtained by dynamic light scattering (DLS) and Laser Doppler Electrophoresis (LDE).

Graphical abstract



1 Introduction

mRNA (messenger ribonucleic acid) was discovered in 1961, eight years after DNA (deoxyribonucleic acid).¹ In the first decades after its discovery, the main focus was on understanding its structural and functional aspects. In 1990, Wolff et al. demonstrated that direct injection of *in vitro* transcribed (IVT) mRNA into mice skeletal muscle resulted in the expression of the protein encoded by the mRNA.² For the first time, the possibility of using IVT mRNA for therapeutic purposes was shown. Unlike strategies based on plasmid DNA, mRNA does not need to enter into the cell nucleus but only into the cytoplasm to be translated into proteins of interest by ribosomes, allowing to trigger the immune response.³ Since then, mRNA has shown promise for the treatment of a wide range of diseases and different types of cancer.⁴⁻⁷ These advances have been enabled by a better understanding of the structure of IVT mRNA, as well as the development of new delivery system.⁸ Lipid nanoparticles (LNPs) are currently the most clinically advanced non-viral delivery vehicle for RNA-based drugs.⁹ The efficacy of mRNA-based vaccines highly depends on the ability of LNPs to enter cells and deliver mRNA. The physicochemical parameters of LNPs including their size, shape, charge and surface composition, directly impact their cellular internalization.¹⁰

The size of nanovectors is known to affect intracellular delivery and therefore vaccine efficacy.^{11,12} Indeed, size has a significant contribution to many functional parameters, in particular it determines the entry route of particles into the cells.¹³⁻¹⁶ Furthermore, LNPs size can be optimized to target certain organs.¹⁷⁻²⁰ Size requirements are therefore highly dependent on the route of administration and the targeted organ. In all cases, LNPs size must be finely characterized. Regulatory agencies such as the World Health Organization²¹, the European Commission²² and the U. S. Food and Drug Administration²³ qualify LNPs size and size distribution as Critical Quality Attributes (CQA) of messenger RNA vaccines products. Moreover, the regulatory agencies recommend the use of orthogonal methods for LNPs size determination to address technique-related differences.^{21,24}

DLS is a rapid method based on the study of Brownian motion of particles in a liquid. However, critical points can limit the precision of the results obtained by DLS: (*i*) the samples must often be strongly diluted, which can destabilize some formulations; (*ii*) the size derived from the scattered light intensity gives more weight to large particles because the scattered intensity scales as the hydrodynamic radius to the power 6²⁵ and (*iii*) the size distributions are calculated assuming some

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

pattern of particle shape, which is not always accurate. Therefore, DLS is generally only recommended for the control of samples with relatively low polydispersities. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) is another method also based on the analysis of Brownian motion of particles.²⁶ Many particles are analyzed individually and simultaneously, their hydrodynamic diameters are calculated using the Stokes-Einstein equation. NTA appears to be more accurate than DLS for polydisperse particles and for detecting the presence of aggregates.²⁷ However, NTA that is based on the same principle as DLS, also shares some similar limitations, such as important dilutions required and restricted resolution for small particles. Otherwise, Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) has become a leading technology for imaging nanoscale biological samples such as LNPs.²⁸ Cryo-TEM can reveal detailed size, morphology and structure information at high resolution. Although Cryo-TEM analysis has obvious advantages, the large adoption of Cryo-TEM for the characterization of nanoparticles is hampered by several factors, such as the high cost of imaging systems, the complex sample preparation and the low image acquisition and analysis rate.²⁵ Moreover, Cryo-TEM images suffer from high background noise, sometimes non-uniform lighting and artefacts, which makes automatic particle identification difficult.

Charge is another crucial physicochemical parameter cited by the regulatory agencies^{21–23}. Charge plays a key role in cellular internalization, dictating the transport of objects across biological barriers.^{29,30} The charge of the nanocarriers is controlled by the lipids present in the LNPs, in particular ionizable lipids, and by the composition of the aqueous buffer. Ionizable lipids must be positively charged at low pH allowing mRNA complexation during formulation, LNPs self-assembly and endosomal release (likely). In the meantime, these ionizable lipids must be neutral at physiological pH to avoid potential toxic effects due to unwanted interactions.^{31–33} Moreover, studies have shown that the charge of nanoparticles can be optimized to target different organs.^{34,35} The charge of nanoparticles is mostly determined by Laser Doppler Electrophoresis (LDE) and generally expressed in terms of Zeta potential, which represents the potential difference between the dispersion medium and the stationary layer of fluid attached to the particle.³⁶ The Zeta potential strongly depends on the pH, temperature and ionic strength of the medium^{37,38}, and it was reported that the surface charge density can be instead preferably reported^{39,40}. Capillary electrophoresis (CE) is another method for determining the surface charge density of nanoparticles.⁴¹ Several

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

studies have focused on the study of the electrophoretic mobility of liposomes.⁴²⁻⁴⁵ It is worth noting that LDE and CE are both based on the determination of electrophoretic mobilities, which are then transformed into Zeta potential and/or surface charge density using electrophoretic mobility modelling. The determination of electrophoretic mobilities by CE requires small sample volumes and the analyses have the advantage of being easily automated. In addition, CE is a separative method allowing getting information on charge density distributions.

In this work, Taylor Dispersion Analysis (TDA) was used as a new alternative method to determine the size and size distribution of LNPs encapsulating mRNA. TDA is an absolute method which requires very little sample, is easily automated and has the advantage to be performed without any alteration of the sample (analysis performed in the sample matrix). Chamieh et al. used TDA to determine the size of micelles and microemulsions,⁴⁶⁻⁴⁸ while Franzen et al. used TDA to determine the size of PEGylated liposomal formulations.⁴² Moreover, the size distribution of nano-objects can be derived from the experimental Taylorgram using Regularized Linear Inversion (CRLI) approach.⁴⁹ To our knowledge, TDA has never been used for the characterization of lipid nanoparticles encapsulating mRNA. This work presents an optimized TDA methodology to access to the size and size distribution of LNPs and a comparison with the results obtained by DLS. Using the same equipment, the charge of the lipid nanoparticles was determined by capillary electrophoresis and the results were compared with those obtained by LDE.

2 Experimental Section

2.1 Chemicals and Materials

FLuc (Cyanine 5 Firefly Luciferase) mRNA (1929 nucleotides) was purchased from TriLink BioTechnologies (San Diego, USA). DLin-MC3-DMA ((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriacont-6,9,28,31-tetraene-19-yl 4-(dimethylamino)butanoate) was purchased from Sai Life Sciences Ltd. (Telangana, India). DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), Chol (cholesterol), DMG-PEG-2000 (1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000), trisodium citrate dihydrate $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ($M_w = 294.1$ g/mol), citric acid monohydrate $\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 210.1$ g/mol) and Hellmanex III were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). PBS (phosphate-buffered saline) 10X buffer was purchased from Eurobio Scientific (Les Ulis, France). Absolute ethanol was

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

purchased from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France). Bare fused silica capillaries were purchased from Molex Polymicro Technologies (Phoenix, USA). μ SIL-FC (fluorocarbon polymer), PVA (polyvinyl alcohol), DB-1 (polydimethylsiloxane) and DB-WAX (polyethylene glycol) coated capillaries were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Ultratrol LN was purchased from Target Discovery (Santa Clara, USA). PEO (poly(ethylene oxide), $M_v \sim 4,000,000$ Da), DLPC (1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and DDAB (dimethyldioctadecylammonium bromide salt) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). DMF (dimethylformamide) was purchased from Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, France). Deionized water was further purified with a Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France).

2.2 Formulation of LNPs

The formulation of LNPs involved the rapid mixing of an ethanolic phase composed of DLinMC3-DMA:DSPC:Chol:DMG-PEG-2000 (50:10:38.5:1.5 molar ratio, see Figure S1 for the molecular structure of the LNP constituents) with a 50 mM citrate aqueous phase at pH 4 containing the mRNA at 0.25 mg/mL. Stock solutions of lipids were previously prepared in absolute ethanol at the following concentrations: DLinMC3-DMA 100 mg/mL, DSPC 30 mg/mL, Chol 18 mg/mL, DMG-PEG-2000 30 mg/mL. The mixture was carried out using a NanoAssemblr® system from Precision NanoSystems (Vancouver, Canada) at 4 mL/min total flow rate with 3:1 (aqueous phase:ethanolic phase) flow rate ratio. After formulation, 3 dialysis steps were carried out in order to remove ethanol from the formulation and raise the pH to physiological in PBS buffer, 3.2 mL of mRNA-LNP solution were recovered after the last dialysis step.

2.3 Taylor Dispersion Analysis (TDA)

All experiments were carried out on a 7100 CE Agilent system (Waldbronn, Germany). This system is equipped with a diode array detector (DAD). All the measurements were performed at 200 nm. The temperature of the capillary cartridge was set at 25°C. The LNPs formulations were injected without prior dilution into the capillaries filled with PBS buffer. TDA experiments were performed using 60 mbar mobilization pressure of a sample plug injected at 20 mbar for 6 s. The

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

elution peak obtained was fitted using the sum of two Gaussians according to equation (1) using a home-developed Excel spreadsheet and Excel solver:

$$S(t) = \frac{A_1}{\sigma_1\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma_1^2}\right] + \frac{A_2}{\sigma_2\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma_2^2}\right] \quad (1)$$

where $S(t)$ is the absorbance signal, t_0 is the average elution time, σ_1 and σ_2 are the temporal variances and A_1 and A_2 are two constants that depended on the response factor and the injected quantity of solute. σ_1 , σ_2 , A_1 and A_2 are four adjusting parameters obtained by nonlinear least square regression. t_0 is directly obtained from the position of the maximum absorbance. One of the two populations (the largest in size) represents the LNPs, and the other (the smallest) represents the presence of detected small molecules.

The temporal variance σ_i derived from the elution profile allows to calculate the molecular diffusion coefficient D_i of each population according to equation (2), from which the hydrodynamic diameter $D_{h,i}$ can be determined using Stokes–Einstein equation (3):

$$D_i = \frac{R_c^2 t_0}{24\sigma_i^2} \quad (2)$$

where R_c is the capillary radius.

$$D_{h,i} = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_i} \quad (3)$$

where k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature, and η is the eluent viscosity.

To go further in the data analysis of the Taylorgram, the elution profile was fitted using a second approach based on Regularized Linear Inversion (CRLI) algorithm⁴⁹ to get a continuous distribution of the diffusion coefficient or of the hydrodynamic radius according to equation (4):

$$S(t) = \int_0^\infty CM(D)\rho(D)\sqrt{D} \exp\left[-\frac{(t-t_0)^2 12D}{R_c^2 t_0}\right] dD \quad (4)$$

where C is an instrumental constant, $M(D)$ and $\rho(D)$ are the mass and the molar concentration of the objects with the diffusion coefficient D , respectively. The polydispersity of the sample can be determined using equations (5) and (6):

$$\sigma_{D_h}^2 = \frac{\int_{D_{hmin}}^{D_{hmax}} (D_h - \overline{D_h})^2 P(D_h) dD_h}{\int_{D_{hmin}}^{D_{hmax}} P(D_h) dD_h} \quad (5)$$

$$PDI = \left(\frac{\sigma_{D_h}}{\overline{D_h}} \right)^2 \quad (6)$$

2.4 Dynamic Light Scattering (DLS) and Laser Doppler Electrophoresis (LDE)

All experiments were carried out on a Malvern Panalytical Zetasizer Nano ZS system (Palaiseau, France). For both analyses, the temperature of the cuvettes was set at 25°C. For DLS measurements, the LNPs formulations were diluted by adding 10 µL of the formulation into 1 mL PBS buffer prior to analysis. DLS experiments were performed using 173° measurement angle. Cumulant fit was used to fit the experimental data of the autocorrelation function. For LDE measurements, the LNPs formulations were diluted by adding 100 µL of the formulation into 400 µL PBS buffer prior to analysis.

2.5 Capillary Electrophoresis.

All experiments were carried out on a 7100 CE Agilent system (Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector (DAD). µSIL-FC capillaries of 50 cm total length (41.5 cm to the UV detector) × 50 µm i.d. were used. The temperature of the capillary cartridge was set at 25°C. The capillaries were presaturated before use with LNPs formulations for 10 min at 60 mbar. Before each sample injection the capillaries were flushed for 2 min with Mili-Q water at 960 mbar followed by 2 min 10 mM PBS at 960 mbar. LNPs samples were hydrodynamically injected with 20 mbar pressure for 6 s. CE experiment were performed applying 14 kV voltage and 7 mbar pressure. The UV detection was performed at 200 nm.

3 Results and Discussion

3.1 TDA method development for the characterization of LNP size and size distribution

Lipid nanoparticles (LNPs) are usually composed of four lipids serving to encapsulate mRNA: an ionizable lipid, a phospholipid, cholesterol, and a PEG-lipid, as schematically depicted in Figure 1. The ionizable lipid used in this study was DLin-MC3-DMA, which is often used as a reference after its success in the first RNA-based drug (named ONPATRO® (patisiran)) approved by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) in 2018.⁵⁰ This drug uses siRNAs encapsulated into LNPs for the treatment of hereditary transthyretin-mediated (hATTR) amyloidosis.^{51,52} Ionizable lipids are positively charged at low pH, allowing mRNA complexation, and are neutral at physiological pH reducing potential toxic effects.⁵³ The phospholipid used in this study was DSPC, whose role is to increase the stability of the LNPs.⁵⁴ The PEG-lipid used was DMG-PEG-2000, whose incorporation in LNPs increases their colloidal stability and their resistance to *in vivo* opsonization and clearance.⁵⁴ Finally, cholesterol provided structural integrity to the LNPs.^{33,54} The inclusion of cholesterol in nanoparticle formulations has also been shown to improve efficacy, potentially due to improved membrane fusion allowing endosomal release.^{33,55,56} The chemical formulas of the different lipids are given in Figure S1.

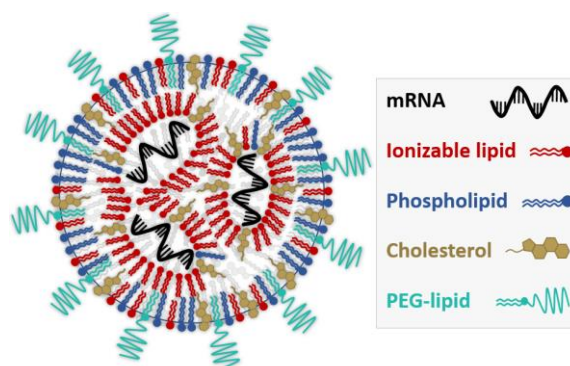


Figure 1. Hypothetical structure of mRNA-LNPs. The PEG-lipid along with DSPC resides primarily on the LNPs surface, while the ionizable lipid and cholesterol are distributed throughout the LNPs.^{57,58}

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

After formulation, the first step of this work was to perform a screening of different coated capillaries in order to select the appropriate coating for the analysis of LNPs. Bare fused silica and DB-1 (polydimethylsiloxane), DB-WAX (PEG), μ SIL-FC (fluorinated polymer) and PVA coated capillaries are commercial capillaries. PEO, Ultratrol LN and DLPC-DDAB coated capillaries were dynamically produced according to the protocols described in Section 2 of the Supporting Information. A plug of LNPs formulation was first injected into the different capillaries after simply rinsing the capillaries with PBS buffer. Results are presented in Figure 2A. It appears that without presaturation of the capillary with the LNPs formulation, DB-WAX coating was the only capillary coating that allowed to observe a symmetrical Taylorgram. Yet, this coating was not retained, due to relatively poor repeatability of the measurements. A very important absorption was observed on all the other capillaries. It is interesting to note that no peak was observed on silica, DB1 and μ SIL capillaries, suggesting that the injected sample was totally adsorbed on the capillary wall. On the contrary, after presaturation of the capillaries by performing a pre-frontal injection of LNPs formulations (60 mbar for 10 min), a peak was observed on all the different capillaries (see Figure 2B). The presaturation allows to saturate the interaction sites within the capillary surface and creates a dynamic coating inside the capillary. For all the studied coated capillaries, the peak appeared more symmetrical after presaturation, suggesting a reduced LNP adsorption. The coating which was selected for the rest of the study was the μ SIL-FC coating, as it gave the most symmetrical gaussian peak and the best baseline return after presaturation (see Figure 2B).

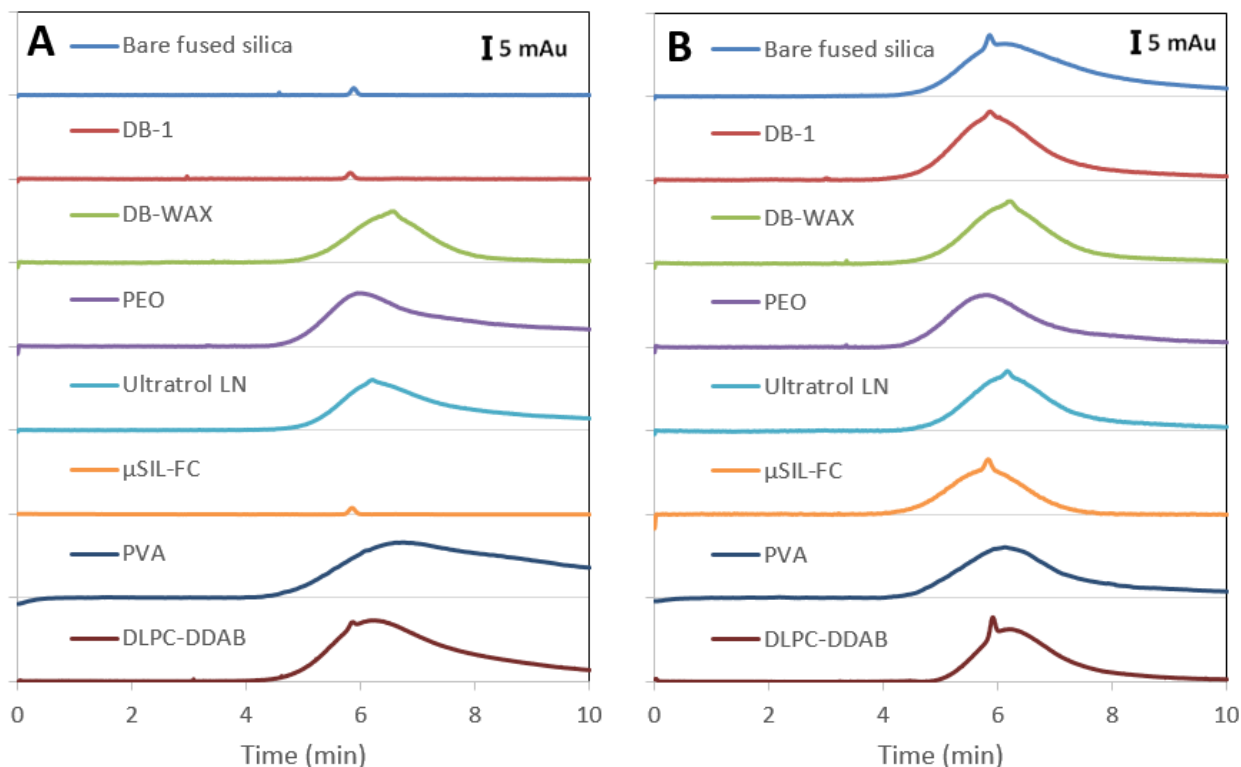


Figure 2. Screening of different capillary coatings without capillary presaturation (A) and with capillary presaturation (B). Experimental conditions: 50 cm total length (41.5 cm to the UV detector) \times 50 μ m i.d. capillaries. Buffer: PBS, pH 7.4. Capillary conditioning: H₂O for 2 min at 960 mbar followed by 2 min PBS at 960 mbar (A), H₂O for 2 min, LNP for 10 min at 60 mbar followed by 2 min PBS at 960 mbar (B). Injection of LNP: 20 mbar, 6 s. Mobilization pressure: 60 mbar. Sample: lipid nanoparticles (DLin-MC3-DMA:DSPC:Chol:DMG-PEG-2000 at 50:10:38.5:1.5 molar ratio) encapsulating Firefly Luciferase (FLuc) mRNA. UV detection: 200 nm. Temperature: 25°C. Capillary conditioning: H₂O for 2 min at 960 mbar followed by 2 min PBS at 960 mbar.

In order to improve the repeatability of the measurements, rinsing steps were also optimized. Between two successive runs, capillaries were simply rinsed for 1 min with water and 2 min with PBS buffer. The repeatability of 10 successive runs was shown in Figure 3A. After each analysis sequence capillaries were rinsed for 5 min with 1% Hellmanex in water, 10 min with isopropanol and 5 min with water. Capillaries were presaturated again at the start of each new sequence by injecting a front of the sample (60 mbar for 10 min).

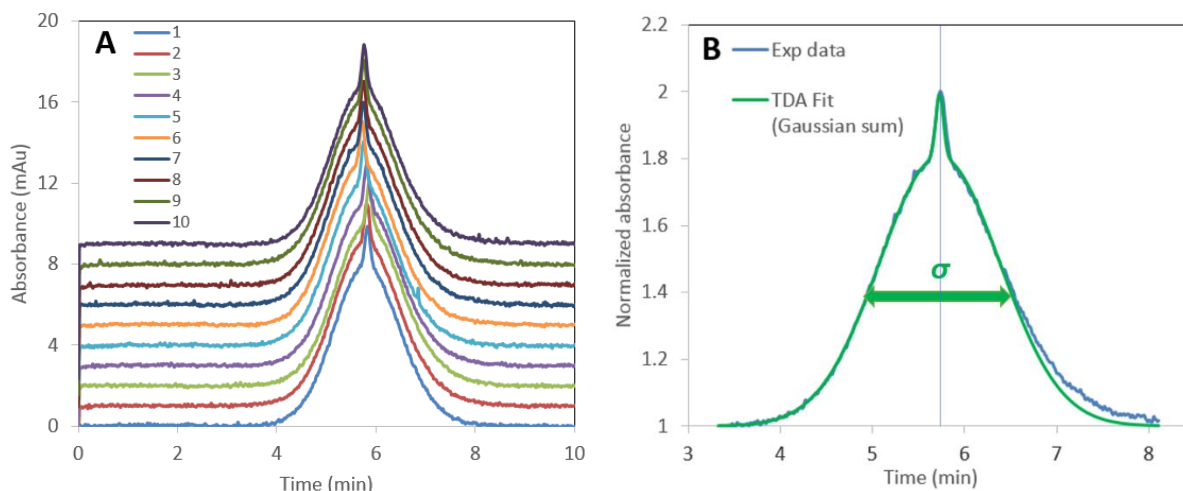


Figure 3. Repeatability on 10 successive runs (A) and an example of two-Gaussian fit (B) of the Taylorgrams obtained for LNP size characterization. Experimental conditions: μ SIL-FC coated capillaries of 50 cm total length (41.5 cm to the UV detector) \times 50 μ m i.d. Buffer: 10 mM PBS, pH 7.4, $\eta = 0.9 \times 10^{-3}$ Pa.s. Capillary presaturation: LNP for 10 min at 60 mbar. Capillary preconditioning: H₂O for 2 min at 960 mbar followed by 2 min PBS at 960 mbar. Injection of LNP: 20 mbar, 6 s. Mobilization pressure: 60 mbar. Sample: lipid nanoparticles (DLin-MC3-DMA:DSPC:Chol:DMG-PEG-2000 at 50:10:38.5:1.5 molar ratio) encapsulating Firefly Luciferase (FLuc) mRNA. UV detection: 200 nm. Temperature: 25°C.

Figure 3B displays an example of two-Gaussian fit obtained for one repetition of the LNP sample. The two-Gaussian fit was performed only on the left half of the elution peak to avoid any impact of peak tailing on the size measurement. Two-Gaussian fit was required due to the presence of UV absorbing small molecules in the LNP sample, appearing as the small peak on the top of the signal. The calculation of the LNP hydrodynamic diameter requires to know the viscosity of the analysis buffer, which can be easily derived by measuring the elution time of UV absorbing marker in a prefilled capillary (see section 3 in Supporting Information for more details). Using the determined viscosity of PBS ($\eta = 0.90 \cdot 10^{-3}$ Pa.s⁻¹), the hydrodynamic diameter obtained by Gaussian fit for the LNPs analyzed by TDA was 86 ± 1 nm (average over the 10 runs presented in Figure 3).

A more advanced data processing of the Taylorgram based on Regularized Linear Inversion (CRLI) algorithm⁴⁹ was performed to get a continuous distribution of the diffusion coefficient (see Figure

S3 for example of experimental fit). The size distribution could be determined by CRLI as exemplified in Figure 4A.

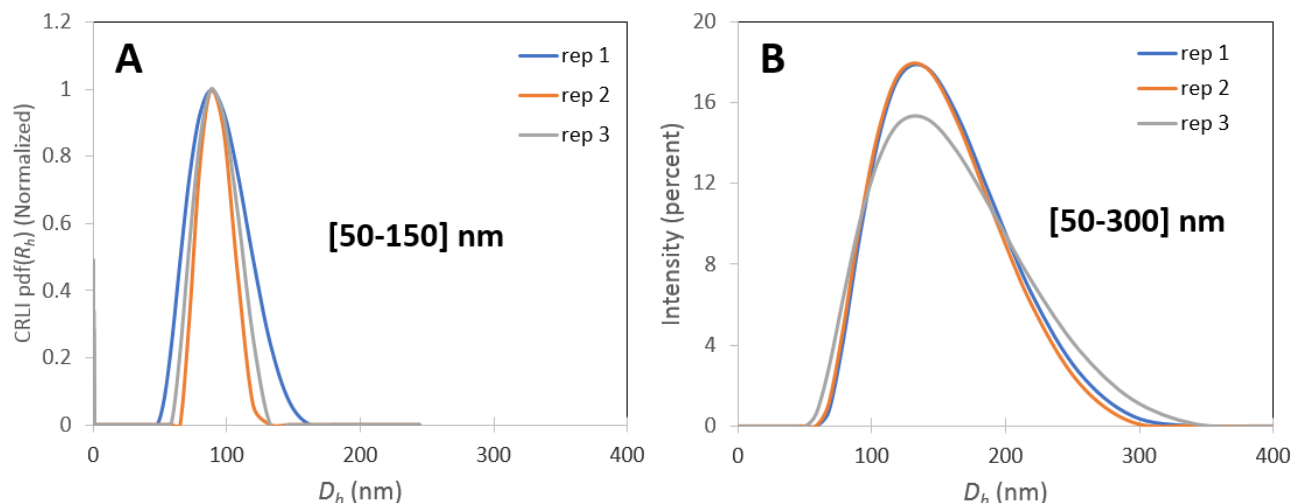


Figure 4. Size distributions (three repetitions) obtained by TDA (A) and by DLS (B). Same experimental conditions for TDA as in Figure 3. Experimental conditions for DLS: 10 μ L LNP solution into 1 mL of 10 mM PBS, pH 7.4, $\eta = 0.9 \times 10^{-3}$ Pa.s. Measurement angle: 173°C. Temperature: 25°C.

3.2 Comparison between TDA and DLS for LNPs size analysis

The size distributions obtained by TDA (CRLI) were compared with those obtained by DLS using Cumulant fit (Figure 4B). The size distributions obtained by DLS [50-300 nm] were wider than those obtained in TDA [50-150 nm]. Accordingly, the mean hydrodynamic diameter obtained by DLS was higher than the one obtained by TDA (128 ± 1 nm vs 86 ± 1) and the polydispersity index was higher in DLS than in TDA (0.112 vs 0.011). These differences can be explained by the fact that the two techniques are not sensitive to the same size distributions. Intensity average distributions obtained by DLS give more weight to the larger entities (see Figure 5), since the distribution is weighted by the scattered intensity which basically scales as the hydrodynamic radius to the power 6. In contrast, the size distribution derived from TDA is basically related to the weight-average distribution, which means that each LNP should contribute to the distribution in

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

proportion to their mass content in the mixture. To stress the differences between the two methods, an example of the differently weighted distributions is provided in Figure 5 taking as an example a bimodal mixture containing 5% in number of large particles (200 nm) and 95% of smaller one (80 nm), which could mimic an example of LNP mixture containing a minor content of larger particles. Clearly, the intensity-based distribution (DLS) is weighting more the larger particles than the weight counterpart (TDA). These differences demonstrate the complementarity of the two techniques which do not determine the same size distributions. Of course, for truly monodisperse samples, both techniques should converge; otherwise the discrepancy between the average values and the distributions are indicative of the sample size heterogeneity. However, it should be noted that it is generally not straightforward to convert the intensity based DLS distribution into a mass-weighted (or a number-weighted) size distribution because the scattered intensity is depending on the size and the shape of the solutes⁵⁹. For such transformations, strong assumptions are required such as the spherical shape and the homogeneity of the solutes, and may be restricted to a limited range of sizes. Moreover, due to the intensity based response of the light scattered intensity, the signal due to the smallest solutes can be so weak that it is not detected, especially in the case of polydisperse samples. This is a reason why orthogonal sizing methods are requested by the regulation authorities in the case of polydisperse samples.

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

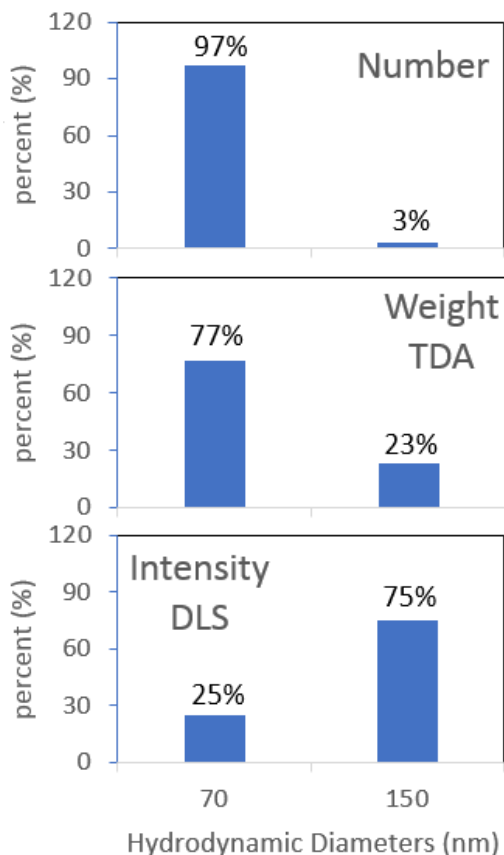


Figure 5. Distributions in number, in weight (as determined by TDA for mass sensitive detection) and in intensity (as determined by DLS) considering a bimodal mixture containing 3% in number of large particles (150 nm) and 97% of smaller ones (70 nm). The mass proportion, obtained in TDA for mass sensitive detection, is proportional to the number of particles multiplied by the hydrodynamic size to the power 3 (volume). We assume as a first approximation that the density of the particles is the same for both particle sizes. The scattered intensity obtained in DLS is proportional to the number of particles multiplied by the hydrodynamic size to the power 6.

3.3 Characterization of LNPs global charge by CE

Finally, the charge of the LNPs was studied by capillary electrophoresis (CE) using a μ SIL coated capillary as for TDA analysis. Figure 6A displays a Taylorgram (no electric field, see blue trace) where the marker (DMF at 0.1 g/L in water) is detected at the same elution time as the LNPs, but with a narrower profile compared to the broad LNP elution profile. By applying an electric field and reducing the mobilization pressure from 30 mbar (orange trace) to 7 mbar (green trace), it was possible to separate the two peaks and to calculate the effective electrophoretic mobility of the LNPs ($\mu_{ep} = -1.86 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). The applied co-pressure (7 mbar) allows to speed

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

up the analysis with a limited impact on the peak broadening of the LNPs peak, and without changing the LNP effective mobility. Knowing the hydrodynamic diameter and the electrophoretic mobility of LNPs, it was possible to calculate the electric charge density (σ_{owo}) using the O'Brien-White-Ohshima (OWO) mathematical model^{39,60,61}, according to equation (7):

$$\sigma_{owo} = \frac{2\varepsilon_0\varepsilon_r\kappa k_B T}{e} \sinh\left(\frac{e\zeta}{2k_B T}\right) \times \left[1 + \frac{1}{\kappa R_h} \frac{2}{\cosh^2\left(\frac{e\zeta}{4k_B T}\right)} + \frac{1}{(\kappa R_h)^2} \frac{8 \ln(\cosh(\frac{e\zeta}{4k_B T}))}{\sinh^2\left(\frac{e\zeta}{2k_B T}\right)} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (7)$$

where ε_r is the relative electric permittivity, ε_0 is the electric permittivity of vacuum, e is the elementary electric charge, ζ is the Zeta potential and κ is the Debye–Hückel parameter ($\kappa = 1.28 \text{ nm}^{-1}$, 165 mM ionic strength in the present work). The surface charge density is the total surface charge of the particle divided by the total surface of the particle at the plane of shear. The determination of σ_{owo} requires the determination of the Zeta potential ζ knowing μ_{ep} and D_h . This can be done using graphical representations of equation (8):

$$\mu_{ep} = \frac{2\varepsilon_0\varepsilon_r\zeta}{3\eta} \left[f_1(\kappa R_h) - \left(\frac{e\zeta}{k_B T}\right)^2 f_3(\kappa R_h) - \frac{m_- + m_+}{2} \left(\frac{e\zeta}{k_B T}\right)^2 f_4(\kappa R_h) \right] \quad (8)$$

m_+ and m_- are dimensionless ionic drag coefficients, accessible from the limiting conductances of the cation Λ_+^0 and the anion Λ_-^0 in the electrolyte considered:

$$m_{\pm} = \frac{2\varepsilon_0\varepsilon_r k_B T N_A}{3\eta z \Lambda_{\pm}^0} \quad (9)$$

where N_A is the Avogadro's number and $m_+ = 0.263$, $m_- = 0.172$ for NaCl electrolyte. Equation (8) takes the relaxation effect into account and is valid for $\zeta \leq 100 \text{ mV}$. f_1 , f_3 and f_4 are functions given by equations (10), (11) and (12):

$$f_1(\kappa R_h) = 1 + \frac{1}{2 \left[1 + 2.5 / \left\{ \kappa R_h \left(1 + 2e^{-\kappa R_h} \right) \right\} \right]^3} \quad (10)$$

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

$$f_3(\kappa R_h) = \frac{\kappa R_h (\kappa R_h + 1.3e^{-0.18\kappa R_h} + 2.5)}{2(\kappa R_h + 1.2e^{-7.4\kappa R_h} + 4.8)^3} \quad (11)$$

$$f_4(\kappa R_h) = \frac{9\kappa R_h (\kappa R_h + 5.2e^{-3.9\kappa R_h} + 5.6)}{8(\kappa R_h + 1.55e^{-0.32\kappa R_h} + 6.02)^3} \quad (12)$$

Thus, for the formulation of LNPs studied in this work, the Zeta potential determined by graphical representation was $\zeta_{LNP} = -2.5$ mV (see Figure S4 with $\kappa R_h = 55$), which allowed to calculate the lipid nanoparticles electric charge density, $\sigma_{LNP} = -2.4 \times 10^{-3} \text{ Cm}^{-2} = -0.015$ elementary charge per nm^2 . This negative charge at physiological pH is relatively low but is desired to reduce unwanted interactions during circulation in the body. Such surface charge density corresponds to an overall effective charge of about 350 elementary charges per LNP entity. Because the charge density is low, relaxation phenomena is expected to be negligible, and it is therefore possible to apply the approximated Henry equation, which is a more straightforward way to determine the Zeta potential from the effective electrophoretic mobility using eq. (13)⁶²:

$$\mu_{ep} = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} \times \left(1 + \frac{1}{2 \left(1 + \frac{\delta}{\kappa R_h} \right)^3} \right) \quad (13)$$

where $\delta = \frac{2.5}{1 + 2 \exp(-\kappa R_h)}$. Numerical application to LNP leads to $\delta = 2.5$, $\mu_{ep} = \frac{0.958\varepsilon\zeta}{\eta}$, $\zeta_{LNP} = -2.47$ mV and finally to the same values of $\sigma_{LNP} = -2.4 \times 10^{-3} \text{ Cm}^{-2} = -0.015$ elementary charge per nm^2 as those previously obtained with OWO modeling.

It is worth noting that the surface charge density is a much more robust parameter to characterize solute charge compared to Zeta potential, as previously demonstrated for nanoparticles and nanolatexes.^{39,40} Indeed, Zeta potential is strongly dependent on the ionic strength due to the compaction of the electrical double layer with increasing ionic strength, which is not the case for surface charge density^{39,40}. The electrophoretic mobility value obtained by CE can also be

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

compared to the one determined by Laser Doppler electrophoresis (LDE) $\mu_{ep} = -5.00 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which is of the same order of magnitude as the one determined by CE ($\mu_{ep} = -1.86 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and allows to determine the Zeta by graphical representation using OWO model $\zeta_{LNP} = -6.5 \text{ mV}$, see Figure S4. The difference between the two values can nevertheless be explained by the fact that the electrophoretic mobility determined by LDE strongly depends on the other ions present in the matrix since LDE is a non-separative method.

It is worth noting that it is also important to know which electrophoretic modelling is used to convert the effective mobility into Zeta potential and at which ionic strength the measurement was performed. Strong differences can arise depending on the retained modelling (Nernst-Einstein, Hückel, Smolukowski, Henry, OWO, modified Yoon and Kim modelling) depending on the solute's characteristics. OWO and modified Yoon and Kim modelling are the most accurate one since they take into account both the electrophoretic effect (counter ion friction) and the relaxation effect (distortion of the counterion cloud)⁶¹. We also recommend, for the reasons previously explained, to express all the results in terms of surface charge density using equation (7) instead of Zeta potential.

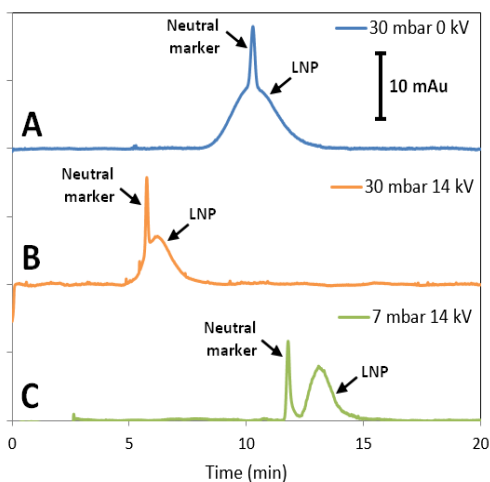


Figure 6. Taylorgram (A) and electropherograms (B, C) obtained for a mixture of LNP and DMF. Experimental conditions: μ SIL-FC capillaries of 50 cm total length (41.5 cm to the UV detector) \times 50 μ m i.d. Buffer: 10 mM PBS, pH 7.4, $\eta = 0.9 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Capillary presaturation: LNP for 10 min at 60 mbar. Capillary preconditioning: H_2O for 2 min at 960 mbar followed by 2 min PBS at 960 mbar. Injection of LNP: 20 mbar, 6 s. Mobilization pressure and separation voltage: as indicated on the graph. Sample: lipid nanoparticles (DLin-MC3-DMA:DSPC:Chol:DMG-PEG-2000 at 50:10:38.5:1.5 molar ratio) encapsulating Firefly Luciferase (FLuc) mRNA. UV detection: 200 nm. Temperature: 25°C.

4 Conclusions

This work aimed at developing a new methodology to characterize the average size and the size distribution, as well as the charge density, of lipid nanoparticles (LNPs) used as delivery vehicle for mRNA vaccines. The TDA method developed in this work was found to reach this goal with direct injection of the samples (no dilution, no filtration). It appeared that the presaturation of the capillary with the LNP sample and the capillary rinsing were crucial steps that significantly decreased the adsorption of LNPs onto the capillary wall and considerably improved the repeatability. The comparison between TDA and DLS shows that the hydrodynamic diameters obtained by TDA were smaller (mass-weighted) than those obtained by DLS (intensity-weighted), as expected. Both methods are therefore complementary and allow a better characterization of the LNP size. TDA shows promise to be widely used as it is an absolute method (no calibration) that consumes little sample volumes, it is easy and straightforward to use, and it can be easily automated. TDA performed on a CE equipment can also easily provide the viscosity of LNPs formulations, which can be useful when low amounts of product are available. Finally, CE, implemented on the same equipment as TDA, can be used for the charge characterization of LNPs using O'Brien-White-Ohshima or Henry electrophoretic mobility modelling. Thus, a single equipment can give access to important information on critical LNPs physicochemical parameters.

5 Supporting information

5.1 Chemical formula of the lipids used in the formulation

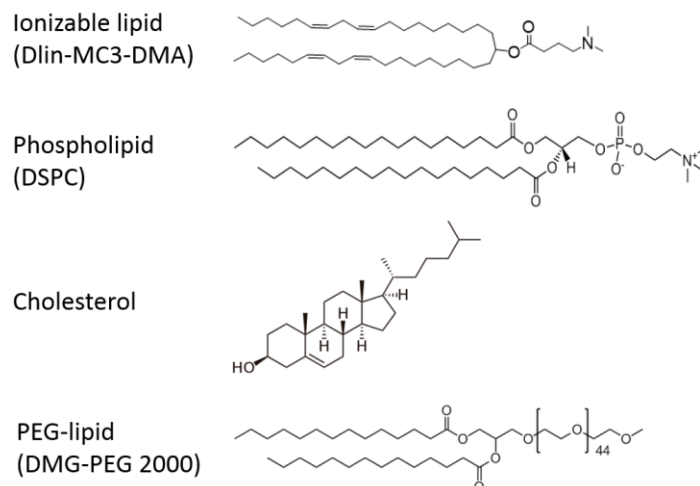


Figure S1. Chemical formula of the 4 lipids used in the formulation of the lipid nanoparticles.

5.2 PEO, Ultratrol LN and DDAB-DLPC capillary coating protocols

The coatings were performed on bare fused silica capillaries of 50 cm total length and 50 μm i.d.

PEO dynamic capillary coatings were performed by the following successive flushes at 950 mbar: 2 min with 1 M HCl, 5 min with 0.2% (w/w) PEO 4M in 0.1 M HCl, 2 min with water, as described by Iki et al¹.

Ultratrol LN dynamic capillary coatings were performed by the following successive flushes at 950 mbar: 2 min with 1 M NaOH, 2 min with 0.1 M HCl, 2 min with water, 2 min with UltraTrol LN solution (without any dilution), wait for 5 min, 2 min with water, as described by Ouadah et al.²

Two separate solution of 100% DDAB and 100% DLPC at 0.1 mM each were prepared in 20 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl₂ buffer at pH 7.4. DLPC-DDAB dynamic capillary coatings were performed by the following the successive flushes at 950 mbar: 15 min with an 90% DLPC-10% DDAB solution mixture, and 2 min with 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, as described by Baryla et al.^{3,4}

5.3 Calculation of the viscosity of PBS and LNP solutions

The viscosity of the PBS buffer was determined by filling the capillary with the analysis buffer, then by injecting a plug of 0.1 g/L DMF solution in PBS, and finally by comparing the elution time of DMF with the elution time obtained in water ($\eta_{PBS} = \eta_{H2O} \times t_{PBS} / t_{H2O}$). The same methodology was used to calculate the viscosity of the lipid nanoparticles formulation, by filling the capillary with the formulation, then by injecting a plug of DMF, and finally by comparing the elution time to the same molecule in water (see Figure S2 and Table S1).

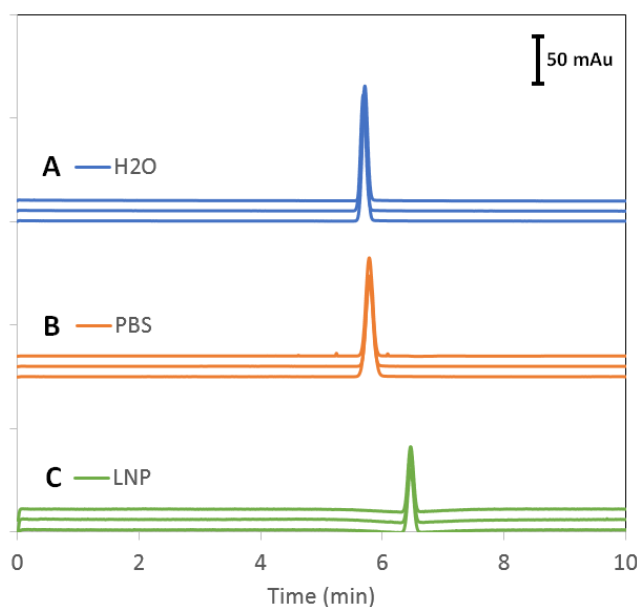


Figure S2. DMF traces (3 repetitions) obtained for the calculation of the viscosity of PBS and LNP solutions. The capillary is filled either with water (A), or with 10 mM PBS buffer (B), or with a solution of LNPs (DLin-MC3-DMA: DSPC: Chol: DMG-PEG-2000 at 50:10:38.5:1.5 molar ratio) encapsulating FLuc mRNA (C). The migration time of the DMF peak allows to calculate the viscosity of the solution. Experimental conditions: μ SIL-FC capillaries of 50 cm total length (41.5 cm to the UV detector) \times 50 μ m i.d. Mobilization pressure: 60 mbar. UV detection: 200 nm. Temperature: 25°C. Sample: DMF at 0.1 g/L into water.

Capillary matrix	H ₂ O	PBS buffer	LNP
DMF detection time (min)	5.71	5.78	6.47
η (10 ⁻³ Pa.s)	0.89	0.90	1.01

Table S1. Calculation of the viscosity of PBS and LNP solutions,

$$\eta(\text{PBS or LNP}) = \eta_{\text{H}_2\text{O}} \times t(\text{PBS or LNP}) / t_{\text{H}_2\text{O}}.$$

5.4 CRLI Fit

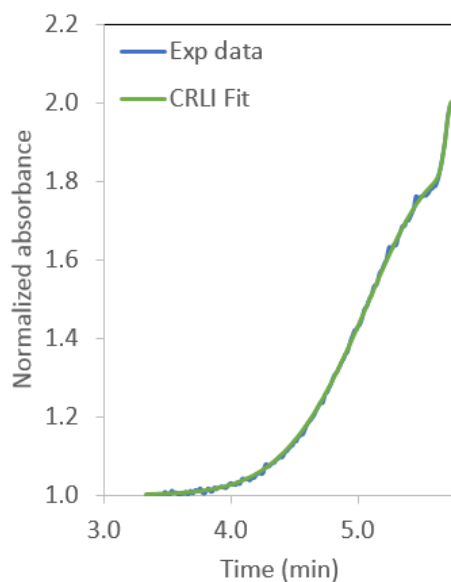


Figure S3. Left part of the experimental Taylorgram in blue and the corresponding CRLI fit in green obtained for LNP loaded with FLuc mRNA. Experimental conditions: μ SIL-FC capillaries of 50 cm total length (41.5 cm to the UV detector) \times 50 μ m i.d. Buffer: PBS 10 mM, pH 7.4, $\eta = 0.9 \times 10^{-3}$ Pa.s. Mobilization pressure: 60 mbar. UV detection: 200 nm. Temperature: 25°C. Sample: lipid nanoparticles (DLin-MC3-DMA:DSPC:Chol:DMG-PEG-2000 at 50:10:38.5:1.5 molar ratio) encapsulating Firefly Luciferase (FLuc) mRNA.

5.5 Graphic Representation $\mu_{ep} = f(\kappa R_h)$ The Debye length k^{-1} is given by the following equation:

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_B T}{2000 \times I N_A e^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (S1)$$

where I is the ionic strength expressed in M. A convenient expression of the Debye length in water at 20°C is given by:

$$\kappa^{-1} (nm) = \frac{0.3}{\sqrt{I}} \quad (S2)$$

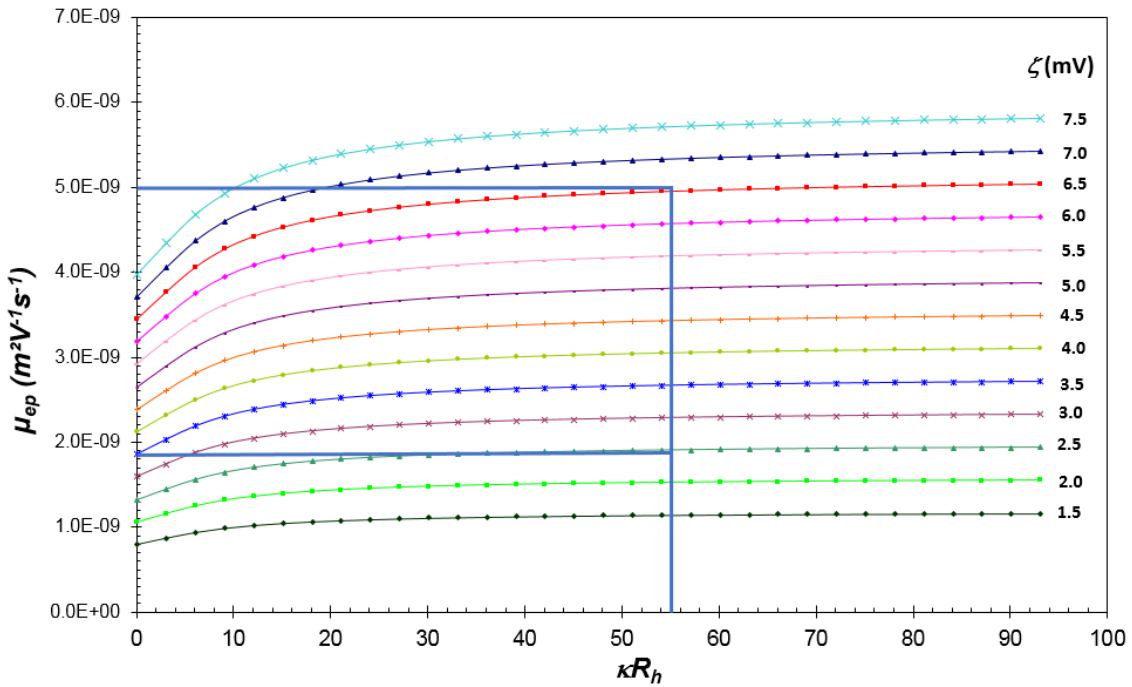


Figure S4. Electrophoretic mobility μ_{ep} as a function of κR_h for different zeta potential (ζ) values according to O'Brien–White–Ohshima model (OWO).

6 References

- (1) Brenner, S.; Jacob, F.; Meselson, M. An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis. *Nature* 1961, 190 (4776), 576–581. <https://doi.org/10.1038/190576a0>.
- (2) Wolff, J.; Malone, R.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P. Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science* 1990, 247 (4949), 1465–1468. <https://doi.org/DOI:10.1126/science.1690918>.
- (3) Liu, M. A. A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. *Vaccines* 2019, 7 (2), 37. <https://doi.org/10.3390/vaccines7020037>.
- (4) Jirikowski, G.; Sanna, P.; Maciejewski-Lenoir, D.; Bloom, F. Reversal of Diabetes Insipidus in Brattleboro Rats: Intrahypothalamic Injection of Vasopressin mRNA. *Science* 1992, 255 (5047), 996. <https://doi.org/10.1126/science.1546298>.
- (5) Schirmmayer, V.; Förg, P.; Dalemans, W.; Chlichlia, K.; Zeng, Y.; Fournier, P.; von Hoegen, P. Intra-Pinna Anti-Tumor Vaccination with Self-Replicating Infectious RNA or with DNA Encoding a Model Tumor Antigen and a Cytokine. *Gene Ther.* 2000, 7 (13), 1137–1147. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301220>.
- (6) Ramaswamy, S.; Tonnu, N.; Tachikawa, K.; Limphong, P.; Vega, J. B.; Karmali, P. P.; Chivukula, P.; Verma, I. M. Systemic Delivery of Factor IX Messenger RNA for Protein Replacement Therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017, 114 (10), E1941. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619653114>.
- (7) Pardi, N.; Sereeto, A. J.; Shan, X.; Debonera, F.; Glover, J.; Yi, Y.; Muramatsu, H.; Ni, H.; Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Shaheen, F.; Collman, R. G.; Karikó, K.; Danet-Desnoyers, G. A.; Madden, T. D.; Hope, M. J.; Weissman, D. Administration of Nucleoside-Modified mRNA Encoding Broadly Neutralizing Antibody Protects Humanized Mice from HIV-1 Challenge. *Nat. Commun.* 2017, 8 (1), 14630. <https://doi.org/10.1038/ncomms14630>.
- (8) Hagg, K. A.; Whitehead, K. A. Tools for Translation: Non-Viral Materials for Therapeutic mRNA Delivery. *Nat. Rev. Mater.* 2017, 2 (10), 17056. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.56>.
- (9) Davies, N.; Hovdal, D.; Edmunds, N.; Nordberg, P.; Dahlén, A.; Dabkowska, A.; Arteta, M. Y.; Radulescu, A.; Kjellman, T.; Höijer, A.; Seeliger, F.; Holmedal, E.; Andihh, E.; Bergenhem, N.; Sandinge, A.-S.; Johansson, C.; Hultin, L.; Johansson, M.; Lindqvist, J.; Björsson, L.; Jing, Y.; Bartesaghi, S.; Lindfors, L.; Andersson, S. Functionalized Lipid Nanoparticles for Subcutaneous Administration of mRNA to Achieve Systemic Exposures of a Therapeutic Protein. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 2021, 24, 369–384. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.03.008>.
- (10) Kim, J.; Eygeris, Y.; Gupta, M.; Sahay, G. Self-Assembled mRNA Vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021, 170, 83–112. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.014>.
- (11) Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanoparticle-Mediated Cellular Response Is Size-Dependent. *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3 (3), 145–150. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>.
- (12) Hoshyar, N.; Gray, S.; Han, H.; Bao, G. The Effect of Nanoparticle Size on in Vivo Pharmacokinetics and Cellular Interaction. *Nanomed.* 2016, 11 (6), 673–692. <https://doi.org/10.2217/nmm.16.5>.
- (13) Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated Portals of Entry into the Cell. *Nature* 2003, 422 (6927), 37–44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>.
- (14) Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. Size-Dependent Internalization of Particles via the Pathways of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis. *Biochem. J.* 2004, 377 (Pt 1), 159–169. <https://doi.org/10.1042/BJ20031253>.
- (15) Petros, R. A.; DeSimone, J. M. Strategies in the Design of Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9 (8), 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
- (16) Andar, A. U.; Hood, R. R.; Vreeland, W. N.; DeVoe, D. L.; Swaan, P. W. Microfluidic Preparation of Liposomes to Determine Particle Size Influence on Cellular Uptake Mechanisms. *Pharm. Res.* 2014, 31 (2), 401–413. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1171-8>.
- (17) Chauhan, V. P.; Jain, R. K. Strategies for Advancing Cancer Nanomedicine. *Nat. Mater.* 2013, 12 (11), 958–962. <https://doi.org/10.1038/nmat3792>.
- (18) Le-Vinh, B.; Steinbring, C.; Wibel, R.; Friedl, J. D.; Bernkop-Schnürch, A. Size Shifting of Solid Lipid Nanoparticle System Triggered by Alkaline Phosphatase for Site Specific Mucosal Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2021, 163, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.03.012>.
- (19) Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021, 20 (2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

- (20) Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* 2015, 33 (9), 941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>.
- (21) World Health Organization. Evaluation of the Quality, Safety and Efficacy of Messenger RNA Vaccines for the Prevention of Infectious Diseases: Regulatory Considerations. 2021.
- (22) EU Official Control Authority. Official Control Authority Batch Release Of Pandemic COVID-19 Vaccine (MRNA). 2021.
- (23) U.S. FDA. Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. 2018.
- (24) U.S. FDA. Drug Products, Including Biological Products, That Contain Nanomaterials-Guidance for Industry. 2017.
- (25) Crawford, R.; Dogdas, B.; Keough, E.; Haas, R. M.; Wepukhulu, W.; Krotzer, S.; Burke, P. A.; Sepp-Lorenzino, L.; Bagchi, A.; Howell, B. J. Analysis of Lipid Nanoparticles by Cryo-EM for Characterizing siRNA Delivery Vehicles. *Int. J. Pharm.* 2011, 403 (1), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.025>.
- (26) Rozo, A. J.; Cox, M. H.; Devitt, A.; Rothnie, A. J.; Goddard, A. D. Biophysical Analysis of Lipidic Nanoparticles. *Membr. Protein Tools Drug Discov.* 2020, 180, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.05.001>.
- (27) Filipe, V.; Hawe, A.; Jiskoot, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharm. Res.* 2010, 27 (5), 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>.
- (28) Kulkarni, J. A.; Darjuan, M. M.; Mercer, J. E.; Chen, S.; van der Meel, R.; Thewalt, J. L.; Tam, Y. Y. C.; Cullis, P. R. On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA. *ACS Nano* 2018, 12 (5), 4787–4795. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01516>.
- (29) Huang, X.; Chau, Y. Investigating Impacts of Surface Charge on Intraocular Distribution of Intravitreal Lipid Nanoparticles. *Exp. Eye Res.* 2019, 186, 107711. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107711>.
- (30) Kim, H.; Robinson, S. B.; Csaky, K. G. Investigating the Movement of Intravitreal Human Serum Albumin Nanoparticles in the Vitreous and Retina. *Pharm. Res.* 2009, 26 (2), 329–337. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9745-6>.
- (31) Let's Talk about Lipid Nanoparticles. *Nat. Rev. Mater.* 2021, 6 (2), 99–99. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00281-4>.
- (32) Lv, H.; Zhang, S.; Wang, B.; Cui, S.; Yan, J. Toxicity of Cationic Lipids and Cationic Polymers in Gene Delivery. *J. Controlled Release* 2006, 114 (1), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.014>.
- (33) Patel, S.; Ashwanikumar, N.; Robinson, E.; Xia, Y.; Mihai, C.; Griffith, J. P.; Hou, S.; Esposito, A. A.; Ketova, T.; Welsher, K.; Joyal, J. L.; Almarsson, Ö.; Sahay, G. Naturally-Occurring Cholesterol Analogues in Lipid Nanoparticles Induce Polymorphic Shape and Enhance Intracellular Delivery of mRNA. *Nat. Commun.* 2020, 11 (1), 983. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14527-2>.
- (34) Kranz, L. M.; Diken, M.; Haas, H.; Kreiter, S.; Loquai, C.; Reuter, K. C.; Meng, M.; Fritz, D.; Vascotto, F.; Hefesha, H.; Grunwitz, C.; Vormehr, M.; Hüsemann, Y.; Selmi, A.; Kuhn, A. N.; Buck, J.; Derhovanessian, E.; Rae, R.; Attig, S.; Diekmann, J.; Jabulowsky, R. A.; Heesch, S.; Hassel, J.; Langguth, P.; Grabbe, S.; Huber, C.; Türeci, Ö.; Sahin, U. Systemic RNA Delivery to Dendritic Cells Exploits Antiviral Defence for Cancer Immunotherapy. *Nature* 2016, 534 (7607), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature18300>.
- (35) Cheng, Q.; Wei, T.; Farbiak, L.; Johnson, L. T.; Dilliard, S. A.; Siegwart, D. J. Selective Organ Targeting (SORT) Nanoparticles for Tissue-Specific mRNA Delivery and CRISPR–Cas Gene Editing. *Nat. Nanotechnol.* 2020, 15 (4), 313–320. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0669-6>.
- (36) Barba, A. A.; Bochicchio, S.; Dalmoro, A.; Caccavo, D.; Cascone, S.; Lamberti, G. Chapter 10 - Polymeric and Lipid-Based Systems for Controlled Drug Release: An Engineering Point of View. In *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*; Grumezescu, A. M., Ed.; William Andrew Publishing, 2019; pp 267–304. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00013-8>.
- (37) Makino, K.; Yamada, T.; Kimura, M.; Oka, T.; Ohshima, H.; Kondo, T. Temperature- and Ionic Strength-Induced Conformational Changes in the Lipid Head Group Region of Liposomes as Suggested by Zeta Potential Data. *Biophys. Chem.* 1991, 41 (2), 175–183. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(91\)80017-L](https://doi.org/10.1016/0301-4622(91)80017-L).
- (38) Fatouros, D. G.; Klepetsanis, P.; Ioannou, P. V.; Antimisiaris, S. G. The Effect of PH on the Electrophoretic Behaviour of a New Class of Liposomes: Arsonoliposomes. *Int. J. Pharm.* 2005, 288 (1), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.09.016>.

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

- (39) Makino, K.; Ohshima, H. Electrophoretic Mobility of a Colloidal Particle with Constant Surface Charge Density. *Langmuir* 2010, 26 (23), 18016–18019. <https://doi.org/10.1021/la1035745>.
- (40) Oukacine, F.; Morel, A.; Cottet, H. Characterization of Carboxylated Nanolatexes by Capillary Electrophoresis. *Langmuir* 2011, 27 (7), 4040–4047. <https://doi.org/10.1021/la1048562>.
- (41) Franzen, U.; Østergaard, J. Physico-Chemical Characterization of Liposomes and Drug Substance–Liposome Interactions in Pharmaceutics Using Capillary Electrophoresis and Electrokinetic Chromatography. *J Chromatogr A* 2012, 1267, 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.018>.
- (42) Franzen, U.; Vermehren, C.; Jensen, H.; Østergaard, J. Physicochemical Characterization of a PEGylated Liposomal Drug Formulation Using Capillary Electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* 2011, 32 (6-7), 738–748. <https://doi.org/10.1002/elps.201000552>.
- (43) Roberts, M. A.; Locascio-Brown, L.; MacCrehan, W. A.; Durst, R. A. Liposome Behavior in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 1996, 68 (19), 3434–3440. <https://doi.org/10.1021/ac9603284>.
- (44) Wiedmer, S. K.; Jussila, M. S.; Holopainen, J. M.; Alakoskela, J.-M.; Kinnunen, P. K. J.; Riekkola, M.-L. Cholesterol-Containing Phosphatidylcholine Liposomes: Characterization and Use as Dispersed Phase in Electrokinetic Capillary Chromatography. *J. Sep. Sci.* 2002, 25 (7), 427–437. [https://doi.org/10.1002/1615-9314\(20020501\)25:7<427::AID-JSSC427>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1615-9314(20020501)25:7<427::AID-JSSC427>3.0.CO;2-#).
- (45) Phayre, A. N.; Vanegas Farfano, H. M.; Hayes, M. A. Effects of PH Gradients on Liposomal Charge States Examined by Capillary Electrophoresis. *Langmuir* 2002, 18 (17), 6499–6503. <https://doi.org/10.1021/la025625k>.
- (46) Chamieh, J.; Davanier, F.; Jannin, V.; Demarne, F.; Cottet, H. Size Characterization of Commercial Micelles and Microemulsions by Taylor Dispersion Analysis. *Int. J. Pharm.* 2015, 492 (1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.037>.
- (47) Chamieh, J.; Jannin, V.; Demarne, F.; Cottet, H. Hydrodynamic Size Characterization of a Self-Emulsifying Lipid Pharmaceutical Excipient by Taylor Dispersion Analysis with Fluorescent Detection. *Int. J. Pharm.* 2016, 513 (1), 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.016>.
- (48) Chamieh, J.; Merdassi, H.; Rossi, J.-C.; Jannin, V.; Demarne, F.; Cottet, H. Size Characterization of Lipid-Based Self-Emulsifying Pharmaceutical Excipients during Lipolysis Using Taylor Dispersion Analysis with Fluorescence Detection. *Int. J. Pharm.* 2018, 537 (1), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.032>.
- (49) Cipelletti, L.; Biron, J.-P.; Martin, M.; Cottet, H. Measuring Arbitrary Diffusion Coefficient Distributions of Nano-Objects by Taylor Dispersion Analysis. *Anal. Chem.* 2015, 87 (16), 8489–8496. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02053>.
- (50) Zhang, X.; Goel, V.; Robbie, G. J. Pharmacokinetics of Patisiran, the First Approved RNA Interference Therapy in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *J. Clin. Pharmacol.* 2020, 60 (5), 573–585. <https://doi.org/10.1002/jcph.1553>.
- (51) Urits, I.; Swanson, D.; Swett, M. C.; Patel, A.; Berardino, K.; Amgalan, A.; Berger, A. A.; Kassem, H.; Kaye, A. D.; Viswanath, O. A Review of Patisiran (ONPATPRO®) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Neurol. Ther.* 2020, 9 (2), 301–315. <https://doi.org/10.1007/s40120-020-00208-1>.
- (52) Akinc, A.; Maier, M. A.; Manoharan, M.; Fitzgerald, K.; Jayaraman, M.; Barros, S.; Ansell, S.; Du, X.; Hope, M. J.; Madden, T. D.; Mui, B. L.; Semple, S. C.; Tam, Y. K.; Ciufolini, M.; Witzigmann, D.; Kulkarni, J. A.; van der Meel, R.; Cullis, P. R. The Onpatro Story and the Clinical Translation of Nanomedicines Containing Nucleic Acid-Based Drugs. *Nat. Nanotechnol.* 2019, 14 (12), 1084–1087. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>.
- (53) Tenchov, R.; Bird, R.; Curtze, A. E.; Zhou, Q. Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. *ACS Nano* 2021. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>.
- (54) Cheng, X.; Lee, R. J. The Role of Helper Lipids in Lipid Nanoparticles (LNPs) Designed for Oligonucleotide Delivery. *Non-Antigen. Regul. Target. Imaging Ther.* 2016, 99, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.022>.
- (55) Pozzi, D.; Marchini, C.; Cardarelli, F.; Amenitsch, H.; Garulli, C.; Bifone, A.; Caracciolo, G. Transfection Efficiency Boost of Cholesterol-Containing Lipoplexes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 2012, 1818 (9), 2335–2343. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.017>.
- (56) Tenchov, B. G.; MacDonald, R. C.; Siegel, D. P. Cubic Phases in Phosphatidylcholine-Cholesterol Mixtures: Cholesterol as Membrane “Fusogen.” *Biophys. J.* 2006, 91 (7), 2508–2516. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.083766>.

Chapitre V. Caractérisation de la taille et de la charge des LNP

- (57) Yanez Arteta, M.; Kjellman, T.; Bartesaghi, S.; Wallin, S.; Wu, X.; Kvist, A. J.; Dabkowska, A.; Székely, N.; Radulescu, A.; Bergenholtz, J.; Lindfors, L. Successful Reprogramming of Cellular Protein Production through mRNA Delivered by Functionalized Lipid Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018, 115 (15), E3351. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720542115>.
- (58) Viger-Gravel, J.; Schantz, A.; Pinon, A. C.; Rossini, A. J.; Schantz, S.; Emsley, L. Structure of Lipid Nanoparticles Containing siRNA or mRNA by Dynamic Nuclear Polarization-Enhanced NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 2018, 122 (7), 2073–2081. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b10795>.
- (59) Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. *Biophys. Rev.* 2016, 8 (4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- (60) Ohshima, H. Approximate Analytic Expression for the Electrophoretic Mobility of a Spherical Colloidal Particle. *J. Colloid Interface Sci.* 2001, 239 (2), 587–590. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7608>.
- (61) Ibrahim, A.; Ohshima, H.; Allison, S. A.; Cottet, H. Determination of Effective Charge of Small Ions, Polyelectrolytes and Nanoparticles by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 2012, 1247, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.010>.
- (62) Ohshima, H.; Furusawa, K.; Dekker, M. Electrical Phenomena at Interfaces : Fundamentals, Measurements and Applications, in *Surfactant Science Series - Second Edition*. 2018, 76, 24–25.

Supporting information references

- (1) Iki, N.; Yeung, E. S. Non-Bonded Poly(Ethylene Oxide) Polymer-Coated Column for Protein Separation by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1996, 731 (1), 273–282. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)01158-7](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01158-7).
- (2) Ouadah, N.; Moire, C.; Brothier, F.; Kuntz, J.-F.; Malý, M.; Dubský, P.; Cottet, H. Mobility Shift Affinity Capillary Electrophoresis at High Ligand Concentrations: Application to Aluminum Chlorohydrate–Protein Interactions. *ACS Omega* 2018, 3 (12), 17547–17554. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02326>.
- (3) Baryla, N. E.; Lucy, C. A. Semi-Permanent Surfactant Coatings for Inorganic Anion Analysis in Capillary Electrophoresis. *14th Int. Ion Chromatogr. Symp.* 2002, 956 (1), 271–277. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01516-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01516-3).
- (4) Lucy, C. A.; MacDonald, A. M.; Gulcev, M. D. Non-Covalent Capillary Coatings for Protein Separations in Capillary Electrophoresis. *50 Years J. Chromatogr.* 2008, 1184 (1), 81–105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.114>.

Chapitre VI. Analyse de la dispersion de Taylor pour le développement des formulations de nanoparticules lipidiques pour les vaccins à ARNm

La taille des nanoparticules lipidiques est un paramètre critique qui dicte la pharmacocinétique et la voie d'internalisation cellulaire des nanoparticules. De plus, l'optimisation de la taille des LNPs peut servir à cibler spécifiquement certains organes. Enfin, le contrôle de la taille est un paramètre majeur lors des études de stabilité pour vérifier qu'il n'y a pas d'agrégation, de fusion ou de dégradation des LNPs. Nous avons montré que la TDA peut être utilisée pour accéder au diamètre hydrodynamique et à la polydispersité des LNPs. L'objectif de cette étude est de montrer que la TDA peut être employée en support à la formulation pour optimiser la taille des LNPs et également pour obtenir des informations supplémentaires sur le taux d'encapsulation de l'ARNm au sein des LNPs et leur intégrité par TDA. En effet, le degré d'encapsulation est également un attribut critique car l'ARNm non encapsulé peut être facilement dégradé et pénétrer difficilement dans les cellules en raison de sa charge négative. L'intégrité de l'ARNm est également d'importance majeure, car une fois dégradé, l'ARNm ne peut plus être traduit en protéine d'intérêt. Ainsi, l'efficacité vaccinale dépend fortement du taux d'encapsulation et de l'intégrité de l'ARNm encapsulé.

Article 5. Taylor dispersion analysis to support LNP formulations for mRNA vaccines

Camille Malburet^{1,2}, Laurent Leclercq¹, Jean-François Cotte², Jérôme Thiebaud², Emilie Bazin², Marie Garinot², Hervé Cottet^{1*}

¹ IBMM, University of Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

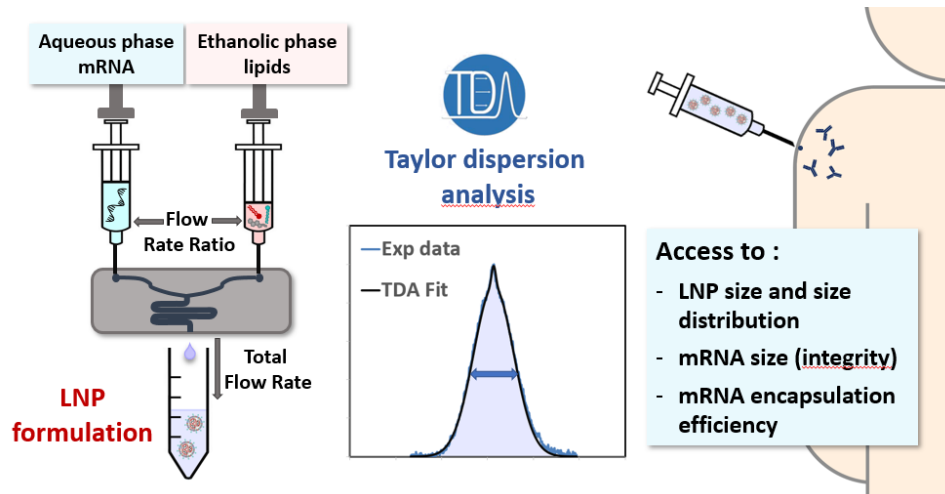
² Sanofi Pasteur, 1541 avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France

*Correspondence should be addressed to H.C. (herve.cottet@umontpellier.fr)

Abstract

Lipid nanoparticles (LNPs) are currently the most advanced non-viral clinically approved messenger ribonucleic acid (mRNA) delivery systems. The ability of a mRNA vaccine to have a therapeutic effect is related to the capacity of LNPs to deliver the nucleic acid intact into cells. The role of LNPs is to protect mRNA, especially from degradation by ribonucleases (RNases) and to allow it to access the cytoplasm of cells where it can be translated into the protein of interest. LNPs enter cells by endocytosis and their size is a critical parameter impacting their cellular internalization. In this work, we studied different formulation process parameters impacting LNPs size. Taylor dispersion analysis (TDA) was used to determine the LNPs size and size distribution and the results were compared with those obtained by Dynamic Light Scattering (DLS). TDA was also used to study both the degradation of mRNA in the presence of RNases and the encapsulation rate of mRNA within LNPs.

Graphical abstract



1 Introduction

Prophylactic vaccines stimulate the immune system to produce immunity against a specific pathogen, protecting the person from future infections. Thereby, during the last century, conventional vaccine approaches have drastically reduced the mortality and morbidity associated with infectious diseases.^{1,2} Despite this success, the number of untreated medical needs remains high and new infectious diseases are periodically appearing.³ The development of new vaccine strategies is therefore required.

Messenger ribonucleic acid (mRNA) vaccines have emerged as promising and versatile alternatives to conventional vaccine approaches.⁴ These vaccines do not carry a typical antigen but rather the information for producing it using the cell machinery and turning the body into its own antigen factory. This is close to the process of natural viral infections, where viral genetic material is used to produce viral proteins from within a host cell. The use of mRNA vaccine has several beneficial features over whole inactivated, live-attenuated, subunit or DNA-based vaccines. Indeed, mRNA is a non-infectious platform that does not need to enter into the cell nucleus to be effective⁵ and has the potential for rapid development and manufacturing. mRNA vaccines are manufactured using defined processes, regardless of the antigen encoded by the mRNA, which allows to simplify vaccine production and quality control and therefore reduce development and validation timelines.⁶ The first report of successful use of *in vitro* transcribed (IVT) mRNA was published in 1990, when mRNAs were injected into mice and protein production was detected.⁷ However, until recently, use of mRNA vaccine has been hold back by mRNA instability, high innate immune activation and inefficient intra cellular delivery.⁸ Recent advances on IVT-mRNA structure and RNA delivery systems have allowed to overcome these issues, and mRNA vaccines show now considerable promises for both prophylactic and therapeutic vaccines.⁹ Onpattro® (patisiran) was the first RNA-based drug approved by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) in 2018.¹⁰ This drug uses small interfering RNA (siRNAs) encapsulated into lipid nanoparticles (LNPs) for the treatment of hereditary transthyretin-mediated (hATTR) amyloidosis.^{11,12} Since then, other highly effective RNA-based vaccines using LNPs have been developed and approved in a record time during the COVID-19 epidemic.¹³ This opens the way and the hope for the acceleration of the development of new vaccines based on

mRNA vaccine technology.¹⁴ Yet, some points still need to be optimized such as the stability of the formulations^{15,16}, the endosomal escape efficiency^{17,18}, the reduction of reactogenicity and adverse events after injection¹⁹ and the precise targeting of certain organs²⁰⁻²².

LNPs are not simple carriers, they play an active role in the vaccine efficacy.²³ Among other physicochemical parameters, the size of the LNPs is a critical parameter that has an important effect on their *in vivo* behavior. Particle size is known to influence the pathway of cell internalization and intracellular processing.²⁴⁻²⁷ Size also influences the pharmacokinetics of the nanoparticles.^{28,29} The size of LNPs can therefore be optimized to specifically target certain organs.³⁰⁻³⁴ Moreover, size characterization is also of major importance during stability studies as it is necessary to verify that there is no aggregation, fusion or degradation of the LNPs and that their size remains stable.¹⁵

Optimizing mRNA-based vaccine formulations requires the development of new analytical methods to better understand current limitations and to challenge existing analytical methods.³⁵

In this work, Taylor dispersion analysis (TDA) was used as a powerful tool for the optimization of LNPs formulations. LNPs of different sizes were formulated by modifying three parameters: (i) the PEG-lipid content, (ii) the total flow rate (TFR) which is the fluid volume which passes per unit of time and (iii) the flow rate ratio (FRR) between the aqueous and the organic phase. The sizes and size distribution obtained by TDA were then compared to those obtained by Dynamic Light Scattering (DLS) which is a method widely used for the monitoring of LNPs formulations.^{28,36} TDA was also used to follow the degradation of mRNA in the presence of ribonucleases and to determine the encapsulation rate of mRNA within the LNPs.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals and Materials

FLuc (Cyanine 5 Firefly Luciferase) mRNA (1929 nucleotides) at 1 mg/mL in 1 mM sodium citrate pH 6.4 was purchased from TriLink BioTechnologies (San Diego, CA, USA). RNase-free water DEPC treated was purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Trisodium citrate dihydrate $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ($M_w = 294.1$ g/mol) and citric acid monohydrate $\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 210.1$ g/mol) were purchased from Merk (Darmstadt, Germany). DLin-MC3-DMA ((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriacont-6,9,28,31-tetraene-19-yl 4-(dimethylamino)butanoate) was purchased from Sai Life Sciences Ltd.

(Telangana, India). DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), Chol (cholesterol) and DMG-PEG-2000 (1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Absolute ethanol was purchased from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France). PBS (phosphate-buffered saline) 10X buffer was purchased from Eurobio Scientific (Les Ulis, France). Slide-A-Lyzer™ dialysis cassettes, 10K MWCO, 3 mL, were purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). μ SIL-FC (fluorocarbon polymer) coated capillaries were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Invitrogen™ Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Assay Kit and Pierce™ White Opaque 96-Well Plates were purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Ribonuclease A from bovine pancreas (RNase A, $M_w = 14$ kDa, pI = 9) and Triton™ X-100 were purchased from Merk (Darmstadt, Germany). Deionized water was further purified with a Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France).

2.2 Formulation of LNPs

Lipid nanoparticles (LNPs) self-assemble by the rapid dilution of an organic phase containing lipids in an aqueous phase containing the mRNA. The organic phase was prepared by mixing the 4 lipids in absolute ethanol at the following molar ratio DLinMC3-DMA: DSPC: Chol: DMG-PEG-2000 (50:10:40-x:x). Stock solutions of lipids were previously prepared in absolute ethanol at the following concentrations: DLinMC3-DMA 100 mg/mL, DSPC 30 mg/mL, Chol 18 mg/mL, DMG-PEG-2000 30 mg/mL. The aqueous phase was prepared by diluting mRNA at 0.25 g/L in 50 mM RNase free citrate buffer, pH 4. The mixing step was performed using NanoAssemblr® Ignite™ instrument from Precision NanoSystems (Vancouver, Canada). One syringe was filled with the aqueous solution and another one with the ethanolic solution. LNPs are then produced setting up the NanoAssemblr® software with the following parameters: Flow Rate Ratio (FRR) and Total Flow Rate (TFR). Both parameters varied according to each formulation, as summarized in Table 1. 2 mL solution were involved per formulation with 0.45 mL of start waste volume and 0.05 mL of end waste volume, resulting in 1.5 mL per LNP formulation. After formulation step, each LNP-mRNA sample was immediately dialyzed one night against 500 mL of 50 mM citrate buffer, pH 4 using Slide-A-Lyzer dialysis cassette 10K MWCO. This first dialysis was performed to remove residual ethanol. After that, two successive dialysis of

one day and one night long in total were performed against 500 mL PBS buffer at pH 7.4 to raise the pH to physiological value. The size of the different LNPs formulations was then determined by DLS and the formulations were filtered using 0.2 or 0.45 micrometer filters according to their size. The formulations were then stored at +5°C.

2.3 Taylor Dispersion Analysis (TDA)

The equipment used for TDA experiments was a 7100 Capillary Electrophoresis Agilent system (Waldbronn, Germany). This system was equipped with a diode array detector (DAD) and with a Zetalif LED induced fluorescence (LEDIF) detector purchased from Adelis (Grabels, France), both connected in series. The UV measurements were performed at 200 nm. The fluorescent measurements were performed with excitation at 480 nm (for RiboGreen® RNA dye). The temperature of the capillary cartridge was set at 25°C. The LNP formulations were injected without prior dilution into the capillaries filled with PBS buffer. TDA experiments were performed using 60 mbar mobilization pressure of a sample plug injected at 20 mbar for 6 s. The elution peaks obtained were fitted using two Gaussians, depending on the number of objects in the solution, according to equation (1) using a home-developed Excel spreadsheet:

$$S(t) = \sum_{i=1}^2 \frac{A_i}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} \exp \frac{-(t-t_0)^2}{2\sigma_i^2} \quad (1)$$

where $S(t)$ is the absorbance signal, σ_i is the temporal variance, A_i is a constant that depended on the response factor and the injected quantity of solute and t_0 is the average elution time. t_0 is directly obtained from the position of the maximum of absorbance and σ_i , and A_i are adjusting parameters obtained by nonlinear least square regression using Excel solver.

The temporal variance σ_i allows to calculate the molecular diffusion coefficient D_i according to equation (2):

$$D_i = \frac{R_c^2 t_0}{24\sigma_i^2} \quad (2)$$

where R_c is the capillary radius. Stokes–Einstein equation (3) allows then to determine the hydrodynamic diameter $D_{h,i}$:

$$D_{h,i} = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_i} \quad (3)$$

where k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature, and η is the eluent viscosity.

To get the size distribution, the elution profile can be fitted using a second approach based on Regularized Linear Inversion (CRLI) algorithm³⁷ according to equation (4):

$$S(t) = \int_0^\infty CM(D)\rho(D)\sqrt{D} \exp\left[-\frac{(t-t_0)^2 12D}{R_c^2 t_0}\right] dD \quad (4)$$

where C is an instrumental constant, $M(D)$ and $\rho(D)$ are the mass and the molar concentration of the objects with the diffusion coefficient D , respectively. The polydispersity of the sample can further be determined using equations (5) and (6):

$$\sigma_{D_h}^2 = \frac{\int_{D_{hmin}}^{D_{hmax}} (D_h - \bar{D}_h)^2 P(D_h) dD_h}{\int_{D_{hmin}}^{D_{hmax}} P(D_h) dD_h} \quad (5)$$

$$PDI = \left(\frac{\sigma_{D_h}}{\bar{D}_h}\right)^2 \quad (6)$$

2.4 Dynamic Light Scattering (DLS)

The equipment used for DLS experiments was a Malvern Panalytical Zetasizer Nano ZS system (Palaiseau, France). LNPs formulations were diluted by adding 10 μ L of the formulation into 1 mL PBS buffer. The temperature of the cuvettes was set at 25°C. The measurement angle was 173°. Cumulant fit was used to fit the experimental data of the autocorrelation function and to get the intensity average hydrodynamic diameter.

2.5 Encapsulation efficiency by Ribogreen assay

To determine mRNA encapsulation efficiency, two calibration curves were first performed with unformulated mRNA. The first curve was determined with mRNA diluted in 1X RNase free TE buffer and the second one in 1X RNase free TE buffer with 0.5% (v/v) Triton X-100 in a 96-well plate. Quant-iT RiboGreen fluorescent reagent was then added to each well and the fluorescence

signal (excitation/emission: 480/520 nm) was quantified using SpectraMax® i3k from Molecular Devices (San Jose, CA, USA).

LNP-mRNA formulations were then diluted in 1X RNase free TE buffer and in 1X RNase free TE buffer with 0.5% (v/v) Triton X-100, followed by Quant-iT RiboGreen reagent addition. mRNA encapsulation was determined by comparing the fluorescence in the presence and in the absence of Triton X-100. In the absence of Triton X-100, the signal only comes from the free (unencapsulated) mRNA while, in the presence of Triton X-100, the signal comes from the total mRNA as the detergent allows to break the LNPs. The encapsulation efficiencies (ee%) were therefore calculated according to equation (7):

$$ee\% = \left(1 - \frac{\text{free mRNA (without Triton)}}{\text{total mRNA (with Triton)}}\right) \times 100 \quad (7)$$

3 Results

3.1 Lipid nanoparticles (LNPs) formulation

Nine formulations of lipid nanoparticles (LNPs) were produced by dilution of an ethanolic phase containing the lipids in an aqueous citrate buffer containing mRNA, as shown in Figure 1. The first three formulations [F1-F3] have been formulated with mRNA in the citrate buffer and the next six [F4-F9] without mRNA but with the same other parameters of formulation. Three formulation parameters have been studied: (i) the PEG-lipid content, (ii) the total flow rate and (iii) the flow rate ratio between the aqueous and the organic phase, as summarized in Table 1.

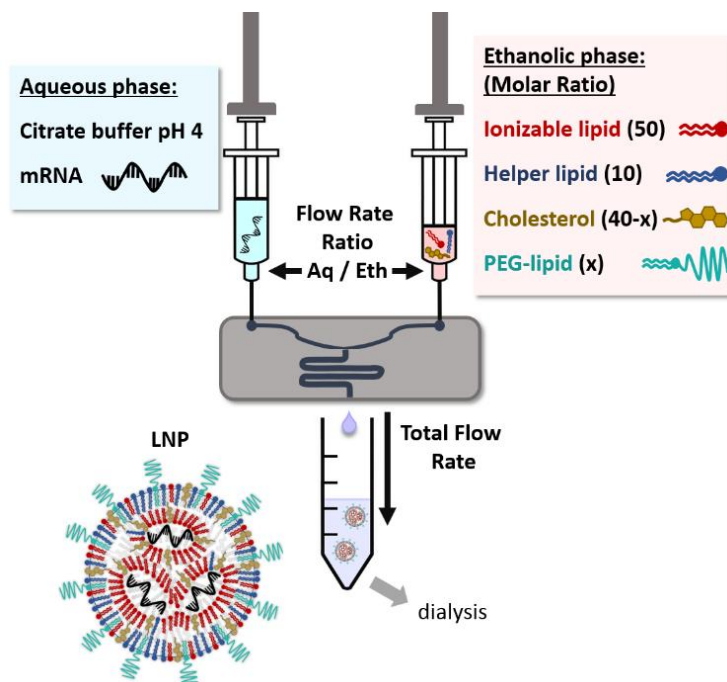


Figure 1: Schematic representation of lipid nanoparticles (LNPs) formulation by rapid dilution of an ethanolic phase containing lipids in an aqueous phase containing mRNA. At low pH, the ionizable lipids are positively charged and electrostatic interactions between the negatively charged mRNA and the ionizable lipids result in the formation of the LNPs nuclei. At the same time, hydrophobic interactions between the lipids and the aqueous phase cause the lipids to group, avoiding contact with the aqueous phase, and resulting in the formation of the LNPs envelope.

3.2 Characterization of LNPs size and size distribution by TDA and DLS

The formulations were analyzed in triplicates by TDA and the mean hydrodynamic diameters were calculated by fitting the elution peaks obtained with two gaussian curves using a home-developed Excel spreadsheet (see Figure S1 to visualize the taylorgram fits). Two-Gaussian fitting is used for taking into account the LNP population and the presence of small molecules in the samples (represented by the small sharp peak at the top of the elution profile). Figure 2A shows that decreasing the PEG-lipid content from 5 to 0.5% led to an increase in the hydrodynamic diameters of the LNPs from 52 to 216 nm, respectively, leading to broader elution profiles. Figure 2B shows that a decrease in the total flow rate from 6 to 1 mL/min resulted in an increase in the hydrodynamic diameters from 83 to 121 nm, respectively. Figure 2C shows that a decrease in the flow rate ratio from 5:1 to 2:1 also resulted in an increase in the hydrodynamic diameters from 79 to 100 nm, respectively.

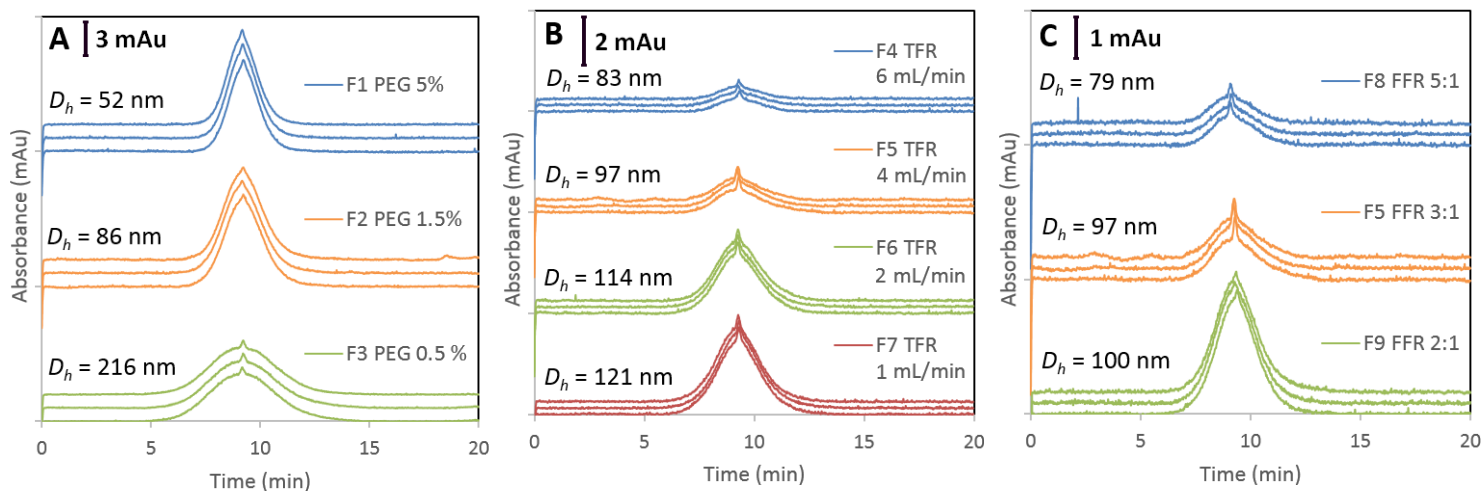


Figure 2: Taylorgrams obtained for LNPs size characterization. Impact of formulation parameters: PEG-lipid content (A), Total Flow Rate (TFR) (B), Flow Rate Ratio (FRR) (C). Experimental conditions: μ SIL-FC coated capillaries of 61 cm total length (52.5 cm to the UV detector) \times 50 μ m i.d. Buffer: 10 mM PBS, pH 7.4, $\eta = 0.9 \times 10^{-3}$ Pa.s. Capillary presaturation: LNPs for 10 min at 60 mbar. Capillary preconditioning: H₂O for 2 min at 960 mbar followed by 2 min PBS at 960 mbar. Injection of LNPs: 20 mbar, 6 s. Mobilization pressure: 60 mbar. Sample: LNPs (DLin-MC3-DMA:DSPC:Chol:DMG-PEG-2000 at 50:10:40-x:x molar ratio) empty or encapsulating Firefly Luciferase (FLuc) mRNA. UV detection: 200 nm. Temperature: 25°C. All results are presented in triplicates.

The mean hydrodynamic diameters and the polydispersity indices of all LNPs formulations were also measured by DLS for comparison (see Table 1). The size distributions obtained by DLS and by TDA using Regularized Linear Inversion (CRLI) algorithm³⁷ were given in Figure S2 and Figure S3, respectively, and the corresponding polydispersity indices (PDI) were gathered in Table 1. The results obtained by TDA and DLS were compared and the sizes and PDI obtained by TDA were systematically lower than those obtained by DLS for all the LNPs formulations, due to intrinsic differences in these two techniques.

Table 1: Summary of the formulation parameters of the nine studied formulations and comparison of the hydrodynamic diameters (D_h) and the polydispersity indices (PDI) obtained by both TDA and DLS (see materials and methods).

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	
Formulation parameters	% PEG	5	1.5	0.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	
	TFR (mL/min)	4	4	4	6	4	2	1	4	
	FRR	3:1	3:1	3:1	3:1	3:1	3:1	3:1	5:1	
	mRNA	yes	yes	yes	no	no	no	no	no	
Results	D_h TDA (nm)	52 ± 2	86 ± 3	216 ± 4	83 ± 5	97 ± 4	114 ± 3	121 ± 5	79 ± 4	
	PDI TDA	0.004 ± 0.002	0.011 ± 0.007	0.017 ± 0.005	0.011 ± 0.007	0.009 ± 0.003	0.015 ± 0.015	0.032 ± 0.023	0.001 ± 0.001	0.064 ± 0.006
	D_h DLS (nm)	93 ± 3	128 ± 2	239 ± 3	85 ± 2	117 ± 2	144 ± 1	191 ± 6	91 ± 3	132 ± 2
	PDI DLS	0.148 ± 0.041	0.112 ± 0.045	0.099 ± 0.048	0.152 ± 0.036	0.171 ± 0.012	0.166 ± 0.022	0.151 ± 0.035	0.156 ± 0.024	0.141 ± 0.008

Figure 3A displays the size distributions (in triplicates) obtained by TDA for formulation F1, F3 and for a 50/50 (v/v) F1-F3 mixture. Figure 3B displays the size distributions of the same samples obtained by DLS for comparison. In DLS, the size distributions of the two formulations analyzed separately were shown to overlap with [30-300] nm for F1 and [110-600] nm for F2, which was not the case in TDA, [35-70] nm for F1 and [160-280] nm for F2. When analyzing the F1-F3 mixture, a single population with a very broad peak of [30-600] nm and an average size of 211 nm was observed in DLS, while two distinct populations of [40-70] nm and [160-240] nm could be distinguished in TDA.

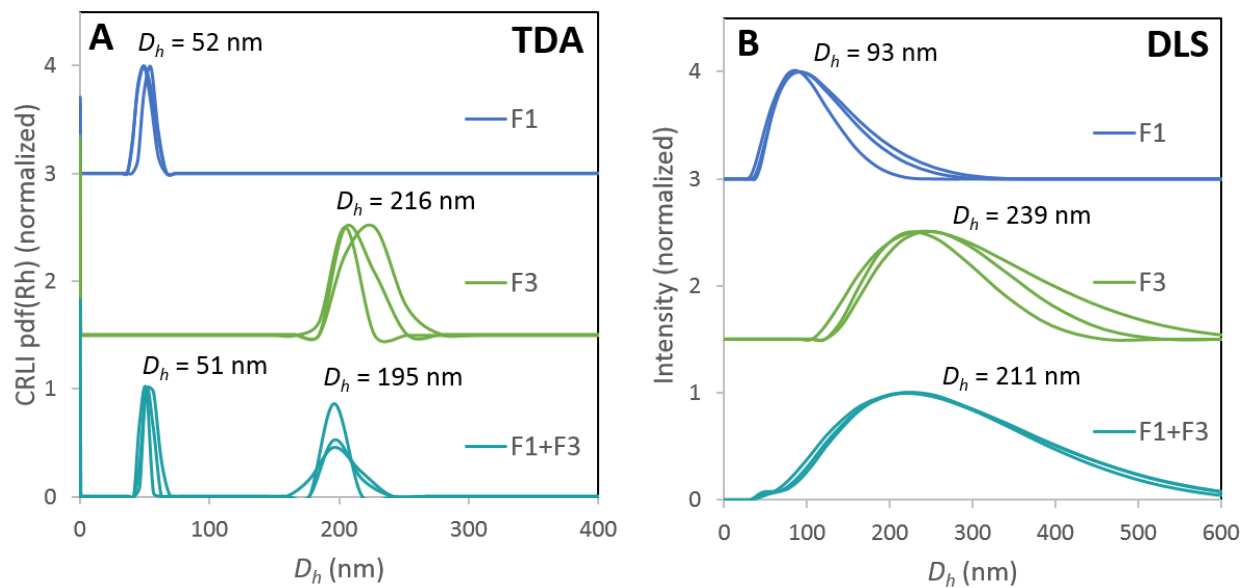


Figure 3: Size distributions obtained by TDA (A) and DLS (B) for formulations F1, F3 and a 50/50 (v/v) mixture of F1 and F3. TDA experimental conditions as in Figure 2. DLS experimental conditions: 10 mM PBS buffer, pH 7.4, $\eta = 0.9 \times 10^{-3}$ Pa.s. Sample: LNPs (DLin-MC3-DMA:DSPC:Chol:DMG-PEG-2000 at 50:10:40-x:x molar ratio) empty or encapsulating Firefly Luciferase (FLuc) mRNA. Sample dilution: 10 μ L of the formulation into 1 mL PBS buffer. Temperature: 25°C. Measurement angle: 173°. All results are presented in triplicates.

3.3 Study of the degradation of mRNA in the presence of ribonucleases

Subsequently, TDA was used to study the degradation of mRNA in presence of ribonuclease A (RNase A). Figure 4A shows the analysis of naked mRNA (unencapsulated) at 0.5 g/L in PBS buffer (without RNase A, see blue trace) giving an average hydrodynamic diameter of 43 nm (mRNA Length: 1929 nucleotides). Repeating the same operation after addition of RNase A at 5 mg/L (below RNase A UV detection limit in TDA) in the mRNA solution, led to much a thinner peak (see green trace), the hydrodynamic diameter being only 1.4 nm. The same experiment was then carried out on a LNP formulation encapsulating mRNA. No significant difference in size was observed with or without the presence of RNase A, the hydrodynamic diameters being similar (82 and 84 nm, respectively). Finally, a 50/50 (v/v) mixture of a LNPs solution and a free mRNA solution was prepared. In the absence of RNase A, two populations were distinguished by TDA, one of 43 nm corresponding to the free mRNA and one of 84 nm corresponding to LNPs (see blue trace). In the presence of RNase A, a population of 1.4 nm, corresponding to the naked mRNA

degraded by RNase A, and another one of 86 nm, corresponding to LNPs, were observed. The Gaussian fits of the elution profiles are presented in Figure S4.

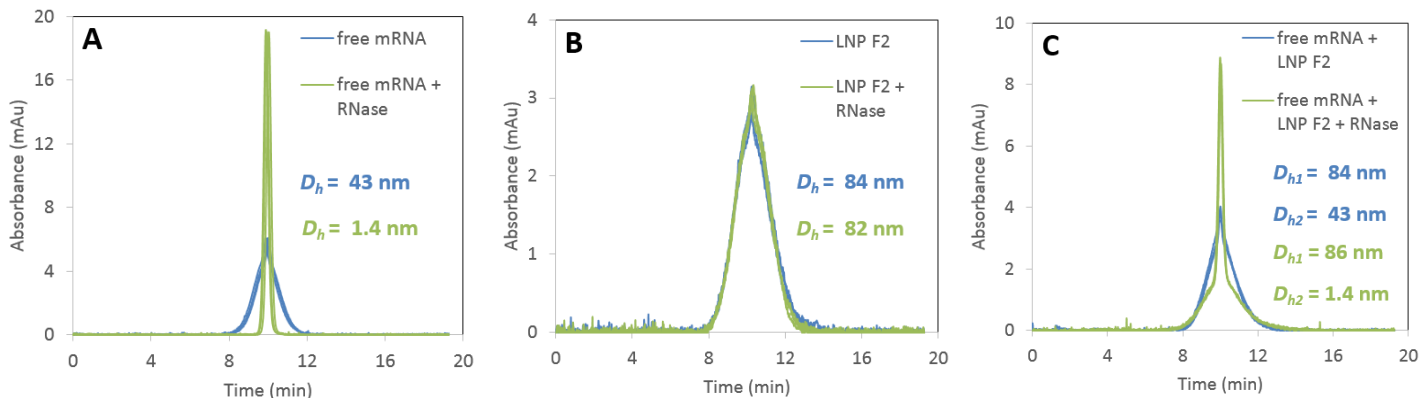


Figure 4: Taylorgrams obtained in the absence (blue trace) or in the presence (green trace) of RNase A for: free mRNA (A), mRNA loaded LNP formulation F2 (B) a mixture of free mRNA and LNP formulation F2 (C). Experimental conditions: free mRNA is Firefly Luciferase (FLuc) mRNA. LNP formulation F2 is DLin-MC3-DMA:DSPC:Chol:DMG-PEG-2000 at 50:10:38.5:1.5 molar ratio encapsulating FLuc mRNA. RNase A concentration in the final samples: 2.5 mg/L. Other conditions as in Figure 2. All results are presented in triplicates.

3.4 Calculation of mRNA encapsulation efficiency by TDA

In order to access the integrity of the mRNA encapsulated within the LNPs and to calculate the encapsulation rate, RiboGreen[®] Reagent was used with a fluorescence detector on the capillary electrophoresis equipment. This fluorescent reagent does not enter LNPs and allows to label the free mRNA (red traces in Figure 5). A first visual observation of the free mRNA peaks obtained for the two formulations F1 and F3 in Figure 5, shows that F1 has a higher rate of free mRNA than F3. To access the amount of total mRNA, the LNPs were deformulated by adding a powerful surfactant Triton X-100 at 0.5% (v/v) (see purple traces in Figure 5). The ratio between the two peak areas (free mRNA/total mRNA) directly gave access to the encapsulation rate. Encapsulation rates of 79% and 95% were obtained for F1 and F3, respectively. To confirm these results, the encapsulation efficiencies of the two formulations were also calculated by Ribogreen assay using SpectraMax[®] i3k, (see materials and methods). This orthogonal method gave similar encapsulation rates (75% and 94% for F1 and F3, respectively).

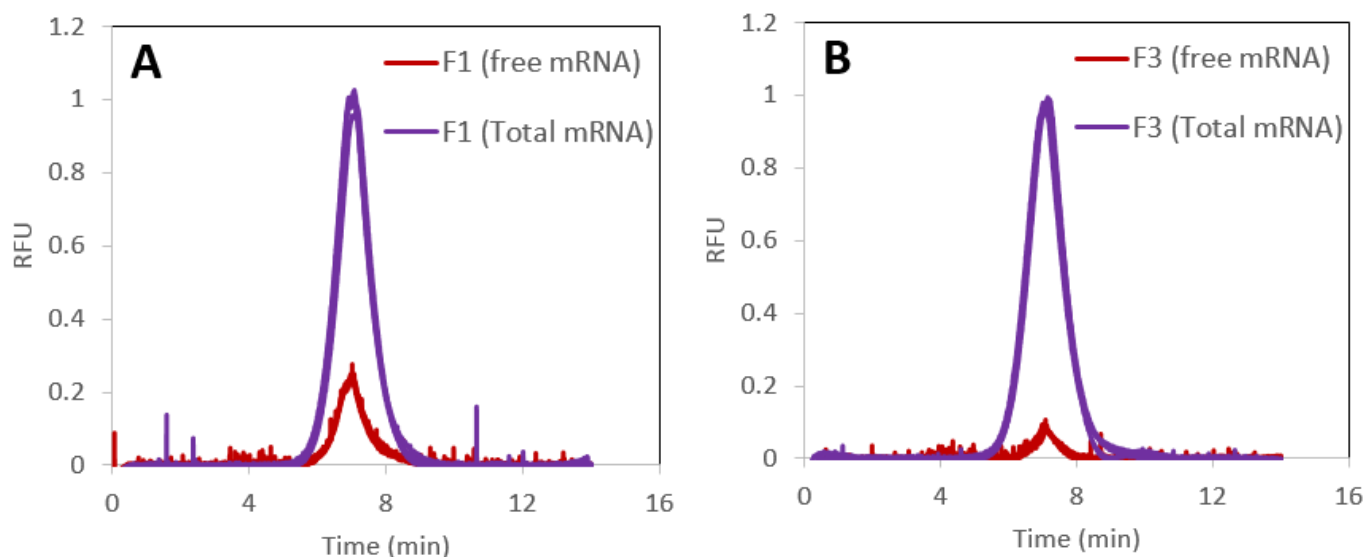


Figure 5: Taylorgrams obtained for the determination of mRNA encapsulation rate and free mRNA hydrodynamic diameters for formulation F1 (A) and formulation F3 (B). Use of RiboGreen® fluorescent Reagent to label the free (unencapsulated) mRNA (red traces) and the total mRNA after deformation of the LNP with Triton X-100 (purple traces). Experimental conditions: μ SIL-FC coated capillaries of 61 cm total length (40 cm to the fluorescence detector) \times 50 μ m i.d. Buffer: TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5). Capillary presaturation: LNP for 10 min at 60 mbar. Capillary preconditioning between runs: H₂O for 2 min at 960 mbar followed by 2 min TE buffer at 960 mbar. Injection: 20 mbar, 6 s. Mobilization pressure: 60 mbar. Sample: LNP formulations F1 and F3 with RiboGreen® fluorescent Reagent and with (purple trace) or without (red trace) Triton X-100 at 0.5% (v/v) in the sample. Fluorescence excitation at 480 nm, emission light wavelength ranges from 515 to 760 nm. All results are presented in triplicates.

Additionally, it was possible to access the size of the mRNA by TDA, giving information on its integrity, by fitting the elution profile before and after LNP deformation using Triton X-100. In the case of formulation F1, the average hydrodynamic diameter was 28 nm and 37 nm for the free mRNA (before deformation) and the total mRNA (after deformation), respectively. In the case of formulation F2, the average hydrodynamic diameter was 10 nm and 42 nm for the free mRNA and the total mRNA, respectively.

Finally, using calibration curves performed with naked mRNA, as presented in Figure S5, it was possible to access the concentration of the total mRNA and free mRNA present in one formulation.

12.3 µg/mL free mRNA and 60.7µg/mL total mRNA were found for formulation F1 and 3.2 µg/mL free mRNA and 62.1µg/mL total mRNA were found for formulation F3.

4 Discussion

The size of LNPs is a critical parameter for cellular uptake.^{33,38} In this work, three parameters impacting LNPs size were studied. First, the PEG-lipid content was shown to have a significant impact on the size of LNPs, as a decrease from 5% to 0.5% multiplies the hydrodynamic diameter by 4. The strong influence of the PEG-lipid content has already been reported in the literature and the results obtained are in agreement with those of Belliveau et al.³⁹ and Yanez Arteta et al.⁴⁰ Furthermore, Bao et al.⁴¹ showed that LNPs with higher PEG-C-DMA amount altered gene silencing efficacy by potentially reducing endosomal disruption. In addition, several studies reported the presence of anti-PEG antibodies^{42,43}, therefore the development of new strategies to optimize or replace the PEG-lipid were explored.⁴⁴⁻⁴⁸ But its replacement is tricky and other strategies must be considered for size optimization, especially trying to obtain small-sized LNPs with diameter <100 nm.

Two other parameters of the formulation that have also been reported to have an impact on LNP size⁴⁹ were studied, namely the TFR and the FRR. It appeared in this work that the higher the TFR and the FRR, the smaller the LNPs size. Indeed, the faster the dilution of the ethanol phase in the aqueous phase, the less time needed for lipids to group and stabilize, and the smaller the LNPs size. Therefore, the system used for mixing the organic and the aqueous phases is also a critical point for controlling the LNPs size. To obtain small LNPs of well-defined size, the system must allow a rapid and homogeneous dilution of the ethanolic phase into the aqueous phase by maximizing the contact interface between the two fluids.^{50,51}

The sizes, size distributions and polydispersity indices of the LNPs formulations measured by TDA using CRLI fit⁵² were compared to the ones obtained by DLS using Cumulant fit. The size distributions obtained by TDA were all narrower and shifted towards smaller sizes than those obtained by DLS. Therefore, the mean hydrodynamic diameters and the polydispersity indices obtained by TDA were smaller than those one obtained by DLS. These differences can be explained by the fact that the two techniques do not determine the same size distributions. The size

Chapitre VI. Caractérisation des formulations vaccinales ARNm par TDA

distribution obtained by TDA is related to the weight-average (or mass-average) distribution for a detection sensitive to the mass concentration⁵³, each LNP contributing to the distribution relative to their mass proportion in the mixture. In contrast, the size distribution obtained by DLS is related to the intensity-average distribution, that gives more weight to the larger entities, since the distribution is weighted by the scattered intensity scaling as the hydrodynamic radius to the power 6. As the size distributions obtained by DLS are wider than those obtained by TDA, it is thus more difficult to distinguish two populations in DLS than in TDA. This was confirmed by the analysis of a 50-50 mixture of two LNP formulations of different hydrodynamic diameters (52 and 216 nm). Indeed, DLS experiments showed a single mode distribution with an average size close to the one of the largest LNP in the mixture, while TDA was able to identify the presence of two LNP populations. These differences show the complementarity of the two methods for a better characterization of LNP size distributions. For instance, DLS can easily detect the presence of few quantities of larger or aggregated LNP in the sample, while TDA brings a distribution relative to the mass proportion of each nanoparticle in the mixture, and consequently a non-biased mass-average size. Moreover, the complementary use of these two methods comply with the US FDA recommendation about the use of orthogonal methods to address technique-related differences for critical drug product parameters.⁵⁴

Subsequently, TDA was used to study the degradation of mRNA in the presence of ribonucleases. Degradation of mRNA is one of the main reasons why mRNA should be encapsulated into LNPs.^{55,56} It was observed that the addition of small amounts of RNase A is able to cut mRNA into small pieces as its hydrodynamic diameter instantly drops from 43 to 1.4 nm. TDA thus allowed a clear observation of mRNA degradation. Concerning the mRNA loaded LNPs, no visible degradation was directly observed by TDA after RNase addition.

It was demonstrated that TDA can be also used to determine the encapsulation rate of mRNA within LNPs and the size integrity of the encapsulated mRNA. The results obtained were consistent with those obtained by Ribogreen assay using a microplate reader. The degree of encapsulation is an important parameter, as unencapsulated mRNA can easily be degraded and hardly penetrate into the cytoplasm of cells due to its negative charge. For the two studied formulations, the size of the free mRNA obtained by TDA was smaller than the one of the encapsulated mRNA, which shows

Chapitre VI. Caractérisation des formulations vaccinales ARNm par TDA

a potential degradation of the free mRNA when the formulations are stored in non-RNase free conditions. mRNA integrity is a critical parameter, as in case of degradation, it can no longer be translated into the protein of interest. Therefore, the vaccine efficacy highly depends on the rate of encapsulation and on mRNA integrity.

Finally, this study showed that a single capillary electrophoresis equipment is able to provide valuable and complementary information on mRNA-LNP formulations. As TDA is easy to automatize, inexpensive and allow to work under physiological conditions, it could be advantageously used for quality control and stability studies to control LNPs size and mRNA size integrity. As it requires small volumes (nL are injected, 20 μ L typically handled), TDA can also be used for research purpose to optimize LNP formulations parameters.

5 Supporting information

5.1 Two-Gaussian fit of the elution profiles obtained by TDA

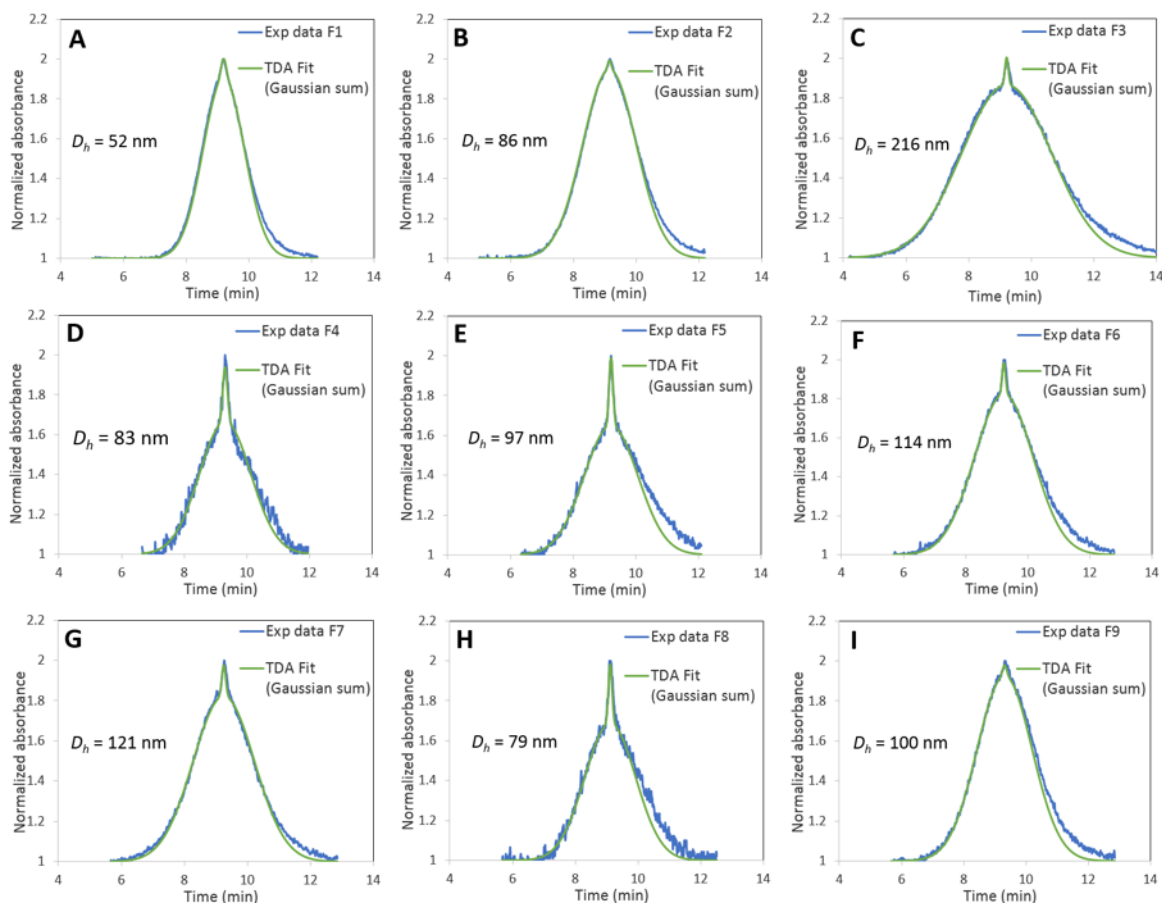


Figure S1: Experimental Taylorgrams (blue traces) obtained for the nine studied LNPs formulations and the corresponding two-Gaussian fits (green traces) allowing to calculate the LNPs hydrodynamic diameters. The Gaussian fits are performed only on the left half of the elution peak to avoid any impact of peak tailing on the size measurement. Experimental conditions: μ SIL-FC coated capillaries of 61 cm total length (52.5 cm to the UV detector) \times 50 μ m i.d. Buffer: 10 mM PBS, pH 7.4, $\eta = 0.9 \times 10^{-3}$ Pa.s. Capillary presaturation: LNPs for 10 min at 60 mbar. Capillary preconditioning: H₂O for 2 min at 960 mbar followed by 2 min PBS at 960 mbar. Injection of LNPs: 20 mbar, 6 s. Mobilization pressure: 60 mbar. Sample: LNPs (DLin-MC3-DMA:DSPC:Chol:DMG-PEG-2000 at 50:10:40-x:x molar ratio) empty or encapsulating Firefly Luciferase (FLuc) mRNA. F1 (A), F2 (B), F3 (C), F4 (D), F5 (E), F6 (F), F7 (G), F8 (H), F9 (I). UV detection: 200 nm. Temperature: 25°C.

5.2 Polydispersity curves obtained by DLS

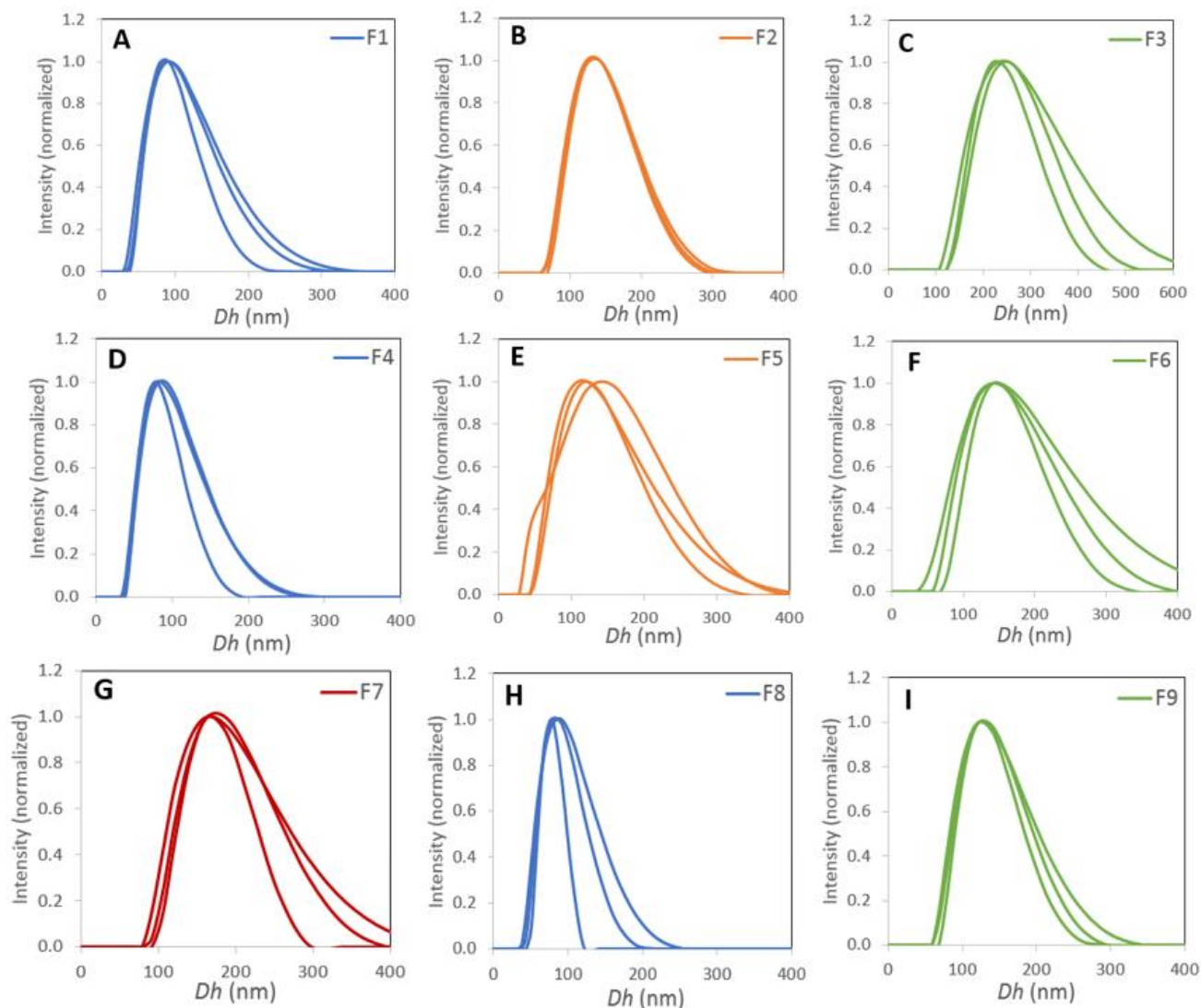


Figure S2: Size distribution of the nine studied LNPs formulation obtained by DLS. Experimental conditions: Buffer: 10 mM PBS buffer, pH 7.4, $\eta = 0.9 \times 10^{-3}$ Pa.s. Sample: LNPs (DLin-MC3-DMA:DSPC:Chol:DMG-PEG-2000 at 50:10:40-x:x molar ratio) empty or encapsulating Firefly Luciferase (FLuc) mRNA. Sample dilution: 10 μ L of the formulation into 1 mL PBS buffer. Temperature: 25°C. Measurement angle: 173°. Results presented in superposed triplicates.

5.3 Polydispersity curves obtained by TDA

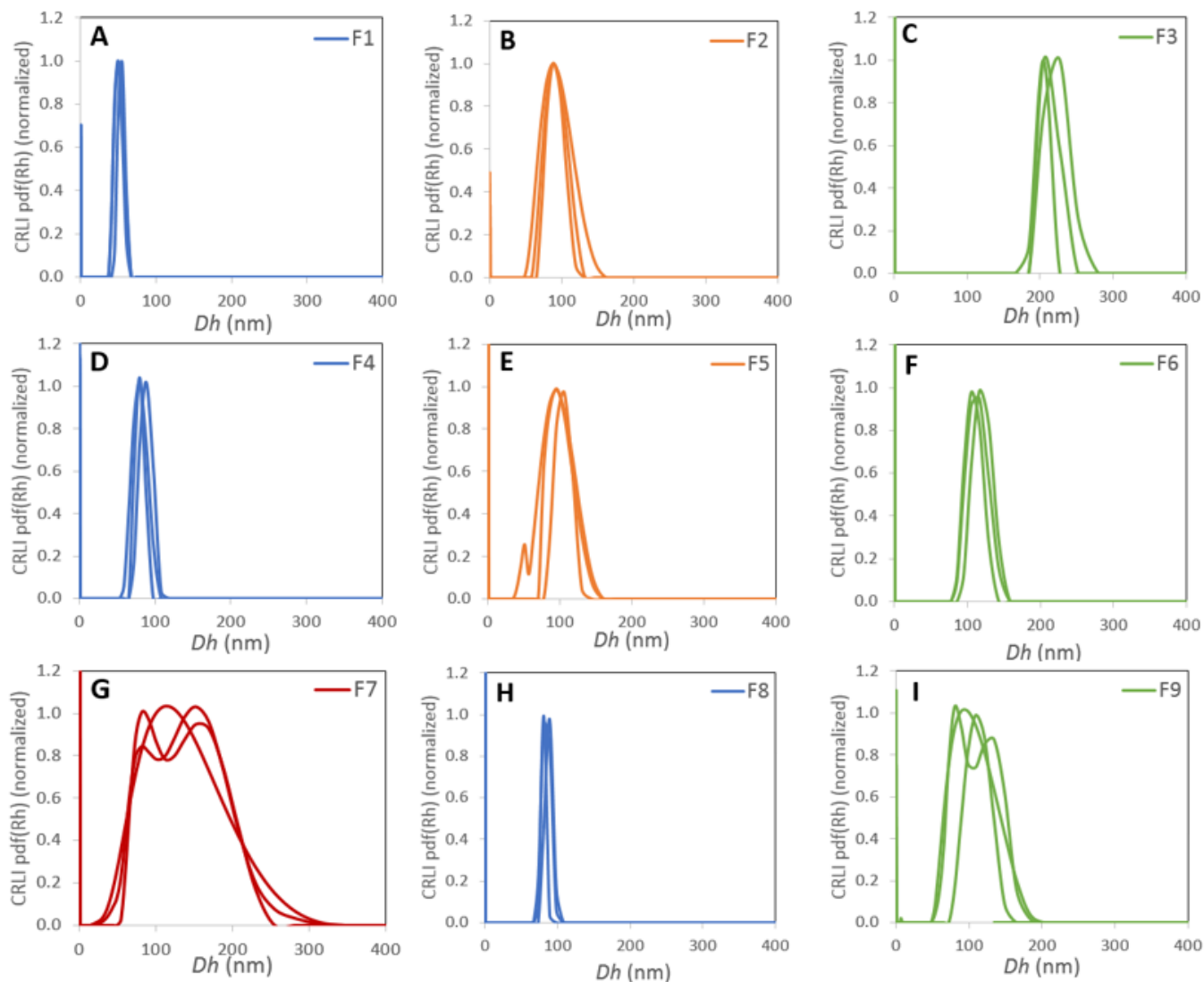


Figure S3: Size distribution of the nine studied LNPs formulation obtained by TDA using Regularized Linear Inversion (CRLI) algorithm. Experimental conditions: the same as in Figure S1. Results presented in superposed triplicates.

5.4 Study of mRNA degradation with voluntary addition of RNase A

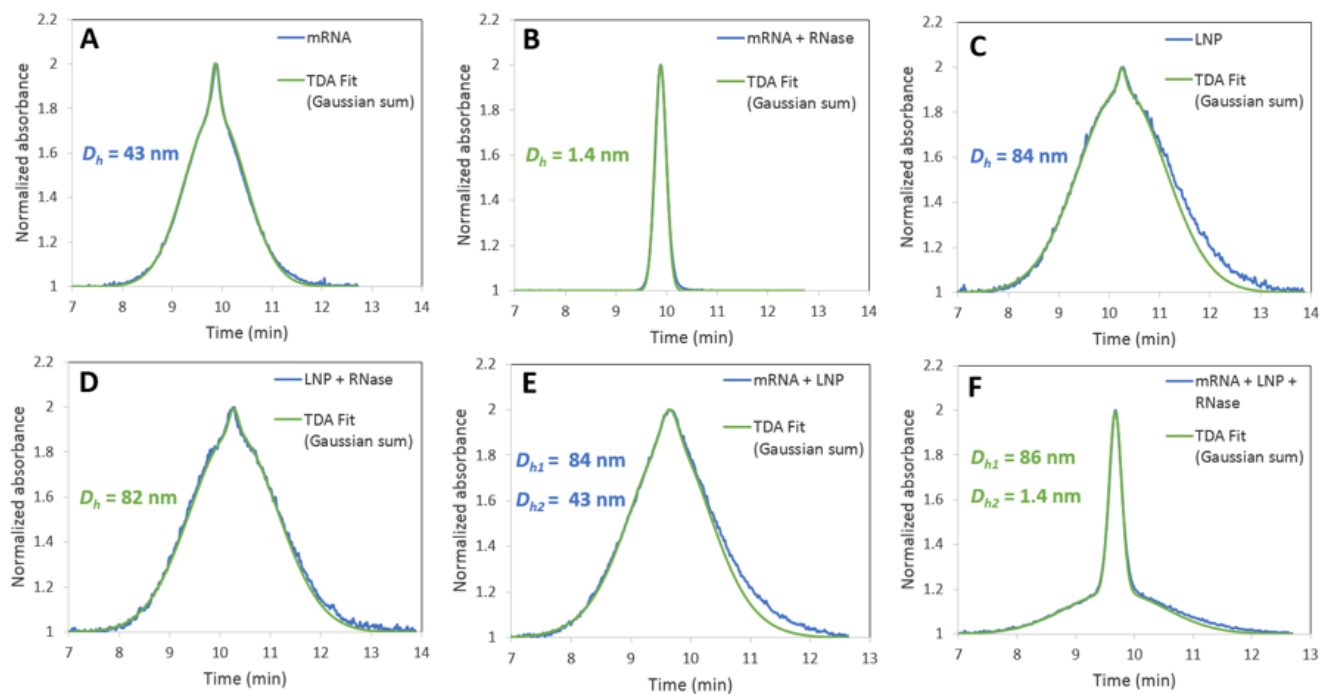


Figure S4: Experimental Taylorgrams (blue traces) obtained and the corresponding two-Gaussian fits (green traces) allowing to calculate the hydrodynamic diameters of: naked mRNA in the absence (A) or in the presence (B) of RNase A, LNPs formulation in the absence (C) or in the presence (D) of RNase and a mixture of naked mRNA and LNPs formulation in the absence (E) or in the presence (F) of RNase A. Experimental conditions: Samples: naked mRNA: Firefly Luciferase (FLuc) mRNA, LNPs formulation: DLin-MC3-DMA:DSPC:Chol:DMG-PEG-2000 at 50:10:38.5:1.5 molar ratio encapsulating Firefly Luciferase (FLuc) mRNA. RNase A concentration in the final solutions 2.5 mg/L. Other experimental conditions: as in Figure S1.

References

- (1) Rappuoli, R.; Pizza, M.; Del Giudice, G.; De Gregorio, E. Vaccines, New Opportunities for a New Society. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (34), 12288–12293. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402981111>.
- (2) Pollard, A. J.; Bijker, E. M. A Guide to Vaccinology: From Basic Principles to New Developments. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21* (2), 83–100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>.
- (3) Morens, D. M.; Fauci, A. S. Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. *Cell* **2020**, *182* (5), 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.021>.
- (4) Hajj, K. A.; Whitehead, K. A. Tools for Translation: Non-Viral Materials for Therapeutic mRNA Delivery. *Nat. Rev. Mater.* **2017**, *2* (10), 17056. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.56>.
- (5) Nanomedicine and the COVID-19 Vaccines. *Nat. Nanotechnol.* **2020**, *15* (12), 963–963. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-00820-0>.
- (6) Gebre, M. S.; Brito, L. A.; Tostanoski, L. H.; Edwards, D. K.; Carfi, A.; Barouch, D. H. Novel Approaches for Vaccine Development. *Cell* **2021**, *184* (6), 1589–1603. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.030>.
- (7) Wolff, J.; Malone, R.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P. Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science* **1990**, *247* (4949), 1465–1468. <https://doi.org/DOI:10.1126/science.1690918>.
- (8) Pardi, N.; Hogan, M. J.; Porter, F. W.; Weissman, D. mRNA Vaccines — a New Era in Vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17* (4), 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>.
- (9) Guan, S.; Rosenecker, J. Nanotechnologies in Delivery of mRNA Therapeutics Using Nonviral Vector-Based Delivery Systems. *Gene Ther.* **2017**, *24* (3), 133–143. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.5>.
- (10) Zhang, X.; Goel, V.; Robbie, G. J. Pharmacokinetics of Patisiran, the First Approved RNA Interference Therapy in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *J. Clin. Pharmacol.* **2020**, *60* (5), 573–585. <https://doi.org/10.1002/jcph.1553>.
- (11) Urits, I.; Swanson, D.; Swett, M. C.; Patel, A.; Berardino, K.; Amgalan, A.; Berger, A. A.; Kassem, H.; Kaye, A. D.; Viswanath, O. A Review of Patisiran (ONPATRO®) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Neurol. Ther.* **2020**, *9* (2), 301–315. <https://doi.org/10.1007/s40120-020-00208-1>.
- (12) Akinc, A.; Maier, M. A.; Manoharan, M.; Fitzgerald, K.; Jayaraman, M.; Barros, S.; Ansell, S.; Du, X.; Hope, M. J.; Madden, T. D.; Mui, B. L.; Semple, S. C.; Tam, Y. K.; Ciufolini, M.; Witzigmann, D.; Kulkarni, J. A.; van der Meel, R.; Cullis, P. R. The Onpattro Story and the Clinical Translation of Nanomedicines Containing Nucleic Acid-Based Drugs. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14* (12), 1084–1087. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>.
- (13) Kim, Y. C.; Dema, B.; Reyes-Sandoval, A. COVID-19 Vaccines: Breaking Record Times to First-in-Human Trials. *Npj Vaccines* **2020**, *5* (1), 34. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0188-3>.
- (14) Friedrichs, S.; Bowman, D. M. COVID-19 May Become Nanomedicine’s Finest Hour yet. *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16* (4), 362–364. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00901-8>.
- (15) Schoenmaker, L.; Witzigmann, D.; Kulkarni, J. A.; Verbeke, R.; Kersten, G.; Jiskoot, W.; Crommelin, D. J. A. mRNA-Lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines: Structure and Stability. *Int. J. Pharm.* **2021**, *601*, 120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>.
- (16) Crommelin, D. J. A.; Anchordoquy, T. J.; Volkin, D. B.; Jiskoot, W.; Mastrobattista, E. Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability. *J. Pharm. Sci.* **2021**, *110* (3), 997–1001. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.12.006>.
- (17) Gilleron, J.; Querbes, W.; Zeigerer, A.; Borodovsky, A.; Marsico, G.; Schubert, U.; Manygoats, K.; Seifert, S.; Andree, C.; Stöter, M.; Epstein-Barash, H.; Zhang, L.; Kotliansky, V.; Fitzgerald, K.; Fava, E.; Bickle, M.; Kalaidzidis, Y.; Akinc, A.; Maier, M.; Zerial, M. Image-Based Analysis of Lipid Nanoparticle-Mediated siRNA Delivery, Intracellular Trafficking and Endosomal Escape. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31* (7), 638–646. <https://doi.org/10.1038/nbt.2612>.
- (18) Sabnis, S.; Kumarasinghe, E. S.; Salerno, T.; Mihai, C.; Ketova, T.; Senn, J. J.; Lynn, A.; Bulychev, A.; McFadyen, I.; Chan, J.; Almarsson, Ö.; Stanton, M. G.; Benenato, K. E. A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-Human Primates. *Mol. Ther.* **2018**, *26* (6), 1509–1519. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.03.010>.
- (19) Chapin-Bardales, J.; Gee, J.; Myers, T. Reactogenicity Following Receipt of mRNA-Based COVID-19 Vaccines. *JAMA* **2021**, *325* (21), 2201–2202. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.5374>.

Chapitre VI. Caractérisation des formulations vaccinales ARNm par TDA

- (20) Cheng, Q.; Wei, T.; Farbiak, L.; Johnson, L. T.; Dilliard, S. A.; Siegwart, D. J. Selective Organ Targeting (SORT) Nanoparticles for Tissue-Specific mRNA Delivery and CRISPR–Cas Gene Editing. *Nat. Nanotechnol.* **2020**, *15* (4), 313–320. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0669-6>.
- (21) Dammes, N.; Goldsmith, M.; Ramishetti, S.; Dearing, J. L. J.; Veiga, N.; Packard, A. B.; Peer, D. Conformation-Sensitive Targeting of Lipid Nanoparticles for RNA Therapeutics. *Nat. Nanotechnol.* **2021**. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00928-x>.
- (22) Wilhelm, S.; Tavares, A. J.; Dai, Q.; Ohta, S.; Audet, J.; Dvorak, H. F.; Chan, W. C. W. Analysis of Nanoparticle Delivery to Tumours. *Nat. Rev. Mater.* **2016**, *1* (5), 16014. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>.
- (23) Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanoparticle-Mediated Cellular Response Is Size-Dependent. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3* (3), 145–150. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>.
- (24) Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated Portals of Entry into the Cell. *Nature* **2003**, *422* (6927), 37–44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>.
- (25) Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. Size-Dependent Internalization of Particles via the Pathways of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis. *Biochem. J.* **2004**, *377* (Pt 1), 159–169. <https://doi.org/10.1042/BJ20031253>.
- (26) Petros, R. A.; DeSimone, J. M. Strategies in the Design of Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (8), 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
- (27) Andar, A. U.; Hood, R. R.; Vreeland, W. N.; DeVoe, D. L.; Swaan, P. W. Microfluidic Preparation of Liposomes to Determine Particle Size Influence on Cellular Uptake Mechanisms. *Pharm. Res.* **2014**, *31* (2), 401–413. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1171-8>.
- (28) Evers, M. J. W.; Kulkarni, J. A.; van der Meel, R.; Cullis, P. R.; Vader, P.; Schiffelers, R. M. State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Small Methods* **2018**, *2* (9), 1700375. <https://doi.org/10.1002/smt.201700375>.
- (29) Hoshyar, N.; Gray, S.; Han, H.; Bao, G. The Effect of Nanoparticle Size on in Vivo Pharmacokinetics and Cellular Interaction. *Nanomed.* **2016**, *11* (6), 673–692. <https://doi.org/10.2217/nmm.16.5>.
- (30) Chauhan, V. P.; Jain, R. K. Strategies for Advancing Cancer Nanomedicine. *Nat. Mater.* **2013**, *12* (11), 958–962. <https://doi.org/10.1038/nmat3792>.
- (31) Le-Vinh, B.; Steinbring, C.; Wibel, R.; Friedl, J. D.; Bernkop-Schnürch, A. Size Shifting of Solid Lipid Nanoparticle System Triggered by Alkaline Phosphatase for Site Specific Mucosal Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**, *163*, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.03.012>.
- (32) Trevaskis, N. L.; Kaminskis, L. M.; Porter, C. J. H. From Sewer to Saviour — Targeting the Lymphatic System to Promote Drug Exposure and Activity. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14* (11), 781–803. <https://doi.org/10.1038/nrd4608>.
- (33) Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.
- (34) Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33* (9), 941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>.
- (35) Demelonne, A.; Servais, A.-C.; Crommen, J.; Fillet, M. Analytical Techniques Currently Used in the Pharmaceutical Industry for the Quality Control of RNA-Based Therapeutics and Ongoing Developments. *J. Chromatogr. A* **2021**, *1651*, 462283. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462283>.
- (36) Fan, Y.; Marioli, M.; Zhang, K. Analytical Characterization of Liposomes and Other Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *192*, 113642. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>.
- (37) Cipelletti, L.; Biron, J.-P.; Martin, M.; Cottet, H. Measuring Arbitrary Diffusion Coefficient Distributions of Nano-Objects by Taylor Dispersion Analysis. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (16), 8489–8496. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02053>.
- (38) Zhang, S.; Li, J.; Lykotrafitis, G.; Bao, G.; Suresh, S. Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (4), 419–424. <https://doi.org/10.1002/adma.200801393>.
- (39) 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.; Hansen, C. L.; Cullis, P. R. Microfluidic Synthesis of Highly Potent Limit-Size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of siRNA. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2012**, *1*, e37. <https://doi.org/10.1038/mtna.2012.28>.
- (40) Yanez Arteta, M.; Kjellman, T.; Bartesaghi, S.; Wallin, S.; Wu, X.; Kvist, A. J.; Dabkowska, A.; Székely, N.; Radulescu, A.; Bergenholtz, J.; Lindfors, L. Successful Reprogramming of Cellular Protein Production

Chapitre VI. Caractérisation des formulations vaccinales ARNm par TDA

- through mRNA Delivered by Functionalized Lipid Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (15), E3351. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720542115>.
- (41) Bao, Y.; Jin, Y.; Chivukula, P.; Zhang, J.; Liu, Y.; Liu, J.; Clamme, J.-P.; Mahato, R. I.; Ng, D.; Ying, W.; Wang, Y.; Yu, L. Effect of PEGylation on Biodistribution and Gene Silencing of siRNA/Lipid Nanoparticle Complexes. *Pharm. Res.* **2013**, *30* (2), 342–351. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0874-6>.
- (42) Kozma, G. T.; Shimizu, T.; Ishida, T.; Szebeni, J. Anti-PEG Antibodies: Properties, Formation, Testing and Role in Adverse Immune Reactions to PEGylated Nano-Biopharmaceuticals. *Adv. Liposome Res.* **2020**, *154–155*, 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.024>.
- (43) Hoang Thi, T. T.; Pilkington, E. H.; Nguyen, D. H.; Lee, J. S.; Park, K. D.; Truong, N. P. The Importance of Poly(Ethylene Glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. *Polymers* **2020**, *12* (2), 298. <https://doi.org/10.3390/polym12020298>.
- (44) Nogueira, S. S.; Schlegel, A.; Maxeiner, K.; Weber, B.; Barz, M.; Schroer, M. A.; Blanchet, C. E.; Svergun, D. I.; Ramishetti, S.; Peer, D.; Langguth, P.; Sahin, U.; Haas, H. Polysarcosine-Functionalized Lipid Nanoparticles for Therapeutic mRNA Delivery. *ACS Appl. Nano Mater.* **2020**, *3* (11), 10634–10645. <https://doi.org/10.1021/acsnm.0c01834>.
- (45) Joh, D. Y.; Zimmers, Z.; Avlani, M.; Heggestad, J. T.; Aydin, H. B.; Ganson, N.; Kumar, S.; Fontes, C. M.; Achar, R. K.; Hershfield, M. S.; Hucknall, A. M.; Chilkoti, A. Architectural Modification of Conformal PEG-Bottlebrush Coatings Minimizes Anti-PEG Antigenicity While Preserving Stealth Properties. *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *8* (8), 1801177. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801177>.
- (46) Ou, H.; Cheng, T.; Zhang, Y.; Liu, J.; Ding, Y.; Zhen, J.; Shen, W.; Xu, Y.; Yang, W.; Niu, P.; Liu, J.; An, Y.; Liu, Y.; Shi, L. Surface-Adaptive Zwitterionic Nanoparticles for Prolonged Blood Circulation Time and Enhanced Cellular Uptake in Tumor Cells. *Acta Biomater.* **2018**, *65*, 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.10.034>.
- (47) Pitek, A. S.; Jameson, S. A.; Veliz, F. A.; Shukla, S.; Steinmetz, N. F. Serum Albumin ‘Camouflage’ of Plant Virus Based Nanoparticles Prevents Their Antibody Recognition and Enhances Pharmacokinetics. *Biomaterials* **2016**, *89*, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.032>.
- (48) Gulati, N. M.; Stewart, P. L.; Steinmetz, N. F. Bioinspired Shielding Strategies for Nanoparticle Drug Delivery Applications. *Mol. Pharm.* **2018**, *15* (8), 2900–2909. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00292>.
- (49) Roces, C. B.; Lou, G.; Jain, N.; Abraham, S.; Thomas, A.; Halbert, G. W.; Perrie, Y. Manufacturing Considerations for the Development of Lipid Nanoparticles Using Microfluidics. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111095>.
- (50) Zhigaltsev, I. V.; Belliveau, N.; Hafez, I.; Leung, A. K. K.; Huft, J.; Hansen, C.; Cullis, P. R. Bottom-Up Design and Synthesis of Limit Size Lipid Nanoparticle Systems with Aqueous and Triglyceride Cores Using Millisecond Microfluidic Mixing. *Langmuir* **2012**, *28* (7), 3633–3640. <https://doi.org/10.1021/la204833h>.
- (51) Chiesa, E.; Greco, A.; Riva, F.; Tosca, E. M.; Dorati, R.; Pisani, S.; Modena, T.; Conti, B.; Genta, I. Staggered Herringbone Microfluid Device for the Manufacturing of Chitosan/TPP Nanoparticles: Systematic Optimization and Preliminary Biological Evaluation. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (24), 6212. <https://doi.org/10.3390/ijms20246212>.
- (52) Cipelletti, L.; Biron, J.-P.; Martin, M.; Cottet, H. Measuring Arbitrary Diffusion Coefficient Distributions of Nano-Objects by Taylor Dispersion Analysis. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (16), 8489–8496. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02053>.
- (53) Cottet, H.; Biron, J.-P.; Martin, M. Taylor Dispersion Analysis of Mixtures. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (23), 9066–9073. <https://doi.org/10.1021/ac071018w>.
- (54) U.S. FDA. Drug Products, Including Biological Products, That Contain Nanomaterials-Guidance for Industry. 2017.
- (55) Let’s Talk about Lipid Nanoparticles. *Nat. Rev. Mater.* **2021**, *6* (2), 99–99. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00281-4>.
- (56) Reichmuth, A. M.; Oberli, M. A.; Jaklenec, A.; Langer, R.; Blankschtein, D. mRNA Vaccine Delivery Using Lipid Nanoparticles. *Ther. Deliv.* **2016**, *7* (5), 319–334. <https://doi.org/10.4155/tde-2016-0006>.

Conclusion générale et perspectives

Le premier objectif de cette thèse était d'évaluer les performances de l'électrophorèse capillaire (CE) et de l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA) pour l'étude des interactions antigène-adjuvant. Trois publications ont été rédigées sur ce sujet.

Dans la première publication, nous nous sommes intéressés à l'étude des interactions entre un adjuvant polymérique anionique (acide polyacrylique, SPA09), et un antigène vaccinal cationique en développement pour le traitement du staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) par FACCE. La FACCE a permis d'accéder rapidement et de façon directe au pourcentage d'antigènes libres et au nombre moyen d'antigènes liés par adjuvant dans une formulation vaccinale. Cela a permis de tracer les isothermes d'adsorption et de déterminer les constantes d'interaction et la stoechiométrie à saturation, en utilisant le modèle de Langmuir des n sites indépendants de même énergie. La force ionique s'est avérée être un paramètre crucial ayant un impact considérable sur les paramètres d'interaction. Il a également été montré que l'adjuvant polymérique lui-même contribue significativement à la force ionique du milieu, et donc à la force des interactions. Sa contribution peut être estimée et corrigée lors de la formulation d'un produit vaccinal.

Dans la seconde publication, le même couple antigène-adjuvant a été étudié par TDA. La TDA a été mise en œuvre avec succès et a permis de déterminer simultanément la taille des complexes antigène-adjuvant dans des conditions physiologiques et le pourcentage d'antigène libre dans le mélange adjuvant/antigène à l'équilibre. Le rayon hydrodynamique moyen des complexes antigène-adjuvant obtenu par TDA a été confirmé par celui mesuré par TEM et les paramètres d'interaction ont été en accord avec ceux obtenus dans l'étude précédente par FACCE.

Dans la troisième publication, nous nous sommes focalisés sur l'étude des interactions antigènes/adjuvants dans le cadre de vaccins contenant un mélange de plusieurs antigènes. Il a été montré que la combinaison de l'utilisation de la β -alanine dans l'électrolyte avec un revêtement de capillaire en polybrène a permis d'améliorer significativement l'efficacité de la séparation en réduisant l'adsorption des protéines sur la paroi des capillaires. La méthodologie développée a permis la séparation de trois souches de poliovirus inactivé, sans dénaturation, et l'étude

Conclusion générale et perspectives

individuelle et simultanée de leur interaction avec l'oxyhydroxyde d'aluminium (AlOOH). Elle a également permis d'observer l'impact de l'ajout d'ions phosphate jouant le rôle de compétiteurs pour les poliovirus sur les interactions avec l'adjuvant.

L'ensemble de ce travail a montré toute la pertinence des méthodes électrophorétiques et de l'analyse de la dispersion de Taylor pour la caractérisation physicochimique des interactions antigène-adjuvant. Ces méthodes peu onéreuses permettent de travailler de manière automatisée, dans des conditions physiologiques, tout en utilisant de faibles quantités/volumes d'échantillon. Ainsi, les méthodes développées peuvent être employées pour optimiser les formulations vaccinales en étudiant l'impact des paramètres physico-chimiques (force ionique, pH, excipients, concentration en adjuvant) sur les paramètres d'interactions et sur la taille des complexes antigène/adjuvant. Ces méthodes peuvent également être utiles pour suivre la stabilité des vaccins et pour contrôler les procédés de fabrication.

En ce qui concerne les limitations de ces techniques, l'adsorption des molécules/antigènes sur la paroi interne des capillaires demeure la limitation majeure. En effet, la sélection du revêtement de capillaire et du tampon d'analyse adéquats pour diminuer l'adsorption peut demander du temps. Enfin, en détection UV, la limite de détection des protéines est souvent aux alentours de 0,01 g/L. Pour abaisser cette limite de détection, une détection par fluorescence nécessitant un marquage des protéines est envisageable.

Le second objectif de cette thèse était d'étudier et de caractériser les formulations vaccinales à ARN messager (ARNm) par CE et TDA. Deux publications ont été rédigées sur ce deuxième sujet. Dans la première publication, nous avons développé une méthode d'analyse de la taille et de la polydispersité des LNPs par TDA. La pré-saturation du capillaire s'est avérée être une étape cruciale pour diminuer significativement l'adsorption des LNPs sur la paroi interne du capillaire. Une comparaison entre les distributions de tailles obtenues par TDA et par DLS a montré que les distributions obtenues en DLS étaient plus larges et décalées vers les grandes tailles que celles obtenues par TDA. Cette différence s'explique par le fait que les deux techniques ne donnent pas accès aux mêmes informations. En effet, la TDA permet d'obtenir la distribution moyenne en poids, avec une détection sensible à la concentration massique. Tandis que, la DLS permet d'accéder à la distribution moyenne en intensité, qui donne un poids plus important aux grandes

Conclusion générale et perspectives

particules, puisque la distribution est pondérée par l'intensité diffusée qui varie comme le rayon hydrodynamique à la puissance 6. Ainsi, les deux méthodes sont complémentaires. La DLS peut facilement détecter la présence de faibles quantités de LNP agrégées dans l'échantillon, tandis que la TDA donne une taille moyenne moins biaisée par la présence d'une faible quantité de particules de plus grande taille. L'utilisation orthogonale de ces deux méthodes est conforme aux recommandations de la Food Drug Administration (FDA), qui préconise d'utiliser plusieurs méthodes pour caractériser des paramètres critiques des formulations de LNPs pour pallier les limites de chacune des techniques. Par ailleurs, la TDA permet également d'accéder facilement à la viscosité des formulations de LNPs, ce qui peut être utile lorsque de faibles quantités de produit sont disponibles. Enfin, la CE a également été utilisée pour déterminer la densité de charge surfacique des LNPs en utilisant la modélisation de la mobilité électrophorétique développée par O'Brien-White-Ohshima.

Dans la seconde publication, la TDA a été employée en support au développement de formulations de LNPs. Trois paramètres de formulation impactant la taille des LNPs ont été étudiés : le taux de PEG-lipides, le débit total de la formulation et le rapport de débit entre la phase aqueuse et la phase organique. Il a ainsi été montré qu'une augmentation du taux de PEG-lipides entraîne une diminution du diamètre hydrodynamique des LNPs et qu'une augmentation du débit total de la formulation, ainsi qu'une augmentation du rapport de débit entre la phase aqueuse et la phase organique, permettent de diminuer la taille des LNPs. En effet, plus la dilution de la phase organique dans la phase aqueuse est rapide, moins les lipides ont le temps de se grouper et se stabiliser, et plus la taille des LNPs est petite. Une comparaison entre les diamètres hydrodynamiques obtenus par TDA et par DLS sur les 9 formulations réalisées a confirmé que les diamètres hydrodynamiques et les distributions de tailles obtenues en DLS étaient respectivement plus grands et plus larges que ceux obtenus en TDA, ce qui rend la discrimination de deux populations de LNP plus difficiles en DLS qu'en TDA. Par la suite, la TDA a été utilisée pour étudier la dégradation de l'ARNm en présence de ribonucléases et pour déterminer le taux d'encapsulation de l'ARNm dans les LNPs ainsi que la taille de l'ARNm encapsulé. Les résultats obtenus étaient cohérents avec ceux obtenus par le dosage Ribogreen à l'aide d'un lecteur fluorescent de microplaques.

Conclusion générale et perspectives

L'ensemble de ce travail a montré qu'un équipement d'électrophorèse capillaire permet à lui seul d'obtenir de nombreuses informations sur les formulations de vaccins ARNm. Notamment, il est possible d'accéder à la taille, à la distribution de tailles et aux indices de polydispersité des LNPs, et aussi à leur charge. La TDA est également utile pour le calcul de la viscosité des formulations de LNPs, la détermination du taux d'encapsulation de l'ARN messenger et le contrôle de son intégrité. Par sa simplicité, son faible coût et sa faible consommation d'échantillon, la TDA est une méthode de choix qui a le potentiel d'être utilisée à différentes étapes du développement de vaccins.

Les méthodologies développées dans cette thèse peuvent servir à étudier l'impact de différents paramètres physicochimiques (force ionique, pH, température...) sur les formulations de vaccins à ARNm et à mieux comprendre le processus d'auto-assemblage des LNPs. La TDA peut également servir en support au développement de nouvelles formulations notamment pour le screening de différents excipients, mais aussi pour suivre la stabilité de ces formulations. Enfin, la TDA pourrait permettre d'étudier et de quantifier les interactions entre les LNPs et différentes molécules présentes dans le sérum sanguin comme l'albumine. En effet, plusieurs études rapportent la formation de couronnes de protéines autour des LNPs, modifiant la taille de ces dernières et leurs interactions avec les cellules.^{1,2}

Pour aller plus loin, il serait également intéressant de poursuivre le développement de nouveaux revêtements neutres afin d'aboutir à un revêtement de capillaire ne nécessitant pas de pré-saturation pour l'étude des formulations de LNPs. Enfin, l'amélioration de l'automatisation du traitement des données obtenues par TDA serait aussi pertinent pour faciliter et développer son utilisation.

- (1) Miao, L.; Lin, J.; Huang, Y.; Li, L.; Delcassian, D.; Ge, Y.; Shi, Y.; Anderson, D. G. Synergistic Lipid Compositions for Albumin Receptor Mediated Delivery of mRNA to the Liver. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 2424. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16248-y>.
- (2) Francia, V.; Schiffelers, R. M.; Cullis, P. R.; Witzigmann, D. The Biomolecular Corona of Lipid Nanoparticles for Gene Therapy. *Bioconj. Chem.* **2020**, *31* (9), 2046–2059. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00366>.

Résumé en Français

Electrophorèse capillaire et analyse de la dispersion de Taylor pour l'étude des interactions antigènes/adjuvants dans les vaccins et la caractérisation des formulations vaccinales à ARN messenger

Ce travail de thèse vise à développer de nouvelles méthodes analytiques pour caractériser les formulations vaccinales.

Le premier objectif a été d'évaluer les performances de l'électrophorèse capillaire (CE) et de l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA) pour l'étude des interactions antigènes-adjuvants dans les vaccins. Comme ces interactions peuvent avoir un impact significatif sur la réponse immunitaire, le développement d'un candidat vaccin implique l'étude précise des mélanges antigènes-adjuvants et de leurs potentielles interactions. Premièrement, l'étude des interactions entre un adjuvant polymérique anionique (polyacide acrylique, SPA09), et un antigène vaccinal cationique en développement pour le traitement du staphylocoque doré a été réalisée par analyse frontale continue en électrophorèse capillaire (FACCE). Cette technique a permis d'accéder directement au pourcentage d'antigènes libres et au nombre moyen d'antigènes liés par adjuvant, à partir desquels les isothermes d'adsorption ont pu être tracées et les constantes d'interactions ont pu être déterminées. La taille des complexes antigènes-adjuvants a pu être déterminés par TDA dans des conditions physiologiques et la TDA a également permis d'accéder aux constantes d'interaction. Les rayons hydrodynamiques moyens (R_h) des complexes obtenus par TDA ont été confirmés par microscopie électronique en transmission (TEM) et les paramètres d'interaction mesurés par TDA étaient comparables à ceux précédemment obtenus par FACCE. Enfin, l'électrophorèse capillaire de zone (CZE) a permis d'étudier les interactions antigènes-adjuvants dans le cadre des vaccins contenant des mélanges de plusieurs antigènes. Après optimisation des conditions d'analyse, trois souches de poliovirus inactivé ont pu être séparées, sans dénaturation, et leurs interactions avec l'adjuvant d'oxyhydroxyde d'aluminium (AlOOH) ont été étudiées.

Le second objectif a été de développer de nouvelles méthodes analytiques pour la caractérisation des formulations vaccinales à ARN messenger (ARNm). Dans ces vaccins, les ARNm sont encapsulés dans des nanoparticules lipidiques (LNPs) qui les protègent de la dégradation et leur permettent d'entrer dans le cytoplasme des cellules. Dans ce contexte, une méthode d'analyse par TDA de la taille et de la distribution en tailles des LNPs et des ARNm a été mise au point. Une comparaison entre les tailles obtenues par TDA et par diffusion dynamique de la lumière (DLS) a été réalisée et les deux méthodes se sont avérées être complémentaires pour la caractérisation des LNPs. Ainsi, la TDA a pu être employée pour étudier différents paramètres de formulation impactant la taille des LNPs. Par la suite, la TDA a également été utilisée pour étudier la dégradation de l'ARNm en présence de ribonucléases et pour évaluer l'efficacité d'encapsulation de l'ARNm dans les LNPs ainsi que la taille de l'ARNm encapsulé. Enfin, la TDA a permis également d'accéder facilement à la viscosité des formulations de LNPs tandis que la CE a permis de déterminer la densité de charge surfacique des LNPs.

Mots clés : vaccins, interactions, analyse de la dispersion de Taylor (TDA), électrophorèse capillaire (CE), ARN messenger, nanoparticules lipidiques (LNPs).

Résumé en Anglais

Capillary electrophoresis and Taylor dispersion analysis for the study of antigen / adjuvant interactions in vaccine products and the characterization of messenger RNA vaccine formulations

This thesis work aims at developing new analytical methods to characterize vaccine formulations.

The first objective was to evaluate the performances of capillary electrophoresis (CE) and Taylor dispersion analysis (TDA) for the study of antigen-adjuvant interactions in vaccine products. As these interactions can have a significant impact on the immune response, the development of a vaccine candidate involves the precise study of antigen-adjuvant mixtures and their potential interactions. First, the study of the interactions between an anionic polymeric adjuvant (polyacrylic acid, SPA09), and a cationic vaccine antigen under development for the treatment of *Staphylococcus aureus* was carried out by frontal analysis continuous capillary electrophoresis (FACCE). This technique provided direct access to the percentage of free antigens and to the average number of antigens bound per adjuvant, from which the adsorption isotherms were plotted and the interaction constants were determined. The size of the antigen-adjuvant complexes could be determined by TDA under physiological conditions and TDA also gave access to the interaction constants. The mean hydrodynamic radii (R_h) of the complexes obtained by TDA were confirmed by transmission electron microscopy (TEM) and the interaction parameters measured by TDA were comparable to those previously obtained by FACCE. Finally, capillary zone electrophoresis (CZE) allowed to study the antigen/adjuvant interactions in vaccines containing several antigens. After optimization of the analysis conditions, three strains of inactivated poliovirus were separated, without any denaturation, and their interaction with the adjuvant aluminum oxyhydroxide (AlOOH) were studied.

The second objective was to develop new analytical methods for the characterization of messenger RNA (mRNA) vaccine formulations. In these vaccines, mRNA is encapsulated into lipid nanoparticles (LNPs) which protect it from degradation and allow it to access the cytoplasm of cells. In this context, a method for analyzing the size and the sizes distribution of LNPs and mRNA by TDA was developed. A comparison between the sizes obtained by TDA and by dynamic light scattering (DLS) was realized and both methods were found complementary for the characterization of LNPs. Consequently, TDA methodology was used to study different formulation parameters impacting the size of LNPs. Subsequently, TDA was also used to follow the degradation of mRNA in the presence of ribonucleases and to determine the encapsulation efficiency of mRNA within LNPs as well as the size of the encapsulated mRNA. Finally, TDA also provided easy access to the viscosity of LNP formulations, whereas CE allowed the determination of the surface charge density of LNPs.

Keywords: vaccines, interactions, Taylor dispersion analysis (TDA), capillary electrophoresis (CE), messenger RNA, lipid nanoparticles (LNPs)