

PROPOSITION DE THESE

Rôle des lipoprotéines plasmatiques dans la biodisponibilité et activité biologique des nanomédicaments à base de prodrogues lipidiques.

Après administration intraveineuse, les nanomédicaments (vecteurs de taille nanométrique chargés en médicament) vont interagir avec de nombreuses molécules endogènes, notamment celles présentes dans la circulation sanguine. En fonction de la composition chimique du nanovecteur, ces molécules vont conférer à celui-ci une signature spécifique,[1,2] qui va orienter sa biodistribution et sa reconnaissance par certaines cellules de l'organisme.[3,4] Plusieurs études concernant l'identification des protéines adsorbées à la surface des nanovecteurs ont été menées alors que moins d'attention a été consacrée à l'interaction avec les lipoprotéines (LPs) qui jouent cependant un rôle considérable dans la biodistribution des médicaments.[5] Or, un nombre élevé de récepteurs aux LPs a été observé dans les cellules à croissance rapide et des études ont démontré que certaines cellules cancéreuses surexpriment ces récepteurs. De ce fait, l'utilisation des LPs comme vecteurs de médicaments anticancéreux a été proposée afin de favoriser le ciblage des cellules tumorales. [6,7]

Notre équipe a développé un concept de vectorisation très original qui consiste à coupler le squalène (un lipide naturel, précurseur de la biosynthèse du cholestérol) à des petites molécules médicamenteuses (concept de squalénisation).[8] Le bioconjugué (SQGem) issu du couplage chimique de la gemcitabine (Gem), une molécule anticancéreuse, au squalène est capable d'auto-organisation sous forme de nanoparticules qui se sont révélées beaucoup plus actives que la gemcitabine seule sur de nombreux modèles de tumeurs expérimentales.[9-10]

Très récemment, nous avons proposé le concept de vectorisation « indirecte » basé sur la capture et le transport spontané des dérivés squalénés, dont la SQGem, par les LPs plasmatiques. [11] Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* démontrent clairement l'association préférentielle de la SQGem aux LPs et sa corrélation avec la quantité de cholestérol présente dans ces derniers. De plus, les simulations *in silico* effectuées ont révélé l'incorporation de SQGem dans le noyau hydrophobe des LPs. Cette interaction spécifique a été mise à profit pour effectuer le ciblage indirect, *via* les LPs, des cellules cancéreuses à la fois *in vivo* et *in vitro*.

En conclusion, il a été démontré que le couplage d'un résidu lipidique, comme le squalène, à des molécules à activité pharmacologique permettait de déclencher l'interaction avec les lipoprotéines et de modifier la pharmacocinétique et biodistribution du principe actif.

L'objectif de la thèse sera de savoir si le squalène est le meilleur adjuvant de ciblage des lipoprotéines ou bien si d'autres résidus lipophiles peuvent être plus efficaces.

Le présent projet de recherche vise donc à (i) concevoir une bibliothèque de nanoparticules à base de nouvelles prodrogues lipidiques de la gemcitabine ; (ii) évaluer leur capacité (ou incapacité) à interagir avec les lipoprotéines et (iii) mettre en évidence la manière dont cette interaction peut influencer le profil pharmacocinétique, l'activité pharmacologique et la toxicité.

Pratiquement, différents bioconjugués seront synthétisés en remplaçant le squalène par d'autres molécules lipophiles (acides gras linéaires saturés ou insaturés, monoglycérides, diglycérides, phospholipides etc.) et en étudiant leur capacité à s'assembler sous forme de nanoparticules. L'interaction avec les différentes classes de lipoprotéines sera évaluée *in vitro* selon plusieurs protocoles expérimentaux déjà maîtrisés au sein de notre équipe. Les résultats permettront d'établir une relation entre la nature du bioconjugué et la classe de lipoprotéines avec laquelle il interagit. Les nanoparticules présentant une accumulation préférentielle dans chacune des fractions lipoprotéiques seront ensuite évaluées *in vivo* chez la souris afin de déterminer l'influence de la nature des interactions nanoparticules/lipoprotéines sur leur devenir dans l'organisme.

Ce projet générera de nouvelles connaissances sur les paramètres physico-chimiques et les mécanismes qui régissent l'interaction des nanoparticules à base de prodrogues lipidiques avec les lipoprotéines. Il permettra, par ailleurs, de générer des nouvelles informations sur les relations structure/activité/toxicité.

Financement : concours d'accès aux contrats doctoraux des établissements d'enseignement supérieur

Lieu : Institut Galien Paris-Sud UMR CNRS 8612 - UFR de Pharmacie - Université Paris-Sud, 5, rue Jean-Baptiste Clément
92290 Châtenay-Malabry – France
Equipe 7, Directeur Prof. Patrick COUVREUR

Contacts : patrick.couvreur@u-psud.fr; simona.mura@u-psud.fr

Profil et compétences recherchées

Le candidat (pharmacien, vétérinaire, ingénieur ou biologiste) devra avoir validé le premier semestre de son master M2 ou de son cycle d'ingénieur en avril 2017 au plus tard ou l'intégralité d'un M2 en 2016. (Note moyenne supérieure à 14/20)

Le candidat devra avoir une formation pluridisciplinaire incluant (de préférence) des connaissances en chimie organique, biologie moléculaire et cellulaire, une ouverture d'esprit sur le monde du médicament. A noter que le projet prévoit des expériences in vivo chez l'animal.

Aptitudes : esprit d'équipe, rigueur au travail, autonomie, motivation, organisation, aptitudes rédactionnelles, esprit critique, bonnes dispositions pour les communications orales, capacité à développer un projet pluridisciplinaire à l'interface entre la chimie, la formulation galénique, la physico-chimie et la biologie.

THESIS RESEARCH PROJECT

Role of plasma lipoproteins on the bioavailability and biological activity of lipid prodrug-based nanomedicines.

Once introduced in the body, nanoparticles encounter a complex biological environment composed of a plethora of endogenous molecules. In function of the composition of the surrounding biological environment (depending on the administration route), as well as the nanoparticle physico-chemical properties (e.g., material, size, surface charge and functionalization), nanoparticles immediately interact with a specific set of biomolecules, thereby acquiring certain biological identity.[1,2] This identity will govern the in vivo fate of nanoparticles in terms of biodistribution, pharmacokinetics, therapeutic efficacy and potential toxicity.[3] The interacting biomolecules might (i) hinder the nanoparticles recognition by the targeted cells or, on the contrary, (ii) increase the specific interaction of the nanoparticles with the corresponding biological target.[4] While a great deal of attention has been focused to identify the proteins adsorbed at the nanoparticles surface, only few studies investigated the interaction of nanoparticles with circulating lipoproteins (LPs). Lipoproteins display various structures and functions and according to their ultracentrifugation flotation density and electrophoretic mobility, they can be classified into chylomicrons (CM), very low density lipoproteins (VLDL), low density lipoproteins (LDL) and high density lipoproteins (HDL).

The association of many hydrophobic drugs with LPs has been described and it is well known that it can have a strong impact on the drug disposition and pharmacological activity. Accordingly, since 2002, the US Food and Drug Administration (FDA) has recommended the introduction of lipoprotein-drug distribution studies for every novel drug with hydrophobic character.[5] In addition, LPs have been described as excellent carriers for targeted delivery of various drugs due to their endogenous, non-toxic, long-circulating nature and to their ability to be recognized and taken up via the LP receptors.[6,7] However, the development of lipoproteins for drug delivery has been hampered by the difficulty to prepare reproducible batches of drug loaded endogenous LPs or to formulate synthetic lipoprotein like-systems.

In this context, we have recently discovered that it was possible to exploit the circulating lipoproteins as “indirect” natural carriers of intravenously administered drug molecules, if these drugs are equipped with a lipoprotein-affine moiety.[11] The proof of concept of this approach has been achieved by the chemical linkage of the anticancer drug gemcitabine (Gem) to squalene (SQ, a natural lipid precursor of the cholesterol’s biosynthesis) which, additionally, triggers the self-assembly of the squalene-drug bioconjugates into nanoparticles (SQGem NPs).[8-10] By virtue of the bio-similarity between SQ and cholesterol (the natural load of lipoproteins), the gemcitabine-squalene bioconjugates were found to be capable to spontaneously interact and then be transported by plasma lipoproteins in the blood circulation. As a result, the interaction between SQGem nanoparticles and LDL (*i.e.*, cholesterol-rich particles in humans) was able to mediate the efficient targeting towards cancer cells with high LDL receptor expression. This led to a higher therapeutic activity in tumor-bearing mice compared to the free drug.

These results demonstrated for the first time that the insertion of gemcitabine into lipoproteins, driven by the squalene moiety, can be applied for indirect cancer cell targeting. Moreover, we showed that not only SQGem nanoparticles but also other SQ-derivatives were capable to interact with lipoproteins, thus opening an entirely new perspective, which may significantly advance the application of LDL as “indirect” drug delivery systems.

But a question immediately arises, whether the squalene only or also other lipid based molecules can trigger strong interaction with lipoproteins. Thus, **the present thesis research project aims to design a library of nanoparticles made of novel lipid-prodrugs of gemcitabine and to assess their capacity (or not) to interact with lipoproteins. The thesis will also investigate how this interaction might further influence the pharmacokinetic profile, the pharmacological activity and the toxicity of the lipid-based nanomedicines.**

Practically, a library of lipid prodrug bioconjugates will be synthesized by replacing the squalene with other lipophilic moieties (e.g., linear saturated or unsaturated fatty acids, monoglycerides, diglycerides, phospholipids etc.) and then assembled in form of nanoparticles. The interaction with the different class of lipoproteins will be evaluated in vitro according to experimental protocols already available in our team. Results will allow to establish a relationship between the structure of the bioconjugate and the class of lipoprotein with which it will interact. Then, in vivo experiments will be performed to assess how the specific uptake by lipoproteins can further influence the biodistribution of the different bioconjugates.

This project will also generate new knowledge on the physico-chemical parameters and the mechanisms which govern the interaction of lipid prodrug nanoparticles with lipoproteins.

Funding: Application to doctoral programme grants

Laboratory: Institut Galien Paris-Sud UMR CNRS 8612 - UFR de Pharmacie - Université Paris-Sud, 5, rue Jean-Baptiste Clément 92290 Châtenay-Malabry – France. Equipe 7, Directeur Prof. Patrick COUVREUR

Contact: patrick.couvreur@u-psud.fr; simona.mura@u-psud.fr

Profile

The candidate (pharmacist, veterinarian, engineer or biologist) must have validated the first semester of a M2 or engineering degree in April 2017 at the latest or the entirety of a M2 in 2016. (Score >14/20)

The candidate should have a multidisciplinary training including (preferably) knowledge in organic chemistry, molecular and cellular biology and a strong interest to the field of nanomedicine and drug delivery. To be noted that the project includes in vivo animal studies.

Skills: rigor at work, autonomy, organization, motivation, good writing and oral communication skills, critical thinking, ability to develop a multidisciplinary project at the interface between chemistry, pharmaceutical technology, physico-chemistry and biology.

References

1. Sobot, D., Mura, S. & Couvreur, P. Nanoparticles: Blood Components Interactions in Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials (eds Shiro Kobayashi & Klaus Müllen) 1352-1360 (Springer Berlin Heidelberg) (2015).
2. Lundqvist, M. et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 14265-14270, (2008).
3. Monopoli, M. P., Aberg, C., Salvati, A. & Dawson, K. A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nano* 7, 779-786 (2012).
4. Tenzer, S. et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nano* 8, 772-781, (2013).
5. Wasan, K. M., Brocks, D. R., Lee, S. D., Sachs-Barrable, K. & Thornton, S. J. Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7, 84-99, (2008).
6. Firestone, R. A. Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells. *Bioconjug Chem* 5, 105-113 (1994)
7. Ng, K. K., Lovell, J. F. & Zheng, G. Lipoprotein-Inspired Nanoparticles for Cancer Theranostics. *Accounts of Chemical Research* 44, 1105-1113, (2011)
8. Couvreur, P., Stella, B., Reddy, L.H., Hillaireau, H., Dubernet, C., Desmaële, D., et al. Squalenoyl Nanomedicines as Potential Therapeutics. *Nano Lett.* 6, 2544-2548.(2006).
9. Reddy, L.H., Dubernet, C., Mouelhi, S.L., Marque, P.E., Desmaele, D., and Couvreur, P. (2007). A new nanomedicine of gemcitabine displays enhanced anticancer activity in sensitive and resistant leukemia types. *J Controlled Release.* 124, 20-27.
10. Reddy, L.H., Marque, P.-E., Dubernet, C., Mouelhi, S.-L., Desmaële, D., and Couvreur, P. Preclinical Toxicology (Subacute and Acute) and Efficacy of a New Squalenoyl Gemcitabine Anticancer Nanomedicine. *J Pharmacol Exp Ther.* 325, 484-490.(2008).
11. Sobot, D., Mura, S., Yesylevskyy, S.O., Dalbin, L., Cayre, F., Bort, G., et al. (2017). Conjugation of squalene to gemcitabine as unique approach exploiting endogenous lipoproteins for drug delivery. *Nature Communications*, (2017) Accepted, In press.