

Université de Montréal

Conception d'espaceurs pour relever les défis de bioconjugaison.

Par Alexandre Melkoumov

Faculté de Pharmacie

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales en vue de
l'obtention du grade de Ph.D. en sciences pharmaceutiques
Option Technologie Pharmaceutique**

Août, 2018

©, Alexandre Melkoumov, 2018

Résumé en français

Un des problèmes majeurs avec l'administration orale ou intraveineuse de médicaments est le fait que le principe actif se distribue à travers tout le corps, avec très peu de spécificité vers le site pathologique. Dans ce projet, l'hypothèse de travail est que la conjugaison de ces principes actifs avec des agents de ciblage permettra d'orienter ces conjugués vers des cibles thérapeutiques dans le but d'améliorer leur efficacité thérapeutique ou leur perméabilité intestinale. À cet effet, une série d'espaceurs de propriétés diverses (longueur, hydrophilie, clivage) a été développée pour conjuguer un principe actif à un agent de ciblage tels qu'un peptide ou une protéine.

Dans un premier temps, des principes actifs peu perméables ont été conjugués à un ligand reconnaissant le récepteur GM1, tels qu'un peptide ou la sous-unité β de la toxine du choléra (CTB), pour améliorer leur perméabilité intestinale. En effet, la CTB utilise le récepteur GM1 pour être internalisée dans les entérocytes. Grâce à une optimisation des espaceurs, l'affinité des conjugués utilisant les peptides avec le récepteur GM1 a été conservée, ce qui a été démontré par titration calorimétrique isotherme (ITC) et par thermophorèse à micro-échelle (MST). L'internalisation des conjugués a été évaluée par cytométrie en flux dans des cellules intestinales Caco-2 et T84. Les conjugués peptidiques sont internalisés dans les cellules Caco-2 et T84, mais cette internalisation est limitée et n'augmente pas en présence de GM1. En revanche, le conjugué de l'albumine avec la CTB (CTB-BSA) est beaucoup mieux internalisé dans les cellules, et dépend de la présence de GM1. Enfin, la perméabilité a été évaluée dans un modèle utilisant une monocouche cellulaire de Caco-2 ou T84. Les conjugués peptidiques ont montré une perméabilité modeste alors que le conjugués CTB-BSA possède une perméabilité supérieure au contrôle. Cette étude montre que la conjugaison de la CTB à une macromolécule permet d'augmenter la perméabilité de protéines à travers une monocouche de cellules intestinales.

Dans un second temps, un médicament immunostimulant, la décitabine, a été conjugué avec un anticorps ciblant le récepteur HER2 du cancer du sein pour former un conjugué Anticorps-Médicament (*Antibody-Drug-Conjugate*, ADC). L'objectif était d'améliorer l'efficacité anticancéreuse de l'anticorps ciblant le HER2 utilisé actuellement dans le traitement du cancer du sein (Trastuzumab), en combinant les propriétés immunostimulantes de la décitabine. L'anticorps anti-HER2 murin a été conjugué à la décitabine grâce à un espaceur clivable pH-sensible. Le degré de conjugaison et la stabilité colloïdale des anticorps conjugués (ADC) ont été évalués par chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC) et chromatographie d'exclusion de taille (SEC) respectivement. Il était possible de greffer 4 ou 8 molécules de décitabine sur l'anticorps en gardant une bonne stabilité colloïdale. L'ADC a conservé son affinité pour des cellules présentant le récepteur HER2 tel que les cellules TUBO et H2N100. La décitabine greffée sur l'ADC a également conservé son activité thérapeutique *in vitro*, ce qui a été démontré dans les mêmes cellules par l'évaluation du degré de méthylation et l'expression des gènes CXCL9 et CXCL10. Ce conjugué s'est révélé prometteur *in vitro* et l'évaluation de son efficacité anticancéreuse *in vivo* sur un modèle murin de cancer du sein, en comparaison avec l'anticorps anti-HER2, est en cours dans le laboratoire Stagg.

Mots-clés : Espaceur, conjugaison, bioconjugués, GM1, CTB, peptide de pénétration cellulaire, perméabilité, biodisponibilité orale, anticorps conjugué à un médicament (ADC), décitabine, HER2, immunothérapie.

Résumé en anglais

One of the major problems of oral or intravenous administration of drugs is the fact that the active pharmaceutical ingredient will distribute itself in the whole body, without any specificity towards the diseased site. In this project, the working hypothesis is that conjugating these active pharmaceutical ingredients with targeted ligands will direct them towards therapeutic targets, to improve therapeutic efficacy or intestinal permeability. For this purpose, a series of spacers with diverse properties (length, hydrophily, cleavability) were developed to conjugate the active pharmaceutical ingredient to a targeting moiety such as a peptide or a protein.

Firstly, poorly permeable active pharmaceutical ingredients were conjugated to ligands recognizing receptor GM1 such as peptides or the β subunit of cholera toxin (CTB), in the purpose to improve intestinal permeability. Indeed, CTB is internalized in enterocytes by binding to receptor GM1. Following optimization of spacers, the affinity of the peptide conjugates with receptor GM1 was preserved as shown by isothermal titration calorimetry (ITC) and microscale thermophoresis (MST). Internalisation of conjugates was evaluated by flow cytometry in Caco-2 and T84 intestinal cells. Peptide conjugates were internalized in Caco-2 and T84 cells, but the internalization was limited and did not increase in presence of GM1 supplementation. On the other hand, an albumin-CTB conjugate (CTB-BSA) was internalized more significantly and the mechanism depended on GM1. Finally, the permeability was evaluated on a monolayer model of Caco-2 and T84 cells. The peptide conjugates demonstrated modest permeability across the monolayer, whereas CTB-BSA had superior permeability against controls. This study shows that conjugating CTB to a macromolecule improves its permeability across a monolayer of intestinal cells.

Secondly, an immunostimulating drug, decitabine, was conjugated to an antibody targeting the HER2 receptor of breast cancer to form an antibody drug conjugate (ADC). The objective of this approach was to improve the anticancer efficacy of the antibody targeting HER2 currently used in the treatment of

breast cancer (Trastuzumab), by combining the immunostimulating properties of decitabine. The anti-HER2 murine antibody was conjugated to decitabine using a cleavable pH-sensitive spacer. The degree of conjugation and colloidal stability of the resulting ADCs were evaluated by hydrophobic interaction chromatography (HIC) and size exclusion chromatography (SEC) respectively. It was possible to graft 4 or 8 molecules of decitabine to the antibody while keeping an adequate colloidal stability. The ADC retained its affinity towards cells presenting HER2 receptor such as TUBO cells and H2N100 cells. Decitabine grafted to the ADC also conserved its therapeutic activity *in vitro* on these cells, as demonstrated by the evaluation of demethylation and gene expression of CXCL9 and CXCL10. These conjugates were promising *in vitro* et the assessment of the anticancer activity *in vivo* on a mouse model of breast is currently being studied in Stagg's laboratory.

Keywords : Spacer, conjugation, bioconjugates, GM1, CTB, cell penetrating peptides, permeability, oral bioavailability, antibody drug conjugates (ADC), decitabine, HER2, immunotherapy

Table des matières

Résumé en français	ii
Résumé en anglais.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
La liste des sigles et la liste des abréviations.....	xii
Chapitre 1 : Revue de littérature.....	1
1.1 Ciblage thérapeutique	1
1.1.1 Pourquoi cibler les médicaments?	1
1.1.2 Comment cibler un médicament?.....	1
1.1.3 Comment choisir sa cible?	4
1.1.3.1 L'expression du récepteur	4
1.1.3.2 La localisation du récepteur.....	5
1.1.3.3 Le processus d'internalisation du récepteur.....	6
1.1.3.4 La topographie du récepteur	7
1.1.3.5 Compétition avec le récepteur.....	8
1.1.4 Quel système utiliser pour le ciblage?.....	8
1.1.4.1 Les systèmes conjugués monomoléculaires.....	8
1.1.4.2 Particules polymériques	9
1.1.4.3 Liposomes	10
1.1.5 Qu'est-ce qu'un ADC?.....	11
1.1.5.1 Espaceurs des ADCs.....	13
1.1.5.2 Conjugaison sur ADCs.....	14
1.1.6 Quel ligand de ciblage utiliser?	15
1.1.6.1 Taille du ligand	15
1.1.6.2 Adaptabilité du ligand	16
1.1.6.3 L'affinité et la spécificité du ligand.....	18
1.1.6.4 Stabilité du ligand.....	18
1.1.6.5 Immunogénicité du ligand.....	19
1.1.7 Quel espaceur utiliser?.....	19
1.1.7.1 Longueur de l'espaceur	19
1.1.7.2 Espaceur hydrophile ou hydrophobe?	20

1.1.7.3 Espaceur clivable.....	20
1.1.7.4 Les espaceurs clivés par une réduction du pont disulfure S-S.....	21
1.2 Biodisponibilité orale.....	29
1.2.1 Biodisponibilité des macromolécules.....	31
1.2.2 Perméabilité.....	31
1.2.3 Absorption intestinale.....	32
1.2.3.1 Diffusion passive.....	33
1.2.3.2 Transport actif.....	33
1.2.3.3 Transport vésiculaire ou endocytose.....	33
1.2.3.4 Transport paracellulaire.....	36
1.2.4 Évaluation de la perméabilité des médicaments.....	36
1.2.5 Barrières à l'absorption intestinale.....	37
1.2.6 Stratégies d'amélioration de la biodisponibilité orale sans modification du principe actif.....	38
1.2.6.1 Enrobage entérique, inhibiteurs d'enzymes et modification chimique.....	38
1.2.6.2 Activateurs de perméation (permeation enhancers).....	39
1.2.6.3 Flore intestinale.....	39
1.2.6.4 Transcytose à travers les cellules M.....	39
1.2.7 Stratégies d'amélioration de la biodisponibilité orale – approche endocytose médié.....	40
1.2.7.1 Récepteur Fc néonatal (FcRn).....	40
1.2.7.2 Récepteur de la transferrine (TfR) et vitamine B12.....	42
1.2.7.3 Ciblage des cellules accessoires – non entérocytes.....	42
1.2.8 Stratégies d'amélioration de la biodisponibilité orale – approches transport actif.....	42
1.2.9 Stratégies d'amélioration de la biodisponibilité orale – peptides de pénétration cellulaire (CPPs).....	43
1.3 Toxines.....	46
1.3.1 Toxines AB ₅	46
1.3.2 Toxines AB.....	48
1.3.3 Toxine du Shiga (AB ₅).....	50
1.3.4 Toxine du choléra (AB ₅).....	51
1.3.5 Gangliosides.....	53
1.4 Hypothèses et objectifs.....	55
1.4.1 Hypothèses de recherche.....	55
1.4.2 Objectifs spécifiques.....	56
Chapitre 2 : Synthèse et évaluation de promédicaments.....	57
2.1 Espaceurs.....	57
2.1.1 Le site de greffage sur le ligand.....	57
2.1.2 Le site de greffage sur le principe actif.....	57
2.1.3 La longueur et l'hydrophilie de l'espaceur.....	58
2.1.4 Le caractère clivable ou non clivable de l'espaceur.....	58

2.2 Promédicaments.....	61
2.2.2 Points à considérer pour la synthèse des promédicaments.....	66
2.3 Perméabilité de la vancomycine conjuguée au peptide G23 (VFITC).....	67
Chapitre 3: GM1 Binding Conjugates to Improve Intestinal Permeability	69
3.1 Supporting information: GM1 Binding Conjugates to Improve Intestinal Permeability.....	97
Chapitre 4 : Anti-HER2-Decitabine Antibody Drug Conjugate: Synthesis and functional in-vitro evaluation	101
4.1 Supporting information: Anti-HER2-Decitabine Antibody Drug Conjugate: Synthesis and functional in-vitro evaluation.....	115
Chapitre 5 : Discussion.....	118
5.1 Choix de l'espaceur.....	118
5.1.1 Choix de l'espaceur selon le rendement et les fonctions disponibles	118
5.1.2 Choix de l'espaceur selon l'affinité du ligand envers sa cible	119
5.1.3 Choix de l'espaceur selon l'efficacité thérapeutique du principe actif.....	120
5.2 Choix de la cible.....	120
5.2.1 Internalisation des conjugués	121
5.2.2 Perméabilité des conjugués	121
5.3 Impact clinique.....	122
5.4 Choix du ligand.....	123
5.5 Choix du système de livraison.....	124
Chapitre 6 : Conclusion et perspectives	126
6.1 Conclusion.....	126
6.2 Perspectives futures.....	128
6.2.1 Utilisation d'un mélange physique de peptides reconnaissant le GM1 avec un composé peu perméable.	128
6.2.2 Utilisation d'un conjugué thérapeutique avec la CTB.....	128
6.2.3 Développement d'une formulation ou d'un conjugué internalisé par le récepteur Fc néonatal.....	129
6.2.4 Évaluation de la pharmacocinétique de l'ADC et son efficacité thérapeutique.....	129
Chapitre 7 : Références	131

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Mécanismes d'endocytose par Doherty et coll.(116).....	35
Tableau 2.1 : Espaceurs bifonctionnels synthétisés durant le projet.....	60
Tableau 2.2 : Promédicaments synthétisés durant la thèse (non publiés).....	64
Tableau 2.3 : Promédicaments synthétisés durant la thèse (non publiés - suite)	65
Tableau 2.4 : Promédicaments synthétisés durant la thèse (non publiés – suite 2).....	66
Table 3.1: Binding affinity of peptides (100 μ M) for the receptor GM1 (25 μ M)	86

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de l'effet « Enhanced Permeability and Retention effect » de Abdalla et coll. (9)	2
.....	3
Figure 2 : Ciblage passif selon la taille de la particule adaptée de Mitragotri et coll. (11).....	3
Figure 3 : LTD ou conjugué utilisant un ligand comme agent de ciblage adaptée de Srinivasarao et al. (14)	4
.....	4
Figure 5 : Ligne du temps des systèmes particuliers par Banik et coll.(37)	9
Figure 7 : Structure et mécanisme d'action d'un ADC par Tsuchikama et al. (43).....	11
Figure 9 : Ligands communément utilisés en ordre de grandeur par Srinivasarao et coll. (14)	15
Figure 14 : Bioactivation <i>in vivo</i> de promédicaments par une transformation chimique ou enzymatique par Jornada et coll. (92)	25
Figure 15 : Résumé des groupements fonctionnalisés (vert) et promédicaments (bleu) par Rautio et coll.(93)	26
Figure 16 : Schéma du cheminement d'un médicament administré par voie orale par Abuhelwa et coll. (102)	30
Figure 17 : Mécanismes d'absorption intestinale par Räder et al. (112)	32
Figure 19 : Barrières à la biodisponibilité orale adaptées de Malhaire et coll.(118)	37
Figure 20 : Solutions aux problèmes de disponibilité orale adaptées de Malhaire et coll. (118).....	38
Figure 21 : Transport des IgG à travers le récepteur FcRn (II.) par Rath et coll. (138)	41
Figure 22 : Transport actif de médicaments par les transporteurs OATP par Tamai (150).....	43
Figure 23 : Utilisation de conjugués avec des peptides de pénétration cellulaire par Khafagy et coll. (153)	44
.....	44
Figure 24 : Parcours cellulaire des toxines AB ₅ par Beddoe et coll. (171)	47
Figure 26 : Conjugués de la toxine anthrax qui sont internalisés par Rabideau et coll. (173).....	49
Figure 27 : Différents systèmes de conjugaison avec la sous-unité B de la toxine du Shiga (StxB) par Luginbuehl et al. (175).....	50
Figure 28 : Mécanisme de transcytose de la toxine du Shiga. (177)	51
Figure 29 : Structure du ganglioside GM1 par Yu et al. (189).....	53
Schéma 2.1 Synthèse des espaceurs non publiés	59
Schéma 2.2 Synthèse des promédicaments non publiés	61
Figure 30 : Perméabilité de 10 µM de la vancomycine-FITC (VFITC) ou de la vancomycine-FITC conjuguée au peptide G23 (VFITC-G23) à travers les cellules intestinales Caco-2 et T84 où A-B = apical vers basolatéral et B-A = basolatéral vers apical.....	67
Scheme 3.1: Synthesis of peptide conjugates.....	86
Figure 3.1: Internalization of fluorescent peptide conjugates.....	89
Figure 3.2: Permeability of fluorescent peptides conjugates.	90
Figure 3.3: CTB-BSA fusion protein synthesis, internalization and permeability studies.....	92
Figure S3.1: MST experiments	97
Figure S3.2: Dot blot quantification of GM1 from 5 µg of total protein lysate from T84 or Caco-2 cells. .	98
Scheme 4.1: Synthesis of anti-HER2-decitabine antibody drug conjugate.....	106

Figure 4.1: A) Drug to antibody ratio (DAR) determination by hydrophobic interaction chromatography (HIC) of antibody 7.16.4, ADC DAR \approx 4.17 and ADC DAR \approx 7.83. B) Aggregation evaluation using size exclusion chromatography (SEC) of antibody 7.16.4, ADC DAR \approx 4.17 and ADC DAR \approx 7.83.	107
Figure 4.2: Binding affinity of antibody 7.16.4 and ADC DAR 8 to H2N100 cells by flow cytometry.	108
Figure 4.3: Methylation activity of decitabine evaluated by quantification of 5-methylcytosine % (5-mC %) in total DNA in H2N100 and TUBO cells.....	109
Figure 4.4: Relative gene expression fold in TUBO cells 3 days after treatment with antibody 7.16.4 10 μ g/mL, ADC DAR 4 10 μ g/mL, Decitabine (DAC) 270 nM and antibody 7.16.4 10 μ g/mL + DAC 270 nM mixture.	110
Figure S4.1: Plasma stability evaluation of ADC by direct quantification of decitabine by LC-MS/MS....	115
Figure S4.3: In vivo tumour growth in mouse model efficacy evaluation of ADC vs 7.16.4 vs 7.16.4 + DAC (mix).....	117

Les figures et tableaux inclus dans cette thèse sont reproduits avec les permissions des détenteurs du droit d'auteur.

La liste des sigles et la liste des abréviations

ADC: Anticorps conjugué à un médicament (*antibody drug conjugate*)

Boc: Groupement protecteur tert-butyloxycarbonyl

Boc₂O: dicarbonate de Di-tert-butyl

BSA: Albumine de sérum bovin (*Bovine serum albumin*)

CPP : Peptide de pénétration cellulaire (*cell penetrating peptide*)

CTB: Sous-unité β de la toxine du choléra

Cy5-NHS: Cyanine 5 (fluorophore) monosuccinimidyl ester

DAC: décitabine ou 5-aza-2'-deoxycytidine

DBCO: Dibenzocyclooctyne

DCM: Dichloromethane

DMF: N,N-Diméthylformamide

EPR: *Enhanced Permeability and Retention effect*

Et₃N: Triéthylamine

EtOAc: Acétate d'éthyle (*ethyl acetate*)

FITC: Fluoresceine isothiocyanate

GM1: Monosialotetrahexosylganglioside

GMBS: Ester de N-γ-maleimidobutyryl-oxysuccinimide

HBSS: Solution saline équilibrée de Hank (*Hank's balanced salt solution*)

HIC: Chromatographie d'interaction hydrophobe (*hydrophobic interaction chromatography*)

ITC: Titration calorimétrique isotherme (*Isothermal titration calorimetry*)

LTD: Conjugué utilisant un ligand comme agent de ciblage (*ligand targeted drug*)

MST: Thermophorèse à micro-échelle (*Microscale thermophoresis*)

NHS: N-Hydroxysuccinimide

PBS: Solution saline tamponnée au phosphate (*Phosphate buffer saline*)

PPMP: DL-threo-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol

RT: Température pièce

SEC: Chromatographie d'exclusion de taille (*size exclusion chromatography*)

SPR: Surface plasmon resonance

TBS: Solution saline tamponnée au Tris

TFA: Acide trifluoroacétique (*trifluoroacetic acid*)

Chapitre 1 : Revue de littérature

1.1 Ciblage thérapeutique

1.1.1 Pourquoi cibler les médicaments?

Un des problèmes majeurs avec l'administration orale ou intraveineuse de médicaments est le fait que le principe actif se distribue à travers tout le corps, avec très peu de spécificité vers le site pathologique.(1)

Il est donc nécessaire d'administrer des doses élevées, afin d'atteindre des concentrations thérapeutiques au site d'action. Conséquemment, le principe actif, défini comme l'ingrédient thérapeutique d'un médicament, peut atteindre des organes sains dans des concentrations qui provoquent des effets indésirables.

Le ciblage thérapeutique peut palier à ces problèmes. Il repose sur le principe du "magic bullet" proposé il y a plus de 100 ans par Paul Ehrlich. Comme une balle qui sort d'un fusil et frappe une cible avec grande précision, Ehrlich avançait qu'il sera possible de spécifiquement cibler un microbe sans affecter les tissus sains environnants.(2)

Les avantages du ciblage thérapeutique sont nombreux dont (i) diminuer les effets secondaires, (ii) réduire la dose nécessaire pour un effet thérapeutique, (iii) réduire la fréquence d'administration et ainsi augmenter l'observance thérapeutique et (iv) augmenter finalement l'efficacité du traitement.(3, 4)

1.1.2 Comment cibler un médicament?

Le ciblage peut être effectué à différents niveaux. En effet, il est possible de cibler soit un organe (*i.e.* l'intestin), une cellule dans un organe (*i.e.* les entérocytes) ou même une composante de la cellule (telle la membrane plasmique des entérocytes). Afin d'adéquatement cibler une de ces composantes, on doit utiliser plusieurs stratégies de ciblage thérapeutiques (1-3) :

1) Utiliser une voie d'administration localisée. Par exemple, on peut administrer le médicament par voie topique, rectale, vaginale, pulmonaire, intranasale, oculaire ou intra-articulaire.(5) Le principe actif sera

alors naturellement localisé sur l'organe ciblé. Cependant, cette approche n'est pas toujours disponible, car elle est utilisée que pour les organes faciles d'accès tels que la peau, l'œil, les poumons, etc.

2) Utiliser le ciblage passif, c'est-à-dire ajuster les propriétés physico-chimiques du médicament pour favoriser sa distribution dans certains organes. Généralement, l'utilisation d'un vecteur synthétique, une sorte de réservoir encapsulant le principe actif, permet d'exploiter le ciblage passif. Par exemple, il a été découvert qu'à certains endroits les vaisseaux sanguins peuvent être perméables, comme dans les tumeurs (6) ou dans les zones hypoxiques suite à un infarctus du myocarde.(7) Un vecteur synthétique de type nanoparticule (taille moyenne < 200 nm), peut s'extravaser et s'accumuler dans l'espace interstitiel grâce à l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention effect*) illustré dans la Fig. 1. Par ailleurs, il est possible de cibler passivement la rate, le foie, les reins, les poumons ou le cœur selon la taille, la forme de la particule et les propriétés de surface du vecteur, tel que dans la Fig. 2.(8-10)

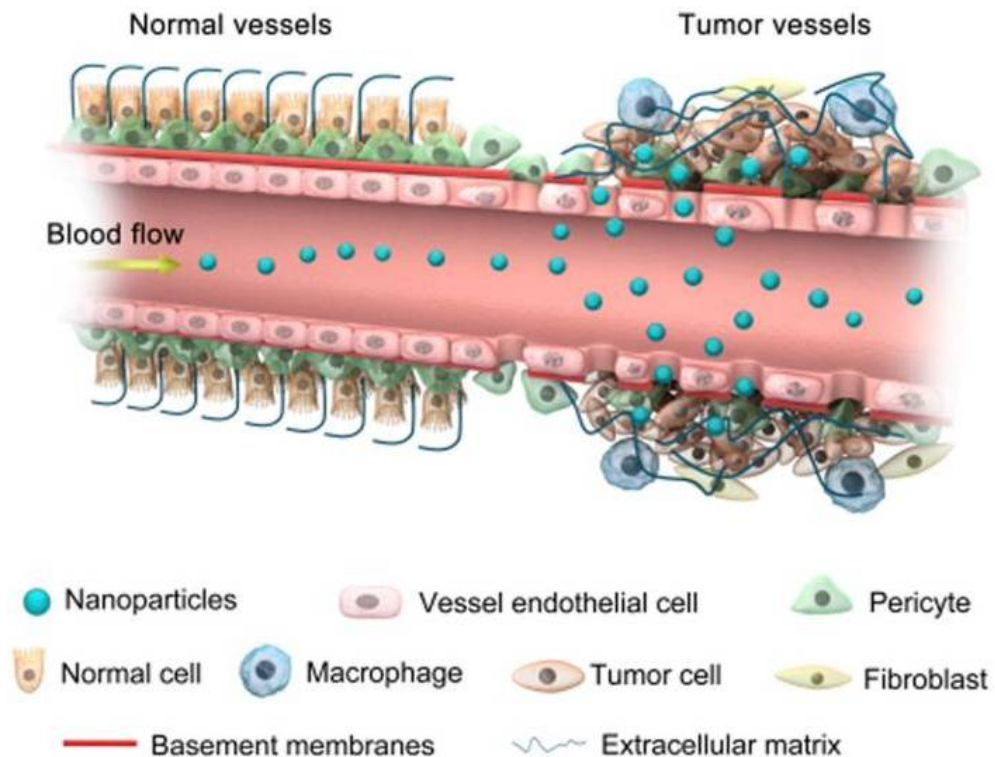


Figure 1 : Représentation de l'effet « Enhanced Permeability and Retention effect » de Abdalla et coll. (9)

Extravasation des nanoparticules (bleu) au niveau du site tumorale par l'effet d'« *Enhanced Permeability and Retention effect* » (EPR) obtenu par une taille de particules de l'ordre du nanomètre.

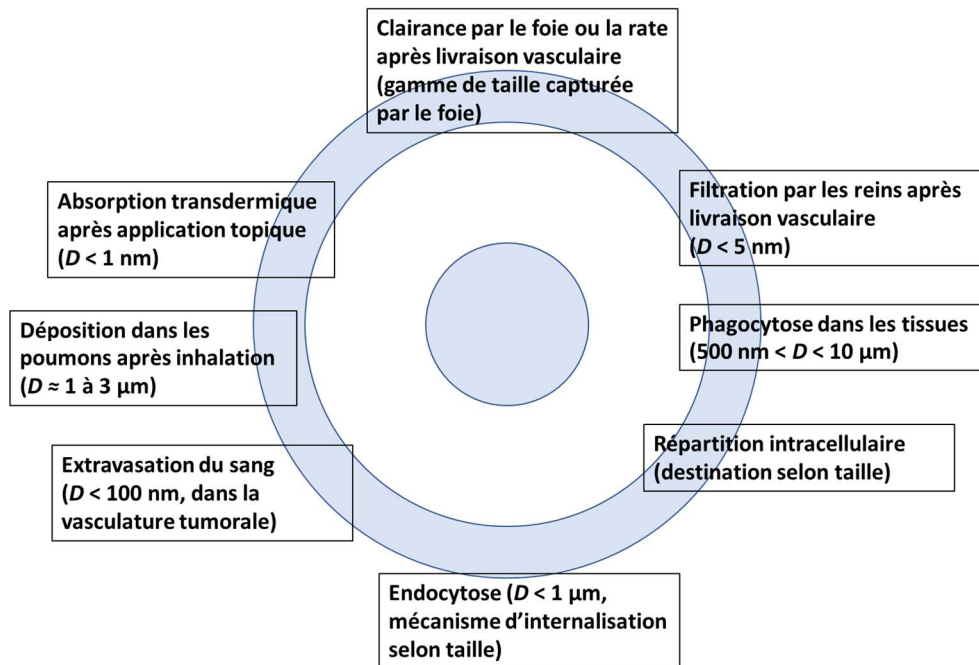


Figure 2 : Ciblage passif selon la taille de la particule adaptée de Mitragotri et coll. (11)

Les particules peuvent traverser les membranes biologiques selon une panoplie de différents processus. La distribution et la clairance de micro ou nanoparticules dépendent de la taille.

3) Cibler le vecteur selon des propriétés physiques comme la température ou le pH. Il est reconnu que dans certaines tumeurs la température est légèrement plus élevée et le pH interstitiel est légèrement plus acide (pH 6.5 à 6.8).(1) Il est possible d'exploiter ces propriétés en injectant des nanoparticules thermosensibles puis d'appliquer une hyperthermie locale qui permet le relargage de principe actif.(12) Aussi, on peut profiter du pH en utilisant des nanoparticules synthétisées avec des matériaux pH-sensibles tels que des micelles de poly-histidine, des polymères incorporant des groupements sulfonamides ou autres. Par ailleurs, l'application d'un champ magnétique localisé permet de diriger des nanoparticules magnétiques vers une zone d'intérêt. (13)

4) Une approche plus universelle de ciblage thérapeutique est la conjugaison d'un cargo (principe actif) à un ligand reconnaissant le site de la cible désirée. Le système LTD (Ligand-Targeted Drug) est montré dans la Fig. 3. Selon les besoins, l'agent de ciblage peut être conjugué sur un vecteur qui transportera plusieurs

molécules de principes actifs ou conjugué directement sur le principe actif. Les ligands seront discutés en détail dans la section 1.1.4 : ligands de ciblage.

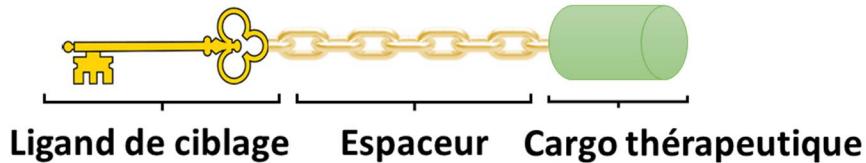


Figure 3 : LTD ou conjugué utilisant un ligand comme agent de ciblage adaptée de Srinivasarao et al. (14)

1.1.3 Comment choisir sa cible?

Afin d'obtenir une efficacité maximale et une innocuité adéquate, il faut tout d'abord identifier la meilleure cible thérapeutique. Cette cible est habituellement un récepteur cellulaire sur les cellules malades capable d'être reconnu par un ligand de ciblage. Plusieurs critères doivent être respectés pour être une bonne cible, dont : (14)

1.1.3.1 L'expression du récepteur

Une composante majeure de l'innocuité d'un système LTD est l'expression du récepteur ciblée dans les cellules malades comparativement aux cellules saines. Il est documenté que le récepteur ciblé doit être au moins 3 fois plus exprimé dans les cellules malades pour limiter la toxicité dans les tissus sains humains. (15, 16) Toutefois, quand le médicament livré est très peu toxique, il est possible d'utiliser un récepteur moins surexprimé.

Il faut également considérer l'expression totale du récepteur dans la cellule malade. En effet, s'il n'y a pas beaucoup de récepteurs on doit utiliser des stratégies synergiques comme une combinaison de plusieurs médicaments ou utiliser un vecteur permettant la délivrance de nombreuses molécules de principe actif par un seul ligand.

Enfin, il faut considérer la variante (ou isoforme) du récepteur car il peut exister plusieurs isoformes mutantes qui se lient différemment à notre ligand selon l'état de la maladie. Par exemple le récepteur

folate β est exprimé préférentiellement sur les macrophages activés (contrairement aux macrophages aux repos), ce qui permet de cibler sélectivement les macrophages inflammatoires.(17)

1.1.3.2 La localisation du récepteur

Les récepteurs intracellulaires ou exposés à la surface sont parfois surexprimés dans des conditions pathologiques. Il est évidemment plus simple de cibler les récepteurs exposés sur la surface externe de la membrane cellulaire. Si un récepteur intracellulaire est ciblé (par exemple, hormones stéroïdiennes, acide rétinoïque, récepteur vitamine, etc.), le LTD doit être perméable à la membrane cellulaire, donc il est possible qu'il rentre aussi dans les cellules saines.(18)

Certains récepteurs exprimés au niveau du cerveau sont très difficiles d'accès à cause de la barrière hématoencéphalique. Ceci constitue un avantage pour le cas du récepteur Neurokinine 1 et le cas de l'antigène membranaire spécifique à la prostate (PSMA). En effet, ces récepteurs sont surexprimés dans les cancers neuroendocriniens et dans le cancer de la prostate, respectivement.(19, 20) Il est donc possible de cibler ces récepteurs, sans pour autant induire une toxicité au niveau du cerveau. En effet, même si ces récepteurs sont présents au niveau du cerveau, la barrière hématoencéphalique empêche l'internalisation des composés. Szabo et collaborateurs ont démontré qu'un système LTD d'imagerie du cancer de la prostate qui cible le PSMA ne démontrent pas d'internalisation au niveau du cerveau sain.(21)

1.1.3.3 Le processus d'internalisation du récepteur

La majorité des récepteurs sont internalisés dans les endosomes durant le recyclage membranaire normal ou durant une réponse à un stimulus tel que démontré dans la Fig. 4.(14, 22)

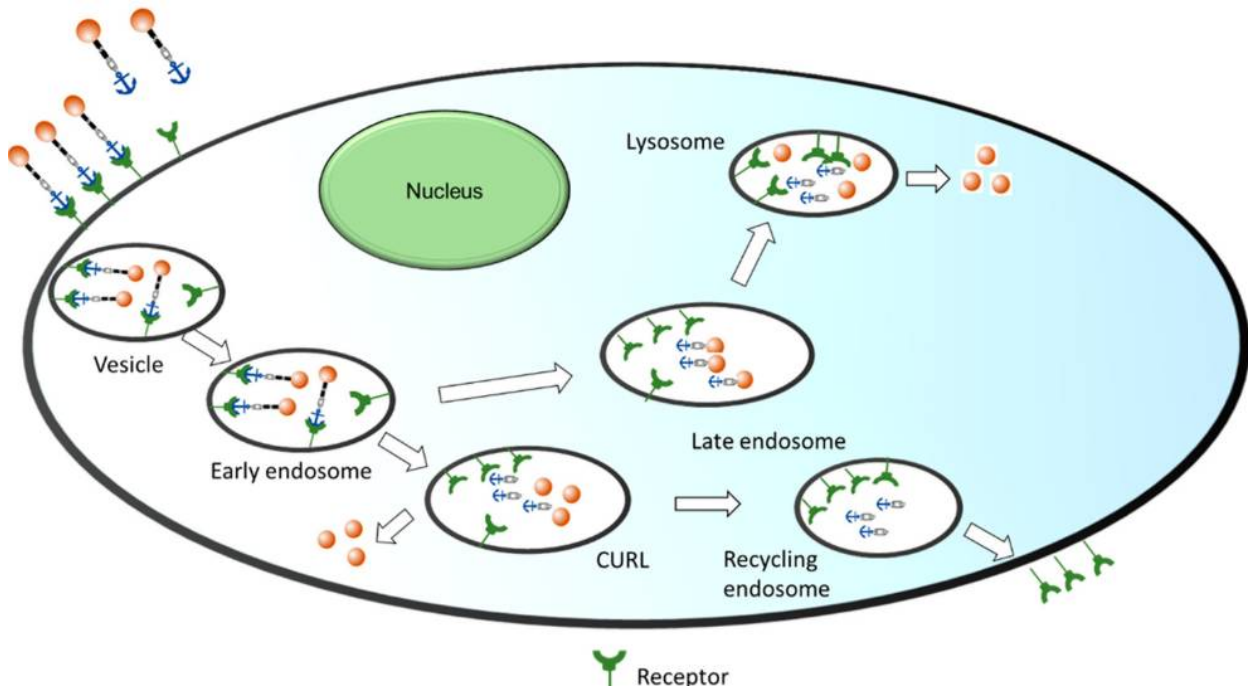


Figure 4 : Processus d'internalisation d'un LTD à travers les compartiments intracellulaires selon Srinivasarao et coll. (14)

Suite à l'internalisation, les LTDs peuvent rejoindre des organelles intracellulaires tels que l'endosome précoce et des compartiments qui permettent le découplage du ligand (CURLs). À ce niveau, le récepteur extracellulaire peut être ensuite recyclé au niveau de la surface cellulaire. Dans d'autres cas, le cargo thérapeutique peut se dissocier de l'espaceur clivable et diffusé dans le cytoplasme. Par ailleurs, il est possible que les LTDs rejoignent le lysosome via l'endosome tardif puis dégradés par les enzymes lysosomales agissant à un pH acidifié.

Le processus d'endocytose permet au principe actif d'atteindre sa cible intracellulaire, mais parfois il est préférable de garder le principe actif à la surface. Par exemple, dans le cas d'haptène immunogène lié à l'acide folique on désire que l'haptène demeure à la surface afin de stimuler une attaque immunitaire sur la cellule cancéreuse.(23)

En ciblant un récepteur non internalisant, il est quand même possible d'augmenter l'internalisation intracellulaire d'un médicament si certaines conditions sont respectées (24) : (i) le principe actif doit se

libérer de son ligand dans le microenvironnement extracellulaire, (ii) le conjugué doit être attaché suffisamment longtemps à la cellule afin que le principe actif se détache et (iii) le principe actif doit pouvoir passer par diffusion passive à l'intérieur de la cellule. On peut observer cette approche dans l'activité thérapeutique de conjugués anticancéreux ciblant le récepteur cholecystokinine 2 (CCK2R) surexprimé dans les tumeurs stromales gastro-intestinales. Le conjugué n'est pas internalisé, mais le clivage du principe actif s'effectue par la réduction des ponts disulfures, puis le principe actif peut exercer son effet thérapeutique.(25)

Enfin, il faut évaluer l'impact de l'occupation du récepteur par le ligand. Dans le cas du récepteur β -adrénergique, la liaison d'un ligand augmente et accélère l'internalisation du récepteur (26) tandis que dans le cas du récepteur à l'acide folique, l'internalisation se produit toujours au même rythme, peu importe le niveau de saturation du récepteur.(27) Dans d'autres cas, le pourcentage des récepteurs occupés va déterminer l'itinéraire intracellulaire : plusieurs récepteurs occupés mènent à une translocation vers le lysosome alors que peu de récepteurs stimulent le recyclage du récepteur vers la surface cellulaire.(28)

1.1.3.4 La topographie du récepteur

La liaison de petites molécules à un récepteur est déterminée par des interactions faibles comme hydrophobes, liaisons H, électrostatiques, π -stacking, Van der Waals et dipôle-dipôle. Une affinité élevée ne peut être atteinte que si plusieurs interactions faibles peuvent être établies simultanément.(29) Donc, lors d'utilisation de ligands de petite masse molaire, il est préférable d'avoir des récepteurs hautement fonctionnalisés avec des cavités de liaison très profondes. Tandis que si le récepteur est superficiel et peu profond, il est recommandé d'utiliser des ligands plus larges ayant un relief plus démarqué tels que des anticorps, aptamères ou des protéines échafauds.(14) Ces ligands seront discutés dans la section « Ligand de ciblage ».

Par la suite, il est préférable d'utiliser un ligand se liant à un site allostérique ou non fonctionnel dans la cavité afin de diminuer la compétition avec le ligand naturel.(30) Par contre, cette approche ne s'applique pas à tous les récepteurs et donc est moins couramment utilisée.

Finalement, Diop-Frimpong et coll. ont combiné leur vecteur avec un agent anti-fibrotique qui inhibe la synthèse de collagène, car le récepteur ciblé était obstrué par un dense réseau de collagène extracellulaire retrouvé dans les tumeurs de cancers du sein ou du pancréas.(31)

1.1.3.5 Compétition avec le récepteur

Il peut y avoir de la compétition avec le récepteur d'intérêt avec des ligands d'origine alimentaire. En effet, le récepteur au folate, un ligand naturel, peut être saturé par la présence de folate alimentaire dans la circulation sanguine. Néanmoins, ces récepteurs ne sont pas affectés par les ligands naturels à moins d'une supplémentation hors norme.(32)

1.1.4 Quel système utiliser pour le ciblage?

Il est possible de conjuguer l'agent ciblant sur plusieurs types de cargos thérapeutiques. Les différentes générations de systèmes de ciblage sont documentées et décrites dans la Fig. 5.

1.1.4.1 Les systèmes conjugués monomoléculaires

Il est possible de former un conjugué monomoléculaire en greffant un agent de ciblage avec un principe actif grâce à un espaceur. Ces bioconjugués présentent habituellement une petite masse molaire, ce qui permet de préserver leur diffusion et augmente leur pénétration tissulaire par rapport aux systèmes polymériques ou liposomaux de plus gros diamètre, présentés ci-après.(33) Récemment, cette approche a été utilisée pour le développement de conjugués anticorps-médicaments (ADC, antibody-drug-conjugate) pour le traitement de cancers. Ces anticorps sur lesquels on greffe un médicament très toxique, seront documentés dans la section 1.1.5.(34, 35)

1.1.4.2 Particules polymériques

Le principe actif est physiquement encapsulé à l'intérieur d'une particule faite de polymères qui peut être injectée ou implantée dans le corps. Au départ, les polymères utilisés n'étaient pas dégradables et la diffusion du médicament était contrôlée par la membrane du polymère comme le caoutchouc de silicone utilisé dans les implants.(36) Plus récemment, de nombreux polymères biodégradables, d'origine naturelle ou synthétique, ont été développés pour diminuer la toxicité chronique et les réactions inflammatoires associées à la première génération.(37) Malgré de nombreux essais cliniques, il n'y a pas encore de nanoparticules polymériques synthétiques approuvées en clinique par voie injectable. Cependant, il existe des microparticules ou microsphères de PLGA qui ont été approuvées comme système de livraison à relargage très prolongée (3 à 6 mois) pour des médicaments tels que le leuprolide pour le cancer de la prostate, la goséreline pour le cancer du sein, etc.(38)

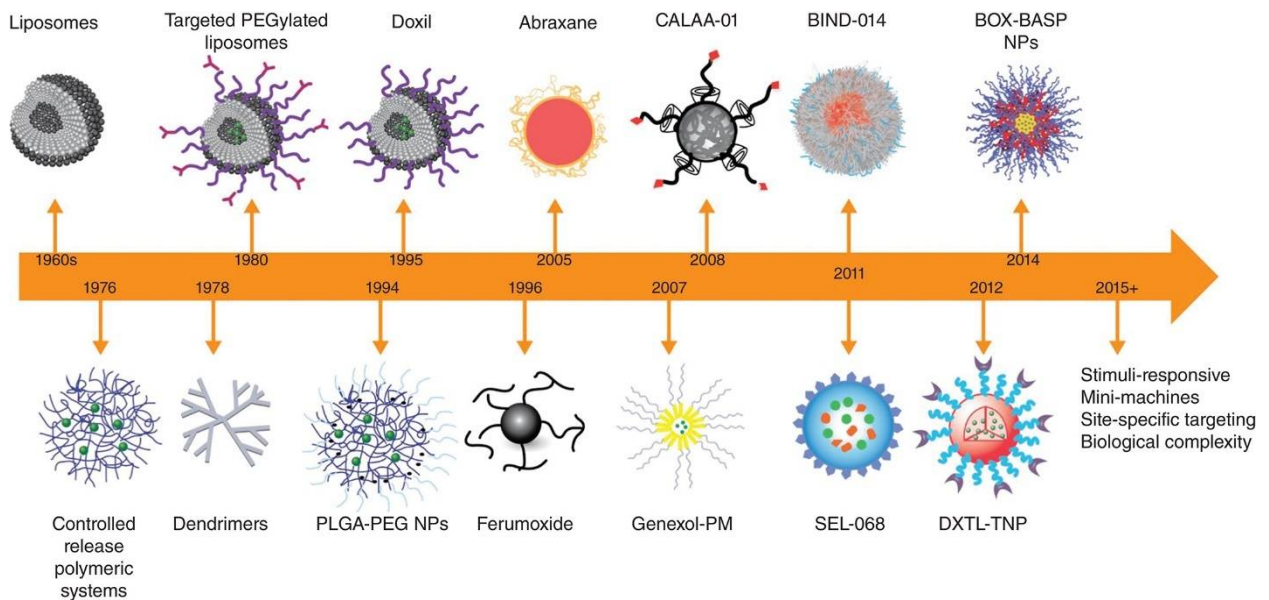


Figure 5 : Ligne du temps des systèmes particulaires par Banik et coll.(37)

Dans la figure 5 ci-haut on peut voir des particules telles que le Doxil® : premier liposome approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA), le développement de nanoparticules PLGA-PEG : Poly(lactique-co-acid glycolique)-co-polyethylene glycol, l'Abraxane® : système de livraison basé sur des protéines, Genexol-PM : micelle polymérique, CALAA-01 : hybride de cyclodextrine-polymère utilisant un agent de ciblage, BIND-014 : particule polymérique utilisant un agent de ciblage, SEL-068 : particule polymérique pour la livraison de vaccins, DXTL-TNP : particule polymérique de docetaxel utilisant un agent de ciblage, DOX-BASP : nanoparticules dégradables par l'acidité.

1.1.4.3 Liposomes

Les liposomes sont de petites vésicules lipidiques composées d'une ou plusieurs bicouches concentriques de phospholipides. Initialement développés pour mimer la membrane cellulaire, ils sont souvent utilisés comme transporteurs de médicaments grâce à leur biocompatibilité, leur biodégradabilité et leur facilité de fonctionnalisation. La structure classique est démontrée à la Fig. 6. L'encapsulation à l'intérieur de ces vésicules permet de livrer plus une importante quantité de principes actifs par un seul liposome. En encapsulant le principe actif, on prévient la dégradation de ce dernier et on réduit aussi la toxicité non spécifique du médicament. Plus d'une dizaine de liposomes thérapeutiques ont été développés et commercialisés en clinique dont des formulations de doxorubicine, amphotéricine B, vincristine, d'irinotécan, etc.(39, 40) Plus récemment, on a utilisé les liposomes pour la livraison de matériel génétique.(41) La Food and Drug Administration (FDA) a approuvé en septembre 2018 le médicament génétique Patisiran, pour le traitement d'une maladie génétique héréditaire, l'amyloïdose de la transthyréline. Ce médicament repose sur une particule lipidique encapsulant un ARN interférent, qui réduit l'expression de la protéine défectueuse dans le foie.(42)

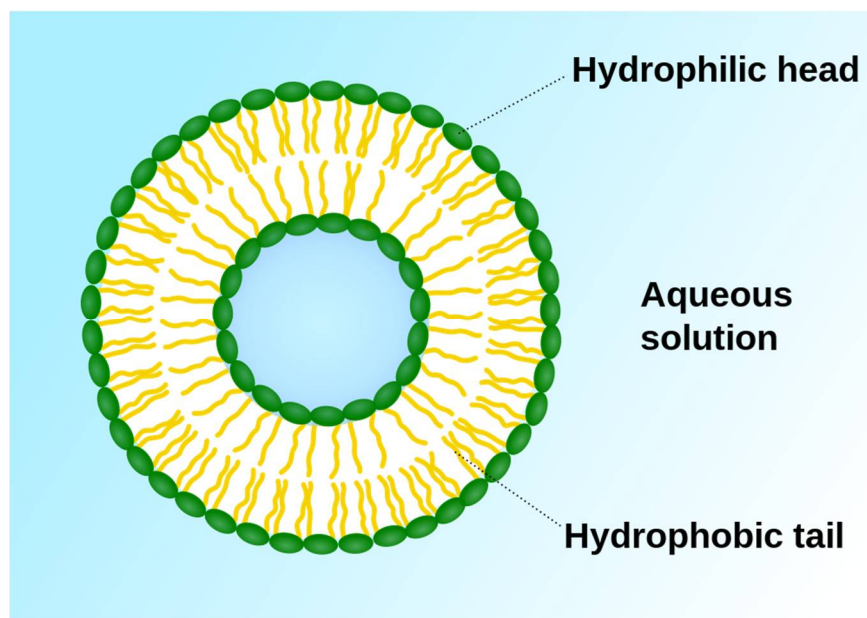


Figure 6 : Structure classique d'un liposome

1.1.5 Qu'est-ce qu'un ADC?

Les anticorps conjugués ou *antibody drug conjugates* (ADCs) sont habituellement composés d'un anticorps monoclonal recombinant (mAb) lié d'une façon covalente à un (ou plusieurs) agent(s) cytotoxique(s) via un espaceur synthétique qui seront documentés dans les sections suivantes.(34)

L'avantage de cette combinaison provient du fait que l'agent très cytotoxique profite des propriétés de l'anticorps : une haute sélectivité cellulaire, une bonne stabilité plasmatique et un profil pharmacocinétique favorable. L'agent cytotoxique est tellement puissant qu'il serait trop toxique si administré seul sans conjugaison avec l'anticorps. Un exemple d'anticorps conjugué avec son mécanisme de cytotoxicité est démontré dans la Fig. 7.

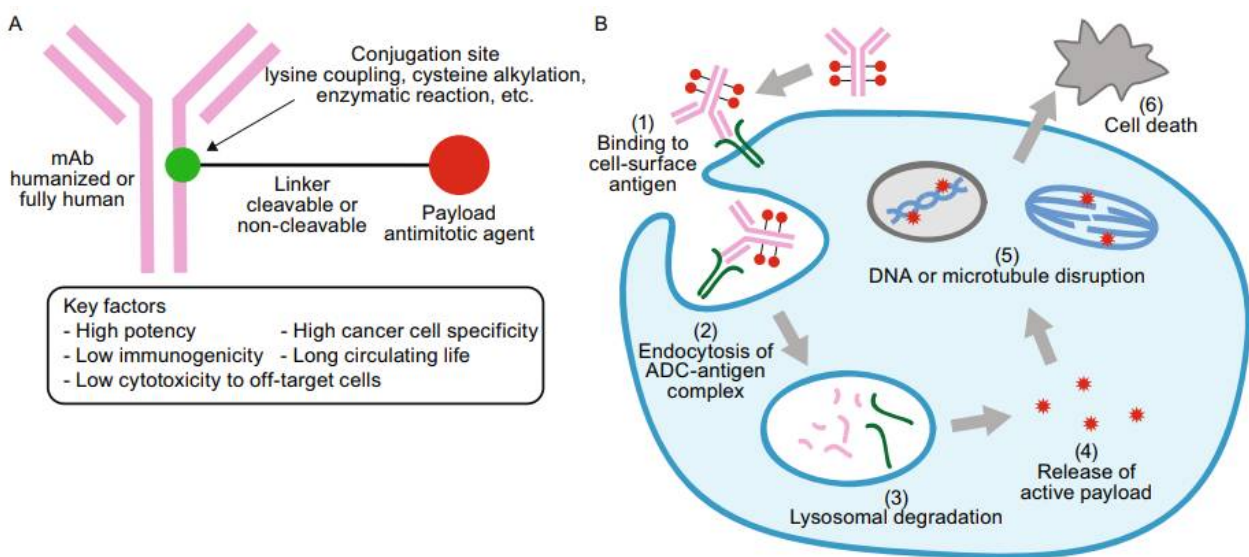


Figure 7 : Structure et mécanisme d'action d'un ADC par Tsuchikama et al. (43)

Dans la figure ci-haut, en A on illustre la structure générale d'un ADC conjugué à un médicament cytotoxique par un espaceur clivable ou non-clivable. En B, on démontre le mécanisme de toxicité de l'ADC où l'anticorps reconnaît l'antigène (étape 1) pour former un complexe antigène-ADC. Ce complexe est ensuite internalisé dans la cellule (étape 2) puis est dégradé dans le lysosome (étape 3) et le médicament cytotoxique est libéré dans la cellule (étape 4). Enfin dans l'étape 5 et 6, le médicament exerce son effet cytotoxique.

Le concept des ADCs date des années 1960 et les premiers essais cliniques des années 1980. Depuis le développement de cette stratégie, quatre ADCs ont été commercialisés tels que Gemtuzumab

ozogamicin, Brentuximab vedotin, Trastuzumab emtansine et Inotuzumab ozogamicin pour le traitement du cancer (leucémies, cancer du sein) et plus de 60 ADCs sont présentement en phase clinique.(35) Des

ADCs de différentes générations sont documentés dans la Fig. 8.

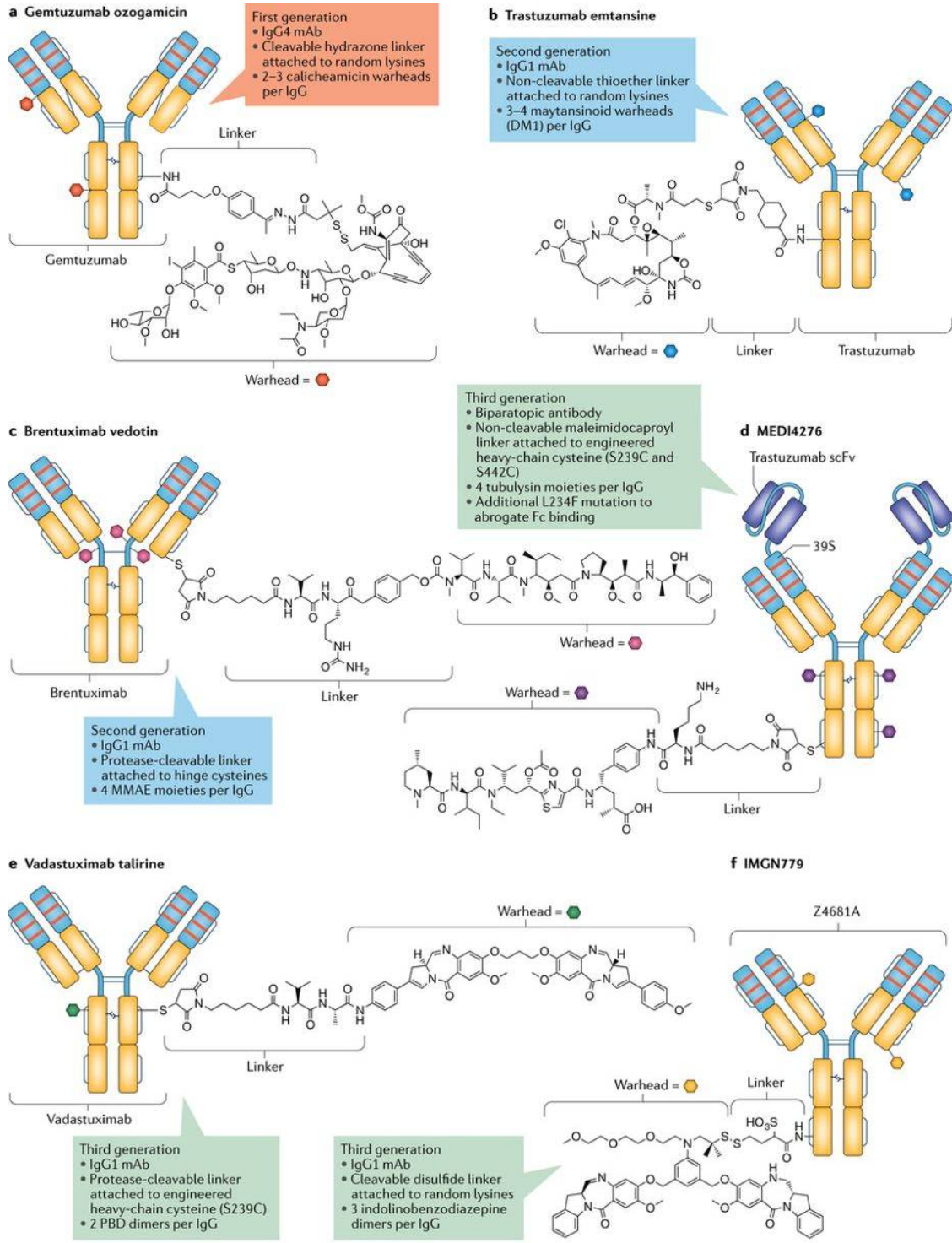


Figure 8 : Structure d'ADCs selon les générations par Beck et coll.(34)

Les médicaments cytotoxiques (warhead) sont conjugués à des anticorps monoclonaux humains, humanisés ou chimériques via des espaceurs différents. A) La 1^{ère} génération d'ADC gemtuzumab ozogamicin est un conjugué d'une immunoglobuline G4 (IgG4) humanisée spécifique pour le CD33 où 2 à 3 calicheamicine étaient conjuguées par IgG, attachées par un espaceur clivable hydrazone sur des résidus lysines. B) La 2^{ème} génération d'ADC trastuzumab emtasine consiste d'un conjugué d'une IgG1 humanisée spécifique pour le récepteur human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) et 3 à 4 unités de DM1 par IgG, attachées par un espaceur non clivable thioether sur des lysines. C) La 2^{ème} génération d'ADC brentuximab vedotin et un conjugué d'une IgG1 chimérique spécifique pour le récepteur CD30 et 4 monomethyl auristatin E (MMAE) par IgG, attachés par des espaceurs clivables par les protéases. D) La 3^{ème} génération d'ADC MEDI4276 consiste d'un anticorps biparatopique qui cible 2 épitopes différents sur HER2, conjugué à 4 tubulysine par IgG en utilisant un espaceur maleimidocaproyl. E) La 3^{ème} génération d'ADC vadastuximab talirine est un conjugué d'une IgG1 humanisée pour le CD33 et 2 pyrrolbenzodiazepines (PDB) par IgG, qui sont attachées sur des cystéines d'ingénierie (S239C) dans la chaîne lourde de l'IgG par un espaceur clivable par les protéases. F) La 3^{ème} génération d'ADC IMGN779 est un conjugué humanisé d'IgG1 spécifique pour le CD33 et 3 indolinobenzodiazepines par IgG, qui sont attachées sur des résidus lysines par un espaceur clivable disulfure.

1.1.5.1 Espaceurs des ADCs

Les espaceurs reliant l'anticorps avec la molécule cytotoxique ont un rôle très important dans la stabilité et l'efficacité de l'ADC.(44) Les espaceurs modifient les propriétés physicochimiques et la cinétique de liaison de l'ADC, ce qui change les propriétés de liaison à l'antigène et les propriétés pharmacocinétiques. Idéalement, le cargo thérapeutique doit être libéré sélectivement à l'intérieur de la cellule, en particulier si la cible thérapeutique est intracellulaire. L'index thérapeutique d'un ADC diminue considérablement si le cargo toxique est libéré trop rapidement dans la circulation plasmatique. C'est notamment le cas du Mylotarg®, un ADC utilisant un espaceur pH sensible à base d'hydrazone. L'instabilité de ce lien a causé un relargage prématuré du médicament et a provoqué une toxicité cliniquement significative et un retrait éventuel du marché.(45)

Les espaceurs peuvent être donc clivables ou non clivables, et les deux stratégies ont été utilisées en clinique. Les espaceurs non clivables augmentent généralement la stabilité plasmatique, puis comptent sur la dégradation complète de l'anticorps dans la cellule. Les espaceurs clivables doivent présenter une forte différence de stabilité entre la circulation plasmatique et le site d'action. Leur hydrolyse est

généralement activée par des propriétés physiopathologiques de la tumeur dont : 1) l'hydrolyse d'un lien acide labile par la présence d'un pH acide, 2) le clivage enzymatique d'un lien amide ou ester par une protéase ou estérase intracellulaire ou 3) la réduction d'un pont disulfure par la présence intracellulaire plus élevée de glutathion. Les espaceurs sensibles aux protéases comptent sur le fait qu'il existe une grande proportion de ces enzymes dans le lysosome de la cellule cancéreuse. Dubowchik et coll. ont découvert le dipeptide valine-citrulline communément utilisé dans les ADCs de dernière génération. Ce dipeptide est clivé par la protéase cathepsine B intracellulaire.(46) Enfin, il a été bien documenté qu'augmenter l'hydrophilie de l'ADC améliore ses propriétés pharmacocinétiques et augmente son index thérapeutique. (47) Les espaceurs sensibles au pH et au glutathion seront revus dans la section « Espaceurs » 1.1.7.

1.1.5.2 Conjugaison sur ADCs

Les espaceurs peuvent être conjugués sur plusieurs sites de l'anticorps. En effet, on peut utiliser les acides aminés naturels possédant une fonction chimiquement modifiable, comme la lysine (NH₂) et la cystéine (SH). Les IgGs ont environ 90 résidus de lysine, dont une trentaine sont disponibles pour la conjugaison. (44) Pour les IgGs, il existe 8 cystéines engagées dans des ponts disulfures qui peuvent être réduits et conjugués, par exemple sur une fonction maléimide de l'espaceur. La conjugaison sur des cystéines produit une ADC plus homogène ayant moins de variabilité et une caractérisation plus facile que la conjugaison sur les lysines. Aussi, les conjugués lysines peuvent perdre leur affinité avec l'antigène et détériorer le profil pharmacocinétique de l'ADC.(44)

De nouvelles stratégies de conjugaison ont été proposées dont l'ajout de cystéines par génie génétique. (48) Toutefois, la liaison maléimide obtenue avec ces nouvelles cystéines est plus fragile, car elle est très accessible au milieu extérieur et donc à l'échange avec les thiols réactifs de l'albumine ou glutathion. Il faut alors utiliser une liaison maléimide auto-hydrolysante et beaucoup plus stable.(49)

Par la suite, l'ajout d'acides aminés non naturels ou d'azides permet une conjugaison par chimie click.(34, 50) La conjugaison assistée par des enzymes est une nouvelle approche prometteuse utilisée par des compagnies comme Pfizer. Une séquence d'acides aminés est encodée pour initier la reconnaissance par des enzymes et la catalyse à ce site spécifique. (51)

Enfin, il est possible de conjuguer le principe actif sur un glycan pour les anticorps glycosylés (52) ou sur les serines (-OH) terminales.(53)

1.1.6 Quel ligand de ciblage utiliser?

Les ligands peuvent nettement augmenter la puissance d'un médicament et la spécificité donc il existe une vaste gamme allant de petites molécules (hormones, folates, sucres), à des peptides, aux aptamères, aux fragments d'anticorps, aux protéines et jusqu'aux anticorps tel que démontré sur la Fig. 9.(54, 55)

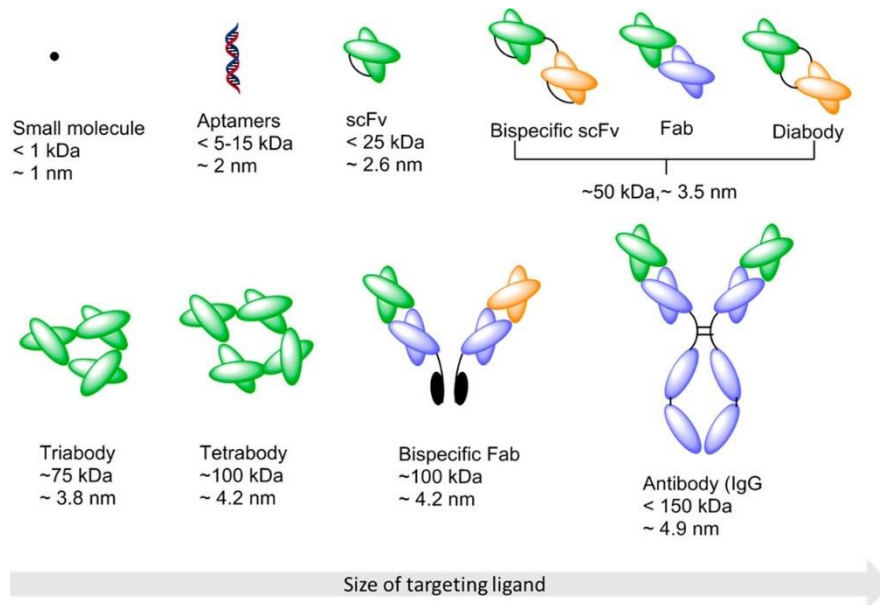


Figure 9 : Ligands communément utilisés en ordre de grandeur par Srinivasarao et coll. (14)

Il est possible de classer les ligands selon certains principes :

1.1.6.1 Taille du ligand

La taille du ligand a le plus grand impact sur les propriétés pharmacocinétiques du LTD. Les molécules de masse molaire inférieure à 40 000 g/mol sont rapidement filtrées par les glomérules du rein, tandis que

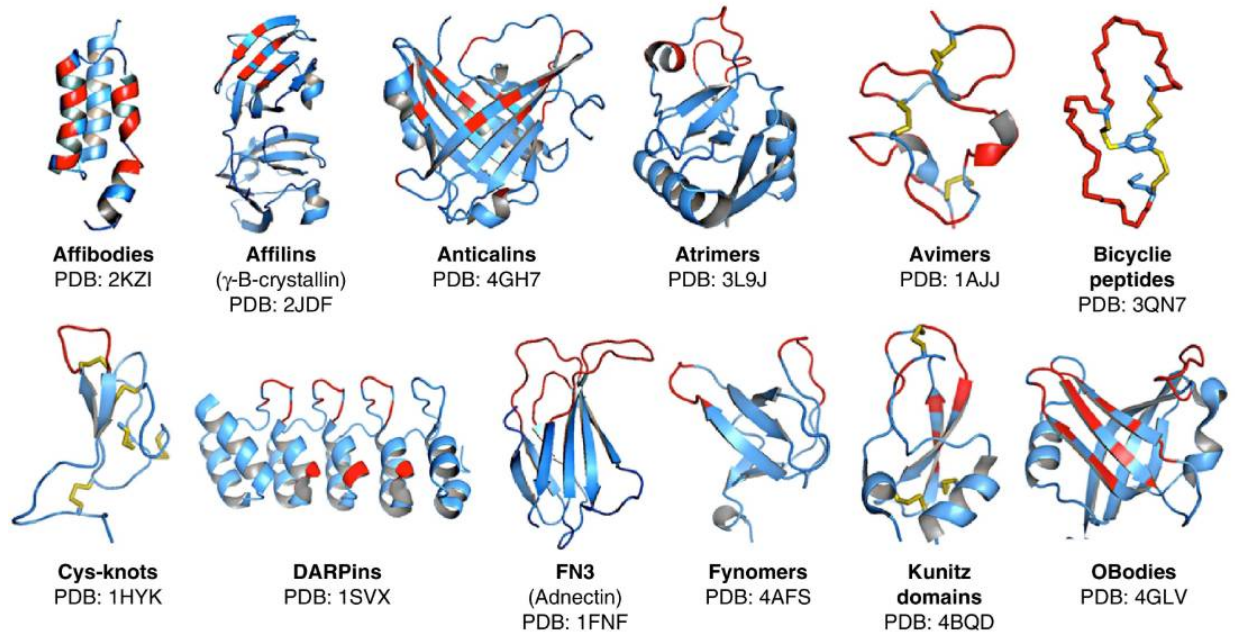
les macromolécules de plus grande masse molaire peuvent circuler dans le sang pendant plusieurs jours.(56) Un temps de circulation prolongé peut être avantageux, car il contribue à une exposition plus longue du principe actif aux tissus malades. De plus, les systèmes avec une masse molaire plus élevée (particules entre 20 et 200 nm) peuvent bénéficier de l'effet EPR.(57) Cependant, il est bien important de noter que le ciblage passif par le système EPR est moins prononcé chez les humains que les modèles animaux. Effectivement, une étude a récemment démontré que seulement 0.7 % des nanoparticules administrées se retrouvent dans la tumeur solide.(58) Ce chiffre dépend évidemment de la nature des nanoparticules utilisées, mais l'ordre de grandeur est représentatif et explique le faible succès clinique des nanovecteurs pour le traitement du cancer.

Un long temps de circulation peut poser des problèmes de stabilité, car le médicament risque de se libérer du conjugué de façon précoce (voir la section 1.1.7).(59) Dans ce cas, le principe actif libéré peut s'accumuler dans des organes non spécifiques tels que le foie et causer de la toxicité secondaire. De plus, il a été démontré dans le traitement de tumeurs solides que la pénétration tissulaire est inversement proportionnelle à la taille du conjugué. (60) Dans le cas de ces tumeurs, la taille idéale pour un vecteur composé de dextran est d'environ 70 kDa, car (i) il est trop grand pour être filtré par les reins, (ii) mais il est suffisamment petit pour pénétrer modérément dans la tumeur (iii) et il peut bénéficier de l'effet EPR. (61)

1.1.6.2 Adaptabilité du ligand

Comme mentionné précédemment, si le récepteur présente peu de relief et ne contient pas une cavité délimitée, il n'est pas un choix idéal pour les ligands de petite masse molaire. Dans ce cas, on doit utiliser un ligand plus encombrant stériquement qui peut former plusieurs interactions faibles en couvrant une grande fraction de la surface du récepteur. Plusieurs protéines ou acides nucléiques ont été développés à cet effet dont : les aptamères d'acides nucléiques ou de peptides, les fragments d'anticorps, les avimères,

les affibodies, les domaines Kunitz, les affilines, les anticalines et les darpines, etc. (62) Certains de ces ligands sont décrits dans la Fig. 10.



Scaffold	Parental protein	Structure	Randomization	MW (kDa)
<i>Affibodies</i>	Z domain (protein A)	α -helical	Helix randomization	6
<i>Affilins</i>	γ -B-crystallin	β -sheet	Beta-strand randomization	20
	Ubiquitin	α/β	Beta-strand randomization	10
<i>Anticalins</i>	Lipocalin	β -sheet + α -helical terminus	Loop randomization Beta-strand randomization	20
<i>Atrimers</i>	C-type lectin (tetranelectin)	α/β	Loop randomization	3 × 20
<i>Avimers</i>	A-domain	Ca ²⁺ binding Disulfide constrained	Loop randomization	4
<i>Bicyclic peptides</i>	Peptide	Chemically constrained	Loop randomization	2
<i>Cys-knots</i>	Peptide	β -sheet Disulfide constrained	Loop randomization	4
<i>DARPins</i>	Ankyrin repeats	α -helical + β -turn	Helix randomization Beta-turn randomization	14-21
<i>FN3 scaffolds</i> (<i>Adnectins, Centyrins, Pronectins, Tn3</i>)	Fibronectin (type III)	β -sheet	Loop randomization Beta-strand randomization	10
<i>Fynomers</i>	SH3 domain (fyn kinase)	β -sheet	Loop randomization	7
<i>Kunitz domains</i>	Serine protease inhibitor	α/β Disulfide constrained	Loop randomization	7
<i>OBodies</i>	OB-fold	β -sheet	Loop randomization Beta-strand randomization	12

Figure 10 : Schéma des ligands non-anticorps par Vazquez-Lombardi (62)

Structures des ligands non-anticorps. Ces ligands sont définis en deux catégories : les ligands de taille d'un domaine (Affibodies, Affilins, Anticalins, Atrimers, DARPin, FN3 scaffolds, Fynomers, Kunitz domains et OBodies) et dans le domaine des peptides (Avimers, peptides bicycliques et Cys-knots). La 1ère classe est d'environ 6 à 20 kDa, tandis que les peptides ont une masse molaire de 2 à 4 kDa. Les illustrations sont générées par PyMOL par Vasquez-Lombardi. Les positions diversifiées sont surlignées en rouge, les disulfures sont surlignés en jaune.

L'avantage de ces ligands est de pouvoir cibler des récepteurs avec très peu de relief ou non repliés (*e.g.*, CD138) ou des récepteurs hautement glycosylés (par exemple, les mucines MUC1 et CA125).(14)

1.1.6.3 L'affinité et la spécificité du ligand

Un ligand ayant une constante de dissociation (K_d) de sa cible minimale de $K_d = 10$ nM possèdera une toxicité réduite. (14) Lorsque le K_d est plus élevé, on peut avoir recours à des ligands multivalents afin d'obtenir d'augmenter la puissance de notre système LTD.(63)

Toutefois, une affinité trop élevée présente le risque que le ligand ne se dissocie pas lors du recyclage du récepteur et qu'il occupe le récepteur pour une période prolongée, diminuant l'accumulation du principe actif. De plus, la pénétration tumorale des ligands très puissants est réduite due à l'existence d'un effet barrière au site de liaison. Pour illustrer ce phénomène, c'est l'anticorps ciblant le HER2 d'affinité moyenne (et non celui avec l'affinité la plus élevée) qui a démontré la meilleure accumulation tumorale post-injection parmi tous les anticorps ciblant le HER2.(64) Il est donc important d'avoir un équilibre entre la pénétration dans le tissu et l'affinité pour le récepteur.(65)

Enfin d'un point de vue spécificité, il est recommandé d'avoir recours au criblage pour les composés pan-assay interference (PAINS) qui sont des ligands de haute affinité envers les protéines, mais ne sont pas toujours utiles pour une application clinique car ils ne sont pas suffisamment spécifiques.(66)

1.1.6.4 Stabilité du ligand

La majorité des ligands peuvent être dégradés par les enzymes digestives du sang, de l'intestin ou des tissus. Il est possible de stabiliser ces ligands, mais la production d'un ligand complètement résistant à la digestion n'est pas atteignable ni souhaitable. L'effort est plutôt mis dans le développement de ligands

qui peuvent circuler longtemps dans la circulation systémique et qui, une fois internalisé par les cellules cibles, se dégradent rapidement. Des solutions proposées à ce problème sont (i) la décoration du ligand avec du polyéthylène glycol, (ii) l'ajout d'acides aminés non naturels pour un ligand peptidique et (iii) l'ajout des sucres ou de nucléotides permettant d'éliminer certains sites de digestion.(67)

1.1.6.5 Immunogénicité du ligand.

Les molécules de petite taille (< 500 g/mol) sont habituellement moins immunogènes comparativement à des molécules plus larges comme les anticorps car les petites molécules sont difficilement présentées par les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules T, B ou dendritiques.(14) De plus, l'agrégation de l'anticorps due à sa modification peut stimuler une réponse immunitaire et humorale.(68) Cette réponse peut diminuer la stabilité et la pharmacocinétique du conjugué et ainsi l'efficacité chez le patient.(69)

1.1.7 Quel espaceur utiliser?

Comme démontré dans la figure 3, un espaceur est nécessaire pour attacher le cargo thérapeutique au ligand ciblant. La fonction de l'espaceur est de minimiser l'interférence stérique du cargo thérapeutique avec le ligand pour préserver l'affinité du ligand envers son récepteur et aussi améliorer les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du conjugué. Un espaceur clivable permet de stabiliser le conjugué durant sa circulation et de relarguer le principe actif lors de son l'internalisation ou dans des conditions physiologiques particulières (pH, température, enzymes). Les paramètres les plus importants des espaceurs sont documentés ci-bas :

1.1.7.1 Longueur de l'espaceur

Comme mentionné ci-haut, il est important d'avoir un espaceur suffisamment long pour empêcher que le cargo thérapeutique interfère avec la liaison du ligand. Dans certains cas on peut se fier à la structure cristalline du récepteur pour déduire une longueur idéale. En effet, les relations de structure-activité (SAR) sur le PSMA (prostate-specific membrane antigen, protéine surexprimée sur les cellules cancéreuses de

la prostate) ont démontré qu'il est nécessaire d'avoir un ligand d'au moins 12 atomes puisque la poche de liaison est étroite et profonde.(70) Dans le cas où le récepteur est très superficiel et présente peu de relief, comme dans le cas du récepteur folate, un espaceur court d'éthylène glycol ou d'éthyle diamine est suffisant pour la liaison.(71)

1.1.7.2 Espaceur hydrophile ou hydrophobe?

La majorité des médicaments doivent agir à l'intérieur de la cellule pour être efficaces et donc doivent être suffisamment hydrophobes pour diffuser au travers de la membrane plasmique afin d'atteindre leur cible intracellulaire.(72) Certains auteurs recommandent que les ligands de petite taille soient hydrophiles afin de minimiser l'internalisation dans les cellules saines sans récepteur.(73) Puisque l'hydrophobicité du ligand ou du principe actif ne peuvent être changés sans modifier leur affinité/efficacité, l'hydrophobicité globale peut être modifiée en changeant l'espaceur.(74) Les polyéthylènes glycols de différentes longueurs sont de bons espaceurs qui sont fréquemment utilisés grâce à leur faible immunogénicité et leur bonne stabilité plasmatique.(75) Enfin quand un espaceur flexible interfère avec la liaison du ligand à son récepteur, on peut avoir recours à un espaceur plus rigide et hydrophile.(76)

1.1.7.3 Espaceur clivable

Les espaceurs non clivables sont préférés quand le cargo est un agent d'imagerie qui doit être retenu dans les cellules malades, ou rester dans la circulation sanguine. On peut aussi utiliser ces espaceurs lorsqu'une pompe à efflux diminue l'efficacité d'un médicament, car ce dernier sera retenu plus longtemps dans la cellule. (77)

On utilise un espaceur clivable quand le médicament doit échapper l'endosome et se lier à la cible moléculaire.(78) Les propriétés suivantes caractérisent un bon espaceur : (i) stable en circulation, (ii) rapidement clivé lorsqu'internalisé dans la cellule malade et (iii) le clivage relargue le principe actif intact (sans résidu de l'espaceur). Il n'est pas nécessaire d'avoir une longue stabilité pour les petits conjugués, car ils seront capturés rapidement par la cellule ou éliminés.(79) Au contraire, les espaceurs qui sont liés

à des anticorps doivent avoir une stabilité plasmatique de presque deux semaines.(34, 44) Il est important d'avoir un équilibre entre la stabilité plasmatique de l'espaceur et sa capacité à se cliver.(80)

1.1.7.4 Les espaceurs clivés par une réduction du pont disulfure S-S

La concentration du glutathion (GSH) réduit dans le cytoplasme cellulaire (environ 2 à 10 mM) est beaucoup plus élevée que dans le milieu extracellulaire, ce qui rend le milieu intracellulaire plus réducteur que le milieu extracellulaire.(81) Il est possible d'exploiter ce phénomène en utilisant une liaison entre deux atomes de soufre (pont disulfures). Ces ponts disulfures sont plus stables dans la circulation sanguine que dans les compartiments intracellulaires.(79, 82) Ainsi, on peut obtenir un relargage ciblé dans le compartiment intracellulaire.

Il est possible de moduler la stabilité des espaceurs présentant un pont disulfure en ajoutant des groupements stériques à proximité des ponts disulfures. En effet, comme démontré à la Fig. 11., le temps de demi-vie en présence d'un agent réducteur passe de moins de 5 minutes à plus de 8 heures avec l'ajout de groupements méthyles.(83) Cette stabilité accrue peut aussi diminuer l'efficacité, puisqu'elle limite la vitesse de libération du principe actif sur le site d'action.(80, 83) À noter que la stabilité d'un conjugué utilisant un espaceur avec des ponts disulfures non modifiés est d'environ 3 jours.

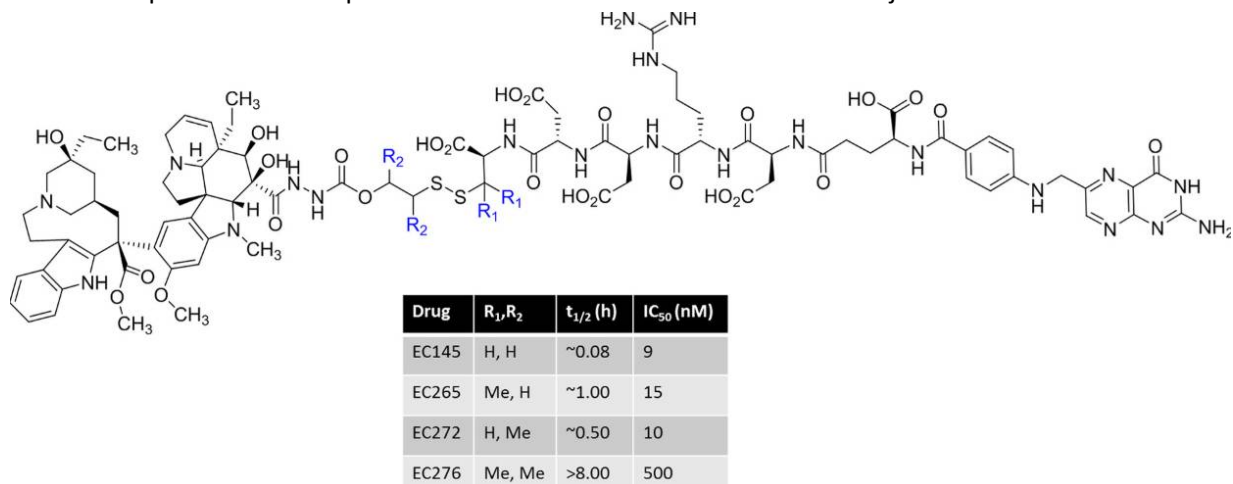


Figure 11 : Effet de l'encombrement stérique à proximité d'un lien disulfure sur la stabilité et la cytotoxicité d'un conjugué ciblant le récepteur folate de désacétylvincristine par Srinivasarao (14)

1.1.7.5 Les espaceurs clivés par un pH acide

L'utilisation d'espaceurs pH-sensibles se base sur la différence de pH entre l'endosome (pH = 5-6) et le cytosol (pH = 7.4).(84) En général, ces espaceurs présentent une meilleure stabilité à pH cytosolique qu'à pH endosomal. Grâce au ligand choisi, le LTD est internalisé dans la cellule par endocytose médiée par le récepteur ciblé. Le LTD se retrouve alors dans l'endosome où l'espaceur est déstabilisé et clivé. Le principe actif libéré peut alors diffuser jusqu'au cytosol ou à l'organelle cible pour y exercer son effet thérapeutique. Les deux groupements pH-sensibles les plus utilisés sont le groupement *p*-methoxybenzyl acétale (83) ou la fonction hydrazone.(85) Malheureusement, les espaceurs hydrazones ont démontré des inconvénients cliniques car ils ne sont pas suffisamment stables dans la circulation sanguine. Par exemple, le conjugué Mylotarg® utilisant un espaceur hydrazone avait une fenêtre thérapeutique trop étroite suite au relargage prématuré du principe actif.(44)

De nombreux groupements pH-sensibles ont été développés pour convenir à cette libération contrôlée dans l'endosome. Parmi eux, les espaceurs silyl éthers sont plus stables que les espaceurs hydrazones et leur stabilité peut être modifiée selon l'encombrement stérique au niveau de l'atome de silicium.(86) Récemment, Parrot et coll. ont utilisé ces espaceurs dans des conjugués pour former des nanoparticules « PRINT » et ont démontré une stabilité à pH 7.4 et une dégradation à pH 5.0 *in vitro* tel que démontré à la Fig. 12. De plus, Finniss et coll. ont utilisé un espaceur silyl éther pour la synthèse d'un ADC et ont démontré une stabilité à pH 7 et une dégradation à pH 5.(87)

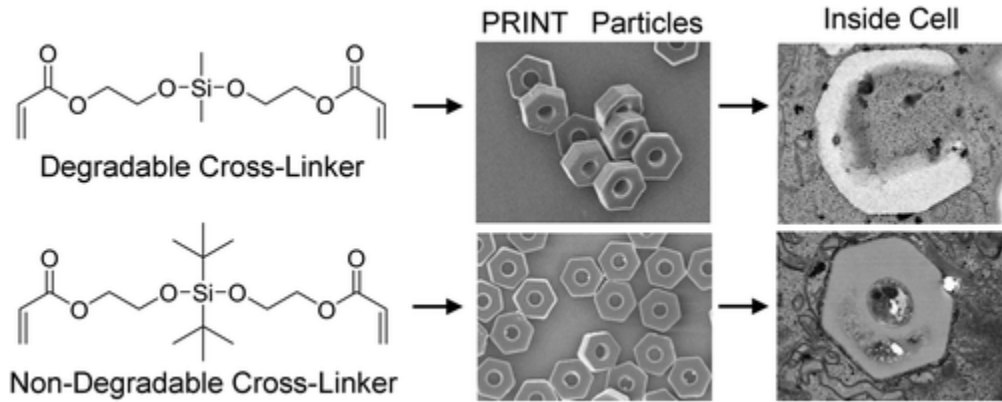


Figure 12 : Effet de l'encombrement stérique au niveau de l'atome silicium sur la dégradation intracellulaire de particules par Parrott et coll.(86)

Des espaceurs (cross-linker) ont été utilisés pour fabriquer des particules par la technologie *particle replication in nonwetting templates* (PRINT). Ces particules ont ensuite été incubées dans des cellules HELA afin d'observer la dégradation intracellulaire. Comme démontré ci-haut, les particules utilisant l'espaceur dégradé se défont plus rapidement à l'intérieure de la cellule (images par microscopie électronique à transmission).

1.1.7.6 Les espaceurs clivables par voie enzymatique à l'intérieur de la cellule

Il existe une panoplie d'enzymes à l'intérieur de la cellule qui sont différentes des enzymes retrouvées dans le sang ou le fluide interstitiel. En plus, plusieurs enzymes hydrolytiques sont activées et surexprimées dans les cellules malades (cancer, arthrite, colite ulcéreuse, etc.).(14) Par exemple, l'espaceur dipeptidique très stable valine-citrulline est clivé par l'enzyme Cathepsine B dans les lysosomes acidifiés.(88) On peut coupler cet espaceur clivable par voie enzymatique avec un espaceur qui s'auto-clive comme le *para*-aminobenzoxycarbonyl (PABC). Ceci permet de relarguer plusieurs molécules actives intactes sans résidus de l'espaceur tel que démontré à la Fig. 13.(89) Plusieurs ADCs utilisent l'espaceur valine-citrulline en clinique dont le Brentuximab vedotin (Adcetris), Glembatumumab vedotin (CDX-011), tel que démontré dans la figure 8.(34)

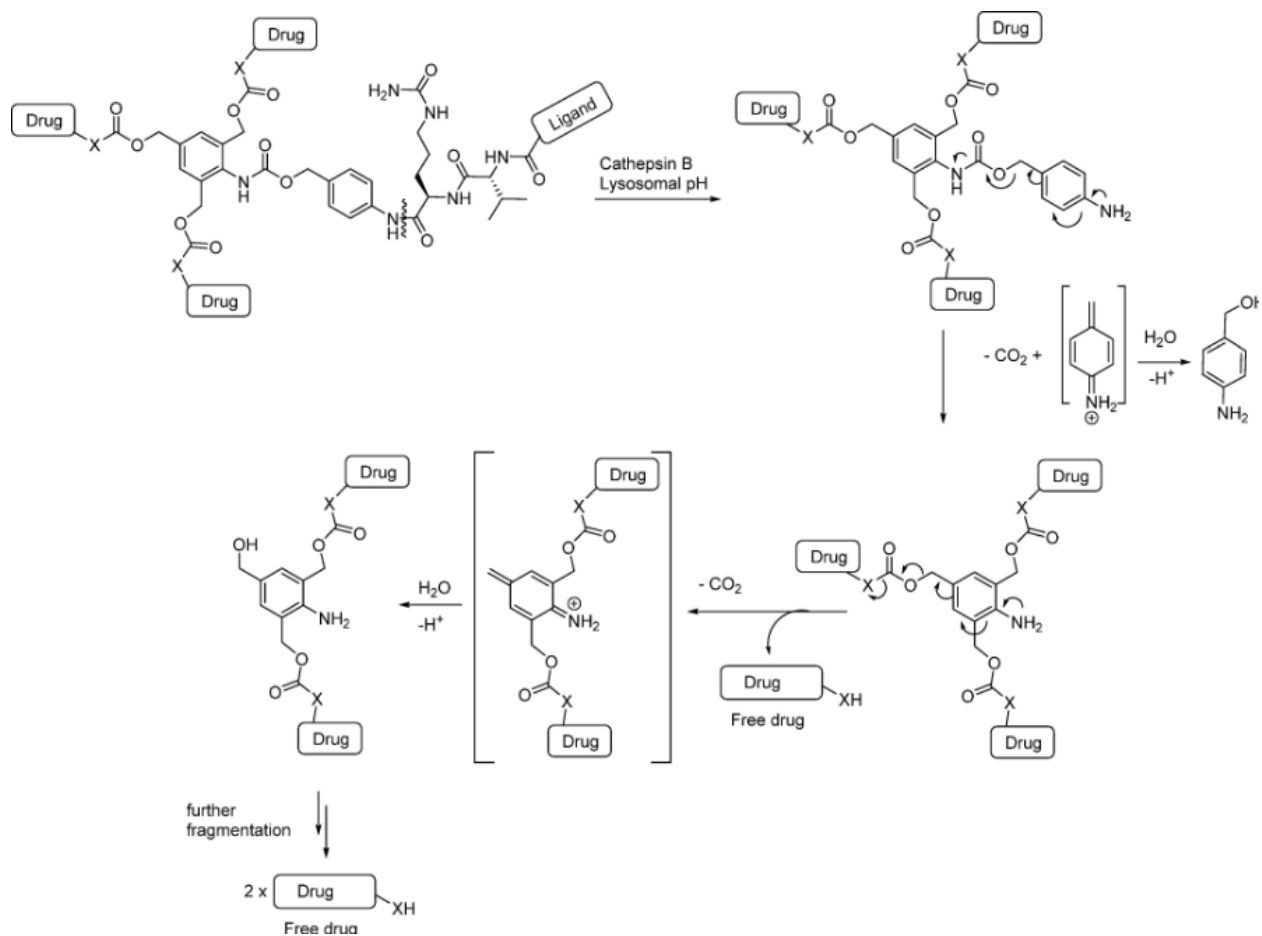


Figure 13 : Un exemple d'un espaceur PABC conjugué à plusieurs molécules thérapeutiques (14)

Ci-haut à la Fig. 13., un exemple d'un espaceur clivable en présence de l'enzyme cathepsine B. Le dipeptide valine-citrulline est couplé à un espaceur auto-clivant *para*-aminobenzoxycarbonyl afin d'augmenter l'efficacité de clivage et de permettre la livraison de plusieurs molécules de principes actifs par un seul ligand de ciblage.

Une autre stratégie est d'utiliser l'enzyme β -glucuronidase qui est surexprimée dans plusieurs cancers.

(90) Encore une fois, l'espaceur β -glucuronide est couplé à une fonction auto-clivante qui relargue le principe actif tel quel.(91)

1.1.7.7 Les espaceurs clivés à l'extérieur de la cellule ou promédicaments (92)

Les principes actifs de petite taille peuvent être conjugués à un espaceur qui sera clivé dans la circulation systémique (à l'extérieur de la cellule) comme démontré à la Fig. 14.

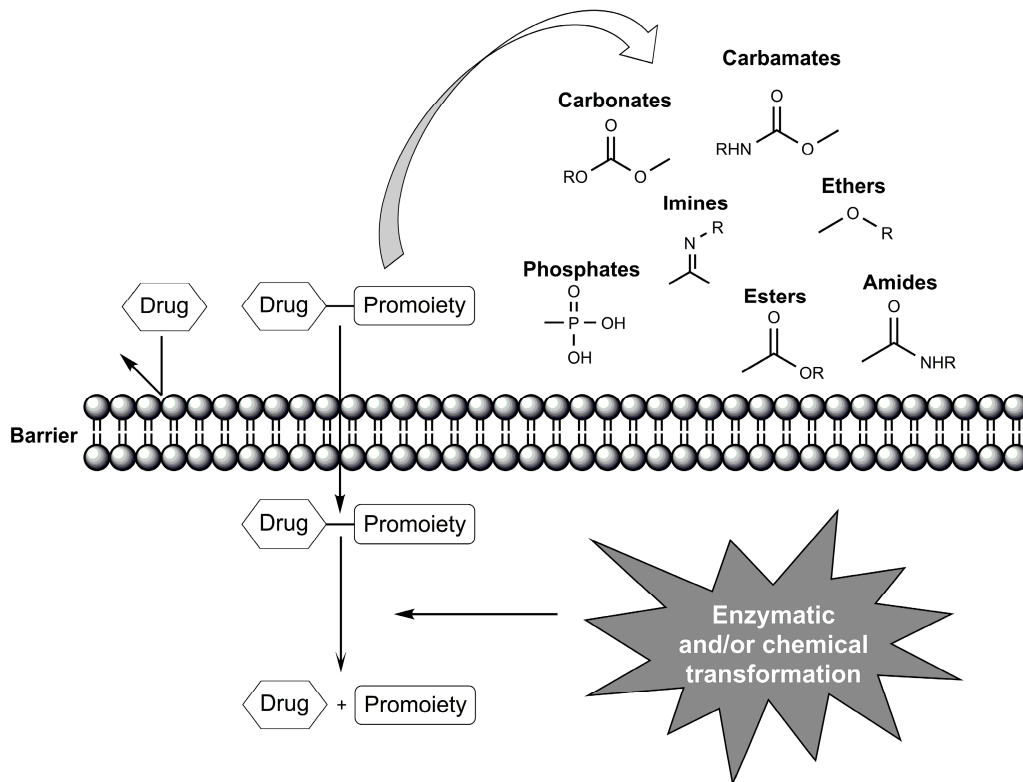


Figure 14 : Bioactivation *in vivo* de promédicaments par une transformation chimique ou enzymatique par Jornada et coll. (92)

Ci-haut à la Fig. 14., un promédicament composé d'un médicament (drug) et d'une fonction permettant d'améliorer ses propriétés biopharmaceutiques (promoiety). Ces fonctions sont habituellement clivables dans la circulation sanguine afin de livrer le principe actif inchangé. On retrouve des fonctions tels que carbonates, carbamates, phosphates, imines, éthers, esters et amides.

On parle alors habituellement de promédicaments. Environ 5 à 7% des médicaments approuvés dans le monde peuvent être classifiés sous la catégorie de promédicaments. (93) Plusieurs groupements du principe actif peuvent être fonctionnalisés afin d'en améliorer les propriétés physicochimiques, biopharmaceutiques ou pharmacocinétiques. Les groupements qu'on peut fonctionnaliser (vert) et les promédicaments obtenus (bleu) apparaissent à la Fig. 15.

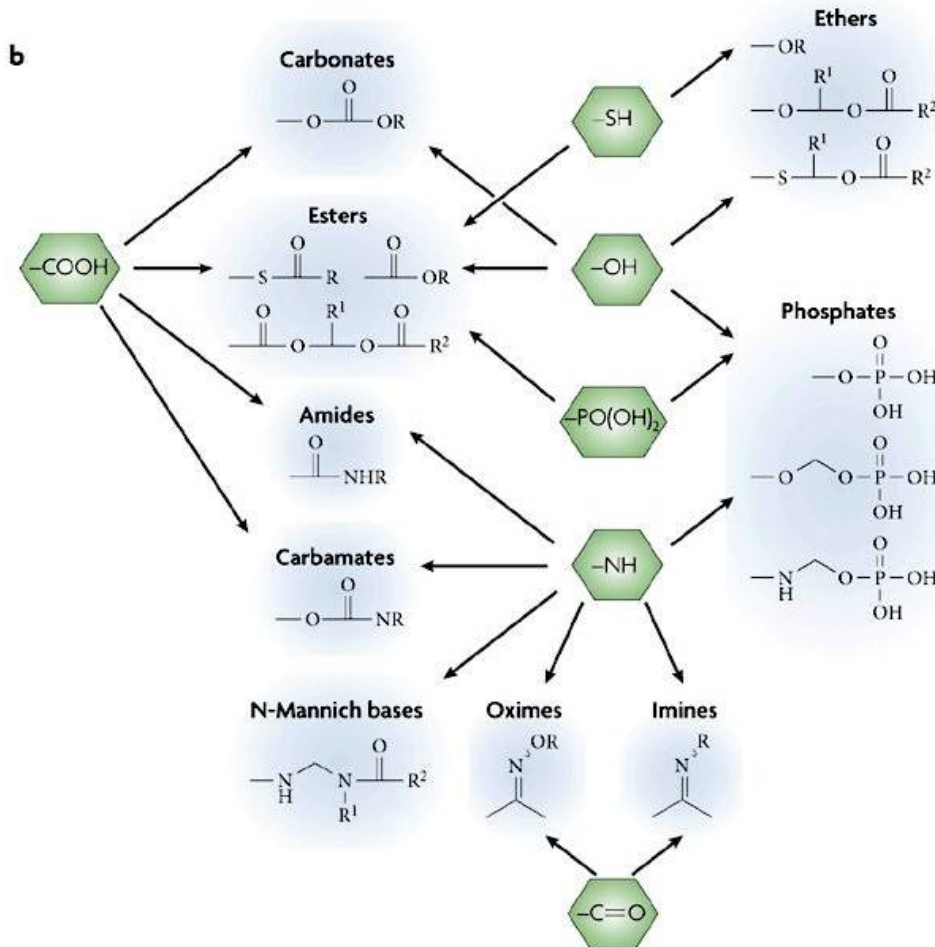


Figure 15 : Résumé des groupements fonctionnalisés (vert) et promédicaments (bleu) par Rautio et coll.(93)

Un promédicament est habituellement une molécule pharmacologiquement inactive. La conjugaison d'une fonction (promoiety) à un principe actif est nécessaire pour traverser certaines barrières ou améliorer les propriétés pharmacocinétiques. La liaison entre la fonction et le principe actif est covalente, mais bioréversible par des groupements qui se dégradent chimiquement ou enzymatiquement. Les groupements qu'on peut fonctionnaliser sont définis en vert, tandis que les liaisons sont définies en bleu.

Les promédicaments existent pour pallier un problème de solubilité aqueuse, d'instabilité chimique, de pauvre perméabilité orale, de métabolisme pré-systémique ou autres. Généralement, on a recours à cette technologie pour améliorer l'absorption orale d'un médicament, mais parfois pour améliorer la solubilité ou le temps de demi-vie d'une formulation injectable.(93) Il n'est pas nécessaire d'avoir un ligand de ciblage pour développer un promédicament.

Les esters sont les fonctions les plus fréquemment utilisées (49% de tous les promédicaments sur le marché). En effet, les esters permettent d'augmenter la lipophilie d'un principe actif soluble dans l'eau. La résultante est qu'en masquant le groupement chargé tels l'acide carboxylique ou le phosphate on augmente la diffusion passive membranaire de la molécule.(94) À noter que cette diffusion passive est toujours limitée par la taille (≤ 500 g/mol).(72) Une fois le promédicament ester dans la circulation systémique, il peut être hydrolysé par des estérases endogènes dans le sang, le foie ou d'autres organes et tissus, incluant les carboxylestérases, les acétylcholinestérases, butyrylcholinestérases, les paraoxonases et les arylestérases.(95) Plusieurs aryls ou alkyl esters sont utilisés en clinique pour les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et les acyloxyalkyl esters pour les antibiotiques β -lactamines. L'utilisation de carbonates ou carbamates peut être avantageuse quand on recherche une liaison plus stable.

Par ailleurs, les esters de phosphate sont utiles pour améliorer la solubilité d'un principe actif en modifiant sa fonction hydroxyle ou amine. Cependant, cette approche dans l'administration orale est plutôt limitée, car les phosphatases intestinales peuvent briser la liaison trop rapidement.(96)

Les fonctions amides sont habituellement trop stables pour faire des promédicaments et sont utilisées principalement pour les conjugués utilisant un transport actif.(97) Enfin, quand il n'y a aucune fonction hydroxyle, amine ou carboxyle on peut modifier les cétones, amidines et guanidines avec des fonctions

oximes. Les oximes sont hydrolysées par le cytochrome P450 et peuvent être utilisées dans l'augmentation de la perméabilité membrane ou l'absorption.(98)

1.2 Biodisponibilité orale

La biodisponibilité orale (F) est la fraction de la dose d'un médicament administré par voie orale qui atteint la circulation systémique sous forme inchangée. Cette circulation systémique est définie par le site de prélèvement, tel qu'un vaisseau sanguin.(99) Afin de déterminer la biodisponibilité orale absolue, on fait habituellement un rapport entre l'aire sous la courbe (AUC) d'une dose administrée par voie orale (po) et l'aire sous la courbe (AUC) d'une dose administrée par voie intraveineuse (iv) tel que démontré dans l'équation 1. L'aire sous la courbe (AUC) représente la concentration plasmatique d'un médicament en fonction du temps.

Équation 1 : Calcul de la biodisponibilité orale absolue (100) :

$$F = \left(\frac{AUC_{po}}{AUC_{iv}} \right) \times \left(\frac{Dose_{iv}}{Dose_{po}} \right) \times 100\%$$

AUC_{po} : représente l'aire sous la courbe d'un médicament administré par voie orale; obtenue lors de dosages plasmatiques en fonction du temps, habituellement en mg·h/L.

AUC_{iv} : représente l'aire sous la courbe d'un médicament administré par voie intraveineuse; obtenue lors de dosages plasmatiques en fonction du temps, habituellement en mg·h/L.

$Dose_{po}$: représente la dose totale administrée par voie orale, habituellement en mg

$Dose_{iv}$: représente la dose totale administrée par voie orale, habituellement en mg

Un médicament administré par voie orale doit traverser plusieurs barrières physiques et biologiques, donc une biodisponibilité orale de 100% est plutôt rare. À cet effet, les médicaments peuvent être classés dans un système de classification biopharmaceutique (BCS) développé par FDA.(101) Les principes actifs sont classés dans quatre classes selon leur perméabilité à travers la barrière intestinale ou leur solubilité. Les médicaments de BCS classe I sont très perméables et très solubles, BCS classe II sont très perméables mais

peu solubles, BCS classe III sont peu perméables mais très solubles et BCS classe IV sont peu perméables et peu solubles.

Il est important de comprendre qu'un comprimé doit tout d'abord se désintégrer, puis le principe actif doit se solubiliser dans le tractus gastrointestinal, ce qui est un facteur limitant pour les principes actifs de classe BCS II et IV. Ensuite, le médicament doit être absorbé à travers la paroi intestinale, ce qui est un défi pour les médicaments de classe BCS III et IV, puis passer par la veine porte à travers le foie, ce qui induit l'effet de premier passage hépatique où le médicament risque une forte métabolisation. Enfin, le principe actif doit résister à la dégradation enzymatique et à la clairance au niveau de la circulation systémique. Ces barrières sont illustrées à la Fig. 16.

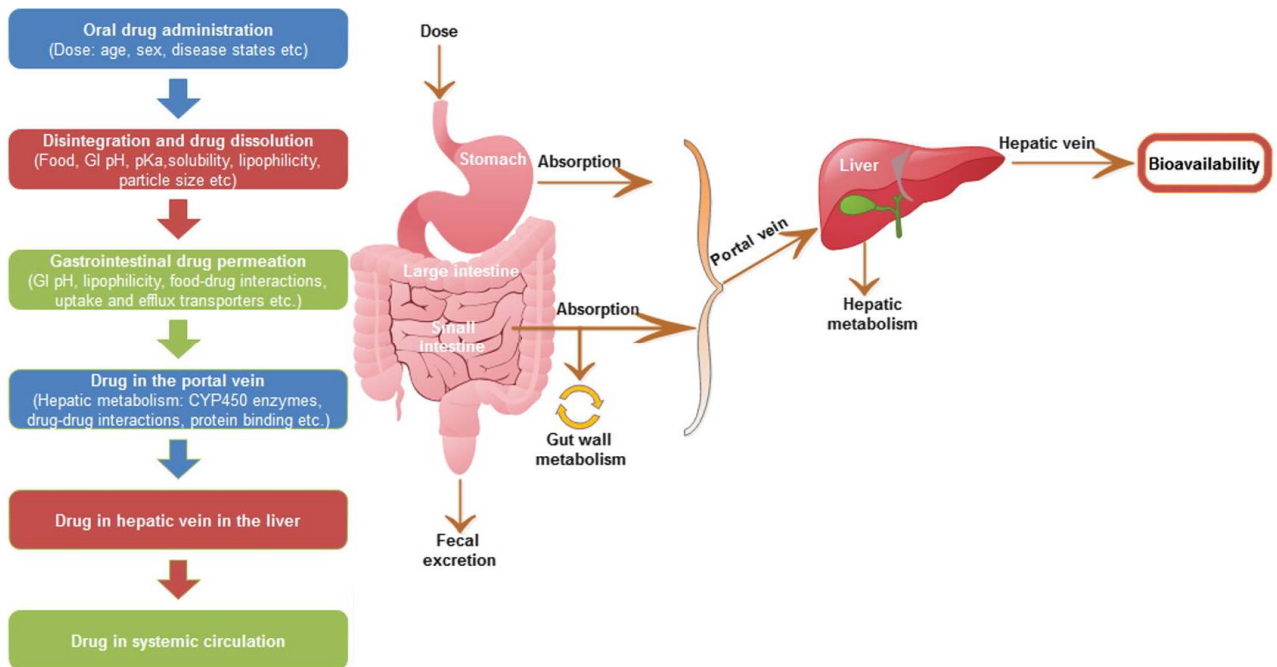


Figure 16 : Schéma du cheminement d'un médicament administré par voie orale par Abuhelwa et coll.

(102)

L'administration d'un médicament par voie orale est sujette à plusieurs barrières avant de se rendre dans la circulation sanguine pour exercer son effet thérapeutique. Tout d'abord, le médicament doit se

désintégrer et le principe actif doit se solubiliser. Ensuite, le principe actif doit traverser la membrane gastrointestinale où il est possible qu'il soit dégradé par des enzymes ou un pH acide par exemple. Le principe actif rejoint alors la veine porte et puis le foie où il peut être métabolisé. Enfin, le principe actif se retrouve dans la circulation systémique.

1.2.1 Biodisponibilité des macromolécules

La biodisponibilité orale de macromolécules ($> 1000 \text{ g/mol}$) est une problématique identifiée depuis presque 100 ans. (103) Les macromolécules sont des molécules de relativement haute masse molaire qui sont composées d'une répétition d'un monomère comme un acide aminé, acide nucléique, etc. Quelques études pilotes ont démontré qu'il était possible d'absorber certaines macromolécules par voie orale tel que la desmopressine (1069 g/mol), le sirolimus (914 g/mol) ou même l'insuline (5733 g/mol). Cette biodisponibilité orale reste faible et très variable : 0.08% et 0.16% pour la desmopressine, 15 à 20% pour le sirolimus et très variable pour l'insuline.(104-106) Ces macromolécules sont donc généralement administrées par voie injectable. La voie injectable est souvent associée à des effets secondaires comme la douleur, l'enflure et l'infection au site d'injection. De plus, certains patients sont très réticents à recevoir un traitement injectable chronique.(107) En particulier, cette réticence entraîne les patients diabétiques et leurs cliniciens à tarder à initier un traitement d'insuline, même si nécessaire, ce qui entraîne une diminution de l'espérance de vie.(107-109)

1.2.2 Perméabilité

La perméabilité est par définition le débit (quantité qui traverse une surface donnée par unité de temps) de molécules qui traversent une membrane biologique tel que démontré dans l'équation 2.(110) Un principe actif doit être perméable à travers les cellules intestinales si son effet thérapeutique est au niveau systémique. La grande majorité des principes actifs actuellement disponibles sont plutôt hydrophobes, ce qui facilite leur passage à travers la bicouche de phospholipides composant les membranes cellulaires.

Équation 2 : Calcul de la perméabilité apparente ($P_{app} : \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)(111)

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt}\right) \times \left(\frac{1}{AC_0}\right)$$

dQ/dt : est le flux de molécule d'intérêt en régime permanent ($dpm\ s^{-1}$ or $mmol\ s^{-1}$),

A : est l'aire de surface du filtre (cm^2) dans un système de supports perméables Transwell®

C_0 : est la concentration initiale dans la chambre donneur (μM) dans un système de supports perméables Transwell®

1.2.3 Absorption intestinale

Il existe plusieurs mécanismes d'absorption intestinale tel que démontré à la Fig. 17, qui sont détaillés dans les sections suivantes.

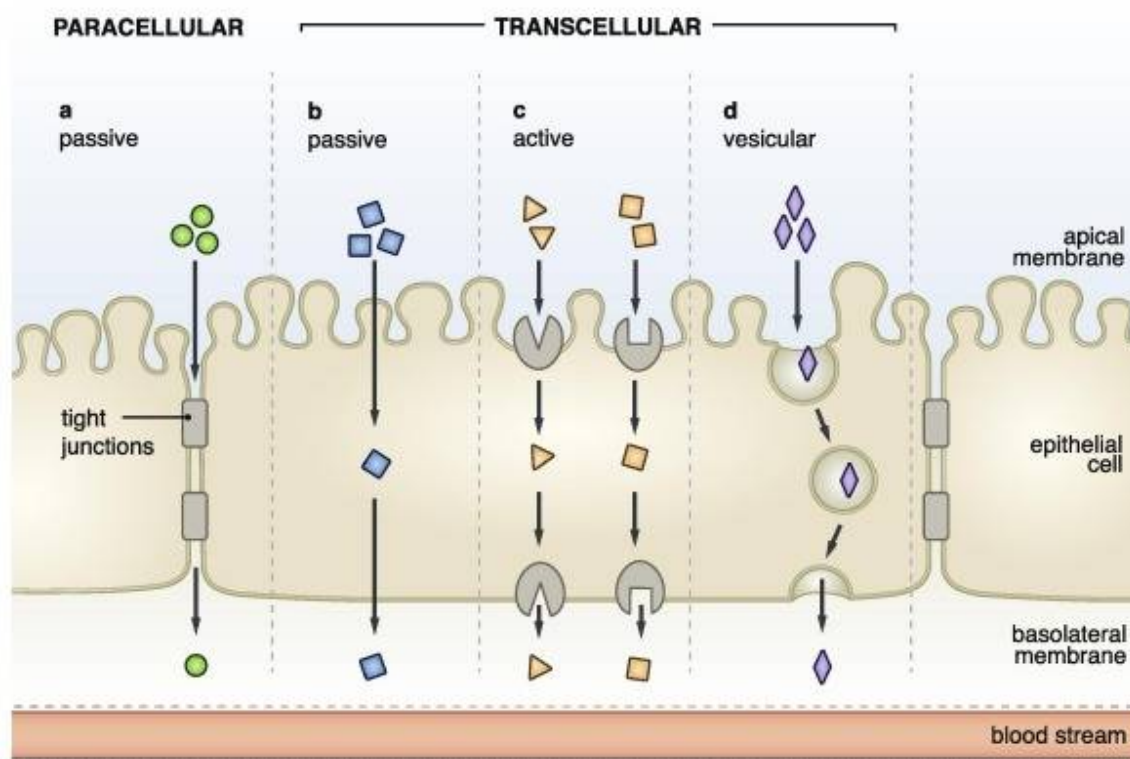


Figure 17 : Mécanismes d'absorption intestinale par Räder et al. (112)

Le composé doit traverser la membrane bordure en brosse de l'intestin du côté apical au côté basolatéral des cellules épithéliales. Deux chemins sont habituellement empruntés (a) la voie paracellulaire à travers les jonctions serrées ou la voie transcellulaire à travers les cellules. Pour la voie

transcellulaire, plusieurs mécanismes sont connus tels que (b) la diffusion passive, (c) le transport actif et (d) l'absorption vésiculaire.

1.2.3.1 Diffusion passive

La diffusion passive est la voie la plus communément empruntée par les médicaments administrés par voie orale. Le principe actif passe à travers la bicouche lipidique et son absorption dépend seulement du gradient de concentration entre le côté apical (lumière intestinale) et le côté basolatéral (circulation systémique), suivant la loi de Fick. (113) Il a été estimé que 95% des médicaments oraux actuellement sur le marché sont absorbés par la voie de diffusion passive. (114)

1.2.3.2 Transport actif

Une molécule ayant une affinité avec une protéine transmembranaire peut être internalisée suite à la liaison avec ce récepteur, par un phénomène de transport actif. Ce transport est dit actif, car il nécessite l'utilisation d'énergie (ATP) pour transporter la molécule du côté apical vers le côté basolatéral. Le récepteur peut favoriser l'influx autant que l'efflux cellulaire, ce qui peut diminuer l'absorption du médicament, comme c'est le cas de la glycoprotéine P (P-gP) qui est responsable de l'efflux de nombreux principes actifs. Enfin, les protéines transmembranaires ne peuvent transporter que des molécules de petite taille (< 400 g/mol).

1.2.3.3 Transport vésiculaire ou endocytose

L'endocytose est un mécanisme par lequel une partie de la membrane cellulaire se déforme pour former une vésicule autour du matériel exogène et le fait pénétrer de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Les trois processus d'endocytose les mieux connus sont l'endocytose médiée par un récepteur, la pinocytose et la phagocytose, et peuvent mener à une transcytose du médicament tel que démontré à la Fig. 18.(115) Cependant, il existe de nombreux autres processus d'endocytose tels que démontré dans le tableau 1.1. (116) Les mécanismes mieux connus sont l'endocytose médiée par les clathrines et l'endocytose médiée par les cavéoles.

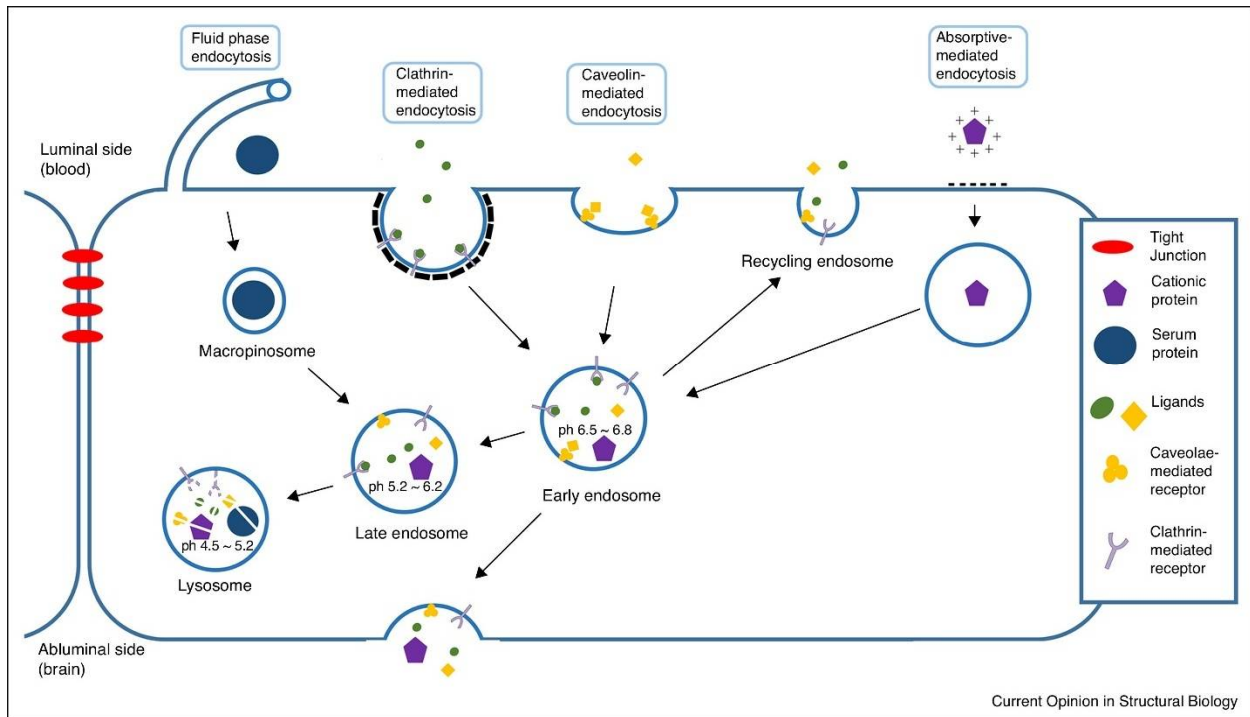


Figure 18 : Mécanismes d'endocytose par Goulatis et coll.(115)

Chemins d'endocytose et transcytose endogènes. L'endocytose en phase fluide implique la formation de grandes vésicules qui internalisent du fluide extracellulaire et des protéines solubles. L'endocytose absorptive est initiée par des interactions non spécifiques de molécules cationiques à la membrane plasmique chargée négativement et le passage endosomal vers la dégradation ou la transcytose. L'endocytose clathrine médiée implique la formation de complexes de clathrine et de protéines adaptatrices qui produisent des vésicules clathrines. Ces vésicules se transforment en endosome précoce, où le cargo peut être recyclé, dégradé ou subir une transcytose. L'endocytose cavéoles médiée commence par la formation de vésicules qui sont structurellement et fonctionnellement différentes de vésicules clathrines, suivi par la livraison du récepteur-ligand vers l'endosome précoce et puis possiblement vers la transcytose.

Tableau 1.1 : Mécanismes d'endocytose par Doherty et coll.(116)

Endocytic mechanisms	Morphology	Implicated cargoes ^b	Small G-protein dependence	Dynamin implicated?	Other proteins implicated
Clathrin mediated	Vesicular	RTKs, GPCRs, transferrin receptor, anthrax toxin	Rab5, Arf6 implicated	Well established	Clathrin, AP2, epsin, SNX9, synaptojanin, actin amphiphysin, plus many others
Caveolae-/caveolin1-dependent	Vesicular/tubulovesicular	CTxB, SV40, GPI-linked proteins	Unclear (caveolins may regulate cdc42 activity)	Some evidence	Caveolins, PTRF, src, PKC, actin (many signaling proteins localize to these sites)
CLIC/GEEC	Tubular/ring like	Fluid phase markers, CTxB, GPI-linked proteins	Cdc42, Arf1	Not as yet	ARHGAP10, actin, GRAF1, other GRAFs
IL2Rβ pathway	Vesicular?	IL2R β , FC ϵ RI, Kir3.4, γ c-cytokine receptor	RhoA, Rac1	Implicated	PAK1, PAK2
Arf6 dependent	Vesicular/tubular	MHC class I proteins, CD59, carboxypeptidase E	Arf6	Not as yet	Unclear as yet
Flotillin dependent	Vesicular	CTxB, CD59, proteoglycans	Unclear	Implicated but unclear	Flotillin 1 and 2
Phagocytosis	Cargo shaped	Pathogens, apoptotic remnants	Arf6/cdc42/rac1/rhoA (depending on type)	Implicated	Actin, IQGAP1, amphiphysin1, Rho kinase, adhesion proteins
Macropinocytosis	Highly ruffled	Fluid phase markers, RTKs	Rac1	Not as yet (CtBP1/BARS implicated in scission)	Actin, PAK1, PI3K, Ras, Src, HDAC6
Circular dorsal ruffles	Highly ruffled	Fluid phase markers, RTKs	Unclear	Implicated	Cortactin, actin
Entosis	Cell shaped	Matrix-deligated cells	RhoA	Not as yet	Adherens junctions

^aSee the text for references.

^bAbbreviations: CLIC, clathrin-independent carrier; GEEC, GPI-AP enriched early endosomal compartment; GPCRs, G protein-coupled receptors; GPI, glycosylphosphatidylinositol; MHC, major histocompatibility complex; RTK, receptor tyrosine kinase.

1.2.3.4 Transport paracellulaire

Certaines molécules sont capables de traverser les jonctions serrées entre les cellules intestinales. En effet, les petites molécules (< 200 Da) hydrophiles et chargées peuvent emprunter cette voie. (113) Les jonctions serrées sont des structures épithéliales qui forment un sceau entre deux cellules. Il est possible de modifier l'étanchéité de ces structures en utilisant des activateurs de perméation tel que discuté dans la section « activateurs de perméation » section 1.2.6.2.

1.2.4 Évaluation de la perméabilité des médicaments

Afin de prédire la perméabilité intestinale, Lipinski a développé 5 règles pour éliminer les molécules potentiellement faiblement perméables (et donc peu biodisponibles par voie orale).(72)

1. Masse molaire > 500 g/mol
2. Plus de 5 groupements donneurs d'hydrogène (somme des OH et NH)
3. Plus de 10 groupements accepteurs d'hydrogène (somme des O et N)
4. Log P > 5
5. Les substrats de transporteurs sont exclus de ces règles.

Les molécules respectant l'ensemble de ces règles ont plus de chance de traverser la membrane cellulaire par diffusion passive.

Par la suite, il est possible de déterminer la perméabilité en ayant recourt à des tests de perméabilité PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) ou monocouche cellulaire. L'essai PAMPA consiste à évaluer la perméabilité à travers une membrane artificielle imbibée de lipides.(117) Ce test corrèle beaucoup avec la balance hydrophile/lipophile d'un principe actif (log P) et est utile pour déterminer la diffusion passive. Les tests utilisant des monocouches cellulaires telle qu'une monocouche de cellules intestinales Caco-2 ou T84 permettent d'obtenir plus d'informations que les tests PAMPA. En effet, ils permettent d'étudier les phénomènes de transport actif, d'endocytose, de perméabilité paracellulaire à travers les jonctions serrées, d'excrétion par les P-GPs, etc.(111)

1.2.5 Barrières à l'absorption intestinale

Les macromolécules ont une pauvre biodisponibilité orale à cause de plusieurs barrières dans le tractus gastro-intestinal démontré dans la Fig. 19.

- ① Acidité et enzymes
- ② Mucus
- ③ Jonctions serrées
- ④ Pompes à efflux
- ⑤ Dégradation endosomale
- ⑥ Élimination systémique
Dégradation hépatique
- ⑦ Immunogénicité

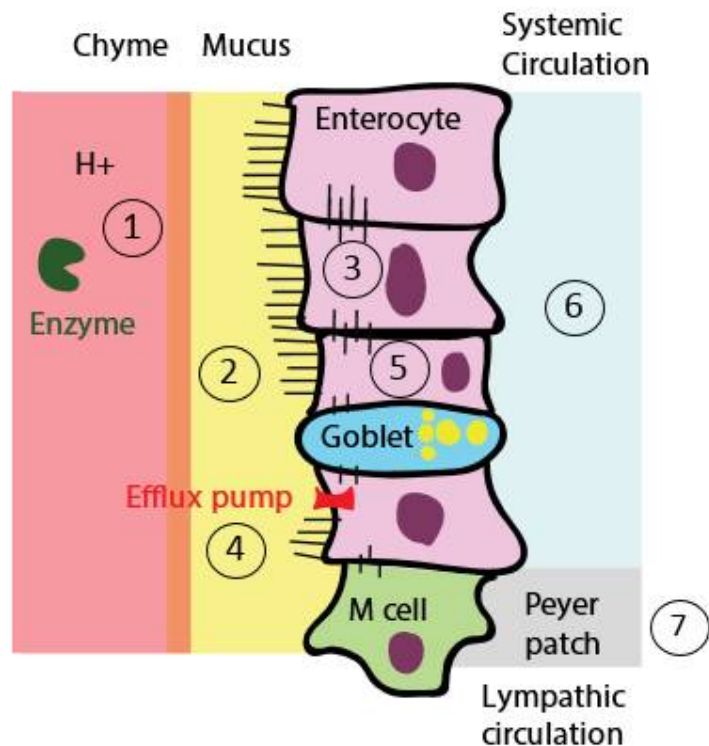


Figure 19 : Barrières à la biodisponibilité orale adaptées de Malhaire et coll.(118)

(1) L'environnement acide de l'estomac et la présence d'enzymes gastriques et intestinales peuvent dégrader la molécule avant qu'elle se rende aux entérocytes.

(2) Les composés de masse molaire élevée peuvent être pris dans le mucus épais de la paroi intestinale ou le glycocalyx produit par les entérocytes bien différenciés

(3) Les jonctions serrées des entérocytes limitent la transcytose paracellulaire.

(4-5) Un composé de petite masse molaire ayant une bonne perméabilité passive peut quand même être excrété hors de la cellule par un système de pompe à efflux. Par ailleurs, si le mécanisme d'internalisation passe par un processus d'endocytose, il se peut que le médicament soit dégradé dans l'endosome ou le lysosome.

(6) Enfin, une fois rentré dans la circulation systémique, il est possible que le médicament soit dégradé par le foie ou l'environnement plasmatique.

(7) Une réponse immunogène peut favoriser l'élimination des composés de plus grande masse molaire.

1.2.6 Stratégies d'amélioration de la biodisponibilité orale sans modification du principe actif

Quelques solutions à une pauvre biodisponibilité orale sont proposées dans la Fig. 20.

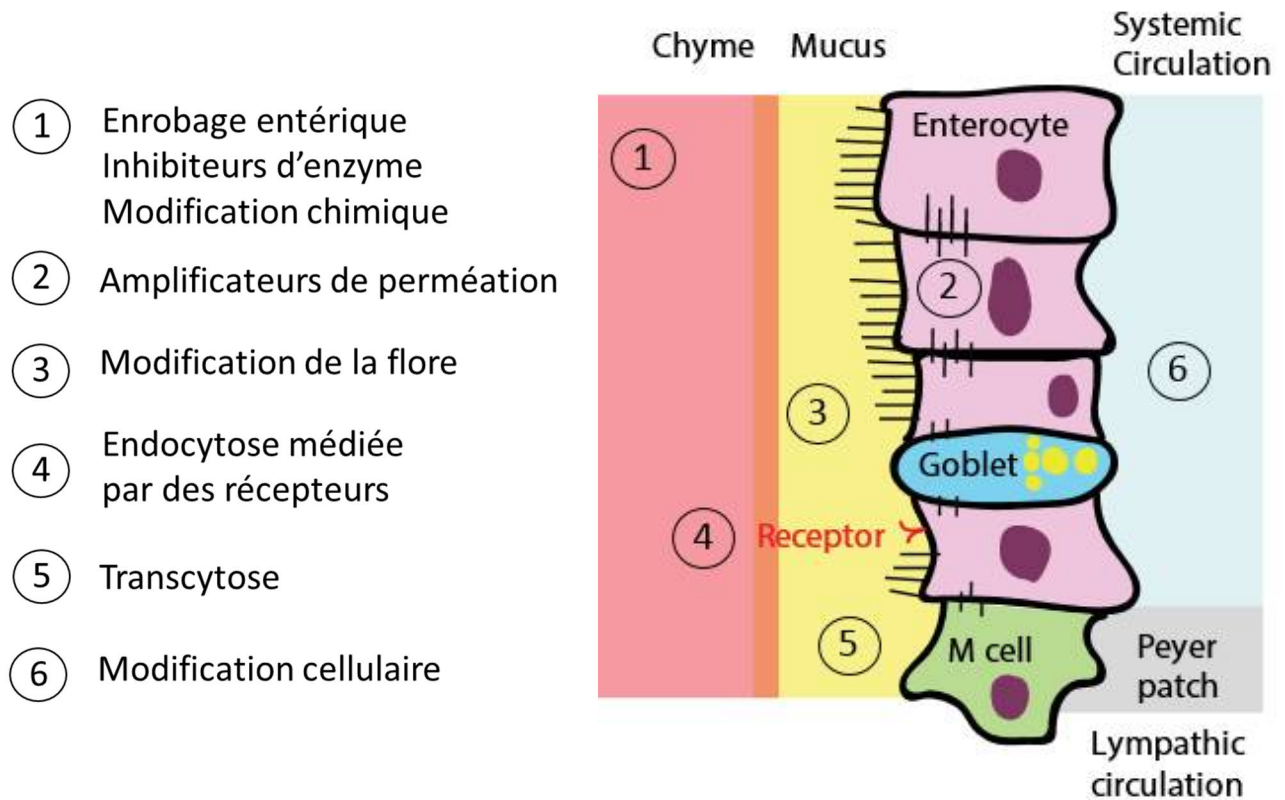


Figure 20 : Solutions aux problèmes de disponibilité orale adaptées de Malhaire et coll. (118)

Les solutions seront détaillées dans les sections ci-dessous.

1.2.6.1 Enrobage entérique, inhibiteurs d'enzymes et modification chimique

L'enrobage entérique permet de protéger le principe actif de l'acidité gastrique, s'il présente une instabilité dans ce milieu. Ces enrobages permettent la libération ciblée du médicament dans un environnement plus alcalin, donc dans la région intestinale. Il est aussi possible d'ajouter dans la formulation des inhibiteurs enzymatiques tels que les inhibiteurs de protéases, qui empêchent la dégradation enzymatique. Enfin, le principe actif peut être modifié chimiquement sur un site fragile pour augmenter sa stabilité gastrique.

1.2.6.2 Activateurs de perméation (permeation enhancers)

Les activateurs de perméation sont des molécules qui peuvent augmenter la perméabilité de certains principes actifs peu perméables. Habituellement, ces activateurs sont des molécules comme les cyclodextrines, les surfactants, les acides gras, les détergents stéroïdiens, les chitosans, les polymères muco-adhésifs et les toxines *Zonula occludens*.(119-121) La majorité de ces agents ont un effet sur les jonctions serrées, qu'ils ouvrent de façon transitoire et réversible. L'ouverture maximale d'une jonction serrée qu'on peut obtenir avec ces composés est d'environ 20 nm.(122) Cependant, puisque ces activateurs augmentent l'absorption sans contrôler le type de composé absorbé, la toxicité à moyen ou long terme reste à évaluer.(120) Une compagnie pharmaceutique (Oramed®) est présentement en phase IIb pour l'administration d'insuline par voie orale en utilisant une formulation combinant l'enrobage entérique, les inhibiteurs enzymatiques et les activateurs de perméation.(103) Aussi, la compagnie Diabetology® a développé un produit utilisant une approche similaire. Cette compagnie a démontré une diminution significative de l'hypoglycémie, mais une relation dose-réponse n'a pu être établie et l'effet de la nourriture reste à élucider.(123)

1.2.6.3 Flore intestinale

Certains auteurs ont produit des probiotiques (par exemple, des lactobacilles) génétiquement modifiés qui produisent une protéine d'intérêt.(124) Ils ont démontré une biodisponibilité orale plus élevée en utilisant leur souche probiotique par rapport à une solution de la protéine. Dans une autre optique, la compagnie EnGene® modifie les cellules intestinales en délivrant du matériel génétique. Les cellules intestinales modifiées produisent par la suite une protéine d'intérêt telle la cytokine anti-inflammatoire IL-10 pour le traitement de la colite ulcéreuse.(125)

1.2.6.4 Transcytose à travers les cellules M

Un phénomène plutôt bien documenté est le passage de nanoparticules à travers les cellules Microfold (M cells) retrouvées au niveau de la muqueuse intestinale.(122, 126) Ces cellules jouent un grand rôle au niveau de l'immunité et sont spécialisées dans l'endocytose d'antigènes ou de microorganismes.(127) Le

phénomène de transcytose est beaucoup plus puissant dans ces cellules comparativement aux entérocytes. En effet, la présence d'une couche épaisse de glycocalyx peut empêcher la transcytose des nanoparticules à travers les entérocytes. Les cellules M n'ont pas ce glycocalyx épais due à une différence structurale.(128) Malheureusement, une cellule sur 10 millions est une cellule M dans l'épithélium intestinal, donc la capacité d'internalisation est limitée par rapport aux entérocytes.(129)

1.2.7 Stratégies d'amélioration de la biodisponibilité orale – approche endocytose médié

Une autre technique est d'exploiter l'endocytose médiée par les récepteurs illustrée par le point (d) à la figure 17.(130) Cette endocytose se produit quand un ligand ou un complexe se greffe à un récepteur. L'internalisation peut être médiée par un mécanisme dépendant ou indépendant de la clathrine. C'est un processus physiologiquement utile pour l'absorption de substances exogènes. Les récepteurs qui permettent l'internalisation dans les entérocytes sont les récepteurs qui reconnaissent les multivitamines (vitamine B12, acide folique), le galactose, le mannose, le hyaluronate (CD44), le Fc néonatal, la transferrine, les lectines ou autres. (130) Ces ligands ont été conjugués à des principes actifs ou à des particules pour améliorer l'absorption intestinale. Les ligands nutritionnels tels que les vitamines sont caractérisées par une excellente innocuité, stabilité et facilité de conjugaison. Par contre, le transport de vitamine B12 est facilement saturable, surtout chez certains patients qui doivent utiliser un supplément de B12 pour des raisons de santé.(131) Il est en de même pour les récepteurs à la vitamine C.(132)

1.2.7.1 Récepteur Fc néonatal (FcRn)

Le récepteur Fc néonatal (FcRn) est responsable du transport d'immunoglobuline G (IgG) à travers les barrières épithéliales polarisées tel que démontré dans la Fig. 21.(133) Ce récepteur a été découvert après la détection des IgGs du lait maternel dans la circulation sanguine de l'enfant.(134) Les adultes possèdent également le récepteur FcRn.(135) Des protéines fusions de la FSH (follicule stimulating hormone) conjugué avec un fragment Fc et des nanoparticules de PEG-PLA décoré avec des fragments Fc ont démontré une biodisponibilité orale améliorée suite à leur administration dans un modèle de rat et

souris, respectivement. (133, 136) Cependant, l'impact clinique d'une telle approche reste à démontrer, en particulier si l'abondance du FcRn et son efficacité permettent d'avoir un impact thérapeutique. (137)

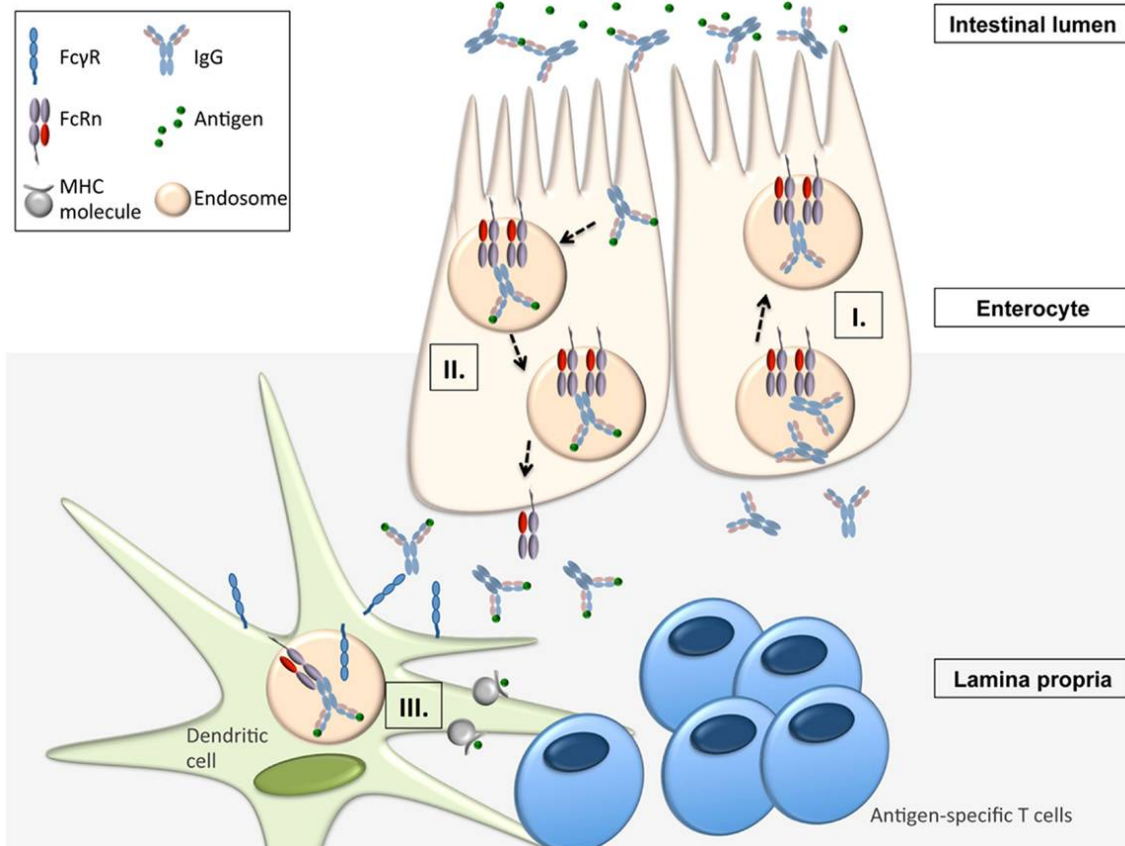


Figure 21 : Transport des IgG à travers le récepteur FcRn (II.) par Rath et coll. (138)

Le récepteur FcRn exerce des fonctions de surveillance du système immunitaire et de l'homéostasie au niveau des cellules intestinales épithéliales. (I.) Le FcRn dans les entérocytes peut transporter des IgGs de la circulation systémique vers la lumière intestinale. (II.) Suite à la formation de complexes immunitaires (ICs) consistants de bactéries et d'IgG anti-bactéries au niveau de la lumière intestinale, le FcRn peut transcytoser ces composés vers la lamina propria. Dans la lamina propria, les ICs sont livrés vers des cellules présentatrices d'antigène (III.).

1.2.7.2 Récepteur de la transferrine (TfR) et vitamine B12

Certains auteurs ont évalué l'utilisation de la transferrine comme ligand potentiel. La transferrine est une glycoprotéine de 76 kDa transportant le fer qui reconnaît le récepteur de la transferrine (TfR), présent sur de nombreuses cellules épithéliales et endothéliales.(139) Récemment, une protéine de fusion de l'hormone de croissance conjuguée à la transferrine a démontré un effet thérapeutique (prise de poids) après administration orale dans un modèle de rat.(140, 141) Le désavantage du récepteur à la transferrine est qu'il se recycle lentement et atteint facilement la saturation.(142) Néanmoins, ce récepteur est aussi présent au niveau de la barrière hémato-encéphalique ce qui peut en faire un bon candidat pour améliorer la perméabilité à travers cette barrière.(143)

1.2.7.3 Ciblage des cellules accessoires – non entérocytes

Les cellules M possèdent des récepteurs sur la surface tel (ICAM)-1, L-fucose, β 1 intégrine et glycoprotéine 2.(129, 144) Les lectines sont des structures de protéines ou glycoprotéines d'origine végétale qui peuvent se lier à des résidus carbohydrates de protéines ou lipides sur la surface cellulaire, plus particulièrement à la surface des cellules M. Notamment, des liposomes d'insuline présentaient une biodisponibilité orale plus élevée lorsque la lectine du blé (wheat germ agglutinin - WGA) était greffée à leur surface.(145) Aussi, l'agglutinine d'*Ulex europaeus* 1(UEA1) a permis de cibler des liposomes vers les cellules M.(146)

1.2.8 Stratégies d'amélioration de la biodisponibilité orale – approches transport actif

L'utilisation de transporteurs actifs est une approche qui est couramment utilisée pour les petites molécules tel que démontré dans la Fig. 22. Les transporteurs de petits peptides tel PEPT1 ou PEPT2 permettent de transporter des molécules ressemblant à des di ou tripeptides.(147) Par exemple, en ajoutant l'acide aminé valine sur le valacyclovir ou le valganciclovir, la perméabilité intestinale a été significativement augmentée.(148) Par ailleurs, Luo *et al.* ont exploré l'utilisation du transporteur de la vitamine C (SVCT) pour augmenter l'absorption orale du saquinavir.(149) Plus récemment, la famille des

transporteurs de polypeptides organiques anioniques (OATP) ont été exploités car ils présentent une sélectivité plus large que les PEPT1.(150)

Enfin, il est intéressant de noter que l'acide folique est internalisé par un transport actif au niveau intestinale. Un récepteur différent permet l'endocytose de l'acide folique au niveau des cellules cancéreuses.(151, 152)

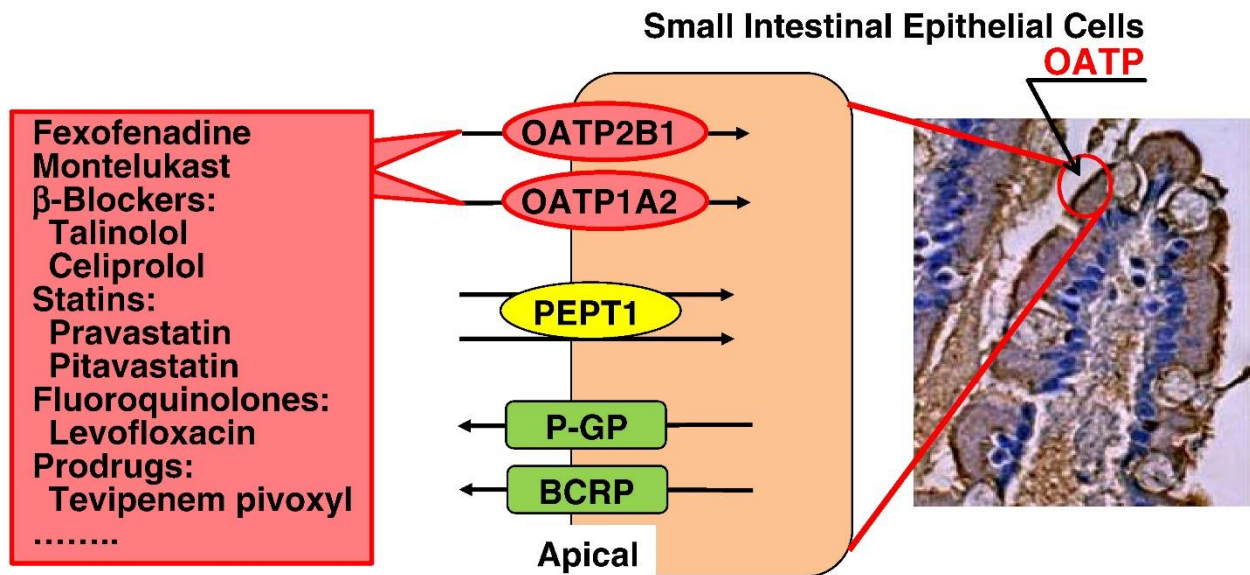


Figure 22 : Transport actif de médicaments par les transporteurs OATP par Tamai (150)

1.2.9 Stratégies d'amélioration de la biodisponibilité orale – peptides de pénétration cellulaire (CPPs)

On recense un nombre important de peptides, naturels ou synthétiques, permettant à des biomolécules de traverser la membrane plasmique cellulaire.(153) Le premier peptide documenté est celui du virus d'immunodéficiência humaine : Tat.(154, 155) Ces peptides de pénétration cellulaire (CPPs) peuvent être cationiques ou amphipathiques et d'origine naturelle, synthétique ou chimérique. Les CPPs sont relativement courts (< 30 acides aminés) et typiquement riches en arginine ou lysine, ce qui permet l'interaction électrostatique avec les composantes chargées négativement de la surface cellulaire, comme les glycosaminoglycanes ou les acides sialiques.(156) De plus, ces peptides ont habituellement un acide

aminé de type hydrophobe comme tryptophane afin de faciliter la translocation à travers une membrane lipidique.(157) Le concept des CPPs est démontré dans la Fig. 23.

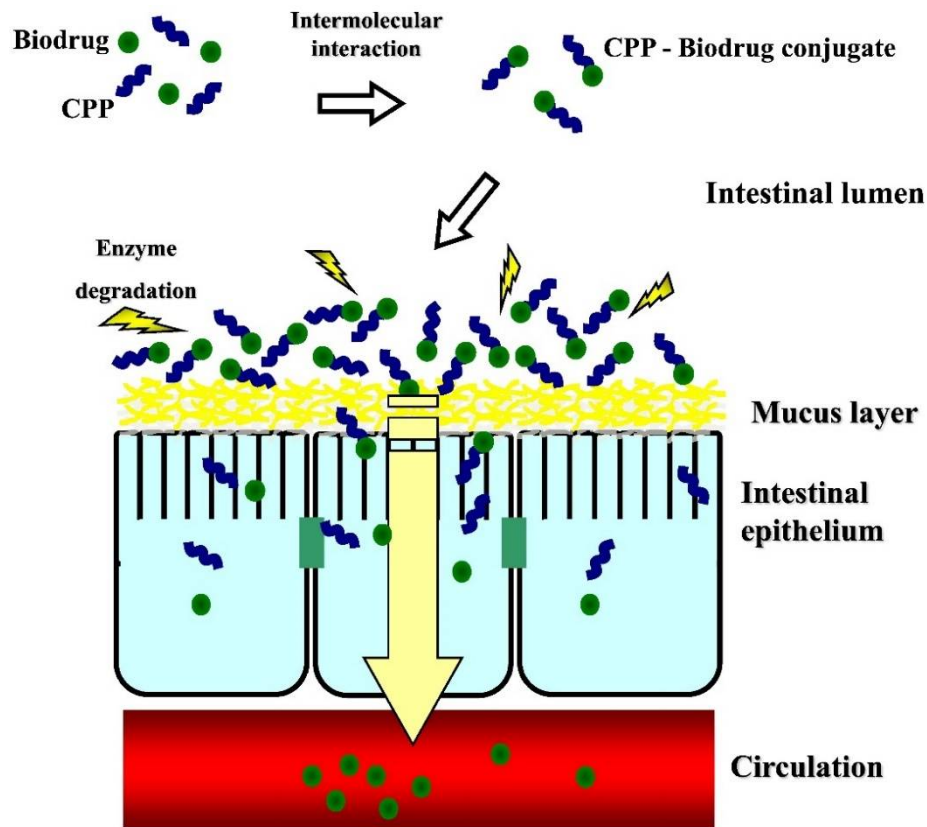


Figure 23 : Utilisation de conjugués avec des peptides de pénétration cellulaire par Khafagy et coll. (153)

Dans l'illustration de la Fig. 23., un principe actif (Biodrug) est mélangé avec des peptides de pénétration cellulaire (CPPs). Des liaisons intermoléculaires se forment entre le Biodrug et le CPP majoritairement par des interactions électrostatiques. Ces composés sont ensuite internalisés en entier au niveau de l'épithélium intestinale dans les entérocytes. Enfin, le mélange Biodrug CPP se défait et le principe actif peut rejoindre la circulation systémique.

On peut conjuguer un principe actif peu perméable avec un CPP (158) ou simplement les mélanger physiquement (159). La conjugaison covalente peut modifier le cargo thérapeutique et l'affinité du peptide, (160) tandis que la coadministration du CPP produit un mélange peu défini, résultant des interactions électrostatiques et hydrophobes entre le cargo thérapeutique et le médicament.(161) Néanmoins, une étude évaluant la coadministration de polypeptides d'arginine (R6, R8, R10) avec l'insuline a démontré une meilleure biodisponibilité orale de cette dernière, surtout dans le cas de R6, sur un modèle d'absorption intestinal *in situ* chez les rats.(159) De plus, Kamei et coll. ont coadministré

l'insuline avec 10 peptides différents dont R8, R12, Tat, Rev, Penetratine, pVEC, Erns, RRL hélice et PRL4.(162) Le mélange d'insuline de CPP a souvent causé de l'agrégation, mais les auteurs ont quand même trouvé une perméabilité supérieure pour trois des peptides administrés : Penetratine, pVec et RRL.(162)

La penetratine est un peptide dérivé d'une homéoprotéine qui provient de *Drosophila*. En combinant la penetratine avec une séquence de sécrétion (Sec), il est possible d'améliorer la transcytose de nanoparticules.(163) PenetraMax est un analogue de la séquence de la penetratine et le dérivé le plus efficace.(164) L'innocuité de PenetraMax a été démontrée dans un modèle murin après un traitement nasal journalier pendant 30 jours consécutifs.(164)

De nombreux exemples illustrent la stratégie de conjugaison d'une macromolécule avec un CPP. Une protéine de fusion β -galactosidase avec Tat a été administrée par injection intrapéritonéale chez la souris et a démontré une efficacité biologique de la β -galactosidase dans tous les tissus incluant le cerveau.(165) De plus, l'insuline conjuguée par des liens covalents à Tat a démontré une meilleure transcytose à travers des cellules Caco-2.(158)

Par ailleurs, le tripeptide RGD se lie à la β_1 intégrine de la surface apicale des cellules M, permettant le ciblage de ces cellules.(166) CSK9, un peptide découvert par *Phage display*, a augmenté le transport de nanoparticules lorsque greffé sur celles-ci. (167) Les cellules gobelets peuvent être ciblées par le peptide CSKSSDYQC (CSK). Des nanoparticules encapsulant l'insuline modifiées avec le peptide CSK ont démontré une perméabilité supérieure comparativement à des nanoparticules non modifiées sur un modèle *in situ* de rat.(168) Enfin, les cellules dendritiques (cellules présentatrices d'antigènes) peuvent être ciblées grâce aux récepteurs à leur surface : récepteurs Toll-like (TLRs), Fc, lectines type C.(169) Les DC-pep découverts par *Phage display* sont des peptides qui ciblent les cellules dendritiques qui peuvent stimuler l'immunité.(170)

1.3 Toxines

1.3.1 Toxines AB₅

Les toxines de la famille AB₅ tuent plus d'un million de personnes par année. Elles sont secrétées par des bactéries pathogènes comme *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae* et certains types d'*Escherichia coli*. Les toxines AB₅, telles que la toxine de pertussis (PTx), la toxine du choléra (Ctx), la toxine du Shiga (Stx) et les entérotoxines (LT) sont composées de deux sous-unités distinctes: la sous-unité A responsable de la toxicité, et la sous-unité B pentamérique reconnaissant les glycanes à la surface de la cellule.(171) Leur parcours cellulaire est démontré dans la Fig. 24. Brièvement, les toxines AB₅ reconnaissent leur récepteur glycané à la surface cellulaire et sont internalisées dans l'endosome précoce (EE). Par la suite, ces toxines sont dirigées vers le Golgi puis le réticulum endoplasmique. Ensuite, la sous-unité A (toxique) se détache de la sous-unité pentamérique B. Enfin, la sous-unité A est exportée du réticulum endoplasmique et peut exercer son effet toxique sur les différentes cibles selon la nature de la toxine. (171)

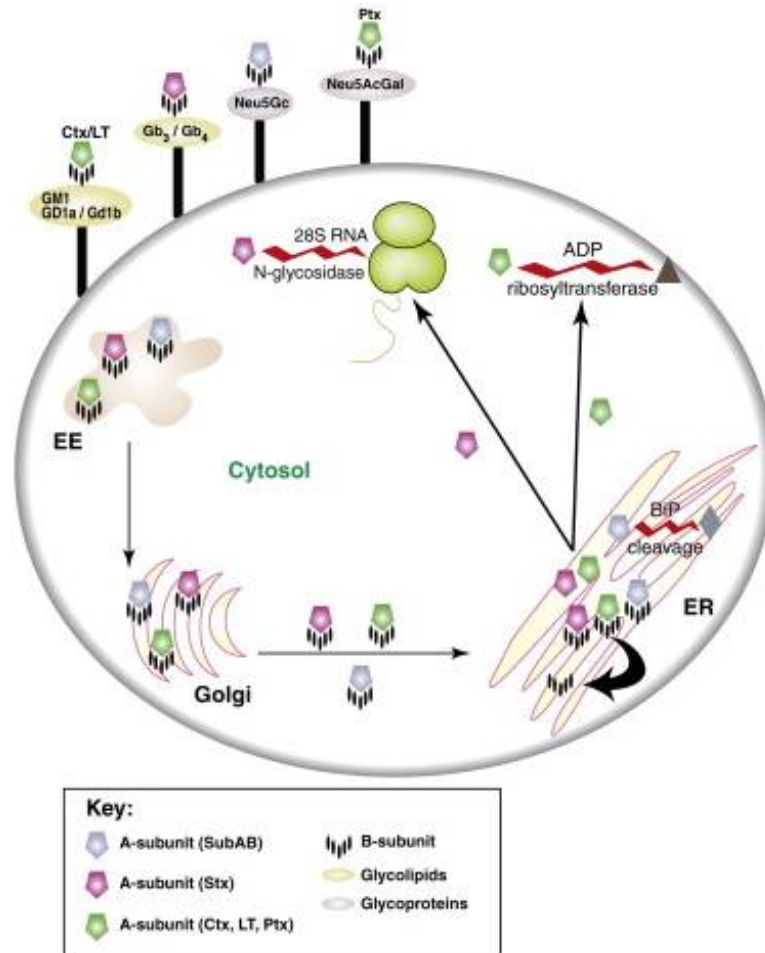


Figure 24 : Parcours cellulaire des toxines AB₅ par Beddoe et coll. (171)

Les sous-unités A sont représentées par un pentagone et chaque sous-unité est coloriée selon son activité catalytique (bleu pour une activité au niveau des protéases, vert pour l'ADP-ribosyltransférase et magenta pour la N-glycosidase). Les toxines se lient à la surface cellulaire via les récepteurs glyqués où ils sont ensuite internalisés dans l'endosome précoce (EE pour early endosome). Le nom des récepteurs glyqués est indiqué sur la figure. Les toxines sont ensuite trafiquées vers le Golgi puis le réticulum endoplasmique (ER) où la sous-unité A de Stx (Shiga), Ctx (Choléra), LT et PTX (Pertussis) sont séparées du pentamère B.

1.3.2 Toxines AB

Une stratégie similaire est empruntée par la toxine de l'Anthrax (*B. anthracis*), l'exotoxine A (*P. aeruginosa*) et la toxine de la diphtérie (*C. diphtheriae*).⁽¹⁷²⁾ L'exotoxine A et la toxine de la diphtérie sont des toxines de type AB (B n'est pas pentamérique) qui sont internalisées directement en reconnaissant leur récepteur à la surface cellulaire. En revanche, la toxine de l'Anthrax sécrète deux composantes complémentaires : l'antigène protecteur (PA) et le facteur létal (LF). L'antigène protecteur (PA) reconnaît la surface cellulaire puis s'assemble en 7 à 8 unités pour former un pore. Le facteur LF reconnaît ce pore et le complexe est ensuite internalisé. ⁽¹⁷³⁾ Ce phénomène est démontré dans la Fig. 25.

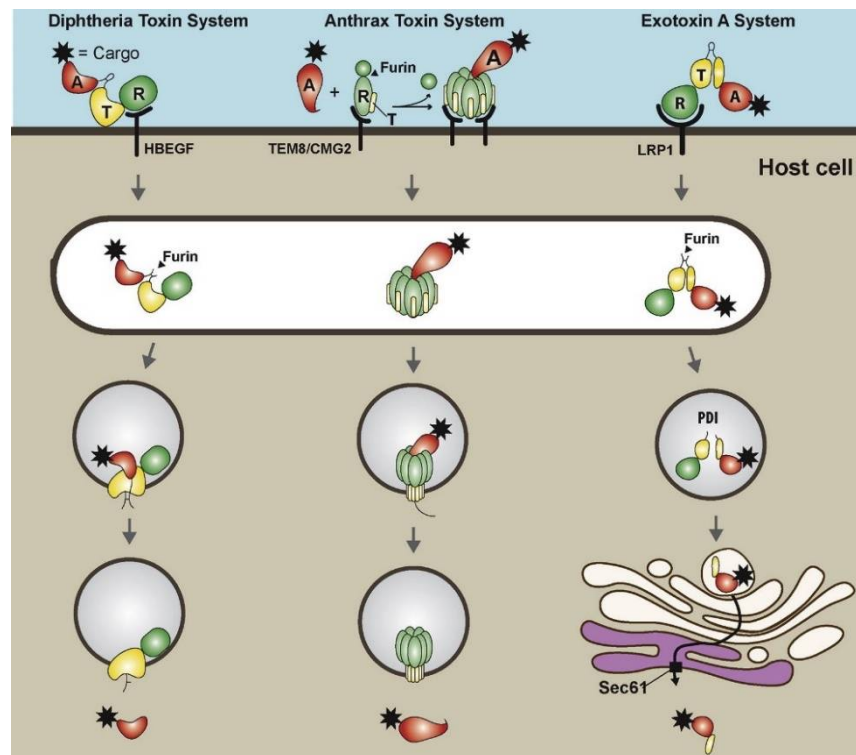
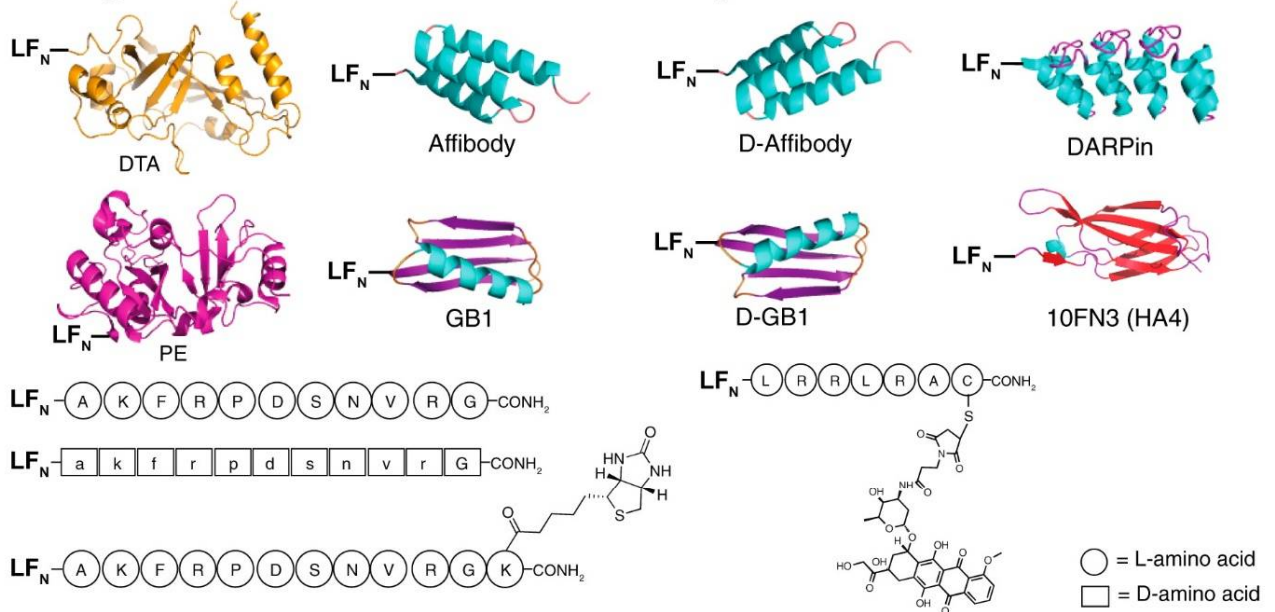


Figure 25 : Mécanisme d'entrée cellulaire de toxines par Beilhartz et coll. ⁽¹⁷²⁾

La toxine de l'Anthrax est l'une des plateformes de livraison la mieux caractérisée. En effet, le cargo thérapeutique peut être conjugué avec le facteur LF_n, une version non toxique du facteur LF capable de reconnaître le pore formé par l'antigène protecteur (PA). Plusieurs exemples de cette stratégie sont

démontrés dans la Fig. 26. (173) Cependant, l'efficacité d'internalisation n'est pas aussi bonne qu'avec l'exotoxine A du *Pseudomonas*.(174) En effet, due à la nature rigide du pore de la toxine de l'anthrax, certains cargos ne peuvent pas être adéquatement internalisés.(172)

a. Cargos that translocate efficiently



b. Cargos that translocate inefficiently

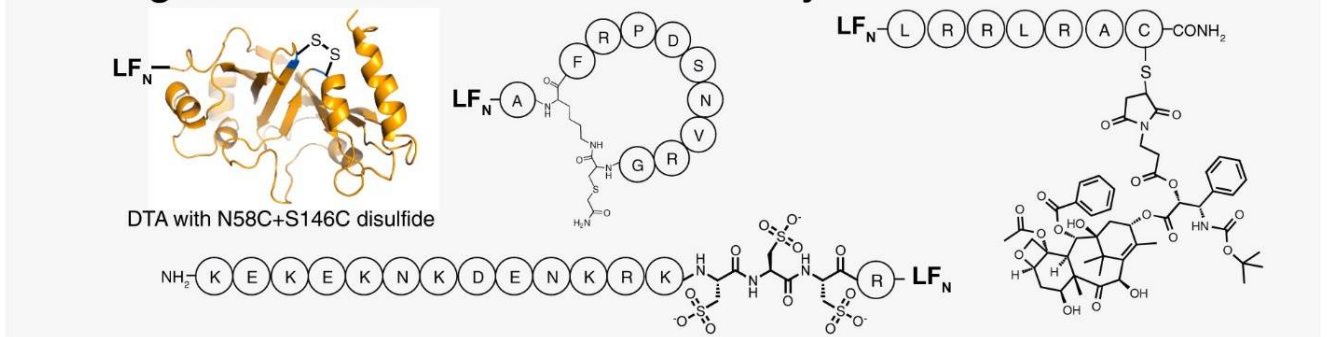


Figure 26 : Conjugués de la toxine anthrax qui sont internalisés par Rabideau et coll. (173)

L'efficacité de translocation a été analysée pour plusieurs peptides et protéines. (a) Représentation des protéines et peptides qui transloquent avec efficacité à travers le pore PA (antigène protecteur de la toxine de l'anthrax) incluent DTA, PE, les affibody (formes L et D), GB1 (formes L et D), DARPin, HA4, le peptide AKFRPDSNVRG (formes L et D), le peptide AKFRPDSNVRG biotine, un conjugué de doxorubicine-peptide. (b) Représentation des peptides et protéines qui ne transloquent pas efficacement (boîte grise) à travers le pore PA incluant DTA contenant N58C+S146S disulfide, AKFRPDSNVRG cyclique, un conjugué docetaxel-peptide.

1.3.3 Toxine du Shiga (AB₅)

Plusieurs systèmes de conjugaison ont été développés avec la sous-unité B de la toxine du Shiga (StxB) tel qu'illustré à la Fig. 27.(175) Cette toxine se lie au ganglioside Gb3 (ganglioglobotriaosylceramide), un récepteur localisé à la surface des reins et du cerveau et surexprimé dans certains cancers.(176)

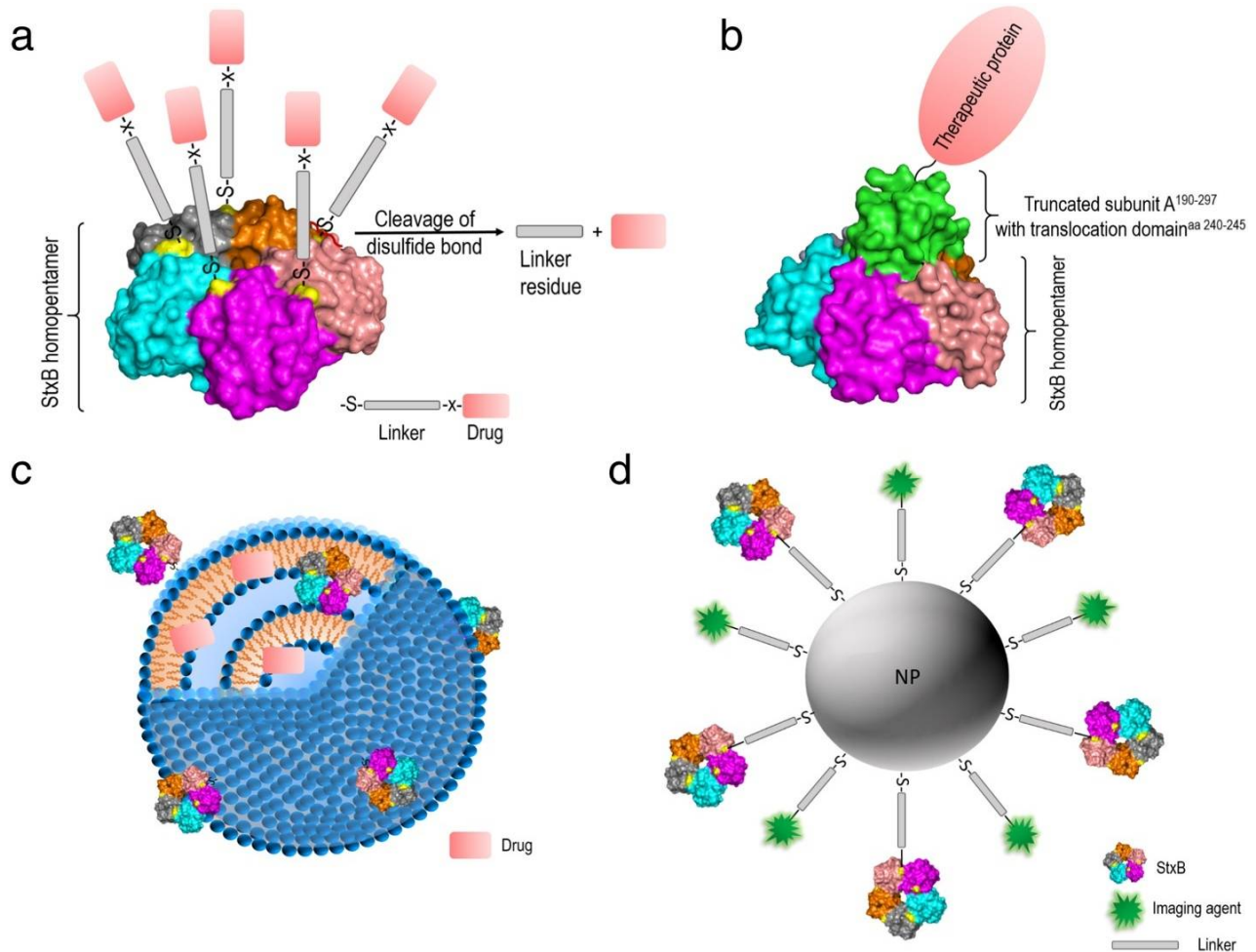


Figure 27 : Différents systèmes de conjugaison avec la sous-unité B de la toxine du Shiga (StxB) par

Luginbuehl et al. (175)

(a) Sous-unité B de la toxine du Shiga (StxB) couplée chimiquement à des petites molécules via un groupement thiol et un espaceur clivable. On peut greffer une molécule par monomère de la sous-unité B ce qui équivaut à cinq molécules par pentamère de StxB. (b) protéine fusion obtenue par génie recombinant impliquant la StxB, un fragment tronqué de StxA et une protéine thérapeutique (enhanced green fluorescent protein dans ce cas-ci). (c) Des vésicules lipidiques multilamellaires contenant une StxB modifiée, incorporée dans la structure de la bicouche. Des médicaments lipophiles ou hydrophiles peuvent être encapsulés dans les liposomes. (d) Des nanoparticules d'or (NP) fonctionnalisées avec des

groupements sulphhydryl sur la surface des nanoparticules qui reconnaissent la StxB et un agent d'imagerie via un espaceur.

Cependant, le phénomène de transcytose de la toxine du Shiga à travers les cellules intestinales est très mal compris.(177) En effet, puisqu'il n'existe que très peu de récepteurs Gb3 au niveau intestinal, cette toxine est probablement internalisée par d'autres mécanismes proposés à la Fig. 28.

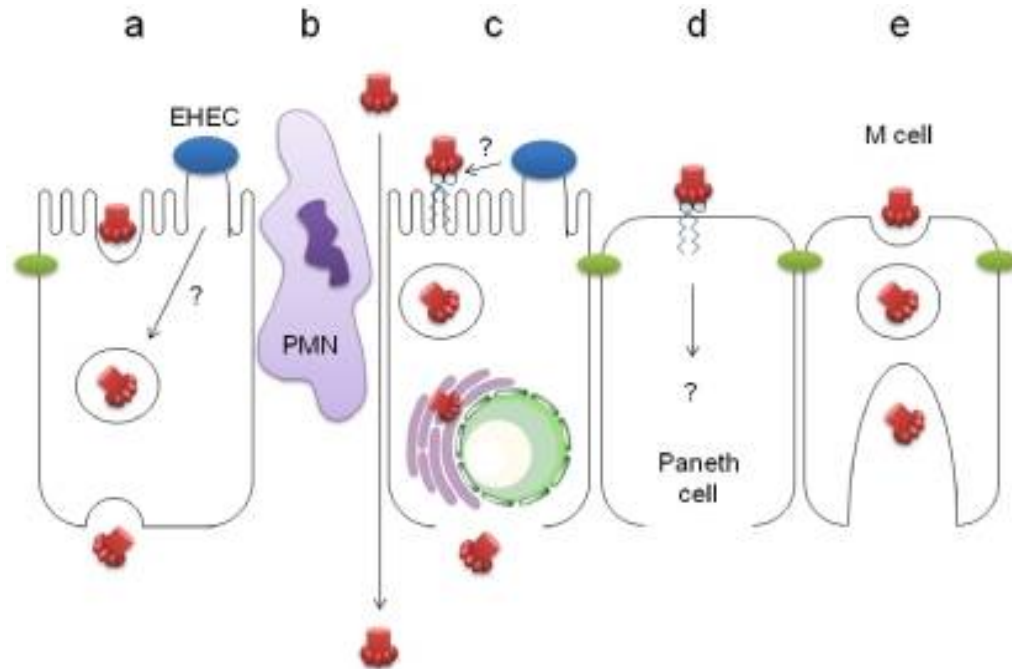


Figure 28 : Mécanisme de transcytose de la toxine du Shiga. (177)

Dans la figure ci-haut on voit : (a) la transcytose indépendante du Gb3, potentialisée par une infection à *E. coli* (b) le transport paracellulaire durant la transmigration de neutrophiles (PMN) (c) l'induction de l'expression de Gb3 par une infection à *E. coli*, le transport rétrograde et le relargage après la mort cellulaire.; (d) la transcytose médiée par le récepteur Gb3 dans les cellules Paneth et (e) la transcytose à travers les cellules M.(177)

1.3.4 Toxine du choléra (AB₅)

La toxine du choléra produite par *V. cholerae* est une protéine AB₅ de 84 kDa. La sous-unité A (CTA) est responsable des effets toxiques sur l'intestin causant une diarrhée mortelle.(178) La sous-unité B (CTB) est une structure homopentamérique de 55 kDa (5 monomères de 11,6 kDa) et se lie au récepteur GM1 des cellules intestinales situé au niveau des radeaux lipidiques.(179) Dès 1996, Frey et collaborateurs ont

exploré l'idée d'utiliser des nanoparticules décorées de CTB pour augmenter la perméabilité intestinale.(180) La CTB a été conjuguée sur les nanoparticules d'or par une méthode citrate-acide tannique. Toutefois, les conjugués de nanoparticules-CTB ne traversaient pas les entérocytes. Les auteurs justifient ce résultat par la présence d'un glycocalyx épais au niveau des entérocytes, empêchant le passage des nanoparticules. De plus, cette hypothèse a été confirmée par Harokopakis et collaborateurs qui ont préparé des liposomes décorés de CTB en utilisant un espaceur bifonctionnel (SMCC). (181)

Ces études démontrent que la conjugaison de la CTB aux nanoparticules ne semble pas être la bonne stratégie pour augmenter la perméabilité intestinale. D'autres groupes ont exploré les protéines de fusion avec la CTB. Une protéine fusion du peptide amyloïde avec la CTB a été produite dans des vers à soie pour le développement d'un vaccin contre la maladie d'Alzheimer.(182) L'administration orale de lyophilisats de cette protéine fusion à un modèle murin de la maladie d'Alzheimer a permis d'améliorer leur capacités cognitives et de mémorisation. Le groupe de Daniell a synthétisé une protéine de fusion CTB avec la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein, GFP) ou avec la protéine se liant à la myéline (myelin binding protein, MBP) dans des chloroplastes de feuilles de tabac.(183, 184) Les souris nourries avec ces feuilles de tabac possédaient une concentration de GFP plus élevée au niveau du foie, du rein, du cœur et du cerveau. De plus, les auteurs pouvaient détecter la MBP dans différentes régions du cerveau dont l'hippocampe. Enfin, les auteurs ont remarqué une diminution des plaques amyloïdes suite à l'administration de la CTB-MBP. Ruhlman et collaborateurs ont également synthétisé une protéine de fusion de la CTB avec la proinsuline dans des chloroplastes de feuilles de laitue et tabac.(185) L'administration des feuilles de tabac par voie orale à des souris diabétiques préservait les cellules B du pancréas productrices d'insuline et protégeait les souris contre l'insulinitis pancréatique.

Ces nombreux exemples de protéine de fusion illustrent que la CTB peut améliorer l'absorption orale de macromolécules. Lencer et collaborateurs ont démontré que la toxine du choléra peut traverser l'épithélium intestinal par un processus de transcytose.(186) Ce processus était dépendant de la liaison

avec le récepteur GM1. Les auteurs stipulent que c'est seulement la sous-unité B qui se retrouve du côté basolatéral et que la toxine au complet ne traverse que très peu la cellule. À la suite de ces travaux, Saslowsky et collaborateurs ont exploré en détail le mécanisme de transcytose par la CTB.(187) Selon leurs résultats, la transcytose de la CTB n'emprunte pas la voie classique du réticulum endoplasmique. La CTB passerait par un système vésiculaire appelé endosome 'commun' qui lui permet de traverser l'entérocytes du côté apical au côté basolatéral. Enfin, une étude a démontré qu'un seul monomère fonctionnel de la CTB (CTB pentamérique) est nécessaire pour l'internalisation de celle-ci par le récepteur GM1.(188)

1.3.5 Gangliosides

Le ganglioside GM1 (monosialotetrahexosylganglioside) est responsable de l'internalisation de la toxine du choléra. Ce ganglioside fait partie de la famille des 188 gangliosides identifiés chez les vertébrés.(189) Les gangliosides sont des glycosphingolipides composés d'un glucide et d'un acide gras dont les structures peuvent varier, tel qu'illustré dans la Fig. 29. Ceux qui possèdent un acide sialique dans la chaîne carbohydrate sont nommés des gangliosides. Dans les cellules, les gangliosides sont situés sur l'extérieur de la membrane plasmatisque, exposant leur chaîne glucide à la lumière extracellulaire.

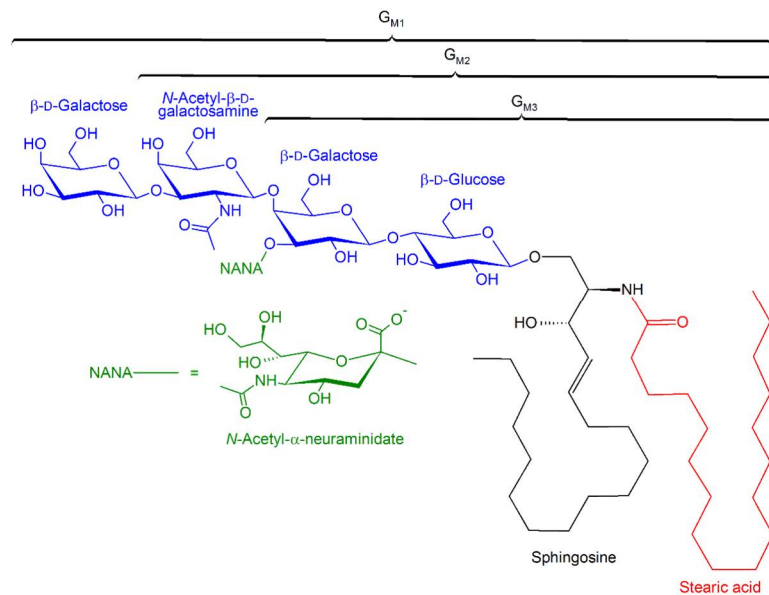


Figure 29 : Structure du ganglioside GM1 par Yu et al. (189)

Les gangliosides sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique puis modifiés dans le Golgi pour l'ajout de sucres. Ces réactions sont catalysées par des glycosyltransférases spécifiques. Les gangliosides se retrouvent un peu partout dans le corps, mais surtout dans le système nerveux.(190) Les gangliosides sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques dont la différenciation, le contrôle de la mémoire, la signalisation cellulaire, la protection neuronale et l'apoptose.(191) Le syndrome Guillain-Barré qui mène à la quadriplégie est dû à un déficit en gangliosides.(192)

1.4 Hypothèses et objectifs

1.4.1 Hypothèses de recherche

Ce travail est basé sur l'hypothèse de recherche suivante : la conjugaison de médicaments avec des agents de ciblage permettra d'améliorer leur perméabilité intestinale ou leur efficacité thérapeutique. Les stratégies de conjugaison devront être optimisées afin de préserver l'affinité du ligand pour sa cible, et de conserver l'activité thérapeutique du principe actif, tout en améliorant ses propriétés physico-chimiques, sa perméabilité ou son ciblage.

Ces hypothèses seront déclinées sur deux thèmes principaux :

1. Des principes actifs modèles peu perméables conjugués à un ligand reconnaissant le GM1 posséderont une perméabilité intestinale améliorée et ainsi une biodisponibilité orale potentiellement plus élevée.
 - 1.1. Les principes actifs conjugués à un peptide reconnaissant le GM1 seront mieux internalisés par les cellules intestinales.
 - 1.2. Les principes actifs conjugués à un peptide reconnaissant le GM1 auront une perméabilité supérieure à travers les cellules intestinales grâce à la présence de GM1.
 - 1.3. Le principe actif modèle conjugué avec la sous-unité B de la toxine du choléra (CTB) aura une perméabilité supérieure à travers les cellules intestinales grâce à la présence de GM1.
2. Des conjugués d'un médicament cytotoxique avec un anticorps ciblant les cellules cancéreuses du sein conserveront les propriétés de ciblage de l'anticorps et l'activité du médicament, pour améliorer l'efficacité anticancéreuse du traitement du cancer du sein.

1.4.2 Objectifs spécifiques

Ce projet a permis de préparer une série d'espaceurs versatiles qui peuvent être utilisés dans plusieurs applications. Deux applications principales ont été explorées, avec les objectifs spécifiques suivants :

1. Développer des conjugués de principes actifs modèles peu perméables pour améliorer l'internalisation et la perméabilité à travers les cellules intestinales :
 - 1.1. Synthétiser et caractériser une série d'espaceurs de propriétés diverses (longueur, hydrophilie, clivage) pour conjuguer un principe actif à un peptide ou une protéine.
 - 1.2. Synthétiser et caractériser des conjugués de médicaments modèles peu perméables avec des peptides reconnaissant le récepteur GM1 ou la sous-unité B de la toxine du choléra (CTB).
 - 1.3. Évaluer l'affinité des conjugués utilisant les peptides avec le récepteur GM1 par titration calorimétrique isotherme (ITC) et par thermophorèse à micro-échelle (MST).
 - 1.4. Évaluer l'internalisation des conjugués dans des cellules intestinales Caco-2 et T84.
 - 1.5. Évaluer la perméabilité des conjugués à travers les cellules intestinales Caco-2 et T84.
2. Développer un conjugué de décitabine avec un anticorps murin ciblant le récepteur HER2.
 - 2.1. Synthétiser et caractériser un espaceur conjugué à la décitabine
 - 2.2. Synthétiser et caractériser des conjugués de décitabine-anticorps ciblant le HER2
 - 2.3. Évaluer l'affinité des conjugués avec une cible cellulaire présentant HER2 (TUBO, H2N100)
 - 2.4. Évaluer l'efficacité des conjugués dans des modèles *in vitro*.

Par ailleurs, dans ce manuscrit le chapitre 2, présente les différentes stratégies utilisées pour la synthèse de bioconjugués, ainsi que les résultats des promédicaments synthétisés qui n'ont pas été inclus dans les publications (chapitre 3 et 4).

Chapitre 2 : Synthèse et évaluation de promédicaments

2.1 Espaceurs

Ce chapitre vise à recenser les différentes stratégies utilisées pour la synthèse de bioconjugués, ainsi que les résultats des promédicaments synthétisés qui n'ont pas été inclus dans les publications (chapitre 3 et 4). Pour la réalisation de ce projet, une librairie d'espaceurs a été conçue pour permettre le greffage de divers médicaments sur un ligand. Les paramètres qui ont été considérés pour la conception sont :

2.1.1 Le site de greffage sur le ligand

Les ligands utilisés durant cette thèse sont tous de nature peptidique (soit des peptides d'une dizaine d'acides aminés, soit une protéine). Ces peptides possèdent des groupements qui peuvent être fonctionnalisés dont des thiols (cystéine), amine ou acide carboxylique. Le groupement thiol (-SH) peut être conjugué avec une fonction alcène ou maléimide.⁽¹⁹³⁾ Initialement la conjugaison aux groupements -SH (cystéine) se faisait par l'entremise d'une liaison alcène. Cette réaction nécessitait l'utilisation d'une lumière UV pour catalyser la réaction.⁽¹⁹⁴⁾ Cependant, le rendement de conjugaison était plutôt faible. De plus, l'utilisation d'une lampe UV peut dégrader certaines molécules par l'ouverture du cycle β -lactame des molécules antibiotiques et la dégradation des sondes fluorescentes par photoblanchiment.

2.1.2 Le site de greffage sur le principe actif

Les principes actifs utilisés durant la thèse avaient des fonctions amine (tobramycine, CTB), alcool (décitabine), ou acide carboxylique (méro pénem, piperacilline, vancomycine). Des espaceurs ont été développés pour répondre à ces besoins de conjugaison. Des fonction COOH ou NHS (ester activé) ont été utilisées pour la conjugaison sur l'amine (NH_2) et une fonction amine ou haloalkane pour se lier à l'acide carboxylique.

2.1.3 La longueur et l'hydrophilie de l'espaceur

Comme vu en introduction, les propriétés physico-chimiques du conjugué reposent en partie sur la structure de l'espaceur. Pour évaluer ce paramètre, nous avons sélectionné des espaceurs courts (4 à 6 atomes, espaceurs 4,10,39,28, Tableau 2.1) ou plus longs (12 à 17 atomes, espaceurs 9, 46, 61, Tableau 2.1). Dans le cas des espaceurs longs, nous avons voulu minimiser l'hydrophobie résultante en introduisant des motifs éthylène glycol (3 à 5 motifs) rapportés pour faciliter la solubilité des bioconjugués.(44)

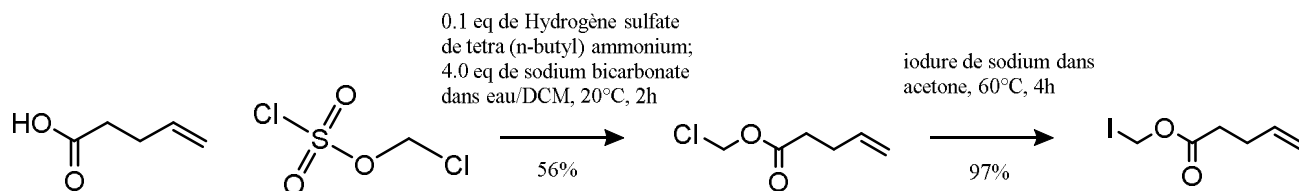
2.1.4 Le caractère clivable ou non clivable de l'espaceur

Ainsi que présenté en introduction, les espaceurs peuvent s'hydrolyser en conditions précises. Afin de tester la valeur ajoutée de cette fonction, nous avons proposé des espaceurs clivables par des estérases plasmatiques (enzymes au niveau de la circulation sanguine) reliés à une fonction ester (acyloxyalkyl) ou non clivable, présentant des fonctions amides. Cette fonction ester (et dérivés) est souvent utilisée dans la synthèse d'antibiotiques pour augmenter leur perméabilité intestinale, puis le relargage de l'antibiotique se fait une fois dans la circulation systémique grâce aux enzymes carboxyl estérases.(195) Il est à noter que certains de ces espaceurs sont commerciaux (10, 28) et ainsi que le fluorophore Cy5-NHS. Cependant, leur prix démesuré nous a encouragé à les synthétiser par nous-mêmes. Les espaceurs finaux sont documentés dans le tableau 2.1.

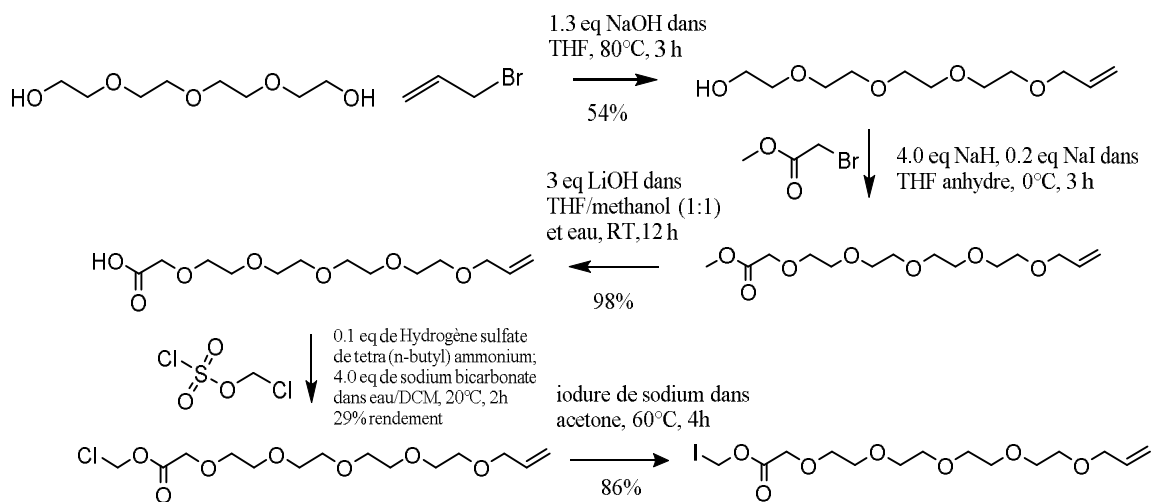
Les schémas de synthèse des espaceurs non publiés sont décrits dans la section suivante 2.1.5 Synthèse des espaceurs non publiés.

Schéma 2.1 Synthèse des espaceurs non publiés

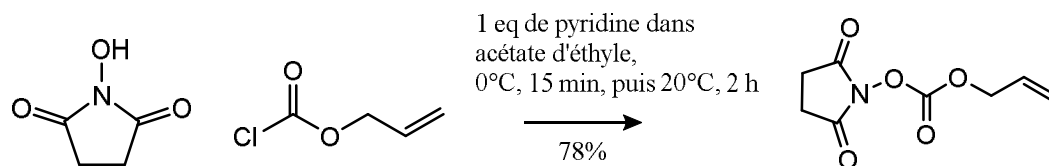
Synthèse de l'espaceur 4



Synthèse de l'espaceur 9



Synthèse de l'espaceur 10



Synthèse de l'espaceur 39

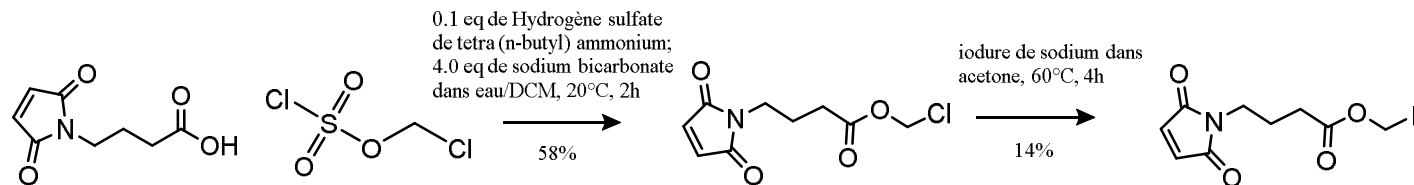
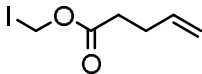
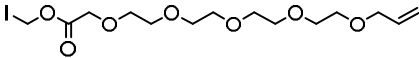
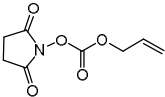
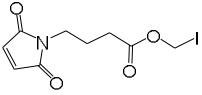
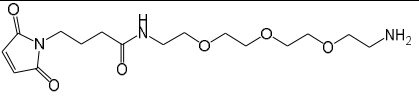
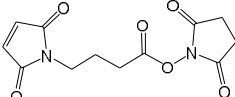
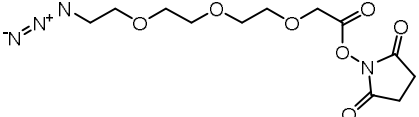


Tableau 2.1 : Espaceurs bifonctionnels synthétisés durant le projet

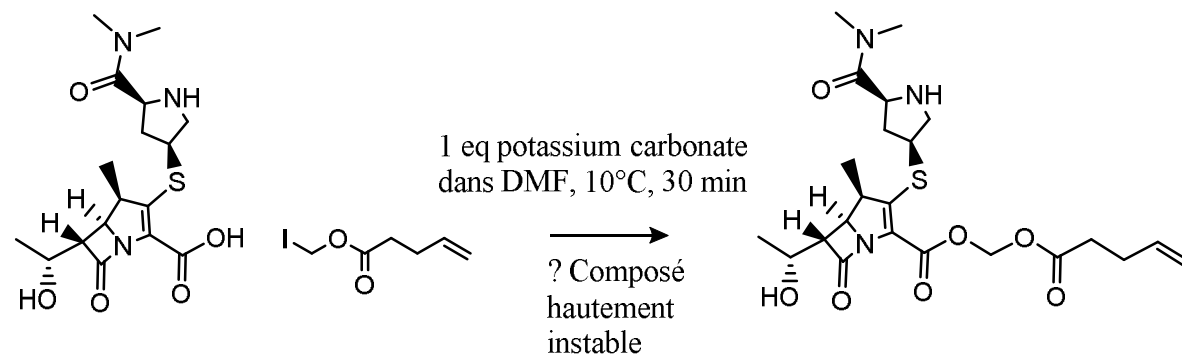
	#	Description	Structure	Purification	Caractérisation	Rendement
Espaceurs clivables	4	Espaceur court liant COOH à SH		Distillation Extraction	RMN ¹ H, ¹³ C	54% (2 étapes)
	9	Espaceur long liant COOH à SH		Extractions, Colonne de silice	RMN ¹ H, LC-MS	13% (5 étapes)
	10	Espaceur court liant NH ₂ à SH		Extraction	RMN ¹ H, ¹³ C	78% (1 étape)
	39	Espaceur court, liant COOH à SH		Extraction	RMN ¹ H	14% (2 étapes)
Espaceurs non-clivables	46	Espaceur long, liant COOH, FITC ou NHS à SH		Extraction, Colonnes de silice	RMN ¹ H, ¹³ C, LC-MS	33% (9 étapes)
	28	Espaceur court, liant NH ₂ à SH		Extraction, Colonne de silice	RMN ¹ H, ¹³ C, LC-MS	31% (2 étapes)
	61	Espaceur long, liant NH ₂ à cycle DBCO		Extraction, Colonnes de silice	RMN ¹ H, ¹³ C, LC-MS	14% (4 étapes)

2.2 Promédicaments

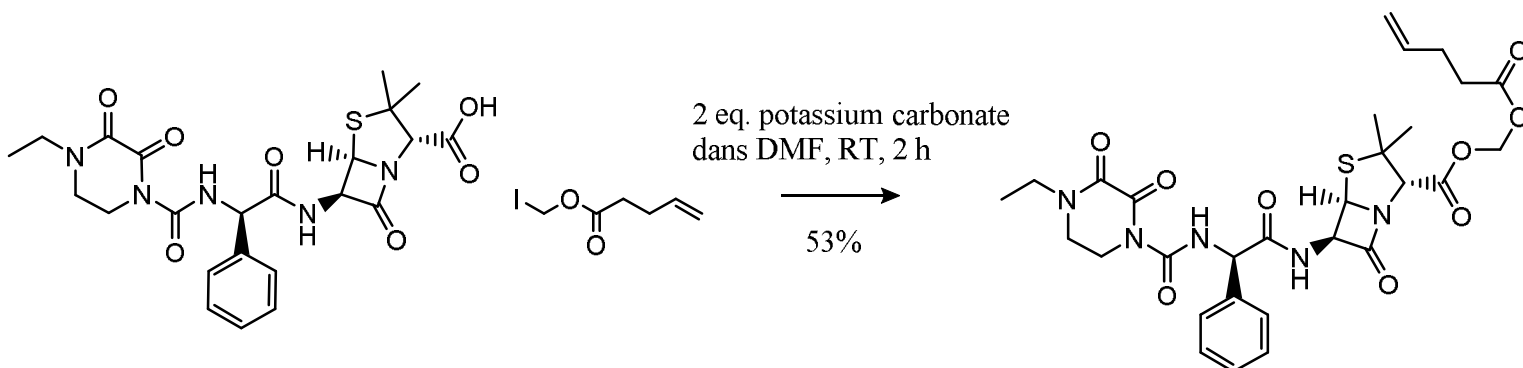
Les principes actifs choisis pour ce projet sont des antibiotiques. En effet, certains antibiotiques sont encore administrés par injection intraveineuse à cause de leur faible biodisponibilité orale. Jean-Marc Forest, pharmacien à l'hôpital pour enfants Ste-Justine (Montréal), a proposé des antibiotiques injectables qui seraient pertinents à transformer en promédicaments administrables par voie orale. Les principes actifs sélectionnés présentaient donc une faible biodisponibilité ainsi qu'une fonction chimique disponible pour le greffage d'une espaceur. Les antibiotiques choisis étaient tous des médicaments de BCS classe III (bonne solubilité, pauvre perméabilité) dont le méropénem, la pipéracilline, la vancomycine et la tobramycine. Les promédicaments développés à partir de ces antibiotiques sont documentés dans le tableau 2.2, 2.3 et 2.4 et les schémas de synthèse des promédicaments non publiés dans la section 2.2.1.

Schéma 2.2 Synthèse des promédicaments non publiés

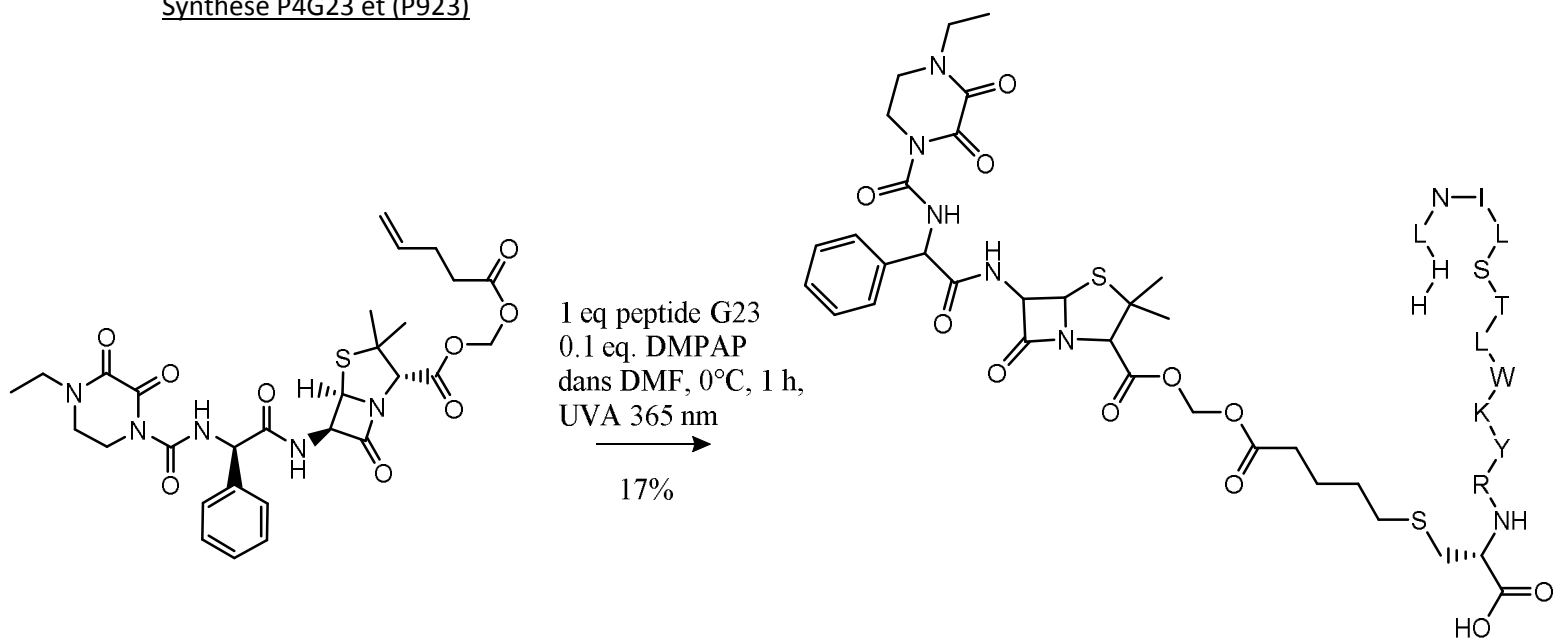
Synthèse de M4



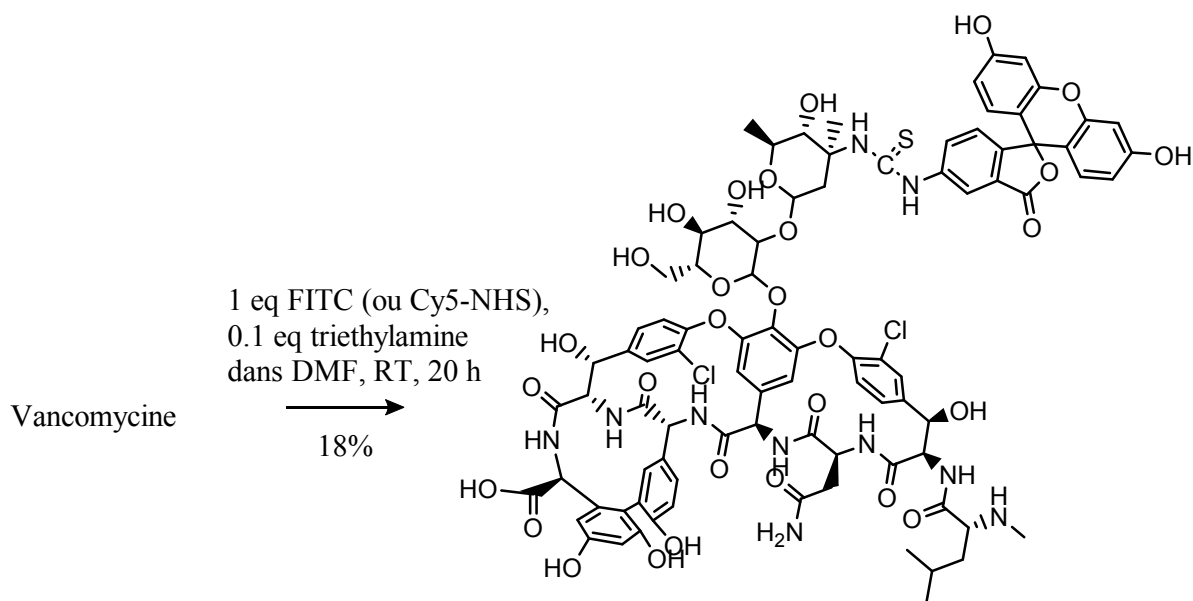
Synthèse de P4 (et P9)



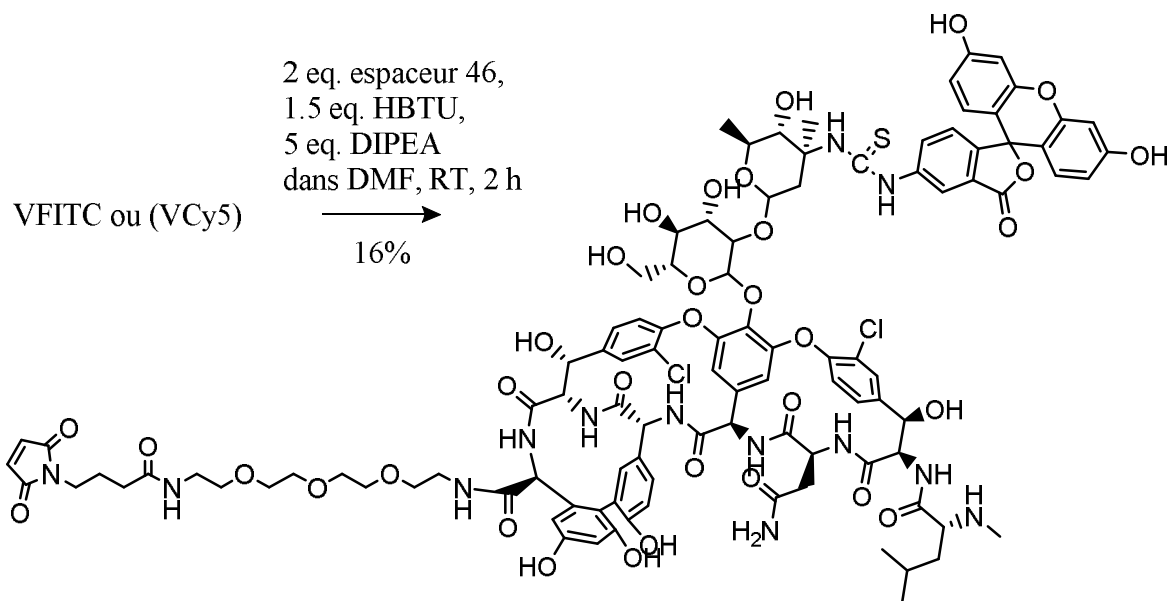
Synthèse P4G23 et (P923)



Synthèse de VFITC et (VCy5)



Synthèse de VFITC 46 et (VCy5 46)



Synthèse de VFITC G23 et (VCy5 G23, VCy5 Scr, VCy5 P3)

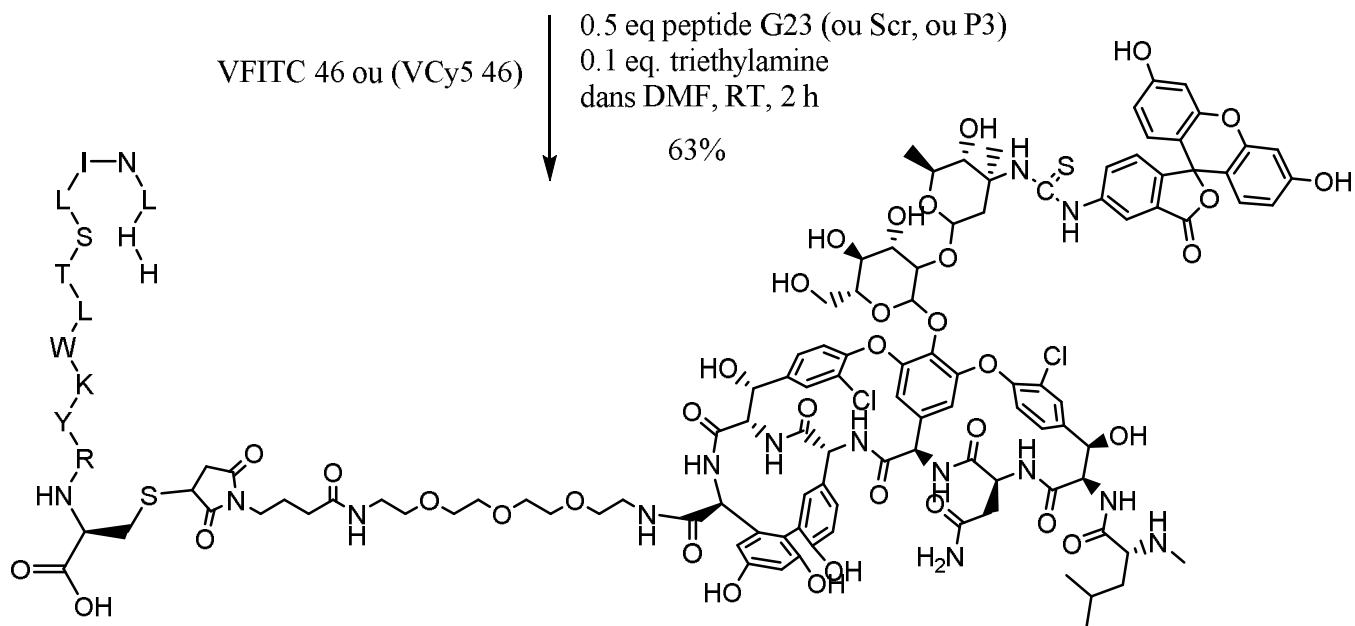


Tableau 2.2 : Promédicaments synthétisés durant la thèse (non publiés)

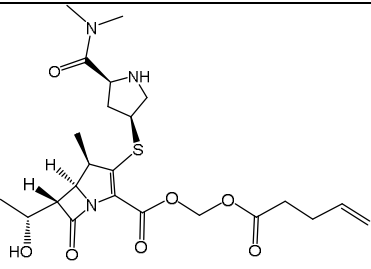
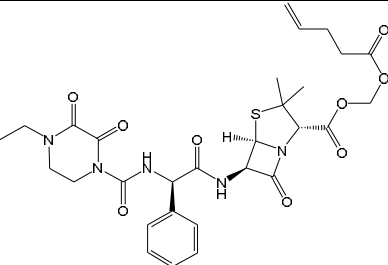
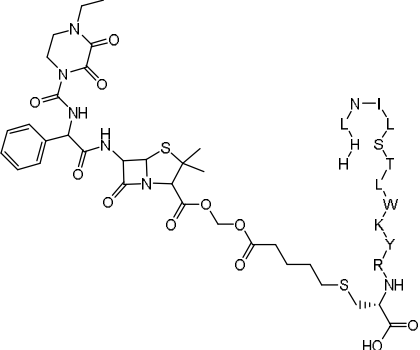
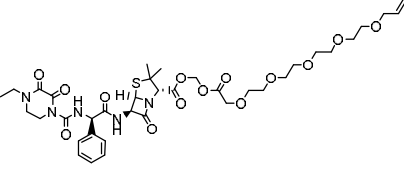
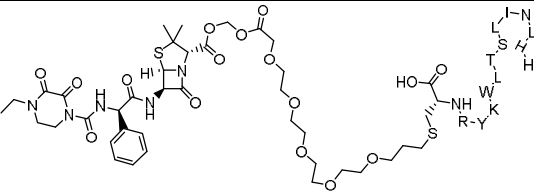
Rx	#	Description	Structure	Purification	Caractérisation	Rendement
Méropenem	M4	Antibiotique injectable avec l'espaceur 4, clivable et court. Composé très instable		Colonne de silice	LC-MS	31% (1 étape)
Pipéracilline	P4	Antibiotique injectable avec l'espaceur # 4 court et clivable		Colonne de silice	RMN ¹ H, ¹³ C, LC-MS/MS, IR	53% (1 étape)
	P4 G23	Antibiotique injectable avec l'espaceur # 4 court et clivable et le peptide G23 (reconnait GM1)		HPLC préparative	LC-MS/MS	17% (1 étape)
	P9	Antibiotique injectable avec espaceur # 9 long et clivable		HPLC préparative	LC-MS	77% (1 étape)
	P9 G23	Antibiotique avec l'espaceur # 9 long et clivable et le peptide G23		HPLC préparative	LC-MS, MS/MS, LC-	9% (1 étape)

Tableau 2.3 : Promédicaments synthétisés durant la thèse (non publiés - suite)

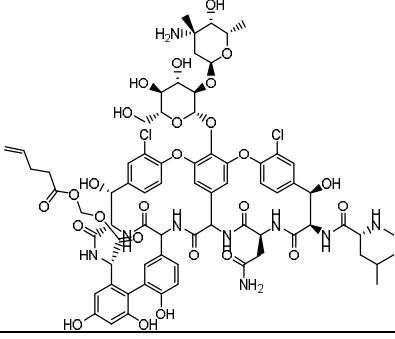
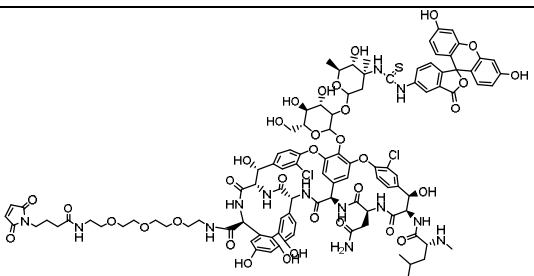
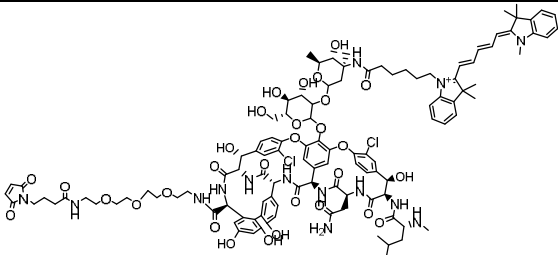
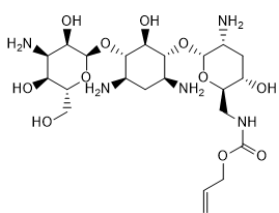
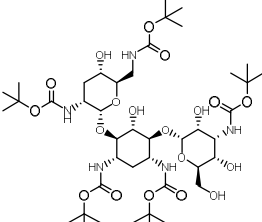
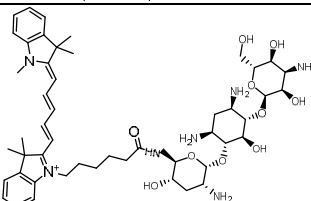
Rx	#	Description	Structure	Purification	Caractérisation	Rendement
Vancomycine	V4	Antibiotique injectable avec l'espaceur # 4 court et clivable		HPLC préparative	LC-MS/MS	9.7% (1 étape)
	VFitc	Contrôle de perméabilité	Vancomycine marquée par le fluorophore FITC (sans espaceur)	HPLC préparative	LC-MS	18% (1 étape)
	VFitc 46	Antibiotique injectable avec l'espaceur # 46 long et non-clivable		HPLC préparative	LC-MS	16% (1 étape)
	VFitc G23	Antibiotique + espaceur # 46 et peptide G23	Vancomycine-FITC avec espaceur 46 (long, non-clivable) et peptide G23 (reconnait GM1)	HPLC préparative	LC-MS	63% (1 étape)
	VCy5	contrôle de perméabilité	Vancomycine marquée par le fluorophore Cy5 (sans espaceur).	HPLC préparative	LC-MS	36% (1 étape)
	VCy5 46	Antibiotique injectable avec l'espaceur # 46 long et non-clivable		HPLC préparative	LC-MS	64% (1 étape)
VCy5 G23 Scr P3	Vancomycine + espaceur # 46 et peptide G23 ou aléatoire (Scr) ou P3	Vancomycine-Cy5 + espaceur 46 conjugués à différents peptides : 1) G23 reconnait GM1 2) ScrG23 séquence aléatoire du G23 3) P3 reconnait GM1	HPLC préparative	LC-MS	62% pour G23 75% pour ScrG23 84% pour P3	

Tableau 2.4 : Promédicaments synthétisés durant la thèse (non publiés – suite 2)

Rx	#	Description	Structure	Purification	Caractérisation	Rendement
Tobramycine	25	Tobramycine + espaceur # 10 court et clivable		Colonne de silice	RMN ¹ H, LC-MS	
	Tob Boc	Tobramycine protégée sur les amines (-NH ₂) Pour attacher espaceur# 46		Filtration	LC-MS	82% (1 étape)
	Tob Cy5	Tobramycine Cy5		HPLC préparative	HRMS	39% (1 étape)

2.2.2 Points à considérer pour la synthèse des promédicaments

On a remarqué certains points critiques durant la synthèse des promédicaments :

- Le méropenem était un antibiotique très difficile à purifier. La purification par HPLC préparative n'était pas possible car le composé était trop instable en milieu aqueux. De plus, le composé était trop hydrophile pour une purification en phase normale (chromatographie sur silice).
- Le composé P4G23 (pipéracilline conjuguée au peptide G23 avec un espaceur court) a perdu son affinité envers le récepteur GM1. En effet, on a mesuré aucune affinité par ITC pour ce composé. Par contre, le composé P9G23 a conservé son affinité (395 nM) et a donc continué avec cette version de la pipéracilline.
- Le composé P9G23 (pipéracilline conjuguée au peptide G23 avec un espaceur long clivable) n'était pas perméable à travers une monocouche de cellules Caco-2. L'espaceur clivable pourrait se

dégrader dans le milieu extra et intracellulaire. On a donc décidé de continuer avec un espaceur non-clivable afin de mieux comprendre le processus d'internalisation et de transcytose.

- On a décidé d'utiliser une approche de fluorophore afin de voir s'il était possible de démontrer un processus de transcytose en utilisant des peptides reconnaissant le récepteur GM1. Deux fluorophores ont été utilisés : FITC, facile d'accès. Nous avons rencontré des problèmes de sensibilité. Nous avons alors conjugué le Cy5, qui présente une bien meilleure sensibilité.

2.3 Perméabilité de la vancomycine conjuguée au peptide G23 (VFITC)

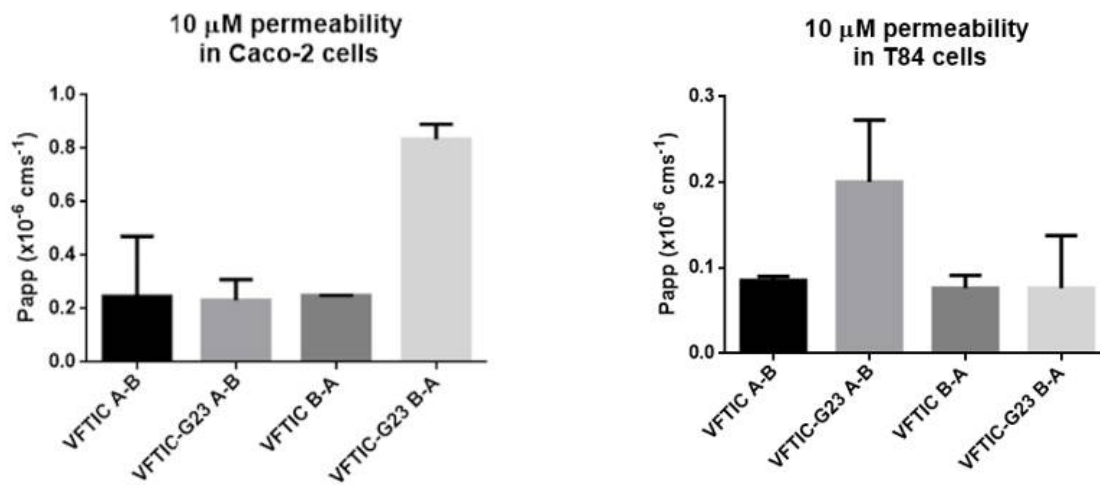


Figure 30 : Perméabilité de 10 μM de la vancomycine-FITC (VFITC) ou de la vancomycine-FITC conjuguée au peptide G23 (VFITC-G23) à travers les cellules intestinales Caco-2 et T84 où A-B = apical vers basolatéral et B-A = basolatéral vers apical

Certains de ces composés ont été testés sur des cellules Caco-2 et T84 pour estimer l'amélioration de la perméabilité des principes actifs. Les essais de perméabilité sont détaillés dans le chapitre 3 section *Permeability through cell monolayers*. Dans les cellules T84, la vancomycine-Fitc avec le peptide G23 (VFITC-G23) semble mieux passer du côté apical vers basolatéral que la vancomycine-Fitc seule (VFITC) tel que démontré dans la Fig. 25. Par contre, on ne voit pas ce même effet quand on regarde

l'expérience du côté basolatéral vers apical. Ceci est un résultat positif, car il y a une plus grande présence de GM1 sur le côté apical. .

Dans les cellules Caco-2, un phénomène particulier est observé. La vancomycine-FITC avec le peptide G23 passe nettement mieux du côté basolatéral vers apical que la vancomycine-FITC seule. Ceci est très difficile à expliquer, mais il est possible que le peptide est substrat d'un mécanisme d'export dans les cellules Caco-2, même si ce n'est pas documenté dans la littérature. Par ailleurs, on ne voit aucune différence en internalisation (A vers B), possiblement dû au fait qu'il n'y a pas beaucoup de GM1 dans les cellules Caco-2. Ces expériences, malheureusement non concluantes, n'ont pas été incluses dans les articles scientifiques ci-après.

Chapitre 3: GM1 Binding Conjugates to Improve Intestinal Permeability

Article accepté dans Molecular Pharmaceutics le 13 novembre 2018

Alexandre Melkoumov[†], Isabelle St-Jean[†], Xavier Banquy[†], Grégoire Leclair^{†*} and Jeanne Leblond Chain^{†*}

[†]*Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, H3C 3J7, Montréal, Québec, Canada*

*Co-corresponding authors. Tel : +1-514-343-6111 ext 0361 ; Fax : +1-514-343-2102 ; E-mail :

Jeanne.leblond-chain@umontreal.ca; gregoire.leclair@umontreal.ca

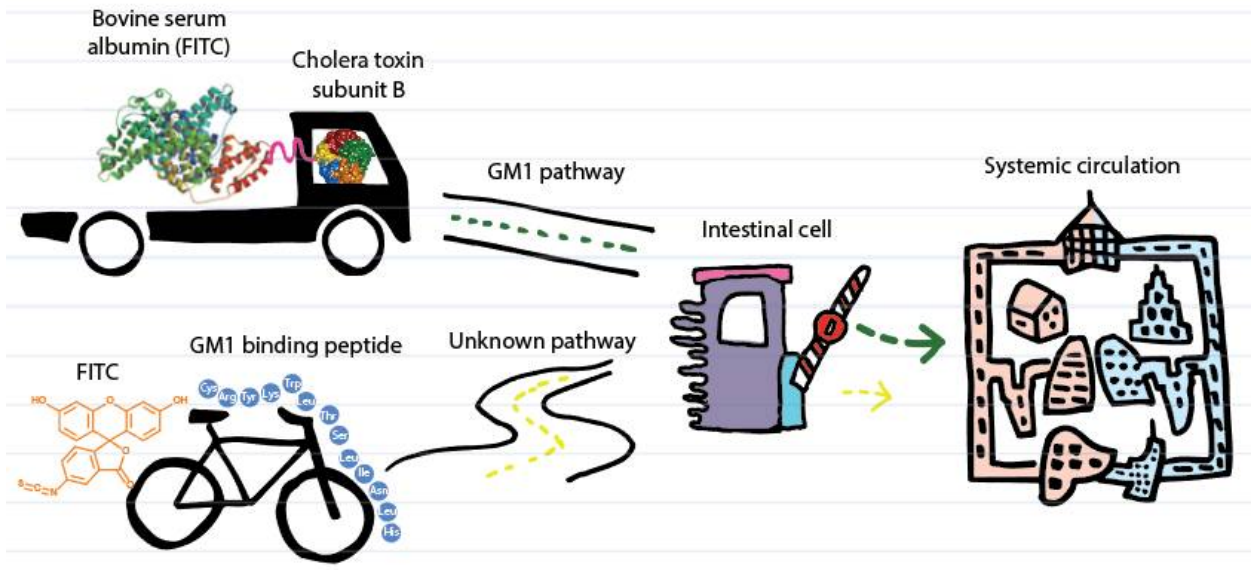


Figure 31: Table of contents graphic (TOC)

Abstract

Drugs and proteins with poor intestinal permeability have a limited oral bioavailability. To remediate this problem, a receptor-mediated endocytosis and transcytosis approach was explored. Indeed, the non-toxic β subunit of cholera toxin (CTB) can cross the intestinal barrier by binding to receptor GM1. In this study, we explored the use of GM1-binding peptides and CTB as potential covalent carriers of poorly permeable molecules. GM1-binding peptides (G23, P3) and CTB were conjugated to poorly permeable fluorescent probes such as FITC and albumin-FITC using triethylene glycol spacers and click chemistry. The affinity of the peptide conjugates with receptor GM1 was confirmed by isothermal titration calorimetry or microscale thermophoresis and the results suggested the involvement of non-specific interactions. Conjugating the model drugs to G23 and P3 improved the internalization into Caco-2 and T84 cells, although the process was not dependent of the amount of GM1 receptor. However, conjugation of BSA-FITC to CTB increased the internalization in the same cells in a GM1-dependent pathway. Peptides conjugates demonstrated a limited permeability through a Caco-2 monolayer, whereas G23- and CTB-conjugates slightly enhanced permeability through a T84 cell monolayer compared to model drugs alone. Since CTB can improve the permeability of large macromolecules such as albumin, it is an interesting carrier for the improvement of oral bioavailability of various other macromolecules such as heparins, proteins and siRNAs.

Keywords: GM1, peptide conjugate, cholera toxin, intestinal permeability, oral bioavailability, bioconjugates

Abbreviations:

BBB: Blood-Brain-Barrier

Boc: tert-butyloxycarbonyl protecting group

Boc₂O: Di-tert-butyl dicarbonate

CT: Cholera toxin

CTB: Cholera toxin subunit B

Cy5-NHS: Cyanine 5 monosuccinimidyl ester

DBCO: Dibenzocyclooctyne

DCM: Dichloromethane

DMF: N,N-Dimethylformamide

Et₃N: Triethylamine

EtOAc: Ethyl acetate

FITC: Fluorescein isothiocyanate

GM1: Monosialotetrahexosylganglioside

GMBS: N-γ-maleimidobutyryl-oxysuccinimide ester

HBSS: Hank's balanced salt solution

ITC: Isothermal titration calorimetry

MβCD: Methyl-beta-cyclodextrin

MST: Microscale thermophoresis

NHS: N-Hydroxysuccinimide

P_{app}: Apparent permeability coefficient

PBS: Phosphate buffer saline

PPMP: DL-threo-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol

RT: Room temperature

SPR: Surface plasmon resonance

TBS: Tris-buffered saline

TFA: Trifluoroacetic acid

Introduction

Recent advances in biologic therapies such as fusion proteins, monoclonal antibodies and therapeutic peptides have demonstrated their efficacy and safety for the treatment of multiple diseases.(196) Unfortunately, oral bioavailability of biomacromolecules is still a major frontier in drug delivery.(103) Interestingly, two peptide drugs — desmopressin (1069 g/mol) and sirolimus (914 g/mol) — are commercially available as an oral solution and tablet, respectively. However, their oral bioavailability remains low and variable: 0.08% to 0.16% for desmopressin,(197) 15 to 20% for sirolimus.(198) Macromolecules exhibiting higher molecular weight (> 1100 g/mol), such as insulin, are mainly administered by injection, which is often associated with pain, swelling and infection at injection site. These adverse effects decrease patient compliance and can delay the initiation of an intravenous therapy, resulting in diminished clinical efficacy and life expectancy.(107-109) Oral formulation of insulin remains the Holy Grail in the pharmaceutical field and continues to face the difficulty of highly variable absorption.(106)

Biomacromolecules have poor oral bioavailability due to the multiple barriers encountered in the gastrointestinal tract such as: (i) an enzymatic and acidic barrier, (ii) a physical mucus barrier and (iii) a cellular permeability barrier.(118) Multiple strategies have been developed to address each of these issues respectively: (i) enzyme inhibitors and enteric coatings to overcome digestion, (ii) nanoparticulate systems able to cross the mucus layer, and (iii) permeation enhancers and receptor-mediated conjugates to facilitate intestinal permeability.(199) Although nanoparticles have demonstrated interesting results, no formulation has been commercialized to this date.(118) Permeation enhancers usually target the tight junctions between enterocytes, which they open transiently, allowing paracellular and/or transcellular absorption of macromolecules.(120, 199) These systems have progressed into clinics, as a glucagon-like peptide-1 receptor agonist (GLP-1, 4114 g/mol) administered with the permeation enhancer N-[8-(2-hydroxybenzoyl) amino] caprylate (SNAC) completed phase III clinical trials. (200) The toxicity in a

chronic administration regimen needs to be carefully examined, due to possible absorption of bystander pathogens and toxins.(120)

Interestingly, some natural compounds, such as the toxins from the AB₅ family, are able to target enterocytes and cross multiple barriers through an endocytosis pathway.(201) Among them, Cholera toxin (CT) is secreted by the bacteria *Vibrio cholerae*. It is composed of two subunits exhibiting specific roles: the subunit B (CTB) is a non-toxic pentameric protein which binds to gangliosides GM1 (monosialotetrahexosylganglioside) or GT1b (trisialoganglioside) in intestinal cells. This binding cross-links five GM1 molecules in the plasma membrane and triggers the internalization of the whole toxin (A and B) thanks to the cholesterol islets and the lipid rafts associated proteins.(202) CT reaches the endoplasmic reticulum via a specific retrograde pathway and the subunit A is then dissociated from the subunit B to exert its toxic effect.(179, 202, 203) Interestingly, transcytosis of cholera toxin subunit B (CTB) was observed by Lencer *et al.* since 1995 in polarized cell lines, such as T84.(204, 205) Since then, CTB has been used to prepare fusion proteins with GFP (206), insulin (185), myelin binding protein (207) and amyloid- β peptide,(182) and has enabled the oral administration of therapeutic proteins or peptides. However, conjugating CTB to a gold nanoparticle did not induce transcytosis through enterocytes, due to the presence of cell glycocalyx in the mucus of enterocytes.(180) Nevertheless, CTB-decorated small liposomes (< 100 nm in diameter) were able to generate a sufficient mucosal immunoglobulin A level to prevent from infectious diseases, probably processing through the M cells.(181) We therefore hypothesized that designing a conjugate of poorly permeable drugs to a GM1-binding unit could improve their intestinal permeability and consequently their bioavailability.

Although CTB has proven to be efficient at improving the bioavailability of macromolecules, it remains an expensive and relatively complex solution to improve oral permeability. Therefore, we first investigated synthetic peptides reported to bind to gangliosides, such as P3 (208) and G23,(209) identified by phage display. The latter, also abbreviated Tet1 due to tetanus toxin-like binding characteristics, is a 13-mer peptide which exhibits neuron targeting properties.(210, 211) Initially identified to bind GT1b,

Georgieva *et al.* demonstrated that G23 also binds to GM1.(212) This group grafted the peptide on the surface of polymersomes and demonstrated the transcytosis of the targeted complexes through the Blood-Brain Barrier (BBB) *in vitro* and *in vivo*, after intravenous administration in mice.(213) Supporting this idea, G23 was coated on an alginate/doxorubicin/iron nanoparticle and significantly improved transcytosis on an *in vitro* BBB model, as well as brain accumulation, after intravenous injection in mice.(214)

Taken into consideration all these data, we hypothesized that the conjugation of a poorly permeable molecule to a GM1-binding peptide (G23, P3) would improve the uptake and transcytosis of model drugs across an *in vitro* model of the intestinal barrier. The conjugates were synthesized using short polyethylene glycol spacers to favor ligand display. Since conjugation can modify the affinity of the GM1-binding peptides, affinity of the conjugates for the GM1 receptor was evaluated using isothermal titration calorimetry (ITC) or microscale thermophoresis (MST). In parallel, we hypothesized that click chemistry could be used instead of recombinant protein production to prepare CTB-conjugates of macromolecules, while still improving their permeability through an *in vitro* model of the intestinal barrier. Cellular uptake of the peptide and protein conjugates was evaluated in intestinal Caco-2 and T84 cells, the latter previously used for CTB transcytosis.(204, 205) The permeability of the conjugates was evaluated through a monolayer of the same differentiated intestinal cells.

Experimental section

Materials

GM1 was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), Cholera toxin subunit B, BSA-FITC and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Peptide G23 (HLNILSTLWKYRC), Peptide P3 (VWRLAPPFSNRLIPC) and a scrambled version of G23 (KISHLLNYRTWL), were custom synthesized by Biomatik (Cambridge, ON, Canada). All solvents, buffers and culture media were purchased from Thermo Fischer Scientific (Pittsburgh, PA, USA) and were of analytical grade and were used as received. Genistein and chlorpromazine were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA) was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), Pitstop 2TM was obtained from Abcam[®] (Toronto, ON, Canada). All other chemicals were obtained from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada) Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA) and Oakwood Chemical (West Columbia, SC, USA) and used as received. Caco-2 and T84 cells were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). Analytical and preparative LC/MS was performed on an Agilent 1260 Infinity system equipped with a single quadrupole Agilent 6120 mass spectrometer (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada). ¹H and ¹³C NMR were recorded on a Varian 400 WB spectrometer, using residual solvent peak for calibration. HRMS analyses were performed on a Waters Xevo G2-S QTOF.

Synthesis of peptide conjugates

Synthesis of 2 (215)

To a solution of NH₂-PEG₃-NH₂ (872.2 mg, 4.54 mmol) in dichloromethane (DCM, 20 mL) was added dropwise a solution of Boc₂O (148.2 mg, 0.68 mmol, 0.15 eq.) in 25 mL of DCM. Reaction was stirred for 5 hours at 4°C and then for 18 hours at room temperature. The organic phase was washed with water, dried with MgSO₄, filtered off and concentrated under reduced pressure to afford a clear oil (134.3 mg,

67 %): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 1.43 (s, 9H), 1.96 (br, 2H, NH_2), 2.88 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NBoc}$), 3.30 (m, 2H, CH_2NH_2), 3.50-3.65 (m, 12H, CH_2O); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 28.41, 40.36, 41.64, 70.21, 70.50, 70.54, 73.17, 76.69, 156.06. LC-MS: RT = 1.141 min ($\lambda = 220$ nm), $[\text{M}+\text{H}]^+ = 293.2$ calculated exact mass: 292.20.

Synthesis of 3

To a 1 mL DCM solution of compound 2 (100.0 mg, 342 μmol) was added N-methylmorpholine (50 μL , 1.3 eq.) and GMBS (79.5 mg, 0.8 eq.). Reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Mixture was then diluted in DCM (1 mL) and washed with a 5 % citric acid solution (2 mL). The aqueous layer was further extracted with DCM (3 x 2 mL). The combined organic layers were then dried with MgSO_4 , filtered off and concentrated under reduced pressure to afford a clear oil. The oil was further purified using a silica plug with ethyl acetate as eluent. (116.3 mg, 88 %): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 6.65 (s, 2H) 3.60-3.49 (m, 14H, CH_2O) 3.39 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, CH_2NH), 3.22 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H, CH_2NH) 2.13 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2CO), 1.87-1.84 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{C}$) 1.38 (s, 9H) ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 171.87, 170.75, 155.94, 133.98, 70.28, 70.22, 70.08, 69.98, 69.74, 40.17, 39.08, 37.12, 33.34, 28.27, 24.53. LC-MS: RT = 1.175 min ($\lambda = 220$ nm), $[\text{M}+\text{H}]^+ = 458.7$ calculated exact mass: 457.24.

Synthesis of 4

Compound 3 (116.3 mg) was dissolved in 2 mL of DCM/TFA (1:1 v/v). Reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature. Mixture was concentrated under reduced pressure to afford a clear oil without further purification (quantitative). RT = 0.811 min ($\lambda = 220$ nm), $[\text{M}+\text{H}]^+ = 358.1$ calculated exact mass: 357.19.

General procedure for synthesis of FL1 and FL2

To a 3 mL DMF solution of compound 4 (80.0 mg) was added FITC (1.1 eq.) or Cy-5-NHS (1.1 eq.) in presence of triethylamine (0.3 mL). Reaction was stirred for 1 hour at room temperature. Mixture was then purified by preparative HPLC using a C18 column (Agilent Zorbax XDB-C18, 21.2 x 150 mm, 5 μ m) where mobile phase A was water + 0.1 % formic acid and mobile phase B was MeOH + 0.1 % formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 30 % B ; 16 min – 95 % B ; 20 min - 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. FL1: RT = 1.217 min (λ = 254 nm), $[M+H]^+$ = 747.2 calculated exact mass: 746.23. FL2: RT = 1.262 (λ = 650 nm), $[M+H]^+$ = 823.7 calculated exact mass: 822.48.

General procedure for synthesis of FL1 or FL2 peptide conjugates

To 10 mg of peptide P3, G23, Scr or Cys was added a 1 mL DMF solution of FL1 (2 eq.) or FL2 (2 eq.) in presence of triethylamine (10 μ L). Reaction was stirred for 1 hour at room temperature. Mixture was then purified by preparative HPLC using a C18 column (Agilent Zorbax XDB-C18, 21.2 x 150 mm, 5 μ m) where mobile phase A was water + 0.1 % formic acid and mobile phase B was MeOH + 0.1 % formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 10 % B ; 16 min – 95 % B ; 20 min - 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. G23-FL1 HRMS m/z $[M + 3H]^{3+}$ calculated for $C_{113}H_{158}N_{25}O_{29}S_2$: 798.7106 found: 798.71082. Scr-FL1 HRMS m/z $[M + 3H]^{3+}$ calculated for $C_{113}H_{158}N_{25}O_{29}S_2$: 798.7106 found: 798.70975. P3-FL1 HRMS m/z $[M + 3H]^{3+}$ calculated for $C_{126}H_{179}N_{28}O_{30}S_2$: 877.1001 found: 877.09934. Cys-FL1 HRMS m/z $[M + 2H]^{2+}$ calculated for $C_{40}H_{45}N_5O_{13}S_2$: 434.6300 found: 434.63181. G23-FL2 HRMS m/z $[M + 3H]^{3+}$ calculated for $C_{124}H_{183}N_{26}O_{25}S_1$: 823.7929 found: 823.79330. Scr-FL2 HRMS m/z $[M + 3H]^{3+}$ calculated for $C_{124}H_{183}N_{26}O_{25}S_1$: 823.7929 found: 823.79325. P3-FL2 HRMS m/z $[M + 3H]^{3+}$ calculated for $C_{137}H_{204}N_{29}O_{26}S_1$: 902.1824 found: 902.18314. Cys-FL2 HRMS m/z $[M + 2H]^{2+}$ calculated for $C_{51}H_{71}N_6O_9S_1$: 472.7574 found: 472.75717.

General procedure for ITC affinity measurement

Calorimetry tests were performed using Microcal VP-ITC (Malvern Instruments Limited, Malvern, UK). Peptides or peptide conjugates were dissolved in Hank's balanced salt solution (HBSS) pH 6.5 to a concentration of 100 μ M and GM1 was dissolved in HBSS pH 6.5 to a concentration of 25 μ M. Samples were heated to 25°C and degassed. Reference chamber was filled with buffer only, test chamber was filled with GM1 and injecting syringe was filled with peptide or peptide conjugate. Chamber temperature was set at 25°C, 25 injections of 10 μ L were performed with an injection time of 20 seconds. Delay between each injection was 360 seconds and stir speed was 351 rpm. Reference power was set at 15 μ cal/sec. The baseline of peptide dilution in buffer was subtracted from the results. Origin software was used to apply a simple interaction model of one binding site to calculate the association and dissociation constants, number of binding sites and enthalpy of binding, using the following equation:(216)

$$Q = \frac{nP_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nP_t} + \frac{1}{nK_a P_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nP_t} + \frac{1}{n_a P_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nP_t}} \right]$$

$$\Delta Q_{(i)} = Q_{(i)} + \frac{dV_{(i)}}{V_0} \left[\frac{Q_{(i)} + Q_{(i-1)}}{2} \right] + Q_{(i-1)}$$

where, P_t is the concentration of protein in the active volume, $dV_{(i)}$ is the displaced volume, V_0 is the volume of the cell, X_t is the concentration of the ligand in the active volume, $Q_{(i)}$ and $Q_{(i-1)}$ are the total heat evolved or absorbed for i th and $(i-1)$ th injections, respectively. Detailed derivation of the equations can be found in the VP ITC manual. Provide an initial estimate of n , K_a and ΔH , which calculates $\Delta Q_{(i)}$ for each injection. Then the program calculates the values of n , K_a , and ΔH that provide the best fit to the calculated and experimental $\Delta Q_{(i)}$.(216) Each experiment was repeated three times. Affinity of P3 for GM1 was analyzed by Microscale Thermophoresis (see supporting information).

Cell culture

T84 cells p20-30 (ATCC® CCL-248™), derived from a lung metastasis of a human colon carcinoma, were maintained in a humidified CO₂ (5 %) incubator at 37°C in DMEM/F12 (1:1) (+L-Glutamine, +15 mM HEPES) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum in the presence of penicillin and streptomycin. Caco-2 colon cells p30-40 (ATCC® HTB-37™) were maintained in a humidified CO₂ (5 %) incubator at 37°C in DMEM (+L-Glutamine, without sodium pyruvate, + 4.5 g/L glucose) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum in the presence of penicillin and streptomycin and non-essential amino acids. GM1 content of each cell line was evaluated by dot-blot in a semi-quantitative method (see supplementary information).

General procedure for internalization by flow cytometry

For internalization studies, 1×10^5 cells per well were plated in a 24-well plate and incubated overnight. After incubation, adhesion and confluence of cells was verified. Cells were then rinsed twice with HBSS (with calcium, magnesium). Peptide conjugates were freshly dissolved in 500 μ L of pre-warmed Opti-MEM® and added to the wells to a 10 μ M final concentration. After 90 minutes incubation, cells were rinsed 3 times with culture media, once with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer (95 % PBS, 5 % FBS, 1.0 mM EDTA). One minute before analysis, 250 μ L of trypan blue 4 mg/mL was added to the cells to quench surface fluorescence of membrane bound conjugates.(217). Cells were then analyzed on a FACS Calibur™ flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). Fold change for each replicate (mean fluorescence intensity; FlowJo software vX.0.7, Ashland, OR) was calculated relatively to the control samples that did not receive any treatment. All experiments were realized in triplicate.

Internalization in presence of a GM1 supplement

GM1 can be given as a supplement as it associates with the cellular membrane and serves as a functional receptor, thereby improving GM1-mediated endocytosis of compounds. (218) Caco-2 cells

were incubated overnight with 80 µg/mL of GM1 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) in serum-free media. The non-cell associated GM1 was washed off with PBS. Cells were then treated as the general procedure for internalization studies with minor modifications: G23-FL1 and P3-FL1 concentrations were set at 1 µM and CTB-FITC at 5 µg/mL. All experiments were realized in triplicate.

Internalization in presence of a ganglioside synthesis inhibitor

PPMP (DL-threo-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol) can be used to block the synthesis of gangliosides, including GM1 and GT1b. (219) Since PPMP is a glucosylceramide synthase inhibitor, the cellular membrane can also be affected in complex ways due to the turnover of gangliosides and ceramide accumulation.(220) Nevertheless, PPMP was reported to inhibit the uptake of CTB in multiple cell lines by downregulating GM1.(218) For PPMP inhibitor studies, cells were grown in cell culture medium and in the presence of 10 µM PPMP for 3 days.(218, 219, 221) They were then treated as internalization studies where G23-FL1 and P3-FL1 concentrations were set at 1 µM and CTB-FITC at 5 µg/mL. All experiments were realized in triplicate.

Permeability through cell monolayers

Permeability studies were conducted as per standardized protocol with minor modifications (111). T84 cells were grown for 10 days on Transwell® (Corning, Corning, NY) permeable supports (polycarbonate membrane pore size 0.4 µm, diameter 12 mm) until TEER values reached >1000 Ω cm² at 37°C measured by Volt-Ohm meter (EMD Millipore Millicell-ERS, Ontario, Canada). Caco-2 cells were grown on Transwell® permeable supports (polycarbonate membrane pore size 0.4 µm, diameter 12 mm) for 21-24 days until TEER values reached >300 Ω cm² at 37°C. Peptide conjugates were added to the apical side at a concentration of 10 µM in a 100 µL volume of Opti-MEM® without phenol red. Basolateral side was filled with 600 µL of Opti-MEM® without phenol red. Samples were taken (200 µL) from the basolateral side at 1, 2 and 4 hours and replaced with fresh Opti-MEM® without phenol red.

Fluorescence was measured in the basolateral side using a Safire microplate reader (Tecan, Seestrasse, Switzerland). The apparent permeability coefficient (P_{app} , unit: cm/s) is the amount of compound transported per time and surface unit. It is calculated according to the following equation:

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt}\right) \times \left(\frac{1}{AC_0}\right)$$

where dQ/dt is the steady-state flux ($\mu\text{mol/s}$), A is the surface area of the filter (cm^2) and C_0 is the initial concentration in the donor chamber (μM).⁽¹¹¹⁾ Finally, TEER values were measured at the end of the experiment to validate the integrity of the membrane. All experiments were realized in triplicate.

General procedure for the synthesis of CTB-BSA(FITC) synthesis using dibenzocyclooctyne linkers: CTB-BSA(FITC) V1 and V2

In two separate Amicon filters (Amicon Ultracel 0.5 mL MWCO 30k), were added 10 μL of BSA(FITC) 5 mg/mL to 490 μL of NaHCO_3 buffer (pH = 8.5) and 50 μL of 1 mg/mL CTB to 450 μL of NaHCO_3 buffer (pH = 8.5). The filters were centrifuged for 5 minutes at 12000 g and washed 4 times with NaHCO_3 to exchange the buffers. The samples were then put upside down and centrifuged at 3300 g for 5 minutes to collect the proteins. 0.5 μL of 40 mM DBCO-NHS linker (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) or DBCO-PEG₄-NHS (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) was added to the aliquot containing CTB and 0.2 μL of N₃-PEG₃-NHS (222) 1 M was added to aliquot containing BSA(FITC). The proteins were left to react for 30 minutes at room temperature. 10 μL of Tris-HCl 1 M was added in each aliquot and reaction was quenched for 30 minutes. The samples were then centrifuged 4 times with PBS in Amicon filters as described above to remove any unreacted linker. CTB-DBCO aliquot was added to the BSA(FITC)-N₃ aliquot and reaction was left overnight at 4°C. The next day, the resulting chimera protein was analyzed by non-denaturing SDS-PAGE (Bio-RAD™). CTB-BSA(FITC) conjugated with DBCO-PEG₄-NHS was called CTB-BSA(FITC) V1, CTB-BSA(FITC) conjugated with DBCO-NHS was called CTB-BSA(FITC) V2.

Procedure for the synthesis of CTB-BSA(FITC) synthesis using GMBS: CTB-BSA(FITC) V3

In two separate Amicon filters (Amicon Ultracel 0.5 mL MWCO 30k), were added 10 μ L of BSA(FITC) 2 mg/mL to 490 μ L of PBS buffer (pH = 7.4) and 15 μ L of CTB 1 mg/mL to 485 μ L of PBS buffer (pH = 7.4). The samples were centrifuged for 5 minutes at 12000 g, and washed 4 times with PBS to exchange the buffers. The filters were then put upside down and centrifuged at 3300 g for 5 minutes to collect the proteins. 5 μ L of GMBS (100 mg/mL in DMSO) was added to the aliquot containing CTB. The reaction was left at room temperature for 60 minutes. CTB-GMBS was washed 4 times with PBS to remove unreacted GMBS. BSA(FITC) was then added to CTB-GMBS and reaction was left overnight at 4°C. The next day, the resulting chimera protein CTB-BSA(FITC) V3 was analyzed by non-denaturing SDS-PAGE (Bio-RAD™).

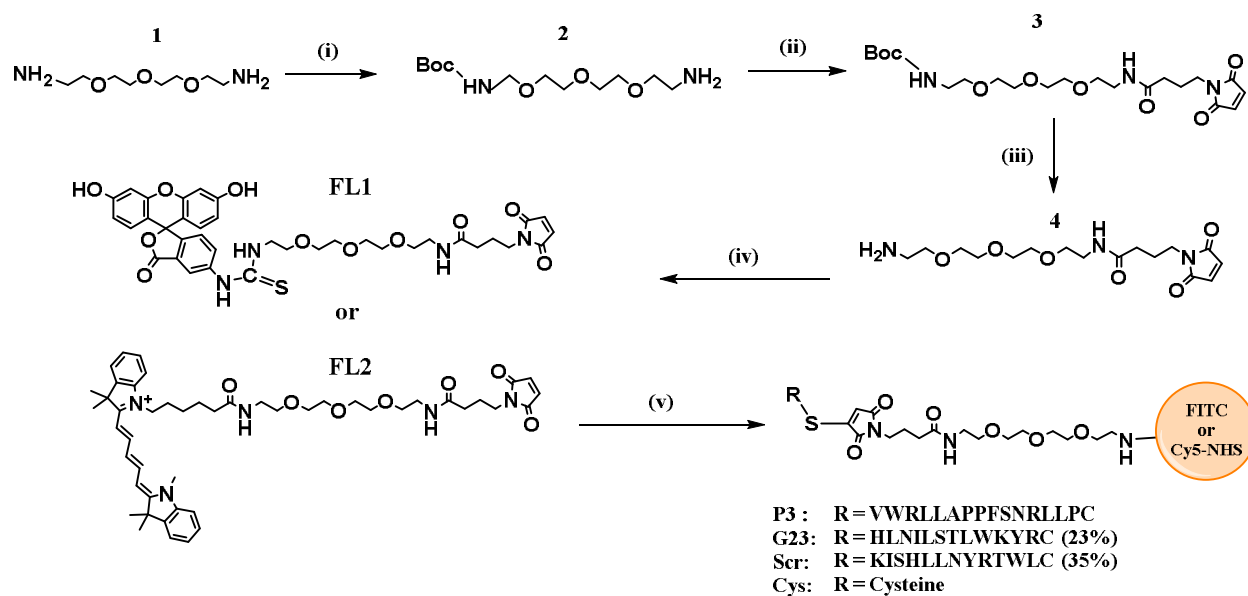
Statistics

Statistical analysis was performed using PRISM 6.01 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). To determine statistically significant differences in internalization and permeability studies, one-way analysis of variance (ANOVA) tests were performed where p values for multiple comparisons were adjusted using the Tukey correction. $p \leq 0.05$ was considered significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Results

Synthesis of the peptide conjugates

Two peptides were selected for their GM1 binding affinity. G23, discovered by phage display and also called Tet1, was reported to show affinity for GT1b (209) and GM1.(212) P3 was also identified by specific phage display using quartz crystal microbalance (QCM).(208) Finally, a scramble version of G23 was used to check the non-specific affinity of the conjugates for GM1.(212, 223) We selected a fluorophore (Cy5-NHS or FITC) as a model drug, since it enables straightforward fluorescence detection and flow cytometry. The fluorophores (Cy5-NHS or FITC) were added on the amino group of a heterobifunctional linker based on a triethylene glycol unit (Scheme 1), frequently used in linker design due to its flexibility and good water-solubility.(224) The peptides (P3, G23, Scr) were condensed through their appended cysteine to the maleimide function of the linker to yield peptide conjugates FL1 or FL2 (Scheme 1). Serving as a negative control for the absence of peptide, a single cysteine was conjugated to the linker to prevent maleimide cross-reactivity with serum proteins in the culture medium. The peptide conjugates were purified by preparative HPLC and characterized by HPLC-MS/MS.



Scheme 3.1: Synthesis of peptide conjugates. Reagents and conditions: (i) Boc_2O , DCM, 5 h at 4 °C then 18 h at RT, DCM/ H_2O extraction; (ii) GMBS, N-methylmorpholine, DCM, room temperature, 16 hours, silica column DCM to EtOAc (iii) DCM/TFA (1:1), room temperature, 1 h; (iv) FITC or Cy5-NHS, Et_3N , DMF, room temperature, 2 h, preparative HPLC; (v) GM1 peptide, room temperature, 2 h, preparative HPLC.

Affinity evaluation of peptide conjugates

Conjugating cell penetrating peptides with fluorescent probes such as FITC can alter the conformation and flexibility of the peptide which in turn can alter the affinity with its target.(225-227) Therefore, the affinity of peptide conjugates with GM1 was verified by isothermal titration calorimetry (ITC).(216, 228) As demonstrated in Table 1, the conjugation of FITC to G23 peptide (G23-FL1) did not alter the affinity for GM1 when compared to G23 alone ($K_d = 418$ nM and 455 nM, respectively). Unexpectedly, the scrambled G23 peptide exhibited a similar affinity for GM1 as the G23 peptide. However, once conjugated to a fluorescent probe (Scr-FL1), the affinity was reduced ($K_d = 2597$ nM). These results suggest that conjugation does indeed impact the affinity, and that non-specific interactions are likely involved into GM1 binding for these peptides. Supporting this idea, we observed that, when G23 was conjugated to a model drug using a short propane spacer, the affinity towards GM1 was too low to be measured by ITC (data not shown). The short spacer was therefore discarded in subsequent studies. Since P3-FL1 exhibited solubility issues at the working peptide concentration (100 μM), it was not possible to measure its affinity for GM1. We therefore used microscale thermophoresis (MST)(229) to measure a K_d of 245 nM of P3-FL1 for GM1 (Figure S1), confirming the affinity was preserved upon conjugation of P3 to FITC.

Table 3.1: Binding affinity of peptides (100 μM) for the receptor GM1 (25 μM) in pH 6.5 HBSS buffer measured by isothermal titration calorimetry (ITC) at 25°C or microscale thermophoresis (MST).

Compound	Affinity constant K_a (M^{-1})	Dissociation constant K_d (nM)	N (sites)	ΔH (cal/mol)
G23	$2.20 E6 \pm 4.74 E5$	455 ± 98	0.302 ± 0.005	$-1.031 E4 \pm 378.7$
Scrambled G23	$2.31 E6 \pm 7.92 E5$	433 ± 148	0.073 ± 0.007	$-2.970 E4 \pm 3933$
G23-FL1	$2.39 E6 \pm 4.66 E5$	418 ± 82	0.161 ± 0.005	$-1.552 E4 \pm 671.1$
Scr-FL1	$3.85 E5 \pm 1.08 E5$	2597 ± 728	0.050 ± 0.024	$-8.477 E4 \pm 4.645 E4$
P3*		245 ± 53		

*Measured by microscale thermophoresis (MST). See Supporting Information and Figure S1.

Internalization of peptide conjugates

Since the peptide conjugates could not be discriminated according to their binding affinity, we compared their internalization into two different polarized cells lines (Caco-2 and T84) by flow cytometry (Figure 3). Caco-2 cells are routinely used to evaluate the *in vitro* permeability of drug candidates.(111) T84 is a human colon adenocarcinoma cell line reported to possess GM1 and where CTB transcytosis has been observed.(204) We compared the GM1 expression of Caco-2 and T84 cells using a semi-quantitative method and confirmed that T84 presented more GM1 than Caco-2 cells (Figure S2).(230, 231)

G23-FL1 and P3-FL1 were internalized significantly more in Caco-2 and T84 cells relative to controls Scr-FL1 and Cys-FL1 (Figure 1A and 1B). To examine the role of GM1 in the uptake, we fed the Caco-2 cells with a supplement of GM1, reported to improve the GM1 insertion in the plasma membrane and increase GM1-mediated uptake.(218) Surprisingly, this treatment did not improve the uptake of the peptide conjugates (Figure 1C), whereas it strongly increased the internalization of the whole cholera toxin subunit B (CTB-FITC) used as the positive control for GM1 binding.(218) The T84 cells, richer in

GM1 than Caco-2 cells (Figure S2), were depleted by a pre-treatment with PPMP, which inhibits the synthesis of gangliosides and thus the membrane availability of GM1 and GT1b.(219) This treatment strongly reduced CTB-FITC uptake but not the internalization of the fluorescent peptide conjugates (Figure 1D). Both results, in Caco-2 and T84, suggest that the observed internalization of fluorescent peptide conjugates did not follow the same internalization pathway as CTB and was probably not only GM1-dependent. Thus, we examined the internalization pathway of G23 peptide conjugates. In preliminary studies (Figure S3A and S3B), the endocytosis of G23-FL1 was partially inhibited by genistein in both cell lines and by methyl- β -cyclodextrin in Caco-2. This suggested the involvement of caveolae-mediated endocytosis.(232-234)

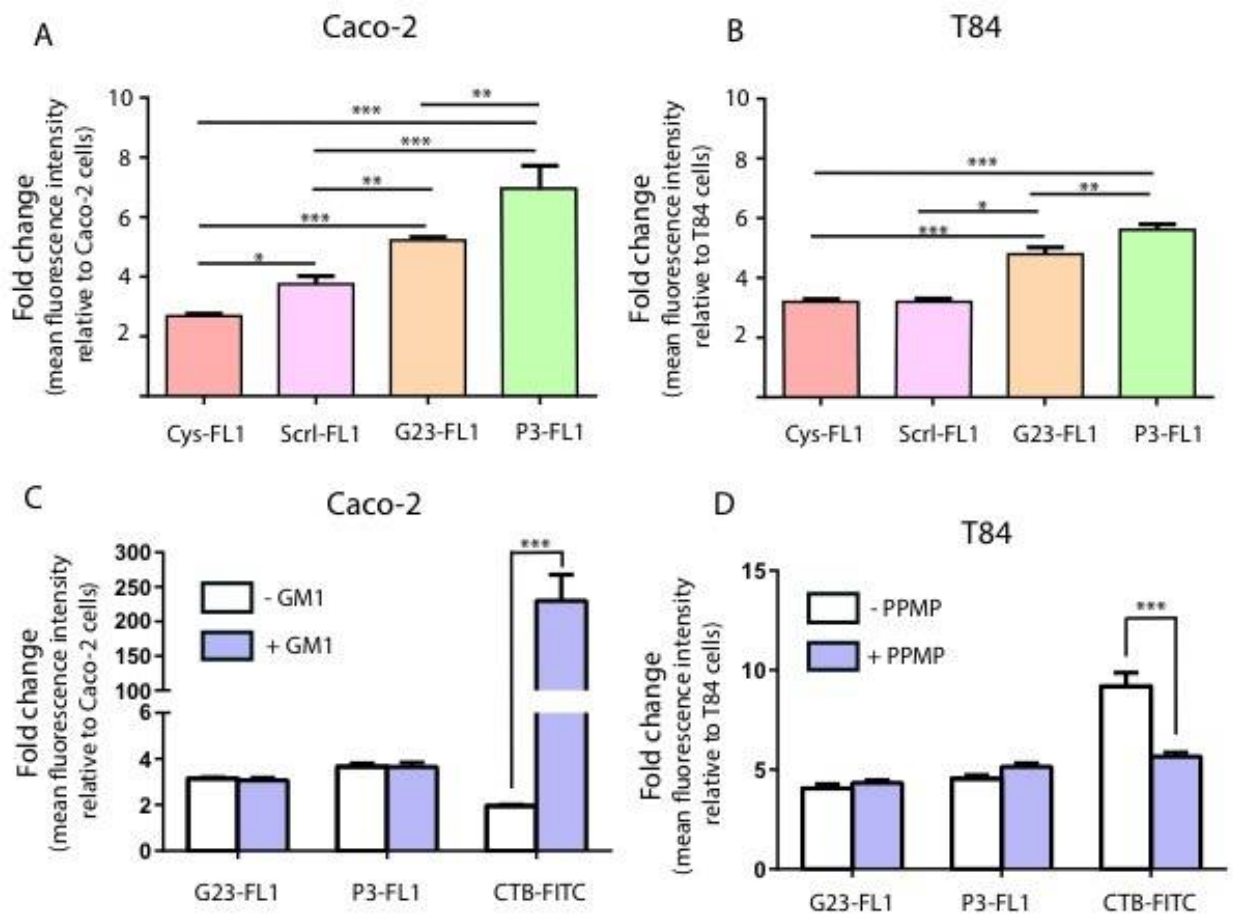


Figure 3.1: Internalization of fluorescent peptide conjugates. Cellular internalization of fluorescent peptide conjugates (G23-FL1, P3-FL1, Scr-FL1 and Cys-FL1) were analyzed by fluorescence activated cell sorting after quenching the external cell fluorescence by trypan blue. Mean fluorescence fold change (n = 3) of Caco-2 (A) and T84 (B) cells after 90 min incubation with fluorescent peptide conjugates as compared to the fluorescence of native cells (n = 3). C) Caco-2 cellular internalization of fluorescent peptide or cholera toxin B (FITC) after GM1 supplement treatment (n = 3). D) T84 cellular internalization of fluorescent peptide or cholera toxin B (FITC) after treatment with the ganglioside inhibitor PPMP (n = 3). Statistical analysis performed with one-way analysis of variance (ANOVA). *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Permeability of peptide conjugates

Even though cellular uptake did not appear to be mediated only by the GM1 receptor in our conditions, the conjugation to the peptide did increase uptake in both cell lines. Therefore, we monitored the permeability enhancement of the different peptide conjugates. In T84 cells, permeability of G23-FL1 was superior to Cys-FL1, representative of the drug alone (Figure 2B). However, there was no statistical difference between the scrambled peptide (Scr-FL1) and G23-FL1 in both cells lines. Also, peptide conjugates with Cy5 (-FL2) had overall permeability inferior to their -FL1 counterparts, highlighting the impact of the conjugated molecule. It should be noted that permeability values P_{app} ($\times 10^{-6} \text{cm s}^{-1}$) were lower than 1 for all compounds in both cell lines and therefore were too low to translate to *in vivo* permeability.(235) Since our results confirmed the active role of GM1 in CTB internalization (Figure 1C), conjugation to the whole cholera toxin subunit B was further explored to increase intestinal permeability using GM1 pathway.

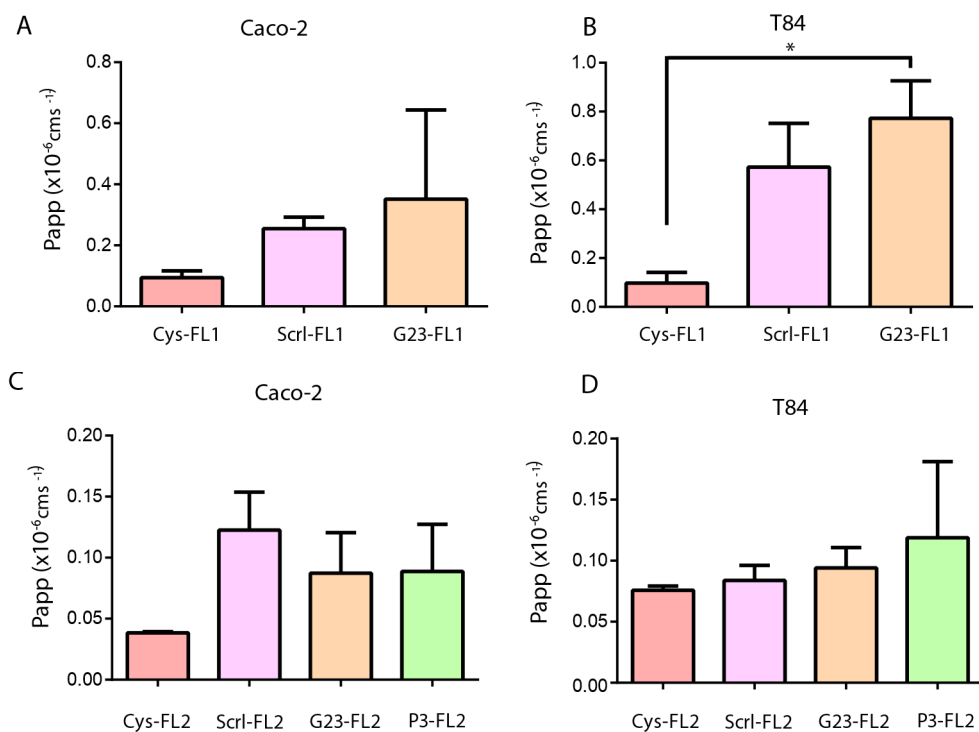


Figure 3.2: Permeability of fluorescent peptides conjugates. Permeability through cellular monolayers of Caco-2 (A, C) and T84 (B, D) was evaluated over 4h for peptides conjugated to FITC (A, B) and Cy5 (C, D). Statistical analysis performed with one-way analysis of variance (ANOVA). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

CTB-BSA fusion protein internalization and permeability

As mentioned in the introduction, the cholera toxin subunit B (CTB) has already been used to prepare fusion protein for oral absorption.(182, 185, 206, 207) As an alternative strategy, we investigated click chemistry to conjugate bovine serum albumin (BSA), used as a model biomacromolecule, to CTB (Figure 3A). Three linkers were compared for their conversion and bioconjugation yield. First, the commercial N- γ -maleimidobutyryl-oxysuccinimide ester (GMBS) was used to link a cysteine of BSA-FITC to a lysine of CTB. Then, we functionalized CTB with dibenzocyclooctyne (DBCO) to react with azide-functionalized BSA, since this biorthogonal conjugation is copper free and produces high yields in biological media. Linkers V1 and V2 differ only by the tetraethylene glycol linker introduced between the proteins to

balance the hydrophobicity of DBCO, which might hide in protein pockets and induce aggregation.(236)
 The reactions were compared using SDS-PAGE electrophoresis in non-denaturing conditions (Figure 3).
 These conditions allowed to visualize the pentameric CTB and its conjugated CTB-BSA(FITC). Using a
 longer and more hydrophilic tetraethylene glycol linker (V1) provided a stronger signal and superior
 yields as compared to other linkers (Figure 3), although all reactions still show the presence of unreacted
 BSA. The slight difference in migration of CTB-BSA(FITC) vs BSA(FITC) and the fragile nature of CTB
 prevented us from purification on AKTA-FPLC. CTB-BSA(FITC) V1 was therefore selected for
 internalization and permeability studies, similar to the peptide conjugates.

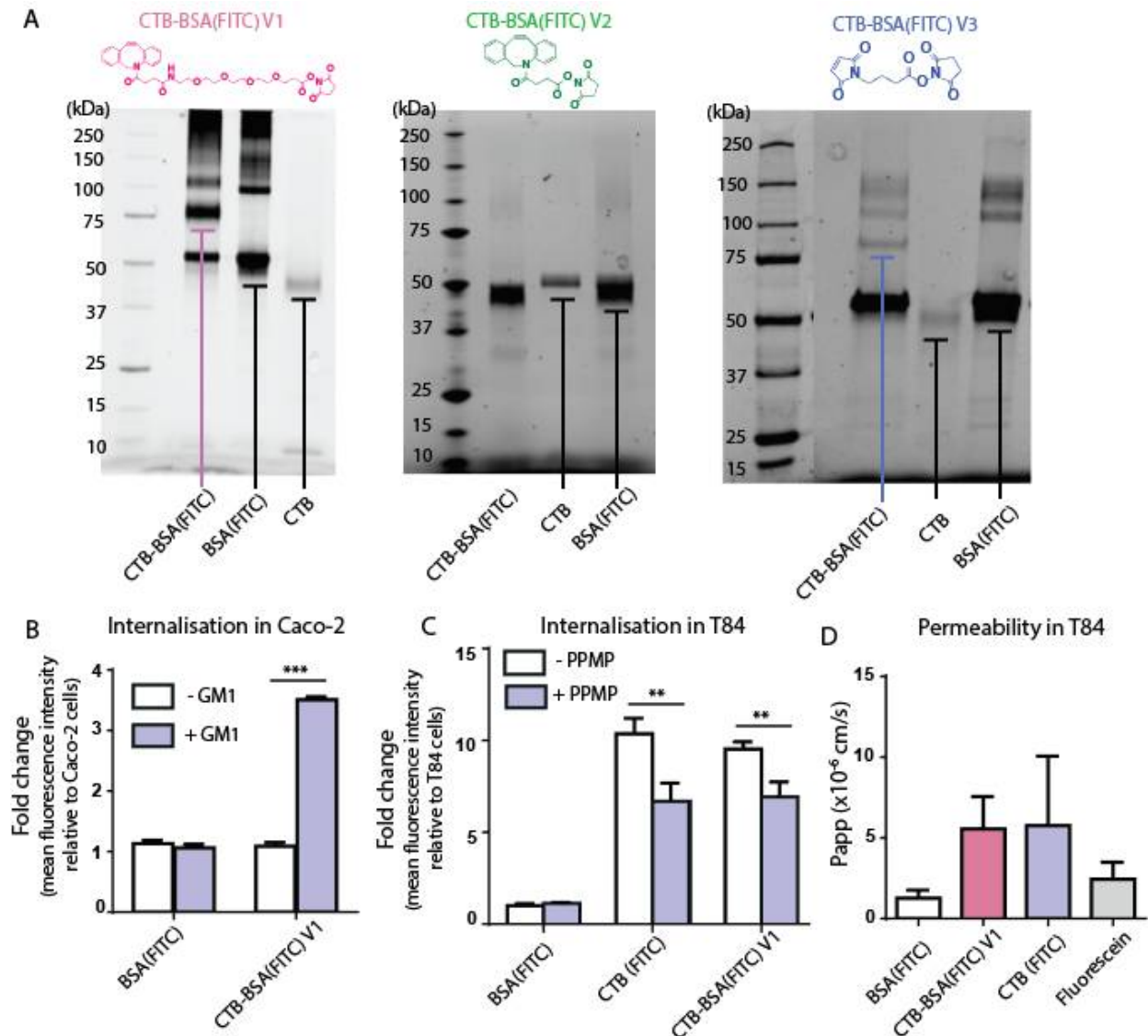


Figure 3.3: CTB-BSA fusion protein synthesis, internalization and permeability studies. A) Qualitative non-denaturing SDS-PAGE of CTB-BSA(FITC) fusion proteins using different linkers. B) Caco-2 cellular internalization of CTB-BSA(FITC) V1 before and after GM1 supplement treatment. C) T84 cellular internalization of CTB-BSA(FITC) V1 before and after treatment with the ganglioside inhibitor PPMP. D) Permeability of CTB-BSA(FITC) V1 in T84 cells. Statistical analysis performed with one-way analysis of variance (ANOVA). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

In Caco-2 cells, internalization of CTB-BSA(FITC) V1 was similar to BSA(FITC) but was strongly increased by a GM1 supplementation (Figure 3B), as observed with parent CTB (Figure 1C). This suggests that internalization is limited by the low amount of GM1 in Caco-2 cells, in agreement with our GM1 assessment (Figure S2). In T84 cells, cell uptake was drastically improved thanks to CTB conjugation and significantly reduced when pretreated with ganglioside inhibitor PPMP (Figure 3C). These results confirmed the successful grafting of BSA-FITC to the CTB and strongly support the GM1-mediated internalization into both cell lines. Finally, the permeability was assessed only in T84, since internalization in Caco-2 cells was not substantial. Permeability through a T84 cell layer was improved using CTB or CTB-BSA in a similar extend, although this was not statistically significant (Figure 3D). We ensured the integrity of the cell monolayer at the end of the experiment by TEER measurement.

Discussion

In this work, poorly permeable drug models were conjugated to GM1-binding peptides or to non-toxic Cholera Toxin subunit B (CTB) to improve their intestinal permeability. The novelty of this work relied on (i) the use of G23 instead of whole CTB for intestinal cell crossing, (ii) the use of G23-soluble conjugates instead of decorated nanoparticles reported for brain targeting and (iii) the optimization of linker click chemistry for bioconjugation with CTB.

The peptides (P3, G23) were selected from literature according to phage display results.(208, 212) To the best of our knowledge, this is the first time that affinity of G23 with GM1 was determined. The affinity constants obtained for P3 by MST ($K_D = 254 \pm 53$) were in the same range as previous literature ($K_D = 1.2 \mu\text{M}$ using quartz-crystal microbalance).(237) However, these values were much lower than the values reported for CTB for GM1 (5 pM to 1 nM, by Surface Plasmon Resonance and on-cell binding measurements).(203) In our conditions, the scramble peptide exhibited similar affinity than the parent G23 peptide (Table 1). In some conditions, the conjugation strongly impacted the affinity, since conjugated Scrl-FL1 reduced its affinity for GM1 (Table 1) and using Cy5 instead of FITC drastically decreased cell permeability (Figure 2). This suggests a major role of non-specific interactions, likely related the physico-chemical properties of the residues (*e.g.* hydrophobicity, charge) rather than the precise sequence. G23 and its conjugates might present in a different spatial organization in solution, which could interfere with the GM1 binding mode. Similar impacts of the conjugation has been reported for several cell penetrating peptides (238) such as polyarginine,(239) Tat,(160) penetratin (160, 240) and Angiopep,(241) for which conjugation modified their physico-chemical properties and reduced their permeation enhancement properties. Finally, it is worth noting that the binding measurements were conducted in a solution of GM1. It is likely that GM1 was micellized in our conditions (25 μM), since the critical micellar concentration (CMC) was reported to between 3.32 μM and 29 μM in aqueous media.(242, 243) In this case, the affinity value might be mainly due to the solubilization of peptides in the core of GM1 micelles, rather than specific interactions.

The second unexpected result was the internalization pathway of peptide conjugates. G23-FL1 and P3-FL1 were weakly but significantly internalized in Caco-2 and T84 cells. However, this uptake was not mediated by GM1, since it was not impacted by a supplement of GM1 in Caco-2 (Figure 2C), nor by inhibition of ganglioside synthesis in T84 (Figure 2D). Consistent with this, the permeability of the peptide conjugates was only slightly increased in T84 as compared to the Cys-FL1, representative of the

model drug alone (Figure 3B). Several hypotheses can be raised: (i) G23 and P3 might bind to GM1 but do not trigger internalization of the conjugates. Since these peptides have been discovered by phage display, they have not been selected on their ability to trigger endocytosis. Although transcytosis has been reported for G23-decorated nanoparticles through *in vitro* BBB models (hCMEC/D3 (213, 244) and bEnd.3 (214)), this was dependent on the nanoparticle composition.(245) Smaller, soluble bioconjugates might not trigger the same endocytosis pathway as nanoparticles. (ii) Conjugation to peptides might alter their internalization pathway, in the same way it impacted the affinity for GM1. This phenomenon was reported for the Angiopep peptide, which exploited different internalization mechanisms alone and when conjugated to a β -secretase inhibitor.(241) Our preliminary study indicated that caveolae-mediated endocytosis was involved in G23-FL1 internalization, since genistein decreased the cell uptake in both cell lines (Figure S3). This process was already reported for internalization of CTB in Caco-2 cells,(246) although several other routes have been reported for CTB in Caco-2, including caveolae-mediated, clathrin-mediated, noncaveolae/nonclathrin-dependent processes.(203) As for G23-decorated nanoparticles, their internalization was a saturated process on hCMEC/D3 cells (213) and involved receptor-mediated uptake on PC-12 (neurons),(210) but the endocytosis pathway was not investigated in Caco-2 cells. Interestingly, G23 ligand increased the uptake of nanoparticles into neurons (PC-12), but did not colocalize with CTB, suggesting a different internalization pathway.(245) Nevertheless, further studies, *i.e.* colocalization studies and/or the effect of dominant negative mutants of specific regulators of endocytosis are necessary to elucidate the endocytotic route of G23-peptide conjugates, since these chemical inhibitors lack specificity.(234)

Conversely to peptides, CTB-FITC exhibited a GM1-dependent pathway in Caco-2 and T84 cells (Figure 1C and 1D). It should be mentioned that in our experiments, Caco-2 did not express much GM1 (Figure S2) and required supplementation with external GM1 to trigger CTB endocytosis (Figure 1C). Our optimization study supported the idea that linkers containing ethylene glycol motifs enhanced the yield

of the conjugated protein. The click chemistry requires only a 2-step reaction: (i) the grafting of a linker onto each protein, followed by (ii) the bioconjugation of functionalized macromolecules. As compared to the recombinant protein strategy, this method is versatile and can be easily translated to conjugate CTB with various macromolecules, such as heparin or siRNA. Furthermore, this strategy allows tuning the linker structure to be cleaved by pH or enzyme in a specific environment.(247) Nevertheless, the purification of the conjugated product, namely from the unreacted macromolecules, should be optimized in each case.

As expected the conjugation of CTB to BSA strongly improved the internalization of BSA in T84, and the process was still GM1-dependent (Figure 3C and 3D). Although the experiment showed a large variability, the P_{app} values reached 5.6 for T84 cells, which is higher than P_{app} of G23 conjugates (Figure 2). Lencer *et al.* have demonstrated that Cholera Toxin (CT) is endocytosed in an apical endosome also called "common endosome"(205). CT is then sorted according to the ceramide anchor of GM1 either to the endoplasmic reticulum (ER) in a retrograde pathway,(202, 203) or to transcytotic vesicles in a distinct pathway.(205) In these studies, transcytosis of CTB through T84 cells was qualitatively observed (by gel electrophoresis), but was not quantified. We might hypothesize that transcytosis traffics a minor amount of CTB as compared to the portion processed through ER. It appears, however, that this process was sufficient to induce an immune response (181) or a pharmacological effect for insulin, myelin binding protein and amyloid-peptide B.(182, 185, 207) Further biodistribution studies after oral administration of fluorescent CTB, could be envisaged to quantify the relevance of this mechanism and its impact in clinical translation.

Conclusion

In this study, we questioned the ability of GM1-binding peptides to improve the permeability of poor permeable drugs through a monolayer of intestinal cells. G23, P3 and Scramble peptide did improve the

internalization into Caco-2 and T84 cells, but did not translate into improved permeability. Our results indicate that conjugation impacted the affinity for GM1 and suggest a strong contribution of non-specific interactions. In both cell lines, the peptides conjugates were internalized independent of the amount of GM1 in the cells, suggesting a different mechanism than CTB. On the other hand, conjugating cholera toxin subunit B (CTB) to a poorly permeable protein such as bovine serum albumin (BSA) provided promising improvements in internalization through a GM1-dependent pathway. Conjugating CTB to biomacromolecules via click chemistry seems a promising approach to improve cellular uptake of proteins such as vaccines, antibodies, heparins or siRNA in intestinal cells.

Acknowledgements: The authors acknowledge FRQNT, GRUM and RQRM for financial support, Martin Jutras for LC-MS/MS experiments, Dr. Badr, Dr. Najmanovich and Dr. Zylber for MST experiments, Sam Babity for English revision, and the summer interns Thien Sa Hoang, Félix-Antoine Le Sieur and Maxime Meloche.

Supporting Information: MST measurements, GM1 quantification in T84 and Caco-2 cells, internalization studies using various inhibitors can be found in supplementary information.

3.1 Supporting information: GM1 Binding Conjugates to Improve Intestinal Permeability

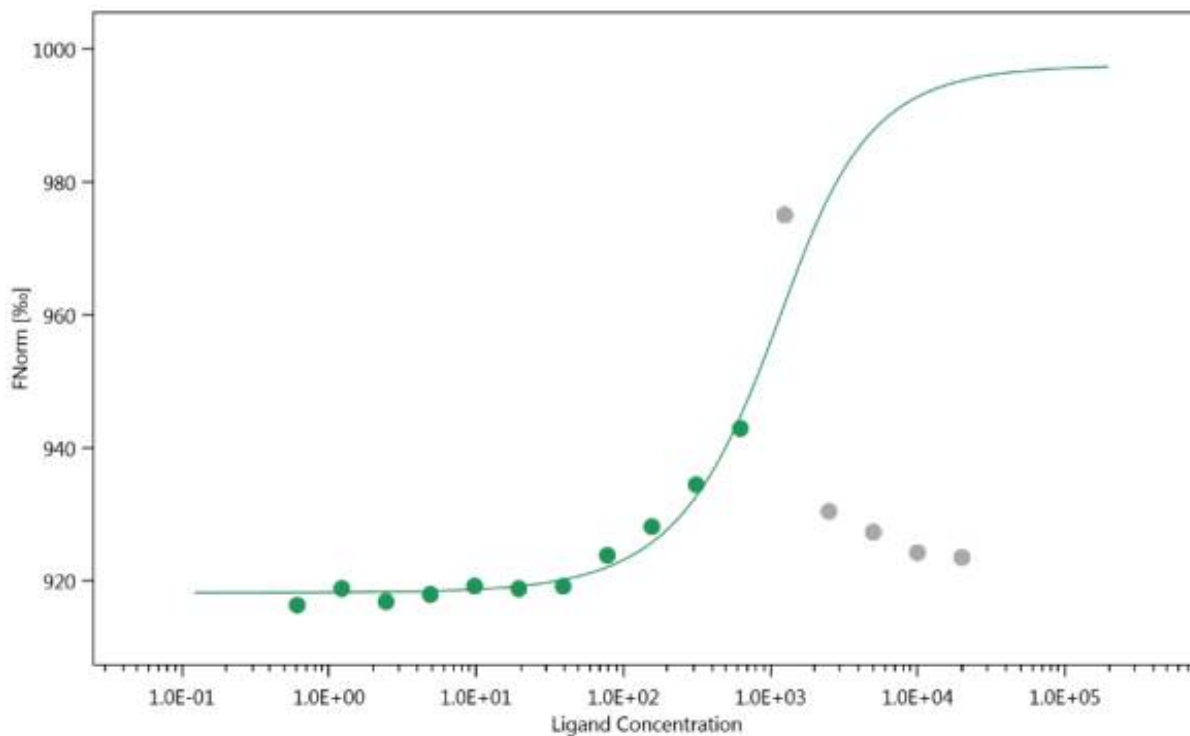


Figure S3.1: MST experiments were carried out in 16 glass capillaries where P3-FL1 concentration was kept constant at 1 μ M and GM1 concentrations varied from 625 nM to 0.61 nM. Samples were loaded in Monolith N.115 for MST analysis where y axis is the normalized fluorescence $F_{norm} = F_{hot}/F_{cold}$ and x axis is the concentration in nM. See below for experimental details.

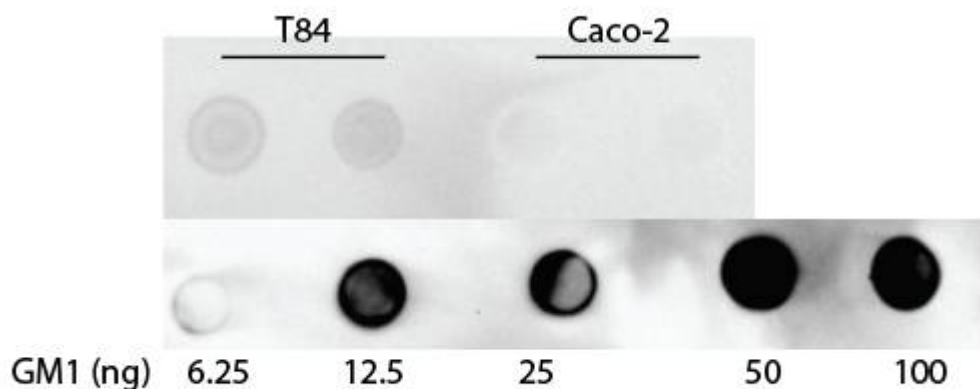


Figure S3.2: Dot blot quantification of GM1 from 5 µg of total protein lysate from T84 or Caco-2 cells.

See below for experimental details.

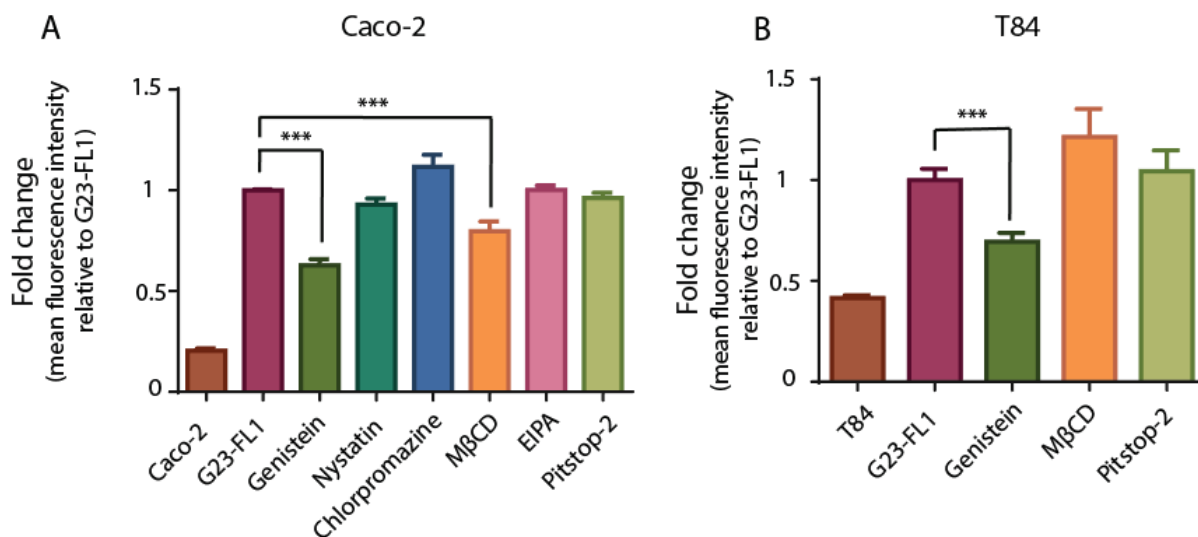


Figure S3.3: Evaluation of endocytosis mechanism of G23-FL1 10 µM by flow cytometry in presence of uptake inhibitors in Caco-2 (A) and T84 cells (B). See below for experimental details.

Affinity evaluation using microscale thermophoresis (MST)

Microscale thermophoresis (MST) was measured using Monolith NT.115 (Nanotemper, München, Germany). MST experiments were carried out in 16 glass capillaries where P3-FL1, G23-FL1 and Scr-FL1

concentrations were kept constant at 1 μM and GM1 concentrations varied from 625 nM to 0.61 nM. Assays were performed in PBS + 0.05% DMSO. After a short incubation time, samples were loaded in apparatus and K_D was determined. K_D values were 579 nM and 3.418 μM for P3-FL1 and G23-FL1 respectively. The affinity for Scr-FL1 was impossible to determine as it was too low.

GM1 quantification in cells by dot-blot (231)

1-1.5 million Caco-2 or T84 cells were seeded in a T25 flask in 5 mL of culture media and grown overnight. The next day, cells were washed twice with PBS buffer (without cations). Cells were then lysed for 30 minutes at 4°C with 1 mL of lysis buffer: 991 μL of tris-buffered saline (TBS: 140 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4), 2 μL of EDTA 0.5M, 2 μL of protease inhibitor, 5 μL of Triton X-100. The lysates were then sonicated and centrifuged at 800 g for 10 minutes. Supernatant was then quantified for total protein content by Bradford reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Supernatant was adjusted to 2.5 mg/mL of total proteins. 2 μL of supernatant was blotted on nitrocellulose membrane alongside a GM1 calibration curve. The membrane was blocked using tris-buffered saline with 0.1 % Tween 20 (TBST) + 5% skim milk for 1 hour at room temperature. The membrane was then incubated with CTB-HRP (200 ng/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 2 hours at room temperature. Membrane was washed 3 times with TBST and detected using Chemiluminescence (Chemidoc XRS+, Bio-Rad, Mississauga, Canada).

Evaluation of internalization mechanism with endocytosis inhibitors

T84 cells were incubated with endocytosis inhibitor ; genistein 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (232); nystatin 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (232), chlorpromazine 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (234), M β CD 10 mM (232), 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl) amiloride(EIPA) 50 μM (248) and Pitstop-2 25 μM (249). Residual DMSO in the assays was 0.2% v/v for all wells. Cells were seeded in 24-well plates (100 000 cells/well) and allowed to attach overnight. The next day, cells were washed with Opti-MEM® and pre-incubated 30 minutes with endocytosis inhibitors diluted in Opti-

MEM®. G23-FL1 10 μ M was then added and incubated for 2 hours. After incubation, cells were rinsed 3 times with culture media, once with PBS, trypsinized and suspended in FACS buffer (95 % PBS, 5 % FBS, 1.0 mM EDTA) for immediate analysis via flow cytometry. Experiments were realized in triplicate.

Chapitre 4 : Anti-HER2-Decitabine Antibody Drug Conjugate: Synthesis and functional in-vitro evaluation

Article en préparation pour Bioconjugate Chemistry

Alexandre Melkoumov[†], Martin Turcotte[†], Domitille de la Tousche[†], Grégoire Leclair[†], John Stagg^{†*}, and Jeanne Leblond Chain^{†*}

[†]*Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, H3C 3J7, Montréal, Québec, Canada*

* Corresponding author. Tel : +1-514-343-6111 ext 0361 ; Fax : +1-514-343-2102 ; E-mail :

Jeanne.leblond-chain@umontreal.ca

Abstract

An immunostimulating drug, decitabine, was conjugated to an antibody targeting the HER2 receptor of breast cancer to form an antibody drug conjugate (ADC). The objective of this approach was to improve the anticancer efficacy of the antibody targeting HER2 currently used in the treatment of breast cancer (Trastuzumab), by combining the immunostimulating properties of decitabine. The anti-HER2 murine antibody was conjugated to decitabine using a cleavable pH-sensitive spacer. The degree of conjugation and colloidal stability of the resulting ADCs were evaluated by hydrophobic interaction chromatography (HIC) and size exclusion chromatography (SEC) respectively. It was possible to graft 4 or 8 molecules of decitabine to the antibody while keep an adequate colloidal stability. The ADC retained its affinity towards cells presenting HER2 receptor such as TUBO and H2N100 cells. Decitabine grafted to the ADC also conserved its therapeutic activity *in vitro* on these cells, as demonstrated by the evaluation of demethylation and gene expression of CXCL9 and CXCL10.

Introduction

Antibody drug conjugates (ADCs) are composed of small therapeutic molecules attached by linkers to a monoclonal antibody (mAb).(34) These constructs take advantage of the higher selectivity and improved pharmacokinetic profile of the mAb. This translates into higher efficacy at the tumor site and reduces the toxicity of the non-specific free drug. As this strategy was developed, four ADCs were commercialized, and more than 60 ADCs are currently in clinical trials. (34, 35)

Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is differently expressed on breast tumor cells and is a common target for ADCs. As such, the new standard of care for breast cancer was the development of ADCs targeting HER2 combined with highly cytotoxic emtansine payload. (250) Unfortunately, most breast cancer develop resistance to these treatments, due to a shared mechanism of resistance between the antibody and the payload. (251) Therefore, it would be of interest to develop an ADC for breast cancer with a novel mechanism of action.(34) Demethylating agents such as decitabine (DAC) have shown clinical anti-tumor efficacy by inducing viral mimicry and other immune mediated effects. (252) Demethylating agents are potent immune modulators but delivering sustained levels can be challenging due to poor stability (253, 254) and increased non specific toxicity (255). Thus, conjugating DAC to an anti-HER2 antibody is an innovative approach to improve the half-life and reduce the toxicity of the bound drug.(256)

Linkers connecting therapeutic molecules to mAbs are crucial for the stability and potency of the ADC.(44) Linkers affect the physico-chemical properties of the ADC, which in turn modifies the antigen-binding properties and the pharmacokinetic profile.(44) The cytotoxic payload must be selectively released in order to improve the therapeutic index of the ADC. Therefore, linkers can be cleavable or non-cleavable. Cleavable linkers are triggered by inherent tumor properties such as 1) pH-sensitivity, 2) protease-sensitivity or 3) glutathione sensitivity. (44) Non-cleavable linkers rely on completed antibody

degradation after internalization. More recently, silyl ether linkers have been explored as cleavable pH-sensitive linkers taking advantage of the reduced endosomal pH (pH = 5-6) compared to cytosolic pH (pH = 7.4). (87) These linkers have previously been explored not only in ADC conjugation, but also in acid labile crosslinkers for biodegradable nanoparticles.(86)

In this work, a murine anti-HER2 antibody was conjugated to decitabine using a silyl ether pH cleavable linker. Drug-to-antibody ratios (DAR) of the resulting ADCs was quantified by hydrophobic interaction chromatography (HIC) and by LC-MS/MS.(257) The aggregation of ADCs, an important pharmacokinetic parameter, was determined by size exclusion chromatography (SEC). Afterwards, *in-vitro* tests were conducted to determine the binding affinity of the ADCs with mammary tumor cells presenting HER2 receptors such as TUBO and H2N100. (258, 259) Also, cell proliferation assays were performed to determine the toxicity of the ADCs in these cells line. On another note, to evaluate the demethylating potency of decitabine on the mAb, methylation assays were done by quantification of 5-methylcytosine % in total DNA. (260, 261) Finally, quantitative PCR experiments were completed on CXCL9 and CXCL10 genes which are essential for T cell homing to tumors and a noted effect of decitabine. (252)

Discussion and results

Synthesis of anti-HER2-decitabine antibody drug conjugate

Antibody 7.16.4 was chosen as the scaffold for conjugation as it is a mouse monoclonal IgG2a targeting HER2 (anti-ErbB2). Demethylating agents such as decitabine have been shown to upregulate immune signaling in cancer through the viral mimicry and other immune mediated effects.(252, 261, 262)

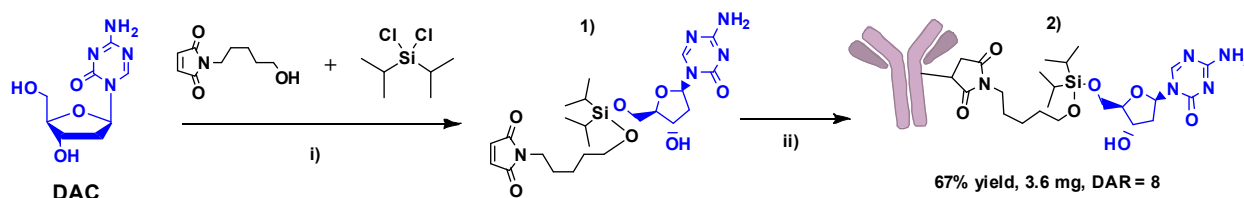
Multiple strategies can be employed to conjugate decitabine to antibody 7.16.4. The chemistry relies on the linkage to the natural amino acids of the antibody such as lysine (NH₂) and cysteine (SH). Indeed, IgG scaffolds have approximately 90 lysine residues, 30 of which are available for conjugation.(44) In addition, in an IgG2 scaffold such as our murine antibody, there are 4 inter-chain disulfide bonds which can be reduced for conjugation.(263) Cysteine conjugation provides a more homogenous subset than lysine conjugation; consequently less variability allowing for an easier characterization method.(44) Furthermore, the more heterogenous mixture in lysine conjugates can modify the antigen-binding properties and negatively affect pharmacokinetics.(44)

pH sensitive linkers based on hydrazone bonds are often utilized for ADC conjugation to take advantage of the lower endosomal pH in cancer cells.(34, 44, 264) Unfortunately, the instability of the hydrazone bond in blood can lead to the premature of release drug which was demonstrated in clinical trials.(44, 45) Silyl ether linkers are more stable than hydrazone linkers and the pH stability can be modulated by altering the steric hindrance around the silicon atom.(86, 87)

Gemcitabine, a structurally similar compound to decitabine, was previously conjugated to trastuzumab (human monoclonal anti-HER2 antibody). (87) We used the same one-pot synthesis where decitabine was reacted with dichlorodispropyl silane and (*N*-(5-hydroxypentyl)maleimide)(265) using a multi-step approach to obtain decitabine silyl ether maleimide (1) as shown in scheme 4.1. (87) Antibody 7.16.4 was then reduced with varying amounts of TCEP for 2 hours at 37 °C and then decitabine silyl ether

maleimide (1) was added to react overnight at 4 °C overnight. The final step consisted of quenching excess decitabine silyl ether maleimide with L-cysteine and purifying by centrifugal filtration.

Scheme 4.1: Synthesis of anti-HER2-decitabine antibody drug conjugate



Reagents and conditions: i) pyridine, DMF, 1 h at 4 °C, then 4 h at RT, preparative HPLC; ii) TCEP 2 h at 37°C, then 4 °C overnight, centrifugal filtration.

Characterisation of anti-HER2-decitabine antibody drug conjugate

Hydrophobic interaction chromatography (HIC) is the reference technique to determine the drug-to-antibody ratio (DAR) in ADCs.(257, 266) HIC relies on the hydrophobic interaction of protein with a hydrophobic adsorbent (column) under high salt buffer conditions. As salt concentration is reduced, the elution of bound molecules is observed as shown in Figure 4.1A; ADCs with DAR \approx 4.17 or DAR \approx 7.93 were obtained. To confirm the DAR \approx 7.93 value, DAC was extracted from the ADC by acidic hydrolysis and quantified by LC-MS/MS. (87, 253) In agreement with the HIC data, decitabine was quantified in amounts corresponding to a DAR of 7.83.

As protein aggregation can severely hinder the pharmacokinetics, size exclusion chromatography (SEC) was used to evaluate qualitatively and quantitatively aggregates.(267) No significant aggregation, characterized by peaks before the 3.4 minute retention time, was noticed in the DAR \approx 4.17 and DAR \approx 7.83 ADCs as shown in Figure 4.1B. A lower intensity and a tailing on ADC DAR 7.83 were observed, suggesting strong adsorption with the column due to the highly hydrophobic nature of the protein.

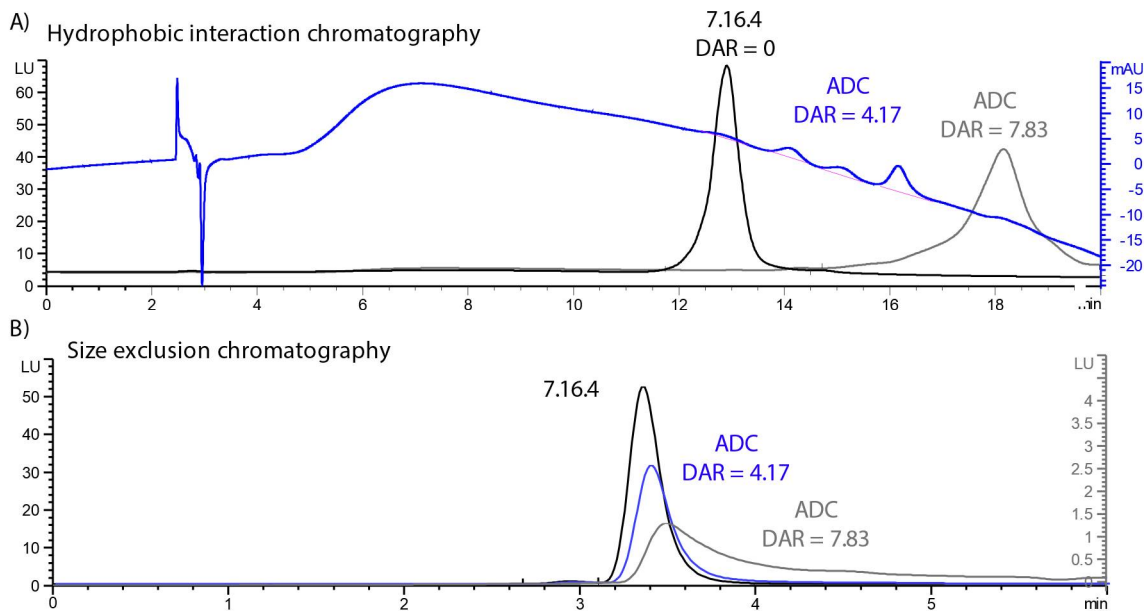


Figure 4.1: A) Drug to antibody ratio (DAR) determination by hydrophobic interaction chromatography (HIC) of antibody 7.16.4, ADC DAR \approx 4.17 and ADC DAR \approx 7.83. B) Aggregation evaluation using size exclusion chromatography (SEC) of antibody 7.16.4, ADC DAR \approx 4.17 and ADC DAR \approx 7.83.

Binding affinity of ADC DAR 8 to H2N100 cells

Conjugating an antibody with multiple drugs can modify its binding affinity towards the antigen.(43)

Therefore, we demonstrated by flow cytometry that the binding affinity of ADC DAR \approx 8 was not modified compared to native antibody 7.16.4 on H2N100 cells, reported to present a significant amount of HER2 (Figure 4.2). This is in agreement with the conjugation to the cysteine sites, which are not located on the epitope of the antibody, and do not interfere with its binding to antigen.

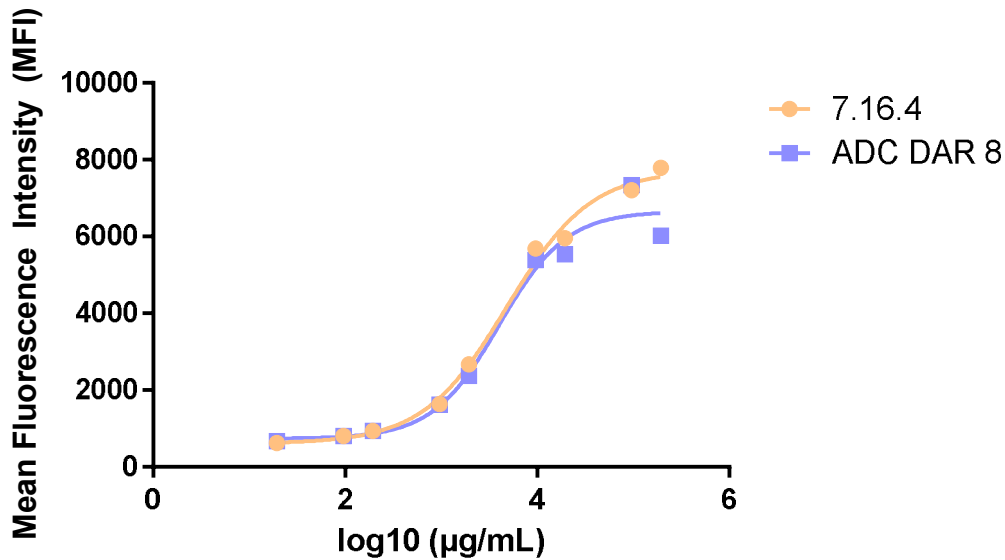


Figure 4.2: Binding affinity of antibody 7.16.4 and ADC DAR 8 to H2N100 cells by flow cytometry.

Proteins were incubated with H2N100 cells for 30 minutes at 4°C, labeled with an anti-mouse IgG probe and analyzed by fluorescence activated cell sorting. A dose response curve was generated with concentrations ranging from 20 µg/mL to 0.002 µg/mL.

Demethylation efficacy of decitabine conjugated to antibody 7.16.4

Once conjugated to antibody 7.16.4, it is important that decitabine continues to hypomethylate DNA to exert its therapeutic effect.(252, 260, 268) This can be problematic since decitabine is a fragile molecule as demonstrated by a half-life of 37–47 minutes in humans or ≈ 3 hours in rats.(253, 254, 269)

Therefore, 5-methylcytosine % in total DNA was quantified as shown in Figure 4.3.(260) In TUBO and H2N100 cells, ADC DAR ≈ 8 had superior demethylating activity compared to antibody 7.16.4.

Furthermore, there was no statistical difference between DAC 0.51 µM and ADC DAR ≈ 8 which possess the same quantity of decitabine. Interestingly, it is possible that the ADC tends to be more efficacious in H2N100 cell line compared to TUBO cell line as previously demonstrated in *in vivo* experiments.(270)

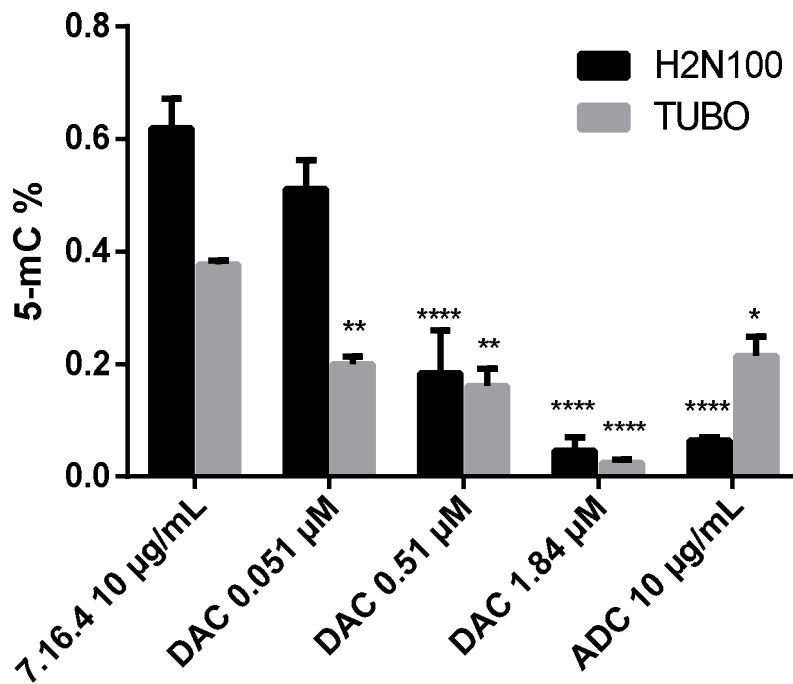


Figure 4.3: Methylation activity of decitabine evaluated by quantification of 5-methylcytosine % (5-mC %) in total DNA in H2N100 and TUBO cells *after 7 days treatment with 7.16.4 antibody 10 µg/mL, decitabine (DAC) 0.051 µM, 0.51 µM and 1.84 µM or ADC DAR 8 10 µg/mL. Means ± SD are shown.*

p<0.05 **p<0.01, **p<0.0001 vs 7.16.4.*

Quantitative PCR of CXCL9 and CXCL10 genes

CXCL9 and CXCL10 are important chemokines that facilitate recruitment of tumour-infiltrating lymphocytes, improving tumour suppressive function. (271, 272) DNA methyltransferase inhibitors agents such as decitabine can upregulate these genes.(273) As demonstrated in Figure 4.4, ADC DAR ≈ 4 upregulates these genes compared to antibody 7.16.4.

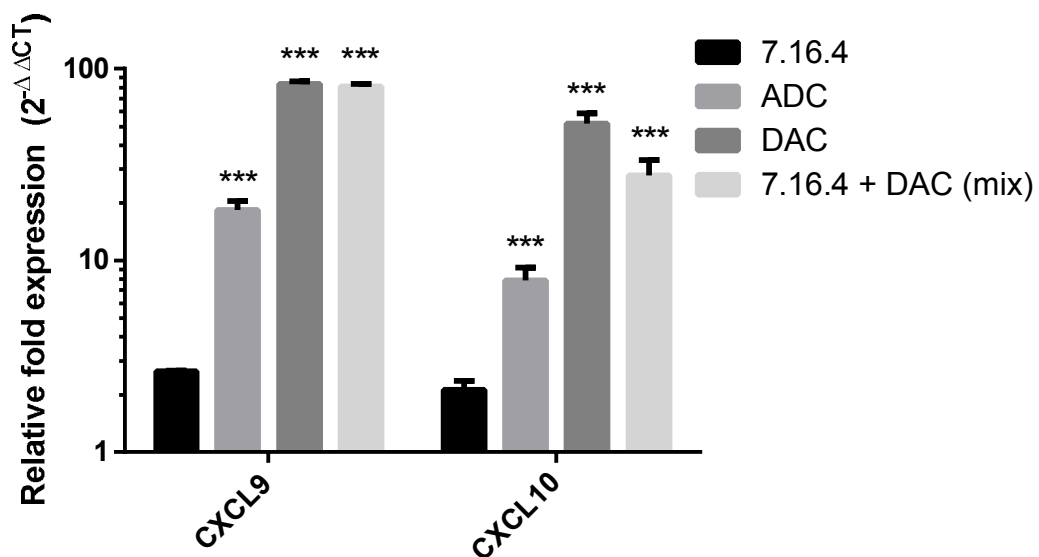


Figure 4.4: Relative gene expression fold in TUBO cells 3 days after treatment with antibody 7.16.4 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ADC DAR 4 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Decitabine (DAC) 270 nM and antibody 7.16.4 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + DAC 270 nM mixture. Quantitative PCR was performed in triplicates for CXCL9 and CXCL10 mRNA levels, and reported as relative levels compared to GAPDH. Means \pm SEM are shown *** $p < 0.001$ one-way ANOVA vs antibody 7.16.4.

Conclusion

In this study, we synthesized an anti-HER2-decitabine antibody drug conjugate using a pH sensitive linker. The one pot synthesis approach can be used for other structurally similar demethylating agents such as azacitidine. Hydrophobic interaction chromatography and LC-MS/MS revealed that we were able to tune the drug-to-antibody ratios to 4 or 8. No significant aggregates were observed by size exclusion chromatography. Binding affinity of the ADC was retained as observed by flow cytometry experiments in H2N100 cells. The pH sensitivity of the silyl ether linker was not evaluated, but the release of decitabine was preserved as demonstrated by the effective demethylation of 5-methylcytosine in H2N100 and TUBO cells. In addition, CXCL9 and CXCL10 genes were upregulated in TUBO cells as demonstrated by qPCR. To our knowledge, this is the first time an antibody was conjugated with an

immune modulator. Required doses for therapeutic effect remain low, because cytotoxicity is not a necessary outcome. This strategy a promising approach to treat problematic anti-HER2 resistant cancers.(274) The next step would be to evaluate the in vivo efficacy on a mouse model of breast cancer (supporting information). Furthermore, translational chemistry to trastuzumab (human anti-HER2) needs to be validated.

Methods

i) Decitabine silyl ether maleimide (1) (87)

In a dry 15 mL round bottom flask, purged with argon, dichlorodiisopropylsilane (40 μ L, 219 μ mol) was dissolved in anhydrous DMF (0.5 mL) and anhydrous pyridine (35 μ L, 434 μ mol) and cooled to 0°C. In another 15 mL round bottom flask, purged with argon, (*N*-(5-hydroxypentyl)maleimide)(265) (25 mg, 110 μ mol) was dissolved in anhydrous DMF (0.5 mL) and cannulated to the reaction mixture dropwise over 1 hour. After 1 hour, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 2 additional hours. The reaction mixture was added to decitabine free base (25 mg, 109 μ mol) in anhydrous DMF (1.2 mL) and was stirred for 2 hours at room temperature. Reaction mixture was then diluted with ethyl acetate (15 mL) and washed 3 times with saturated sodium chloride (3 x 10 mL). Organic phase was dried with magnesium sulfate, filtered and dried under vacuum. The crude was then purified by preparative HPLC with UV detection at 254 nm using a C18 column (Agilent Zorbax XDB-C18, 21.2 x 150 mm, 5 μ m) where mobile phase A was water + 0.1% formic acid and mobile phase B was MeOH + 0.1% formic acid. The mobile phase gradient was: 0 min – 30 % B ; 16 min – 95 % B ; 20 min - 95 % B followed by a column re-equilibration time of 4 min. Retention time of 9.515 min (λ = 254 nm), [M+H]⁺= 524.2 calculated exact mass: 523.2.

ii) Preparation of 7.16.4-decitabine antibody drug conjugates (2) (87)

In a centrifugal filter unit (Amicon Ultracel, 0.5 mL, MWCO 30kDa), was added 50 μ L of 7.16.4 mouse antibody (BioXcell, BE0277) to 450 μ L of 25 mM sodium borate buffer pH 8, 25 mM NaCl, 1mM EDTA. The filter was then centrifuged for 5 minutes at 12000 g and washed 4 times with the same borate buffer to exchange the buffers. The samples were then put upside down and centrifuged at 3300 g for 5 minutes to collect the proteins. Antibody 7.16.4 was then incubated with 2.2, 4.4 eq or 8.8 eq of TCEP for 2 hours at 37 °C to reduce disulfide bonds. After 2 hours, 4.4 or 8.8 equivalents of decitabine silyl ether maleimide (1) were added and the reaction was cooled to 0°C and left overnight. At the end of the reaction, L-cysteine hydrochloride was added to the reaction to a final concentration of 1 mM to quench the excess of decitabine silyl ether maleimide. The resulting ADCs were purified by using a centrifugal filter unit (Amicon Ultracel, 0.5 mL, MWCO 30kDa), with a PBS pH 7.4 as exchange buffer. ADCs with an average DAR of 4 and 8 were retained for further studies.

DAR determination by Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)

Antibody 7.HIC was carried out on Agilent 1100 system on a MabPac HIC-10, 100 x 4.6mM, 5 μ m column (ThermoFisher, Mississauga, ON). Mobile phase A consisted of 3M sodium acetate in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) and mobile phase B of 20 mM phosphate buffer + 10% isopropyl alcohol (IPA). Gradient was 100% mobile phase A to 100% mobile phase B in 20 minutes. 5 μ L of 1 mg/mL protein was injected with a flow rate set at 0.5 mL/min at 25 °C and detection by fluorescence with FLD detector set at λ_{exc} = 280 nm, λ_{em} = 350 nm.

Aggregation determination by Size Exclusion Chromatography (SEC)

SEC was carried out on Agilent 1100 system using SEC Protein BEH 200 Å 4.6 x 150mm 1.7 μ m column (Waters, Mississauga, ON). Mobile phase was 100 mM sodium phosphate + 200 mM NaCl, pH 6.8 + 10% IPA. Flow rate was set at 0.35 mL/min in isocratic mode at 25 °C. Injection volume of 1 mg/mL of protein was 1 μ l and detected by fluorescence with FLD detector set at λ_{exc} = 280 nm, λ_{em} = 350 nm.

Decitabine quantification in ADC by LC-MS/MS

Extraction of decitabine from ADC was performed as previously published.(87) Briefly, 20 µL of ADC was mixed with 80 µL of ACN TFA 1% for 15 minutes to cleave decitabine and precipitate the antibody.

Protein was then centrifuged, and supernatant was quantified on an AB/SCIEX 4000 QTRAP LC-MS/MS using HILIC Thermo Betasil Silica, 50 x 3mm, 5 µm column. Flow rate was set at 0.85 mL/min at 45°C running a gradient mobile phase from A: water + 0.02% TFA + 10 mM NH₄ formate to B: acetonitrile + 0.1% formic acid (96% to 40%B in 2 min, 50% for 0.5 min, and then equilibrated to 96% B for 2 min). MS/MS parameters in ESI+ mode: MRM 229 >113, Declustering at 40 V, collision energy at 18 V.

Cell culture

TUBO and H2N100 cells were initially isolated from BALB/c MMTV-NeuT transgenic mice. (275, 276) TUBO cells were generously donated in 2014 from Dr. Jason Steel (University of Cincinnati, Cincinnati, OH) and used within less than 10 freeze-thaw cycles. H2N100 cells were derived in the laboratory of Dr. Mark J. Smyth (QIMR Berghofer Medical Research, Herston, Queensland, Australia) and used within less than 10 freeze-thaw cycles. TUBO cells were cultured in complete DMEM supplemented with 10% serum, and H2N100 cells were cultured in RPMI supplemented with 10% serum, HEPES, glutamax, nonessential amino acid, and sodium pyruvate. All cell lines were cultured at 37°C under humidified conditions and 5% CO₂, and routinely tested for *Mycoplasma* (MycAlert Detection Kit from Lonza).

Binding affinity of ADC to H2N100 cells by flow cytometry

H2N100 cells cultured in DMEM supplemented with 10% FBS were trypsinized and washed with FACS buffer

7.16.4 antibody and ADC DAR 8 were diluted to 9 dilutions ranging from 20 µg/mL to 0.002 µg/mL in FACS buffer. 100 µL of protein was incubated with H2N100 cells for 30 minutes at 4°C, then washed with

FACS buffer and concentrated by centrifugation. 98 μ L of Master mix with 1% of IgG2A-PE was added to cells and incubate for 30 minutes. Cells were washed with FACS buffer and resuspended in 300 μ L facs buffer. Samples were analyzed on a Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, ON) and data analyzed with FlowJo software.

Methylation assay by quantification of 5-methylcytosine % in total DNA

H2N100 and TUBO cells were plated in a 12-wells plate at 75000 cells per well. They were then incubated for 2 and 7 days with 7.16.4 antibody 10 μ g/mL, decitabine (DAC) 0.051 μ M, 0.51 μ M and 1.84 μ M or ADC DAR 8 10 μ g/mL. A second treatment with compounds was given to cells after 4 days of incubation. Genomic DNA was extracted using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Toronto, Canada) and 5-methylcytosine (methylated DNA) was quantified using the Methylated DNA quantification Kit (ab117128, Abcam, Toronto, Canada) read on a microplate reader at 450 nM. Measurements after 2 days were inconclusive and not shown.

Quantitative PCR

TUBO cells were incubated with antibody 7.16.4 10 μ g/mL, ADC DAR 4 10 μ g/mL, DAC 270 nM, and 7.16.4 10 μ g/mL + DAC 270 nM (mix) for 3. RNA was extracted from cells pellets with RNeasy Mini Kit(Qiagen) and quantified by a Nanodrop spectrometer (Thermo Scientific). 500 ng of RNA was reverse transcribed with qScript cDNA Supermix (Quanta Bioscience, Beverly, MA). Real-time PCR was done using Taqman Master Mix and Gene Expression Assays primers and probes (mouse: CCL2, CXCL9, CXCL10, GAPDH, β -actin, Applied Biosystems) on the StepOnePlus instrument and analyzed with StepOne software V.2.3 (Applied Biosystems). Reaction was performed in triplicate and relative expression of genes was normalized to GAPDH and relative to TUBO control cells.

4.1 Supporting information: Anti-HER2-Decitabine Antibody Drug Conjugate: Synthesis and functional in-vitro evaluation

p.4

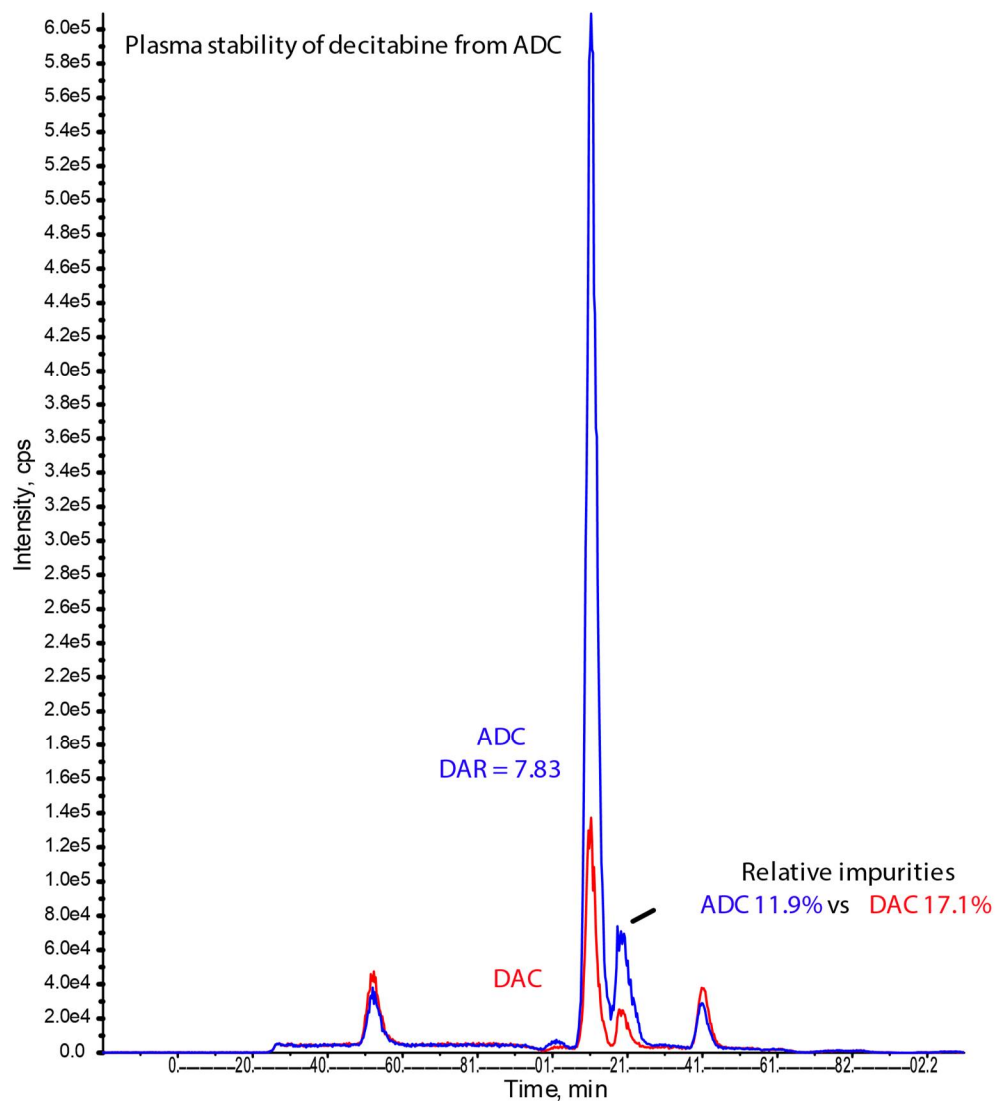


Figure S4.1: Plasma stability evaluation of ADC by direct quantification of decitabine by LC-MS/MS. ADC was incubated in plasma for 4 hours at 37°C then precipitated in acetonitrile TFA 1%. After 15 minutes in TFA 1%, unbound decitabine in supernatant was quantified on a HILIC Thermo Betasil Silica, 50 x 3mm, 5 µm column: flow rate at 0.85 mL/min at 45°C running a gradient mobile phase from A: water + 0.02% TFA + 10 mM NH₄ formate to B: acetonitrile + 0.1% formic acid (96% to 40%B in 2 min).

Decitabine quantification in ADC and plasma stability evaluation by LC-MS/MS

Extraction of decitabine from ADC was performed as previously published.(87) Briefly, 20 μL of ADC was mixed with 80 μL of ACN TFA 1% for 15 minutes to cleave decitabine and precipitate the antibody. Protein was then centrifuged, and supernatant was quantified on an AB/SCIEX 4000 QTRAP LC-MS/MS using HILIC Thermo Betasil Silica, 50 x 3mm, 5 μm column. Flow rate was set at 0.85 mL/min at 45°C running a gradient mobile phase from A: water + 0.02% TFA + 10 mM NH_4 formate to B: acetonitrile + 0.1% formic acid (96% to 40%B in 2 min, 50% for 0.5 min, and then equilibrated to 96% B for 2 min). MS/MS parameters in ESI+ mode: MRM 229 >113, Declustering at 40 V, CE at 18 V.

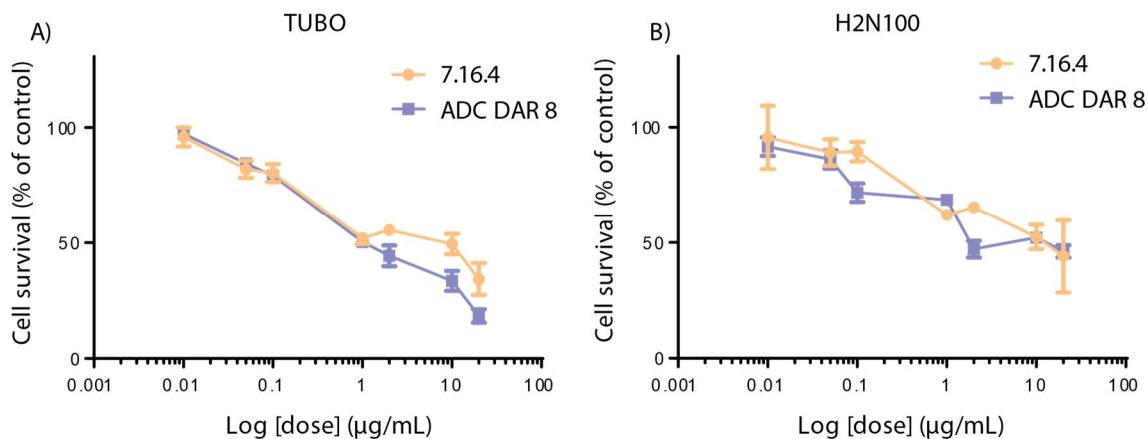


Figure S4.2: Cell proliferation in A) TUBO and B) H2N100 cells 3 days after single treatment of antibody 7.16.4 or ADC DAR 8.

Cell proliferation assay

H2N100 and TUBO cells were plated in a 96 well plate with 5000 cells per well and incubated overnight. The next day, media was changed for media containing ADC DAR 8 or antibody 7.16.4 in concentrations

ranging from 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3 days. Cells were then detached, and cell survival was evaluated using CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA).

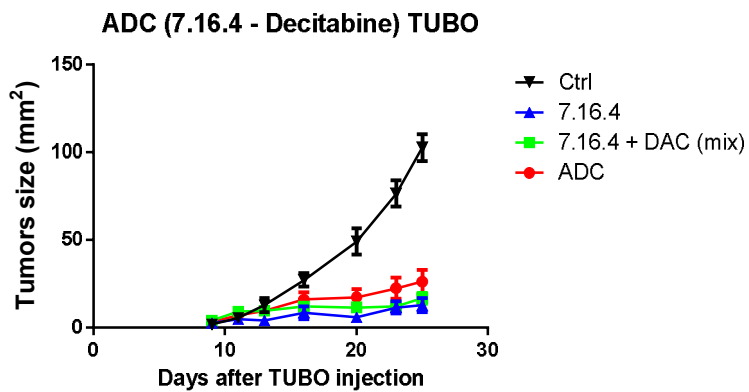


Figure S4.3: In vivo tumour growth in mouse model efficacy evaluation of ADC vs 7.16.4 vs 7.16.4 + DAC (mix)

Chapitre 5 : Discussion

5.1 Choix de l'espaceur

L'objectif premier de cette thèse était de synthétiser des conjugués de principes actifs modèles avec un ligand reconnaissant le GM1 afin d'améliorer la biodisponibilité orale ou avec un anticorps ciblant le récepteur HER2 afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique dans le cancer du sein.

Pour parvenir à cet objectif, il fallait d'abord synthétiser et caractériser une série d'espaceurs de propriétés diverses pour conjuguer un principe actif à un ligand de nature peptidique. En utilisant cette librairie d'espaceurs, il a été possible de synthétiser des conjugués de peptide reconnaissant le GM1 avec plusieurs médicaments dont des antibiotiques injectables ou des fluorophores. Dans un second temps, on a réussi à conjuguer le médicament décitabine sur l'anticorps 16.4.1, équivalent murin du Trastuzumab. Ces projets ont permis de mettre en lumière certains paramètres importants dans le design et le choix de l'espaceur qui seront détaillés dans les sections qui suivent

5.1.1 Choix de l'espaceur selon le rendement et les fonctions disponibles

Le choix d'espaceurs bifonctionnels dépend tout d'abord de la fonction chimique disponible sur le principe actif et sur le ligand. Les principes actifs utilisés dans ce projet présentaient une fonction acide carboxylique (-COOH) ou amine (-NH₂) tandis que le ligand peptidique présentait une fonction thiol (-SH) grâce à la présence de cystéines. D'un point de vue rendement, on a remarqué que la réaction entre une fonction alcène d'un espaceur (par exemple, espaceurs 4, 9, 10 du chapitre 2) et le thiol du ligand avait un faible rendement. De plus, l'utilisation d'un activateur UV (lampe UV) durant la synthèse pouvait dégrader certains principes actifs (ouverture du cycle β -lactamines) ou fluorophores modèles (blanchiment du FITC). Pour pallier ce problème, un espaceur ayant une fonction maléimide a été développé. Cette fonction maléimide possède une stabilité suffisante pour les expériences *in vitro* de cette thèse. C'est la fonction la plus rapportée pour les anticorps conjugués à un médicament (ADC)

actuellement, grâce à l'efficacité et à la sélectivité du couplage.(34) Il a été récemment rapporté que la liaison thiol-maléimide pourrait être partiellement réversible et s'échanger avec d'autres cystéines présentes dans le plasma, comme sur l'albumine.(34) Dans le cas d'une utilisation *in vivo*, il serait alors possible d'utiliser un maléimide auto-hydrolysant avec une stabilité plasmatique plus élevée.(277) Cette option est surtout intéressante pour la synthèse d'ADCs, qui doivent circuler dans le sang pour parfois plusieurs semaines.

Parfois il n'est pas possible d'utiliser un seul espaceur bifonctionnel pour la synthèse d'un conjugué car les deux composantes possèdent exactement les mêmes fonctions, comme par exemple dans le cas deux protéines (chapitre 3). À cet effet, on a utilisé la chimie "click" où la première protéine était conjuguée avec un espaceur ayant en bout de chaîne une fonction azide et une la deuxième protéine avec un espaceur ayant une fonction alcyne (dibenzocyclooctyne). La réaction entre la fonction azide et alcyne est très rapide et hautement spécifique.(278) Cette stratégie a permis de préparer des conjugués de deux protéines sans avoir recours à la synthèse par génie génétique dans des bactéries ou levures. La stratégie de synthèse par génie génétique permet d'obtenir des conjugués très purs, mais prend plus de temps et n'est applicable que pour des conjugués protéine-protéine.

5.1.2 Choix de l'espaceur selon l'affinité du ligand envers sa cible

Les conjugués utilisant un espaceur court (6 atomes ou moins, par exemple P4G23, chapitre 2) ont perdu leur affinité avec le récepteur GM1, selon la mesure par titration calorimétrique isotherme. La nature hydrophobe, la longueur ou la flexibilité de l'espaceur peuvent affecter l'affinité du conjugué.(75) De ce fait, les espaceurs utilisés dans le chapitre 3 et 4 sont tous des espaceurs ayant une longueur de 6 atomes ou plus. On a noté par cytométrie en flux que l'ADC ayant un espaceur de 6 atomes et plus conserve son affinité avec sa cible cellulaire. Aussi, dans le chapitre 3 nous n'avons utilisé que des espaceurs ayant une répétition éthylène glycol, afin de favoriser l'hydratation du ligand et sa présentation vers sa cible. Il serait

possible de transposer ces connaissances pour la synthèse d'ADC. En effet, en augmentant la nature hydrophile de l'ADC, le profil pharmacocinétique ne pourrait que s'améliorer car l'ADC a moins de chances de s'agréger et d'être éliminé.(44)

5.1.3 Choix de l'espaceur selon l'efficacité thérapeutique du principe actif

Initialement, des espaceurs clivables étaient envisagés pour la synthèse des conjugués reconnaissant le récepteur GM1. Le but était de s'assurer que le principe actif soit relargué dans la circulation systémique sans résidus de l'espaceur. Cependant, la perméabilité de ces premiers composés synthétisés avec un espaceur clivable était nulle, et il n'était pas possible de conclure si le principe actif était relargué avant le passage cellulaire ou si l'ensemble du conjugué n'était pas perméable. Nous avons donc poursuivi avec un espaceur non-clivable afin de mieux étudier la perméabilité des conjugués. Dans le cas des ADC, le conjugué présentait un espaceur pH-sensible (fonction silyl ether). Nos résultats ont montré que l'efficacité du principe actif décitabine était maintenue après la conjugaison. Cette efficacité a été validée par des tests de méthylation de l'ADN et des tests d'expression génique. Puisque la décitabine a une action sur l'ADN du noyau, ces résultats montrent que l'espaceur s'est clivé, probablement dans l'endosome, et a permis la diffusion de la décitabine au noyau. Pour de futures études, il serait donc raisonnable d'envisager un espaceur non clivable pour optimiser la synthèse du conjugué, puis d'introduire un espaceur clivable si le principe actif nécessite une livraison intracellulaire tel que dans le cas de la livraison de la décitabine via un ADC reconnaissant le récepteur HER2. L'espaceur non clivable pourrait alors servir de contrôle négatif.

5.2 Choix de la cible

Un second objectif important de cette thèse était d'améliorer l'internalisation et la perméabilité intestinale de composés peu perméables en utilisant le récepteur GM1. Pour cela, l'internalisation et la

perméabilité de composés fluorescents ayant un ligand reconnaissant GM1 ont été évaluées dans des modèles cellulaires tel que documenté dans le chapitre 3.

5.2.1 Internalisation des conjugués

Il a été possible d'augmenter l'internalisation de fluorophores peu perméables conjugués à un peptide reconnaissant le GM1 dans les cellules intestinales. Cependant, tel que démontré dans le chapitre 3, cette internalisation dépend peu du récepteur GM1. Des interactions non-spécifiques semblent jouer un rôle important dans l'internalisation des composés. En revanche, les conjugués reliés à la sous-unité B de la toxine du choléra étaient internalisés par un mécanisme dépendant du GM1. Ceci est probablement dû au fait que la CTB est un ligand beaucoup plus spécifique et puissant que les peptides utilisés. Il est aussi important de noter que l'internalisation du composé médié par le GM1 est documentée seulement avec la CTB. Les études ne démontrent pas qu'un peptide reconnaissant le récepteur GM1 est ensuite internalisé.(237) Notre hypothèse de travail « Les principes actifs conjugués à un peptide reconnaissant le GM1 auront une perméabilité supérieure à travers les cellules intestinales grâce à la présence de GM1 » n'a donc pas pu être confirmée. Toutefois, la troisième « Le principe actif modèle conjugué avec la sous-unité B de la toxine du choléra (CTB) aura une perméabilité supérieure à travers les cellules intestinales grâce à la présence de GM1. » a été confirmée. Pour le futur, il est recommandé de préférer un ligand dont le mécanisme d'internalisation médié par le récepteur est documenté, plutôt que la simple affinité avec le récepteur tel que la liaison et la transcytose de la partie Fc via le récepteur FcRn. Par exemple, la cible HER2 est très bien documentée et il existe plusieurs ADCs en clinique qui ciblent le HER2. L'internalisation de l'ADC du chapitre 4 était donc un résultat attendu.

5.2.2 Perméabilité des conjugués

Une fois le conjugué internalisé dans la cellule, il est important qu'il se transloque du côté basolatéral afin de rejoindre la circulation systémique. La perméabilité est un paramètre qui permet d'améliorer la

biodisponibilité orale. Ce phénomène de translocation ou transcytose est documenté avec la CTB, quoique pas aussi bien détaillé que le phénomène d'internalisation. Des auteurs ont décrit que la transcytose de la CTB passe par un endosome commun (inconnu) qui lui permet d'atteindre le côté basolatéral.(187) Le phénomène de transcytose n'a pas été documenté avec les peptides reconnaissant le récepteur GM1. Georgieva et coll. ont démontré que des nanoparticules décorées avec des peptides reconnaissant le GM1 avaient une perméabilité plus élevée à travers un modèle *in vitro* d'une barrière hémato-encéphalique.(212) Néanmoins, il est difficile de dire si la perméabilité observée dans cette étude est reliée à la liaison au récepteur GM1, ou au véhicule (particule polymérique) car la particule possédait une perméabilité de base. Il est possible que le peptide favorise l'affinité pour la membrane cellulaire, puis que le mécanisme de transcytose soit favorisé par la présence de la particule polymérique.

Dans ce projet de thèse, il a été possible de démontrer que la perméabilité des conjugués ayant un peptide reconnaissant le GM1 était plus élevée que les contrôles. On croit que le phénomène n'est pas exclusivement médié par le GM1 à cause des expériences d'internalisation. Pour ce qui est du conjugué CTB, il paraît être plus perméable que son contrôle. De plus, le mécanisme dépend probablement du GM1, mais ceci reste à valider. En effet, il serait intéressant de faire une expérience de microscopie confocale sur des cellules intestinales ou un modèle *ex-vivo* afin de valider le processus de transcytose.(187)

La transcytose n'était pas un effet recherché ou évalué pour l'ADC documenté dans le chapitre 4. En effet, l'anticorps est administré par voie injectable et se redistribue au niveau systémique.

5.3 Impact clinique

La présence de ganglioside GM1 au niveau intestinal est bien documentée et représente la cause d'une intoxication à la toxine du choléra. Récemment, la quantification du GM1 au niveau intestinal a été revue à la baisse de 3% à 1% des lipides liant un acide sialique par une quantification moins sujette à la contamination.(279) De plus, certains auteurs ont questionné la pertinence du récepteur GM1 pour une

intoxication à la CTB.(280) Ils ont démontré que la CTB se lie à la portion fucose de l'antigène Lewis X présent sur les cellules intestinales. Cet antigène ressemble par sa nature physicochimique à la portion sucre du ganglioside GM1. Ces études soulèvent l'hypothèse d'autres mécanismes d'internalisation que celui médié par le GM1. Il serait alors possible d'envisager des mécanismes collatéraux similaires à la toxine de Shiga (Figure 28, chapitre 1) pour la CTB.

Les peptides reconnaissant le GM1 n'apportent pas suffisamment de bénéfices pour être utilisés comme ligands de conjugaison pour augmenter la perméabilité intestinale. De plus, considérant que ces peptides se dégradent dans l'estomac par les enzymes gastriques et le pH acide, il sera nécessaire de combiner les conjugués avec une formulation ayant un inhibiteur d'enzymes car les enzymes de dégradation sont présentes à travers l'intestin et un enrobage entérique pour protéger du pH gastrique.

Les conjugués utilisant la CTB comme ligand paraissent nettement plus perméables. De plus, tel que décrit dans le chapitre 3, des études ont démontré des bienfaits systémiques tels que la diminution de plaques amyloïde dans un modèle de souris Alzheimer d'une administration orale d'un conjugué de la CTB.(184) Ces protéines fusions utilisant la CTB nécessiteraient une formulation conférant une protection entérique. De plus, due à la nature très variable de cette perméabilité, il serait plus sécuritaire d'utiliser des médicaments à index thérapeutique très large, car leur concentration plasmatique pourrait varier largement en fonction de l'absorption. Enfin, il serait pertinent d'évaluer la toxicité d'une administration répétée de CTB, surtout au niveau immunologique. La toxicité immédiate a déjà été évaluée dans la vaccination comme adjuvant.(281)

5.4 Choix du ligand

Un des objectifs était de cibler le conjugué au récepteur GM1 ou HER2. Les peptides reconnaissant le récepteur GM1 de la littérature étaient capables de reconnaître le récepteur GM1. Cependant, la spécificité de cette interaction n'était pas rapportée. Le fait qu'une conjugaison, qui modifie les

paramètres physico-chimiques, peut compromettre l'affinité avec le récepteur GM1, démontre que ces ligands ne sont peut-être pas aussi spécifiques que supposé initialement. Il est aussi possible que le repliement spatial du peptide soit altéré par la conjugaison d'un principe actif. Cependant, le peptide aléatoire (scrambled) avait une bonne affinité avec le récepteur GM1 et une perméabilité similaire au peptide reconnaissant le GM1. Ceci suggère que l'affinité est plutôt reliée à la nature des acides aminés, et moins à leur séquence spécifique. Des auteurs ont démontré que des conjugués d'un peptide de transport (Angiopep) n'étaient pas internalisés par le récepteur attendu.(241) Matsumoto et coll. ont greffé 31 tripeptides différents sur le peptide pénétration cellulaire R8 afin d'évaluer l'impact de la conjugaison sur l'internalisation .(239) Ils ont remarqué que l'internalisation des conjugués de R8 était grandement influencée par la nature hydrophobe et le point isoélectrique du tripeptide ajouté.

Le ligand CTB a très bien fonctionné dans nos expériences. Cependant, c'est une protéine donc plus dispendieuse à obtenir et moins intéressante pour la livraison de petits cargos. Il serait toujours possible de faire un assemblage moléculaire d'un principe actif (plusieurs molécules de principes actifs sur un échafaud polymérique) et le livrer à travers les cellules intestinales en utilisant la CTB.

5.5 Choix du système de livraison

Le ligand de ciblage a été conjugué directement sur le principe actif d'intérêt. Cette option était nécessaire pour utiliser la voie GM1 car le conjugué devait être de petite taille. En effet, il existe déjà une étude qui a évalué la perméabilité de nanoparticules décorées avec la CTB pour augmenter la perméabilité à travers les cellules intestinales.(180) La présence du glycocalyx sur les cellules intestinales différenciées a bloqué significativement la diffusion de ces nanoparticules. Puisque l'espace entre deux fibres de la brosse glycocalyx est de 8 à 20 nm, un conjugué de cette taille était visé. (282) Nos résultats, qui démontrent une amélioration de la perméabilité des conjugués avec la CTB ou des peptides reconnaissant GM1, suggèrent

que le glycocalyx n'est pas une barrière significative pour ces conjugués, puisque les cellules utilisées en produisent.

D'un point de vue pharmacocinétique, l'ADC reste en circulation plusieurs semaines, et lui-même efficace, il n'est donc pas normalement envisageable d'encapsuler un ADC. Il est possible de décorer un vecteur comme une nanoparticule par anticorps.(283, 284)

L'efficacité individuelle de chaque composante de l'ADC a été évaluée, par la liaison de l'ADC sur sa cible cellulaire et l'évaluation de l'activité de la décitabine. Cependant, l'avantage de l'approche conjugué par rapport à un mélange reste à démontrer. Il sera nécessaire d'évaluer la différence par un modèle *in vivo* afin de prouver que la pharmacocinétique de la décitabine est améliorée lorsque conjuguée à l'ADC, ou l'efficacité sur un modèle de tumeur est supérieure à l'anticorps seul.

Chapitre 6 : Conclusion et perspectives

6.1 Conclusion

Dans cette thèse est rapporté le développement de nouveaux conjugués avec des agents de ciblage permettant d'améliorer la perméabilité intestinale ou l'efficacité thérapeutique. Afin d'obtenir ces conjugués, une série de sept espaceurs de propriétés diverses a été synthétisée et caractérisée par des techniques de chimie traditionnelle tels que la LC-MS, la RMN et la CCM.

Des principes actifs ayant une faible perméabilité intestinale ont été greffés avec un peptide reconnaissant le GM1 ou la sous-unité B de la toxine du choléra. En effet, quatre antibiotiques peu perméables tels que le méropenem, la pipéracilline, la vancomycine et la tobramycine ont été modifiés afin de développer des conjugués monomoléculaires. Certains conjugués tels que le méropenem étaient chimiquement instables pour obtenir des conjugués monomoléculaire, tandis que pour d'autres il était nécessaire d'optimiser la longueur de l'espaceur afin de conserver l'affinité au récepteur GM1 tel que pour la pipéracilline. De plus, des conjugués monomoléculaires avec des fluorophores ont été développés. L'optimisation des espaceurs a permis de conserver l'affinité de ces conjugués pour le récepteur GM1 tel que mesurée par titration calorimétrique isotherme ou par thermophorèse à micro-échelle. De plus, l'internalisation mesurée par cytométrie en flux dans les cellules intestinales T84 et Caco-2 a été améliorée par rapport aux contrôles n'ayant pas de ligand reconnaissant le récepteur GM1. Cependant, pour les conjugués utilisant le ligand peptidique, l'internalisation n'était pas médiée par le GM1. En effet, des essais avec un supplément de GM1 aux cellules Caco-2 et un inhibiteur de la synthèse de gangliosides dans les cellules T84 n'ont pas démontré les résultats attendus. Par la suite, la perméabilité des conjugués a été améliorée à travers une monocouche de cellules T84. En revanche, l'augmentation de la perméabilité était plutôt modeste avec les composés ayant un ligand peptidique.

À la suite de ces résultats avec les ligands peptidiques, des conjugués utilisant la sous-unité β de la toxine du choléra (CTB) ont été développés. La synthèse relativement simple utilisant la chimie 'click' a permis de produire des protéines fusions de la BSA(FITC) conjugué à la CTB. L'internalisation de ces conjugués dans des cellules T84 ou Caco-2 était dépendante de la présence du récepteur GM1. De plus, la perméabilité des protéines fusions étaient supérieure à la BSA(FITC) non conjuguée. La CTB serait donc un ligand intéressant pour augmenter la perméabilité de certaines protéines, héparines ou autres molécules de taille supérieure à 2000 > g/mol.

Dans un second temps, un anticorps reconnaissant le human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) a été conjugué avec le médicament décitabine pour le traitement du cancer du sein. La synthèse était plutôt complexe due à l'instabilité de la décitabine. L'utilisation d'un espaceur pH sensible utilisant une fonction silyl ether a permis de développer des anticorps conjugués à des drogues (ADC) ayant des ratios de décitabine par anticorps (DAR) de 4 ou 8. Ces ratios DARs ont été validés par chromatographie d'interactions hydrophobes et la stabilité des ADCs a été analysée par chromatographie par exclusion de taille. L'affinité de l'ADC DAR 8 était conservée dans des cellules H2N100. De plus, l'activité de la décitabine était également maintenue tels que démontré par des essais de déméthylation et des essais de qPCR, prouvant que le médicament est relargué à l'intérieur de la cellule pour effectuer son effet thérapeutique. Cette nouvelle combinaison constitue une avenue thérapeutique prometteuse et innovante pour le cancer du sein.

6.2 Perspectives futures

6.2.1 Utilisation d'un mélange physique de peptides reconnaissant le GM1 avec un composé peu perméable.

Certains auteurs ont documenté l'utilisation d'une coadministration du principe actif avec des peptides de pénétration cellulaire pour l'amélioration de la perméabilité (sans avoir recours à la conjugaison chimique). La formulation obtenue est plus ou moins bien caractérisée.(155) L'avantage de cette approche est que l'affinité du peptide envers son récepteur n'est pas modifié *a priori*. Un mélange d'insuline avec des peptides de pénétration cellulaire avait une biodisponibilité orale plus élevée que l'insuline seule dans un modèle *in situ* d'absorption.(285) Puisque les peptides reconnaissant le GM1 semblent avoir des propriétés similaires aux peptides de pénétration cellulaire, il serait possible de suivre la même stratégie, en testant un grand nombre de peptides reconnaissant le récepteur GM1 en combinaison avec une protéine modèle comme la BSA, et observer l'impact sur la perméabilité de la BSA. Par ailleurs, il serait intéressant d'explorer une autre librairie de peptides reconnaissant le récepteur GM1. En effet, les nouvelles technologies tels que le séquençage de nouvelle génération (next generation sequencing) ou l'utilisation d'aptamères pourraient obtenir des ligands ayant une affinité plus forte avec le GM1.(286)

6.2.2 Utilisation d'un conjugué thérapeutique avec la CTB

Afin de démontrer la viabilité d'une conjugaison avec la CTB, il serait intéressant de conjuguer un médicament d'intérêt thérapeutique par voie orale. Il serait possible d'utiliser un conjugué avec un index thérapeutique large comme un analogue du glucagon-like peptide-1 (GLP-1) pour le traitement du diabète.(287) Les analogues de GLP-1 sont présentement donnés exclusivement par voie injectable et sont de bons candidats pour une administration orale due à leur pauvre perméabilité intestinale. De plus, on combinerait ce nouveau médicament avec un espaceur clivable afin de s'assurer qu'il est relargué dans la circulation systémique sans trace de la CTB.

6.2.3 Développement d'une formulation ou d'un conjugué internalisé par le récepteur Fc néonatal.

Le récepteur Fc néonatal (FcRn) est un récepteur qui pourrait être exploré pour l'absorption d'IgG (anticorps) par voie orale. Ce récepteur est déjà utilisé pour la transcytose chez les nouveau-nés. Il n'existe qu'une publication documentant l'utilisation d'une protéine fusion combinée à un domaine Fc d'un IgG1 pour l'administration orale.(288) Il serait même possible d'administrer des IgG thérapeutiques par voie orale ou de conjuguer la partie Fc sur un principe actif. Le défi est que la liaison de la partie Fc au récepteur FcRn se fait à un pH plutôt acide ($\text{pH} < 6.5$). (289) Il sera donc critique de développer une formulation qui minimise la dégradation de la partie Fc par l'acidité et les enzymes gastriques.

6.2.4 Évaluation de la pharmacocinétique de l'ADC et son efficacité thérapeutique

La pharmacocinétique est un des paramètres les plus importants à considérer lors de l'administration d'un ADC. En effet, ce paramètre a une corrélation directe avec l'efficacité de l'ADC. Un ADC éliminé trop rapidement n'aura pas le potentiel thérapeutique escompté.(34, 44) Il est primordial d'évaluer la pharmacocinétique de l'ADC préparé dans le chapitre 4 dans un modèle *in vivo* murin.

On pourrait éventuellement améliorer le profil pharmacocinétique en modifiant l'espaceur. On a donc envisagé l'utilisation d'espaceurs à base d'éthylène glycol (comme dans le chapitre 3) et l'utilisation d'une fonction maléimide auto-hydrolysante. Par la suite, il serait nécessaire d'étudier la stabilité plasmatique de l'espaceur pH sensible à base de silyl ester (chapitre 4). S'il s'avère que cet espaceur ne possède pas une stabilité adéquate, il sera possible de développer un espaceur enzymatiquement clivable par la cathepsin B ou la B glucuronidase (1.1.7.6 Les espaceurs clivables par voie enzymatique à l'intérieur de la cellule, chapitre 1).

Une fois que l'ADC présentera une pharmacocinétique similaire à l'anticorps natif, on pourra évaluer l'efficacité thérapeutique de cet ADC dans un modèle murin de cancer du sein. Il sera important à ce moment d'évaluer l'efficacité de l'ADC par rapport au mélange de l'ADC, afin d'établir un bénéfice

d'utiliser un système de conjugaison. Enfin, il est possible de modifier la décitabine pour un autre médicament immunostimulant tel que l'azacitidine.

Chapitre 7 : Références

1. Torchilin VP. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci.* 2000;11 Suppl 2:S81-91.
2. Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer.* 2008;8:473.
3. Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature.* 1998;392(6679 Suppl):5-10.
4. Fahmy TM, Fong PM, Goyal A, Saltzman WM. Targeted for drug delivery. *Mater Today.* 2005;8(8, Supplement):18-26.
5. Williams AS, Camilleri JP, Goodfellow RM, Williams BD. A single intra-articular injection of liposomally conjugated methotrexate suppresses joint inflammation in rat antigen-induced arthritis. *Br J Rheumatol.* 1996;35(8):719-24.
6. Jain RK. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev.* 1987;6(4):559-93.
7. Palmer TN, Caldecourt MA, Kingaby RO. Liposomal drug delivery in chronic ischaemia. *Biochem Soc Trans.* 1984;12(2):344-5.
8. Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today.* 2006;11(17):812-8.
9. Abdalla AME, Xiao L, Ullah MW, Yu M, Ouyang C, Yang G. Current Challenges of Cancer Anti-angiogenic Therapy and the Promise of Nanotherapeutics. *Theranostics.* 2018;8(2):533-48.
10. Devarajan PV, Jindal AB, Patil RR, Mulla F, Gaikwad RV, Samad A. Particle Shape: A New Design Parameter for Passive Targeting In Splenotropic Drug Delivery. *J Pharm Sci.* 2010;99(6):2576-81.
11. Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat Mater.* 2009;8:15.
12. Bredlau AL, Motamarry A, Chen C, McCrackin MA, Helke K, Armeson KE, et al. Localized delivery of therapeutic doxorubicin dose across the canine blood-brain barrier with hyperthermia and temperature sensitive liposomes. *Drug Deliv.* 2018;25(1):973-84.
13. Zhu L, Zhou Z, Mao H, Yang L. Magnetic nanoparticles for precision oncology: theranostic magnetic iron oxide nanoparticles for image-guided and targeted cancer therapy. *Nanomedicine (Lond).* 2017;12(1):73-87.
14. Srinivasarao M, Low PS. Ligand-Targeted Drug Delivery. *Chem Rev.* 2017;117(19):12133-64.
15. Parker N, Turk MJ, Westrick E, Lewis JD, Low PS, Leamon CP. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal Biochem.* 2005;338(2):284-93.
16. Nomura N, Pastorino S, Jiang P, Lambert G, Crawford JR, Gymnopoulos M, et al. Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in primary gliomas and breast cancer brain metastases. *Cancer Cell International.* 2014;14(1):26.
17. Shen J, Hilgenbrink Andrew R, Xia W, Feng Y, Dimitrov Dimiter S, Lockwood Michael B, et al. Folate receptor- β constitutes a marker for human proinflammatory monocytes. *J Leukocyte Biol.* 2014;96(4):563-70.
18. Rajendran L, Knölker H-J, Simons K. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2010;9:29.
19. Kanduluru AK, Srinivasarao M, Low PS. Design, Synthesis, and Evaluation of a Neurokinin-1 Receptor-Targeted Near-IR Dye for Fluorescence-Guided Surgery of Neuroendocrine Cancers. *Bioconj Chem.* 2016;27(9):2157-65.
20. Kularatne SA, Wang K, Santhapuram H-KR, Low PS. Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted Imaging and Therapy of Prostate Cancer Using a PSMA Inhibitor as a Homing Ligand. *Mol Pharm.* 2009;6(3):780-9.

21. Szabo Z, Mena E, Rowe SP, Plyku D, Nidal R, Eisenberger MA, et al. Initial Evaluation of [18F]DCFPyL for Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeted PET Imaging of Prostate Cancer. *Mol Imaging Biol.* 2015;17(4):565-74.
22. Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2004;5:121.
23. Lu Y, You F, Vlahov I, Westrick E, Fan M, Low PS, et al. Folate-Targeted Dinitrophenyl Hapten Immunotherapy: Effect of Linker Chemistry on Antitumor Activity and Allergic Potential. *Mol Pharm.* 2007;4(5):695-706.
24. Perrino E, Steiner M, Krall N, Bernardes GJL, Pretto F, Casi G, et al. Curative Properties of Noninternalizing Antibody–Drug Conjugates Based on Maytansinoids. *Cancer Res.* 2014;74(9):2569.
25. Wayua C, Roy J, Putt KS, Low PS. Selective Tumor Targeting of Desacetyl Vinblastine Hydrazide and Tubulysin B via Conjugation to a Cholecystokinin 2 Receptor (CCK2R) Ligand. *Mol Pharm.* 2015;12(7):2477-83.
26. Moore RH, Sadovnikoff N, Hoffenberg S, Liu S, Woodford P, Angelides K, et al. Ligand-stimulated beta 2-adrenergic receptor internalization via the constitutive endocytic pathway into rab5-containing endosomes. *J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 9):2983-91.
27. Bandara NA, Hansen MJ, Low PS. Effect of Receptor Occupancy on Folate Receptor Internalization. *Mol Pharm.* 2014;11(3):1007-13.
28. Zandstra PW, Jervis E, Haynes CA, Kilburn DG, Eaves CJ, Piret JM. Concentration-dependent internalization of a cytokine/cytokine receptor complex in human hematopoietic cells. *Biotechnol Bioeng.* 2000;63(4):493-501.
29. Gao M, Skolnick J. A Comprehensive Survey of Small-Molecule Binding Pockets in Proteins. *PLoS Comput Biol.* 2013;9(10):e1003302.
30. Grover AK. Use of Allosteric Targets in the Discovery of Safer Drugs. *Medical Principles and Practice.* 2013;22(5):418-26.
31. Diop-Frimpong B, Chauhan VP, Krane S, Boucher Y, Jain RK. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(7):2909-14.
32. Leamon CP, Reddy JA, Dorton R, Bloomfield A, Emsweller K, Parker N, et al. Impact of High and Low Folate Diets on Tissue Folate Receptor Levels and Antitumor Responses Toward Folate-Drug Conjugates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;327(3):918.
33. Muro S. Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 2012;164(2):125-37.
34. Beck A, Goetsch L, Dumontet C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody–drug conjugates. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2017;16:315.
35. Yao H-P, Feng L, Weng T-H, Hu C-Y, Suthe SR, Mostofa AGM, et al. Preclinical Efficacy of Anti-RON Antibody–Drug Conjugate Zt/g4-MMAE for Targeted Therapy of Pancreatic Cancer Overexpressing RON Receptor Tyrosine Kinase. *Mol Pharm.* 2018.
36. Segal SJ. NORPLANT contraceptive implants advancing. *Netw Res Triangle Park N C.* 1984;5(3):1-3.
37. Banik Brittany L, Fattahi P, Brown Justin L. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology.* 2015;8(2):271-99.
38. Schwendeman SP, Shah RB, Bailey BA, Schwendeman AS. Injectable controlled release depots for large molecules. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 2014;190:240-53.
39. Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem Rev.* 2015;115(19):10938-66.

40. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*. 2016;1(1):10-29.
41. Viricel W, Mbarek A, Leblond J. Switchable Lipids: Conformational Change for Fast pH-Triggered Cytoplasmic Delivery. *Angew Chem Int Ed*. 2015;54(43):12743-7.
42. Mullard A. FDA approves landmark RNAi drug. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018;17:613.
43. Tsuchikama K, An Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein & Cell*. 2018;9(1):33-46.
44. Jain N, Smith SW, Ghone S, Tomczuk B. Current ADC Linker Chemistry. *Pharm Res*. 2015;32(11):3526-40.
45. Senter PD. Potent antibody drug conjugates for cancer therapy. *Curr Opin Chem Biol*. 2009;13(3):235-44.
46. Dubowchik GM, Firestone RA, Padilla L, Willner D, Hofstead SJ, Mosure K, et al. Cathepsin B-Labile Dipeptide Linkers for Lysosomal Release of Doxorubicin from Internalizing Immunoconjugates: Model Studies of Enzymatic Drug Release and Antigen-Specific In Vitro Anticancer Activity. *Bioconj Chem*. 2002;13(4):855-69.
47. Lyon RP, Bovee TD, Doronina SO, Burke PJ, Hunter JH, Neff-LaFord HD, et al. Reducing hydrophobicity of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index. *Nat Biotechnol*. 2015;33(7):733-5.
48. Shen BQ, Xu K, Liu L, Raab H, Bhakta S, Kenrick M, et al. Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol*. 2012;30(2):184-9.
49. Fontaine SD, Reid R, Robinson L, Ashley GW, Santi DV. Long-term stabilization of maleimide-thiol conjugates. *Bioconjug Chem*. 2015;26(1):145-52.
50. VanBrunt MP, Shanebeck K, Caldwell Z, Johnson J, Thompson P, Martin T, et al. Genetically Encoded Azide Containing Amino Acid in Mammalian Cells Enables Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Click Cycloaddition Chemistry. *Bioconjug Chem*. 2015;26(11):2249-60.
51. Drake PM, Albers AE, Baker J, Banas S, Barfield RM, Bhat AS, et al. Aldehyde tag coupled with HIPS chemistry enables the production of ADCs conjugated site-specifically to different antibody regions with distinct in vivo efficacy and PK outcomes. *Bioconjug Chem*. 2014;25(7):1331-41.
52. Ekholm FS, Pynnonen H, Viikman A, Pitkanen V, Helin J, Saarinen J, et al. Introducing Glycolinkers for the Functionalization of Cytotoxic Drugs and Applications in Antibody-Drug Conjugation Chemistry. *Chemmedchem*. 2016;11(22):2501-5.
53. Thompson P, Bezabeh B, Fleming R, Pruitt M, Mao S, Strout P, et al. Hydrolytically Stable Site-Specific Conjugation at the N-Terminus of an Engineered Antibody. *Bioconjug Chem*. 2015;26(10):2085-96.
54. Srinivasarao M, Galliford CV, Low PS. Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015;14:203.
55. Hosse Ralf J, Rothe A, Power Barbara E. A new generation of protein display scaffolds for molecular recognition. *Protein Sci*. 2009;15(1):14-27.
56. Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK. Current concepts in proteinuria. *Clin Chem*. 1989;35(5):755-65.
57. Tang L, Fan TM, Borst LB, Cheng J. Synthesis and Biological Response of Size-Specific, Monodisperse Drug-Silica Nanoconjugates. *ACS Nano*. 2012;6(5):3954-66.
58. Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*. 2016;1:16014.
59. Lu J, Jiang F, Lu A, Zhang G. Linkers Having a Crucial Role in Antibody-Drug Conjugates. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(4).
60. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6:583.

61. Dreher MR, Liu W, Michelich CR, Dewhirst MW, Yuan F, Chilkoti A. Tumor Vascular Permeability, Accumulation, and Penetration of Macromolecular Drug Carriers. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(5):335-44.
62. Vazquez-Lombardi R, Phan TG, Zimmermann C, Lowe D, Jeremius L, Christ D. Challenges and opportunities for non-antibody scaffold drugs. *Drug Discov Today*. 2015;20(10):1271-83.
63. Chittasupho C. Multivalent ligand: design principle for targeted therapeutic delivery approach. *Therapeutic Delivery*. 2012;3(10):1171-87.
64. Rudnick SI, Lou J, Shaller CC, Tang Y, Klein-Szanto AJP, Weiner LM, et al. Influence of Affinity and Antigen Internalization on the Uptake and Penetration of Anti-HER2 Antibodies in Solid Tumors. *Cancer Res*. 2011;71(6):2250.
65. Schmidt MM, Wittrup KD. A modeling analysis of the effects of molecular size and binding affinity on tumor targeting. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(10):2861.
66. Baell JB, Holloway GA. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *J Med Chem*. 2010;53(7):2719-40.
67. Keefe AJ, Jiang S. Poly(zwitterionic)protein conjugates offer increased stability without sacrificing binding affinity or bioactivity. *Nature Chemistry*. 2011;4:59.
68. Hock MB, Thudium KE, Carrasco-Triguero M, Schwabe NF. Immunogenicity of Antibody Drug Conjugates: Bioanalytical Methods and Monitoring Strategy for a Novel Therapeutic Modality. *The AAPS Journal*. 2015;17(1):35-43.
69. Smith A, Manoli H, Jaw S, Frutoz K, Epstein AL, Khawli LA, et al. Unraveling the Effect of Immunogenicity on the PK/PD, Efficacy, and Safety of Therapeutic Proteins. *Journal of Immunology Research*. 2016;2016:9.
70. Kularatne SA, Wang K, Santhapuram HK, Low PS. Prostate-specific membrane antigen targeted imaging and therapy of prostate cancer using a PSMA inhibitor as a homing ligand. *Mol Pharm*. 2009;6.
71. Chen C, Ke J, Zhou XE, Yi W, Brunzelle JS, Li J, et al. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature*. 2013;500:486.
72. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Del Rev*. 1997;23(1):3-25.
73. Leeson PD, Springthorpe B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007;6:881.
74. Dosio F, Brusa P, Cattel L. Immunotoxins and anticancer drug conjugate assemblies: the role of the linkage between components. *Toxins (Basel)*. 2011;3(7):848-83.
75. Banerjee SS, Aher N, Patil R, Khandare J. Poly(ethylene glycol)-Prodrug Conjugates: Concept, Design, and Applications. *Journal of Drug Delivery*. 2012;2012:17.
76. Tamura S, Inomata S, Ebine M, Genji T, Iwakura I, Mukai M, et al. Triazolyl-phenyl linker system enhancing the aqueous solubility of a molecular probe and its efficiency in affinity labeling of a target protein for jasmonate glucoside. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(1):188-93.
77. Kovtun YV, Audette CA, Mayo MF, Jones GE, Doherty H, Maloney EK, et al. Antibody-Maytansinoid Conjugates Designed to Bypass Multidrug Resistance. *Cancer Res*. 2010;70(6):2528.
78. Böhme D, Beck-Sickinger Annette G. Drug delivery and release systems for targeted tumor therapy. *J Pept Sci*. 2015;21(3):186-200.
79. Yang J, Chen H, Vlahov IR, Cheng J-X, Low PS. Evaluation of disulfide reduction during receptor-mediated endocytosis by using FRET imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(37):13872.

80. Leamon Christopher P, Reddy Joseph A, Vlahov Iontcho R, Westrick E, Parker N, Nicoson Jeffrey S, et al. Comparative preclinical activity of the folate-targeted Vinca alkaloid conjugates EC140 and EC145. *Int J Cancer*. 2007;121(7):1585-92.
81. Lushchak VI. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*. 2012;2012:26.
82. Liu C, Tadayoni BM, Bourret LA, Mattocks KM, Derr SM, Widdison WC, et al. Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(16):8618.
83. Vlahov IR, Leamon CP. Engineering Folate–Drug Conjugates to Target Cancer: From Chemistry to Clinic. *Bioconj Chem*. 2012;23(7):1357-69.
84. Yang J, Chen H, Vlahov IR, Cheng J-X, Low PS. Characterization of the pH of Folate Receptor-Containing Endosomes and the Rate of Hydrolysis of Internalized Acid-Labile Folate-Drug Conjugates. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321(2):462.
85. Sonawane SJ, Kalhapure RS, Govender T. Hydrazone linkages in pH responsive drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci*. 2017;99:45-65.
86. Parrott MC, Luft JC, Byrne JD, Fain JH, Napier ME, DeSimone JM. Tunable Bifunctional Silyl Ether Cross-Linkers for the Design of Acid-Sensitive Biomaterials. *J Am Chem Soc*. 2010;132(50):17928-32.
87. Finniss MC, Chu KS, Bowerman CJ, Luft JC, Haroon ZA, DeSimone JM. A versatile acid-labile linker for antibody–drug conjugates. *Med Chem Commun*. 2014;5(9):1355-8.
88. Doronina SO, Toki BE, Torgov MY, Mendelsohn BA, Cervený CG, Chace DF, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat Biotechnol*. 2003;21:778.
89. Erez R, Segal E, Miller K, Satchi-Fainaro R, Shabat D. Enhanced cytotoxicity of a polymer–drug conjugate with triple payload of paclitaxel. *Biorg Med Chem*. 2009;17(13):4327-35.
90. Jeffrey SC, Andreyka JB, Bernhardt SX, Kissler KM, Kline T, Lenox JS, et al. Development and Properties of β -Glucuronide Linkers for Monoclonal Antibody–Drug Conjugates. *Bioconj Chem*. 2006;17(3):831-40.
91. Burke PJ, Senter PD, Meyer DW, Miyamoto JB, Anderson M, Toki BE, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Antibody–Drug Conjugates Comprised of Potent Camptothecin Analogues. *Bioconj Chem*. 2009;20(6):1242-50.
92. Jornada DH, dos Santos Fernandes GF, Chiba DE, de Melo TR, dos Santos JL, Chung MC. The Prodrug Approach: A Successful Tool for Improving Drug Solubility. *Molecules*. 2015;21(1):42.
93. Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Järvinen T, et al. Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7:255.
94. Beaumont K, Webster R, Gardner I, Dack K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr Drug Metab*. 2003;4(6):461-85.
95. Liederer BM, Borchardt RT. Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *J Pharm Sci*. 2006;95(6):1177-95.
96. Heimbach T, Oh DM, Li LY, Rodriguez-Hornedo N, Garcia G, Fleisher D. Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *Int J Pharm*. 2003;261(1-2):81-92.
97. Yang CY, Dantzig AH, Pidgeon C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm Res*. 1999;16(9):1331-43.
98. Clement B. REDUCTION OF N-HYDROXYLATED COMPOUNDS: AMIDOXIMES (N-HYDROXYAMIDINES) AS PRO-DRUGS OF AMIDINES. *Drug Metab Rev*. 2002;34(3):565-79.
99. Kwan KC. Oral Bioavailability and First-Pass Effects. *Drug Metab Disposition*. 1997;25(12):1329.
100. Turner JV, Agatonovic-Kustrin S. 5.29 - In Silico Prediction of Oral Bioavailability. In: Taylor JB, Triggler DJ, editors. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Oxford: Elsevier; 2007. p. 699-724.

101. Davit BM, Kanfer I, Tsang YC, Cardot J-M. BCS Biowaivers: Similarities and Differences Among EMA, FDA, and WHO Requirements. *The AAPS Journal*. 2016;18(3):612-8.
102. Abuhelwa AY, Williams DB, Upton RN, Foster DJR. Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017;112:234-48.
103. Moroz E, Matoori S, Leroux JC. Oral delivery of macromolecular drugs: Where we are after almost 100years of attempts. *Adv Drug Del Rev*. 2016;101:108-21.
104. Rembratt A, Graugaard-Jensen C, Senderovitz T, Norgaard JP, Djurhuus JC. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of desmopressin administered orally versus intravenously at daytime versus night-time in healthy men aged 55–70 years. *Eur J Clin Pharmacol*. 2004;60(6):397-402.
105. Emoto C, Fukuda T, Cox S, Christians U, Vinks AA. Development of a Physiologically-Based Pharmacokinetic Model for Sirolimus: Predicting Bioavailability Based on Intestinal CYP3A Content. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. 2013;2(7):e59.
106. Kalra S, Kalra B, Agrawal N. Oral Insulin. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2010;2(1):66.
107. Nichols GA, Koo YH, Shah SN. Delay of insulin addition to oral combination therapy despite inadequate glycemic control: delay of insulin therapy. *J Gen Intern Med*. 2007;22(4):453-8.
108. Calvert MJ, McManus RJ, Freemantle N. Management of type 2 diabetes with multiple oral hypoglycaemic agents or insulin in primary care: retrospective cohort study. *Br J Gen Pract*. 2007;57(539):455-60.
109. Goodall G, Sarpong EM, Hayes C, Valentine WJ. The consequences of delaying insulin initiation in UK type 2 diabetes patients failing oral hyperglycaemic agents: a modelling study. *BMC Endo Dis*. 2009;9:19.
110. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke J-D, Serino M, et al. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:189.
111. Hubatsch I, Ragnarsson EG, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2111-9.
112. Räder AFB, Reichart F, Weinmüller M, Kessler H. Improving oral bioavailability of cyclic peptides by N-methylation. *Biorg Med Chem*. 2018;26(10):2766-73.
113. Zhu L, Lu L, Wang S, Wu J, Shi J, Yan T, et al. Chapter 11 - Oral Absorption Basics: Pathways and Physicochemical and Biological Factors Affecting Absorption. In: Qiu Y, Chen Y, Zhang GGZ, Yu L, Mantri RV, editors. *Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition)*. Boston: Academic Press; 2017. p. 297-329.
114. Di L, Kerns EH. Chapter 8 - Permeability. In: Di L, Kerns EH, editors. *Drug-Like Properties (Second Edition)*. Boston: Academic Press; 2016. p. 95-111.
115. Goulatis LI, Shusta EV. Protein engineering approaches for regulating blood–brain barrier transcytosis. *Curr Opin Struct Biol*. 2017;45:109-15.
116. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:857-902.
117. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J Med Chem*. 1998;41(7):1007-10.
118. Malhaire H, Gimel JC, Roger E, Benoit JP, Lagarce F. How to design the surface of peptide-loaded nanoparticles for efficient oral bioavailability? *Adv Drug Del Rev*. 2016;106(Pt B):320-36.
119. Aungst BJ. Intestinal Permeation Enhancers. *J Pharm Sci*. 2000;89(4):429-42.
120. Aungst BJ. Absorption enhancers: applications and advances. *AAPS J*. 2012;14(1):10-8.
121. Salama NN, Eddington ND, Fasano A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Adv Drug Del Rev*. 2006;58(1):15-28.
122. Lopes MA, Abraham BA, Cabral LM, Rodrigues CR, Seica RM, de Baptista Veiga FJ, et al. Intestinal absorption of insulin nanoparticles: contribution of M cells. *Nanomedicine*. 2014;10(6):1139-51.

123. Luzzio SD, Dunseath G, Lockett A, Broke-Smith TP, New RR, Owens DR. The glucose lowering effect of an oral insulin (Capsulin) during an isoglycaemic clamp study in persons with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2009;12(1):82-7.
124. Kaushal G, Shao J. Genetically engineered normal flora for oral polypeptide delivery: dose-absorption response. *J Pharm Sci.* 2009;98(8):2573-80.
125. Conference 2017: From Innovation to Patient Solution. An International Symposium Held Jointly by CSPS and CC-CRS, May 10-12, 2017, Montréal, Qc, Canda. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences.* 2017.
126. Hussain N, Jaitley V, Florence AT. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv Drug Del Rev.* 2001;50(1):107-42.
127. Albac S, Lopez-Alayon C, Schmitz A, d'Enfert C, Sautour M, Labruère-Chazal C, et al. Les cellules M : une porte d'entrée pour le franchissement de la barrière intestinale par *Candida albicans*. *Journal de Mycologie Médicale.* 2015;25(2):e102-e3.
128. Lundquist P, Artursson P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Adv Drug Del Rev.* 2016;106:256-76.
129. Azizi A, Kumar A, Diaz-Mitoma F, Mestecky J. Enhancing Oral Vaccine Potency by Targeting Intestinal M Cells. *PLoS Pathog.* 2010;6(11):e1001147.
130. Zhang X, Wu W. Ligand-mediated active targeting for enhanced oral absorption. *Drug Discov Today.* 2014;19(7):898-904.
131. Chalasani KB, Russell-Jones GJ, Jain AK, Diwan PV, Jain SK. Effective oral delivery of insulin in animal models using vitamin B12-coated dextran nanoparticles. *J Control Release.* 2007;122(2):141-50.
132. Vadlapudi AD, Vadlapatla RK, Kwatra D, Earla R, Samanta SK, Pal D, et al. Targeted lipid based drug conjugates: a novel strategy for drug delivery. *Int J Pharm.* 2012;434(1-2):315-24.
133. Pridgen EM, Alexis F, Kuo TT, Levy-Nissenbaum E, Karnik R, Blumberg RS, et al. Transepithelial Transport of Fc-Targeted Nanoparticles by the Neonatal Fc Receptor for Oral Delivery. *Science Translational Medicine.* 2013;5(213):213ra167.
134. Brambell FW. The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young. *Proc Nutr Soc.* 1969;28(1):35-41.
135. Israel EJ, Taylor S, Wu Z, Mizoguchi E, Blumberg RS, Bhan A, et al. Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology.* 1997;92(1):69-74.
136. Low SC, Nunes SL, Bitonti AJ, Dumont JA. Oral and pulmonary delivery of FSH-Fc fusion proteins via neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. *Hum Reprod.* 2005;20(7):1805-13.
137. Shi Y, Sun X, Zhang L, Sun K, Li K, Li Y, et al. Fc-modified exenatide-loaded nanoparticles for oral delivery to improve hypoglycemic effects in mice. *Scientific Reports.* 2018;8(1):726.
138. Rath T, Baker K, Pyzik M, Blumberg RS. Regulation of Immune Responses by the Neonatal Fc Receptor and Its Therapeutic Implications. *Frontiers in Immunology.* 2015;5(664).
139. Lim C-J, Shen W-C. Comparison of monomeric and oligomeric transferrin as potential carrier in oral delivery of protein drugs. *J Controlled Release.* 2005;106(3):273-86.
140. Bobst CE, Wang S, Shen W-C, Kaltashov IA. Mass spectrometry study of a transferrin-based protein drug reveals the key role of protein aggregation for successful oral delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(34):13544.
141. Amet N, Wang W, Shen W-C. Human growth hormone-transferrin fusion protein for oral delivery in hypophysectomized rats. *J Controlled Release.* 2010;141(2):177-82.
142. Marsh EW, Leopold PL, Jones NL, Maxfield FR. Oligomerized transferrin receptors are selectively retained by a luminal sorting signal in a long-lived endocytic recycling compartment. *J Cell Biol.* 1995;129(6):1509-22.
143. Paterson J, Webster CI. Exploiting transferrin receptor for delivering drugs across the blood-brain barrier. *Drug Discovery Today: Technologies.* 2016;20:49-52.

144. Brayden DJ, Jepson MA, Baird AW. Keynote review: Intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov Today*. 2005;10(17):1145-57.
145. Zhang N, Ping QN, Huang GH, Xu WF. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. *Int J Pharm*. 2005;294(1):247-59.
146. Clark MA, Blair H, Liang L, Brey RN, Brayden D, Hirst BH. Targeting polymerised liposome vaccine carriers to intestinal M cells. *Vaccine*. 2001;20(1-2):208-17.
147. Ganapathy ME, Huang W, Wang H, Ganapathy V, Leibach FH. Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;246(2):470-5.
148. Zhang Y, Gao Y, Wen X, Ma H. Current prodrug strategies for improving oral absorption of nucleoside analogues. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;9(2):65-74.
149. Luo S, Wang Z, Patel M, Khurana V, Zhu X, Pal D, et al. Targeting SVCT for enhanced drug absorption: synthesis and in vitro evaluation of a novel vitamin C conjugated prodrug of saquinavir. *Int J Pharm*. 2011;414(1-2):77-85.
150. Tamai I. Oral drug delivery utilizing intestinal OATP transporters. *Adv Drug Del Rev*. 2012;64(6):508-14.
151. Visentin M, Diop-Bove N, Zhao R, Goldman ID. The Intestinal Absorption of Folates. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:251-74.
152. Cheung A, Bax HJ, Josephs DH, Ilieva KM, Pellizzari G, Opzoomer J, et al. Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. *Oncotarget*. 2016;7(32):52553-74.
153. Khafagy E-S, Morishita M. Oral biodrug delivery using cell-penetrating peptide. *Adv Drug Del Rev*. 2012;64(6):531-9.
154. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 1988;55(6):1189-93.
155. Kristensen M, Nielsen HM. Cell-Penetrating Peptides as Carriers for Oral Delivery of Biopharmaceuticals. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015;118(2):99-106.
156. Ziegler A, Seelig J. Binding and Clustering of Glycosaminoglycans: A Common Property of Mono- and Multivalent Cell-Penetrating Compounds. *Biophys J*. 2008;94(6):2142-9.
157. Rydberg HA, Matson M, Åmand HL, Esbjörner EK, Nordén B. Effects of Tryptophan Content and Backbone Spacing on the Uptake Efficiency of Cell-Penetrating Peptides. *Biochemistry (Mosc)*. 2012;51(27):5531-9.
158. Liang JF, Yang VC. Insulin-cell penetrating peptide hybrids with improved intestinal absorption efficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335(3):734-8.
159. Morishita M, Kamei N, Ehara J, Isowa K, Takayama K. A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin. *J Controlled Release*. 2007;118(2):177-84.
160. Kristensen M, de Groot AM, Berthelsen J, Franzky H, Sijts A, Nielsen HM. Conjugation of Cell-Penetrating Peptides to Parathyroid Hormone Affects Its Structure, Potency, and Transepithelial Permeation. *Bioconj Chem*. 2015;26(3):477-88.
161. Kristensen M, Franzky H, Klausen MT, Iversen A, Bahnsen JS, Skyggebjerg RB, et al. Penetratin-Mediated Transepithelial Insulin Permeation: Importance of Cationic Residues and pH for Complexation and Permeation. *The AAPS Journal*. 2015;17(5):1200-9.
162. Kamei N, Morishita M, Eda Y, Ida N, Nishio R, Takayama K. Usefulness of cell-penetrating peptides to improve intestinal insulin absorption. *J Control Release*. 2008;132(1):21-5.
163. Zhu S, Chen S, Gao Y, Guo F, Li F, Xie B, et al. Enhanced oral bioavailability of insulin using PLGA nanoparticles co-modified with cell-penetrating peptides and Engrailed secretion peptide (Sec). *Drug Deliv*. 2016;23(6):1980-91.

164. Khafagy E-S, Kamei N, Nielsen EJB, Nishio R, Takeda-Morishita M. One-month subchronic toxicity study of cell-penetrating peptides for insulin nasal delivery in rats. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85(3, Part A):736-43.
165. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science.* 1999;285(5433):1569.
166. Garinot M, Fiévez V, Pourcelle V, Stoffelbach F, des Rieux A, Plapied L, et al. PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *J Controlled Release.* 2007;120(3):195-204.
167. Yoo M-K, Kang S-K, Choi J-H, Park I-K, Na H-S, Lee H-C, et al. Targeted delivery of chitosan nanoparticles to Peyer's patch using M cell-homing peptide selected by phage display technique. *Biomaterials.* 2010;31(30):7738-47.
168. Jin Y, Song Y, Zhu X, Zhou D, Chen C, Zhang Z, et al. Goblet cell-targeting nanoparticles for oral insulin delivery and the influence of mucus on insulin transport. *Biomaterials.* 2012;33(5):1573-82.
169. Owen JL, Sahay B, Mohamadzadeh M. New generation of oral mucosal vaccines targeting dendritic cells. *Curr Opin Chem Biol.* 2013;17(6):918-24.
170. Curiel TJ, Morris C, Brumlik M, Landry SJ, Finstad K, Nelson A, et al. Peptides Identified through Phage Display Direct Immunogenic Antigen to Dendritic Cells. *The Journal of Immunology.* 2004;172(12):7425.
171. Beddoe T, Paton AW, Le Nours J, Rossjohn J, Paton JC. Structure, Biological Functions and Applications of the AB(5) Toxins. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(7):411-8.
172. Beilhartz GL, Sugiman-Marangos SN, Melnyk RA. Repurposing bacterial toxins for intracellular delivery of therapeutic proteins. *Biochem Pharmacol.* 2017;142:13-20.
173. Rabideau AE, Pentelute BL. Delivery of Non-Native Cargo into Mammalian Cells Using Anthrax Lethal Toxin. *ACS Chem Biol.* 2016;11(6):1490-501.
174. Milne JC, Blanket SR, Hanna PC, Collier RJ. Protective antigen-binding domain of anthrax lethal factor mediates translocation of a heterologous protein fused to its amino- or carboxy-terminus. *Mol Microbiol.* 1995;15(4):661-6.
175. Luginbuehl V, Meier N, Kovar K, Rohrer J. Intracellular drug delivery: Potential usefulness of engineered Shiga toxin subunit B for targeted cancer therapy. *Biotechnol Adv.* 2018;36(3):613-23.
176. Engedal N, Skotland T, Torgersen ML, Sandvig K. Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. *Microbial Biotechnology.* 2010;4(1):32-46.
177. Schüller S. Shiga Toxin Interaction with Human Intestinal Epithelium. *Toxins.* 2011;3(6):626-39.
178. Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB. Cholera. *Lancet.* 2012;379(9835):2466-76.
179. Baldauf KJ, Royal JM, Hamorsky KT, Matoba N. Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications. *Toxins (Basel).* 2015;7(3):974-96.
180. Frey A, Giannasca KT, Weltzin R, Giannasca PJ, Reggio H, Lencer WI, et al. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med.* 1996;184(3):1045-59.
181. Harokopakis E, Hajishengallis G, Michalek SM. Effectiveness of Liposomes Possessing Surface-Linked Recombinant B Subunit of Cholera Toxin as an Oral Antigen Delivery System. *Infect Immun.* 1998;66(9):4299-304.
182. Li S, Wei Z, Chen J, Chen Y, Lv Z, Yu W, et al. Oral Administration of a Fusion Protein between the Cholera Toxin B Subunit and the 42-Amino Acid Isoform of Amyloid- β Peptide Produced in Silkworm Pupae Protects against Alzheimer's Disease in Mice. *PLoS ONE.* 2014;9(12):e113585.
183. Limaye A, Koya V, Samsam M, Daniell H. Receptor-mediated oral delivery of a bioencapsulated green fluorescent protein expressed in transgenic chloroplasts into the mouse circulatory system. *FASEB J.* 2006;20(7):959-61.

184. Kohli N, Westerveld DR, Ayache AC, Verma A, Shil P, Prasad T, et al. Oral delivery of bioencapsulated proteins across blood-brain and blood-retinal barriers. *Mol Ther*. 2014;22(3):535-46.
185. Ruhlman T, Ahangari R, Devine A, Samsam M, Daniell H. Expression of cholera toxin B–proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts – oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnol J*. 2007;5(4):495-510.
186. Lencer WI, Moe S, Rufo PA, Madara JL. Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(22):10094-8.
187. Saslowsky DE, te Welscher YM, Chinnapen DJ, Wagner JS, Wan J, Kern E, et al. Ganglioside GM1-mediated transcytosis of cholera toxin bypasses the retrograde pathway and depends on the structure of the ceramide domain. *J Biol Chem*. 2013;288(36):25804-9.
188. Jobling MG, Yang Z, Kam WR, Lencer WI, Holmes RK. A Single Native Ganglioside GM1-Binding Site Is Sufficient for Cholera Toxin To Bind to Cells and Complete the Intoxication Pathway. *mBio*. 2012;3(6).
189. Yu RK, Tsai Y-T, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides—An overview. *Journal of oleo science*. 2011;60(10):537-44.
190. Yu RK, Nakatani Y, Yanagisawa M. The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S440-5.
191. Aureli M, Mauri L, Ciampa MG, Prinetti A, Toffano G, Secchieri C, et al. GM1 Ganglioside: Past Studies and Future Potential. *Mol Neurobiol*. 2016;53(3):1824-42.
192. Kaida K, Ariga T, Yu RK. Antiganglioside antibodies and their pathophysiological effects on Guillain-Barre syndrome and related disorders—a review. *Glycobiology*. 2009;19(7):676-92.
193. Stenzel MH. Bioconjugation Using Thiols: Old Chemistry Rediscovered to Connect Polymers with Nature’s Building Blocks. *ACS Macro Letters*. 2013;2(1):14-8.
194. Uygun M, Tasdelen MA, Yagci Y. Influence of Type of Initiation on Thiol–Ene “Click” Chemistry. *Macromol Chem Phys*. 2009;211(1):103-10.
195. Yang Y-h, Aloysius H, Inoyama D, Chen Y, Hu L-q. Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2011;1(3):143-59.
196. Johnston SL. Biologic therapies: what and when? *J Clin Pathol*. 2007;60(1):8-17.
197. Rembratt A, Graugaard-Jensen C, Senderovitz T, Norgaard JP, Djurhuus JC. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of desmopressin administered orally versus intravenously at daytime versus night-time in healthy men aged 55-70 years. *Eur J Clin Pharmacol*. 2004;60(6):397-402.
198. Emoto C, Fukuda T, Cox S, Christians U, Vinks AA. Development of a Physiologically-Based Pharmacokinetic Model for Sirolimus: Predicting Bioavailability Based on Intestinal CYP3A Content. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2013;2:e59.
199. Goldberg M, Gomez-Orellana I. Challenges for the oral delivery of macromolecules. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(4):289-95.
200. Aroda VR, Rosenstock J, Terauchi Y, Jeppesen OLE, Christiansen E, Hertz CL, et al. Effect and Safety of Oral Semaglutide Monotherapy in Type 2 Diabetes—PIONEER 1 Trial. *Diabetes*. 2018;67(Supplement 1).
201. Sandvig K, van Deurs B. Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002;18(1):1-24.
202. Chinnapen Daniel JF, Hsieh W-T, te Welscher Yvonne M, Saslowsky David E, Kaoutzani L, Brandsma E, et al. Lipid Sorting by Ceramide Structure from Plasma Membrane to ER for the Cholera Toxin Receptor Ganglioside GM1. *Dev Cell*. 2012;23(3):573-86.
203. Chinnapen DJF, Chinnapen H, Saslowsky D, Lencer WI. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;266(2):129-37.
204. Lencer WI, Moe S, Rufo PA, Madara JL. Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(22):10094-8.

205. Saslowsky DE, te Welscher YM, Chinnapen DJ-F, Wagner JS, Wan J, Kern E, et al. Ganglioside GM1-mediated Transcytosis of Cholera Toxin Bypasses the Retrograde Pathway and Depends on the Structure of the Ceramide Domain. *J Biol Chem*. 2013;288(36):25804-9.
206. Limaye A, Koya V, Samsam M, Daniell H. Receptor-mediated oral delivery of a bioencapsulated green fluorescent protein expressed in transgenic chloroplasts into the mouse circulatory system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(7):959-61.
207. Kohli N, Westerveld DR, Ayache AC, Verma A, Shil P, Prasad T, et al. Oral Delivery of Bioencapsulated Proteins Across Blood–Brain and Blood–Retinal Barriers. *Mol Ther*. 2014;22(3):535-46.
208. Matsubara T, Ishikawa D, Taki T, Okahata Y, Sato T. Selection of ganglioside GM1-binding peptides by using a phage library. *FEBS Lett*. 1999;456(2):253-6.
209. Liu JK, Teng Q, Garrity-Moses M, Federici T, Tanase D, Imperiale MJ, et al. A novel peptide defined through phage display for therapeutic protein and vector neuronal targeting. *Neurobiol Dis*. 2005;19(3):407-18.
210. Park I-K, Lasiene J, Chou S-H, Horner PJ, Pun SH. Neuron-specific delivery of nucleic acids mediated by Tet1-modified poly(ethylenimine). *J Gene Med*. 2007;9(8):691-702.
211. Kwon EJ, Bergen JM, Park IK, Pun SH. Peptide-modified vectors for nucleic acid delivery to neurons. *J Controlled Release*. 2008;132(3):230-5.
212. Georgieva JV, Brinkhuis RP, Stojanov K, Weijers CA, Zuilhof H, Rutjes FP, et al. Peptide-mediated blood-brain barrier transport of polymersomes. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012;51(33):8339-42.
213. Georgieva JV, Brinkhuis RP, Stojanov K, Weijers CAGM, Zuilhof H, Rutjes FPJT, et al. Peptide-Mediated Blood–Brain Barrier Transport of Polymersomes. *Angew Chem Int Ed*. 2012;51(33):8339-42.
214. Su C-H, Tsai C-Y, Tomanek B, Chen W-Y, Cheng F-Y. Evaluation of blood–brain barrier-stealth nanocomposites for in situ glioblastoma theranostics applications. *Nanoscale*. 2016;8(15):7866-70.
215. Favre A, Grugier J, Brans A, Joris B, Marchand-Brynaert J. 6-Aminopenicillanic acid (6-APA) derivatives equipped with anchoring arms. *Tetrahedron*. 2012;68(52):10818-26.
216. Dutta AK, Rösgen J, Rajarathnam K. Using Isothermal Titration Calorimetry to Determine Thermodynamic Parameters of Protein–Glycosaminoglycan Interactions. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2015;1229:315-24.
217. Patino T, Soriano J, Barrios L, Ibanez E, Nogues C. Surface modification of microparticles causes differential uptake responses in normal and tumoral human breast epithelial cells. *Sci Rep*. 2015;5:11371.
218. Qi R, Mullen DG, Baker JR, Holl MM. The mechanism of polyplex internalization into cells: testing the GM1/caveolin-1 lipid raft mediated endocytosis pathway. *Mol Pharm*. 2010;7(1):267-79.
219. West AP, Dancho BA, Mizel SB. Gangliosides Inhibit Flagellin Signaling in the Absence of an Effect on Flagellin Binding to Toll-like Receptor 5. *J Biol Chem*. 2005;280(10):9482-8.
220. Alam S, Fedier A, Kohler RS, Jacob F. Glucosylceramide synthase inhibitors differentially affect expression of glycosphingolipids. *Glycobiology*. 2015;25(4):351-6.
221. Couesnon A, Pereira Y, Popoff MR. Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers. *Cell Microbiol*. 2008;10(2):375-87.
222. Lin PC, Ueng SH, Yu SC, Jan MD, Adak AK, Yu CC, et al. Surface modification of magnetic nanoparticle via Cu(I)-catalyzed alkyne-azide [2 + 3] cycloaddition. *Org Lett*. 2007;9(11):2131-4.
223. Stojanov K, Georgieva JV, Brinkhuis RP, van Hest JC, Rutjes FP, Dierckx RA, et al. In vivo biodistribution of prion- and GM1-targeted polymersomes following intravenous administration in mice. *Mol Pharm*. 2012;9(6):1620-7.
224. Wycisk V, Achazi K, Hirsch O, Kuehne C, Dervede J, Haag R, et al. Heterobifunctional Dyes: Highly Fluorescent Linkers Based on Cyanine Dyes. *ChemistryOpen*. 2017;6(3):437-46.

225. Bechara C, Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* 2013;587(12):1693-702.
226. Bertrand JR, Malvy C, Auguste T, Toth GK, Kiss-Ivankovits O, Illyes E, et al. Synthesis and studies on cell-penetrating peptides. *Bioconjug Chem.* 2009;20(7):1307-14.
227. Hedegaard SF, Derbas MS, Lind TK, Kasimova MR, Christensen MV, Michaelsen MH, et al. Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide significantly alters the mode and degree of biomembrane interaction. *Sci Rep.* 2018;8(1):6327.
228. Damian L. Isothermal Titration Calorimetry for Studying Protein–Ligand Interactions. In: Williams MA, Daviter T, editors. *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications.* Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p. 103-18.
229. Scheuermann TH, Padrick SB, Gardner KH, Brautigam CA. On the acquisition and analysis of microscale thermophoresis data. *Anal Biochem.* 2016;496:79-93.
230. Wolf AA, Fujinaga Y, Lencer WI. Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol. *J Biol Chem.* 2002;277(18):16249-56.
231. Pang H, Le PU, Nabi IR. Ganglioside GM1 levels are a determinant of the extent of caveolae/raft-dependent endocytosis of cholera toxin to the Golgi apparatus. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 8):1421-30.
232. Torgersen ML, Skretting G, van Deurs B, Sandvig K. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 20):3737-47.
233. Walker WA, Tarannum M, Vivero-Escoto JL. Cellular Endocytosis and Trafficking of Cholera Toxin B-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles. *J Mater Chem B Mater Biol Med.* 2016;4(7):1254-62.
234. Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, De Smedt SC, et al. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol Ther.* 2010;18(3):561-9.
235. Volpe DA. Application of method suitability for drug permeability classification. *AAPS J.* 2010;12(4):670-8.
236. Gong H, Holcomb I, Ooi A, Wang X, Majonis D, Unger MA, et al. Simple Method To Prepare Oligonucleotide-Conjugated Antibodies and Its Application in Multiplex Protein Detection in Single Cells. *Bioconjug Chem.* 2016;27(1):217-25.
237. Matsubara T, Iijima K, Nakamura M, Taki T, Okahata Y, Sato T. Specific binding of GM1-binding peptides to high-density GM1 in lipid membranes. *Langmuir.* 2007;23(2):708-14.
238. Munyendo WLL, Lv H, Benza-Ingoula H, Baraza LD, Zhou J. Cell Penetrating Peptides in the Delivery of Biopharmaceuticals. *Biomolecules.* 2012;2(2):187-202.
239. Matsumoto R, Okochi M, Shimizu K, Kanie K, Kato R, Honda H. Effects of the properties of short peptides conjugated with cell-penetrating peptides on their internalization into cells. *Scientific Reports.* 2015;5:12884.
240. Hedegaard SF, Derbas MS, Lind TK, Kasimova MR, Christensen MV, Michaelsen MH, et al. Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide significantly alters the mode and degree of biomembrane interaction. *Scientific Reports.* 2018;8(1):6327.
241. Kim JA, Casalini T, Brambilla D, Leroux J-C. Presumed LRP1-targeting transport peptide delivers β -secretase inhibitor to neurons in vitro with limited efficiency. *Scientific Reports.* 2016;6:34297.
242. Rauvala H. Monomer-micelle transition of the ganglioside GM1 and the hydrolysis by *Clostridium perfringens* neuraminidase. *Eur J Biochem.* 1979;97(2):555-64.
243. Basu A, Glew RH. Characterization of the activation of rat liver beta-glucosidase by sialosylgangliotetraosylceramide. *J Biol Chem.* 1985;260(24):13067-73.
244. Stojanov K, Georgieva JV, Brinkhuis RP, van Hest JC, Rutjes FP, Dierckx RAJO, et al. In Vivo Biodistribution of Prion- and GM1-Targeted Polymersomes following Intravenous Administration in Mice. *Mol Pharm.* 2012;9(6):1620-7.

245. Wang P, Zheng X, Guo Q, Yang P, Pang X, Qian K, et al. Systemic delivery of BACE1 siRNA through neuron-targeted nanocomplexes for treatment of Alzheimer's disease. *J Controlled Release*. 2018;279:220-33.
246. Orlandi PA, Fishman PH. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol*. 1998;141(4):905-15.
247. Leriche G, Chisholm L, Wagner A. Cleavable linkers in chemical biology. *Bioorg Med Chem*. 2012;20(2):571-82.
248. Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, Fischer R, Brock R. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic*. 2007;8(7):848-66.
249. Dutta D, Williamson CD, Cole NB, Donaldson JG. Pitstop 2 is a potent inhibitor of clathrin-independent endocytosis. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e45799.
250. Krop IE, Kim SB, Martin AG, LoRusso PM, Ferrero JM, Badovinac-Crnjevic T, et al. Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice in patients with previously treated HER2-positive metastatic breast cancer (TH3RESA): final overall survival results from a randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):743-54.
251. Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Research : BCR*. 2014;16(2):209-.
252. Roulois D, Yau HL, Singhanian R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, et al. DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts. *Cell*. 2015;162(5):961-73.
253. Rogstad DK, Herring JL, Theruvathu JA, Burdzy A, Perry CC, Neidigh JW, et al. The Chemical Decomposition of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine): Kinetic Analyses and Identification of Products by NMR, HPLC, and Mass Spectrometry. *Chem Res Toxicol*. 2009;22(6):1194-204.
254. Derissen EJB, Beijnen JH, Schellens JHM. Concise Drug Review: Azacitidine and Decitabine. *The Oncologist*. 2013;18(5):619-24.
255. Garcia JS, Jain N, Godley LA. An update on the safety and efficacy of decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *OncoTargets and therapy*. 2010;3:1-13.
256. Peng L, Chen X. Antibody-Drug Conjugates. *Bioconj Chem*. 2015;26(11):2169-.
257. Bobály B, Fleury-Souverain S, Beck A, Veuthey J-L, Guillaume D, Fekete S. Current possibilities of liquid chromatography for the characterization of antibody-drug conjugates. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;147:493-505.
258. Park S, Jiang Z, Mortenson ED, Deng L, Radkevich-Brown O, Yang X, et al. The Therapeutic Effect of Anti-HER2/neu Antibody Depends on Both Innate and Adaptive Immunity. *Cancer Cell*. 2010;18(2):160-70.
259. Stagg J, Loi S, Divisekera U, Ngiow SF, Duret H, Yagita H, et al. Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(17):7142-7.
260. Chowdhury B, McGovern A, Cui Y, Choudhury SR, Cho I-H, Cooper B, et al. The hypomethylating agent Decitabine causes a paradoxical increase in 5-hydroxymethylcytosine in human leukemia cells. *Scientific Reports*. 2015;5:9281.
261. Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, Li H, Henke C, Akman B, et al. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*. 2015;162(5):974-86.
262. Wang L, Amoozgar Z, Huang J, Saleh MH, Xing D, Orsulic S, et al. Decitabine Enhances Lymphocyte Migration and Function and Synergizes with CTLA-4 Blockade in a Murine Ovarian Cancer Model. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(9):1030-41.
263. McCombs JR, Owen SC. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *The AAPS Journal*. 2015;17(2):339-51.

264. Ritchie M, Tchistiakova L, Scott N. Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates. *mAbs*. 2013;5(1):13-21.
265. Keller KA, Guo J, Punna S, Finn MG. A thermally-cleavable linker for solid-phase synthesis. *Tetrahedron Lett*. 2005;46(7):1181-4.
266. Rodriguez-Aller M, Guillarme D, Beck A, Fekete S. Practical method development for the separation of monoclonal antibodies and antibody-drug-conjugate species in hydrophobic interaction chromatography, part 1: optimization of the mobile phase. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;118:393-403.
267. Fekete S, Beck A, Veuthey J-L, Guillarme D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;101:161-73.
268. Ramakrishnan S, Hu Q, Krishnan N, Wang D, Smit E, Granger V, et al. Decitabine, a DNA-demethylating agent, promotes differentiation via NOTCH1 signaling and alters immune-related pathways in muscle-invasive bladder cancer. *Cell Death & Disease*. 2017;8(12):3217.
269. Liu Z, Marcucci G, Byrd John C, Grever M, Xiao J, Chan Kenneth K. Characterization of decomposition products and preclinical and low dose clinical pharmacokinetics of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) by a new liquid chromatography/tandem mass spectrometry quantification method. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20(7):1117-26.
270. Turcotte M, Allard D, Mittal D, Bareche Y, Buisseret L, Jose V, et al. CD73 Promotes Resistance to HER2/ErbB2 Antibody Therapy. *Cancer Res*. 2017;77(20):5652-63.
271. Bronger H, Singer J, Windmüller C, Reuning U, Zech D, Delbridge C, et al. CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2016;115:553.
272. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev*. 2018;63:40-7.
273. Luo N, Nixon MJ, Gonzalez-Ericsson PI, Sanchez V, Opalenik SR, Li H, et al. DNA methyltransferase inhibition upregulates MHC-I to potentiate cytotoxic T lymphocyte responses in breast cancer. *Nature Communications*. 2018;9(1):248.
274. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(1):7-30.
275. Charlebois R, Allard B, Allard D, Buisseret L, Turcotte M, Pommey S, et al. PolyI:C and CpG Synergize with Anti-ErbB2 mAb for Treatment of Breast Tumors Resistant to Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Res*. 2017;77(2):312.
276. Rovero S, Amici A, Carlo ED, Bei R, Nanni P, Quagliano E, et al. DNA Vaccination Against Rat Her-2/Neu p185 More Effectively Inhibits Carcinogenesis Than Transplantable Carcinomas in Transgenic BALB/c Mice. *The Journal of Immunology*. 2000;165(9):5133.
277. Lyon RP, Setter JR, Bovee TD, Doronina SO, Hunter JH, Anderson ME, et al. Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol*. 2014;32:1059.
278. Jewett JC, Bertozzi CR. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem Soc Rev*. 2010;39(4):1272-9.
279. Breimer ME, Hansson GC, Karlsson KA, Larson G, Leffler H. Glycosphingolipid composition of epithelial cells isolated along the villus axis of small intestine of a single human individual. *Glycobiology*. 2012;22(12):1721-30.
280. Cervin J, Wands AM, Casselbrant A, Wu H, Krishnamurthy S, Cvjetkovic A, et al. GM1 ganglioside-independent intoxication by Cholera toxin. *PLoS Pathog*. 2018;14(2):e1006862.
281. Stratmann T. Cholera Toxin Subunit B as Adjuvant—An Accelerator in Protective Immunity and a Break in Autoimmunity. *Vaccines*. 2015;3(3):579-96.

282. Curry FE, Adamson RH. ENDOTHELIAL GLYCOCALYX: PERMEABILITY BARRIER AND MECHANOSENSOR. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(4):828-39.
283. Nevala WK, Butterfield JT, Sutor SL, Knauer DJ, Markovic SN. Antibody-targeted paclitaxel loaded nanoparticles for the treatment of CD20+ B-cell lymphoma. *Scientific Reports.* 2017;7:45682.
284. Jahan ST, Sadat SMA, Walliser M, Haddadi A. Targeted Therapeutic Nanoparticles: An Immense Promise to Fight against Cancer. *Journal of Drug Delivery.* 2017;2017:9090325.
285. Kamei N, Kikuchi S, Takeda-Morishita M, Terasawa Y, Yasuda A, Yamamoto S, et al. Determination of the Optimal Cell-Penetrating Peptide Sequence for Intestinal Insulin Delivery Based on Molecular Orbital Analysis with Self-Organizing Maps. *J Pharm Sci.* 2013;102(2):469-79.
286. Yang W, Yoon A, Lee S, Kim S, Han J, Chung J. Next-generation sequencing enables the discovery of more diverse positive clones from a phage-displayed antibody library. *Experimental & Molecular Medicine.* 2017;49:e308.
287. McCartney F, Gleeson JP, Brayden DJ. Safety concerns over the use of intestinal permeation enhancers: A mini-review. *Tissue Barriers.* 2016;4(2):e1176822.
288. Low SC, Nunes SL, Bitonti AJ, Dumont JA. Oral and pulmonary delivery of FSH-Fc fusion proteins via neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. *Hum Reprod.* 2005;20(7):1805-13.
289. Kuo TT, Baker K, Yoshida M, Qiao S-W, Aveson VG, Lencer WI, et al. Neonatal Fc Receptor: From Immunity to Therapeutics. *J Clin Immunol.* 2010;30(6):777-89.