



**HAL**  
open science

# Auto-assemblages constitués de peptides pénétrants et de ferrocifène : une plateforme innovante pour le traitement du cancer du poumon

Léna Guyon

► **To cite this version:**

Léna Guyon. Auto-assemblages constitués de peptides pénétrants et de ferrocifène : une plateforme innovante pour le traitement du cancer du poumon. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2019. Français. NNT : 2019ANGE0044 . tel-04701561

**HAL Id: tel-04701561**

**<https://theses.hal.science/tel-04701561v1>**

Submitted on 18 Sep 2024

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : *Sciences Pharmaceutiques*

Par  
**Léna GUYON**

**Auto-assemblages constitués de peptides pénétrants et de ferrocifène :  
une plateforme innovante pour le traitement du cancer du poumon**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 4 novembre 2019  
Unité de recherche : Micro et Nanomédecines Translationnelles, INSERM 1066 - CNRS 6021  
Thèse N° : 181242

## Rapporteurs avant soutenance :

Dr. Nicolas DELSUC  
Dr. Nicolas TSAPIS

Chargé de recherche CNRS, Université Pierre et Marie Curie, UMR 7203 UPMC-ENS  
Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Sud, UMR CNRS 8612

## Composition du Jury :

Dr. François GANACHAUD  
Dr. Nathalie MIGNET  
Dr. Nicolas DELSUC  
Dr. Nicolas TSAPIS

Directeur de recherche CNRS, INSA Lyon, UMR 5223  
Directeur de recherche CNRS, Université Paris Descartes, UMR 8258 - U1267 INSERM  
Chargé de recherche CNRS, Université Pierre et Marie Curie, UMR 7203 UPMC-ENS  
Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Sud, UMR CNRS 8612

Président

### Directeur de thèse

Pr. Catherine PASSIRANI

Professeur, Université d'Angers, INSERM 1066 - CNRS 6021

### Encadrant

Dr. Elise LEPELTIER

Maître de conférences, Université d'Angers, INSERM 1066 - CNRS 6021

**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :**  
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>



# REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été réalisés entre le laboratoire de Micro et Nanomédecines Translationnelles (MINT) à Angers, la start-up Feroscan à Paris et l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire (équipe ChemBio).

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Patrick Saulnier, directeur de MINT de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire durant cette thèse.

Je remercie cordialement M. Franck Pradier, directeur de Feroscan, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de l'entreprise.

Je remercie chaleureusement le Pr. Catherine Passirani qui a dirigé cette thèse. Merci de m'avoir donné la chance de rejoindre l'équipe et le monde de la recherche. Vous avez su m'aider et me conseiller lors de nos réunions hebdomadaires. Merci pour ces 3 années de thèse qui représentent une expérience unique et enrichissante.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Dr. Elise Lepeltier pour son encadrement durant ces 3 ans. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée durant ces années. Merci pour ton soutien, ta disponibilité et tes conseils avisés. Merci également pour nos échanges professionnels et personnels qui m'ont énormément apportés. J'ai pu grâce à toi acquérir de nombreuses compétences à la fois sur le plan technique et sur le plan moral. Je t'en suis très reconnaissante.

Je tiens également à remercier le Pr. Gérard Jaouen et le Dr. Pascal Pigeon pour leur expertise sur les ferrocifènes lors de nos réunions mensuelles. Merci pour votre accueil chaleureux, nos échanges scientifiques et vos conseils qui m'ont permis d'avancer.

J'adresse tous mes remerciements au Dr. Nicolas Delsuc du laboratoire des BioMolécules à Paris et au Dr. Nicolas Tsapis de l'institut Galien Paris-Sud. Merci de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également le Dr. François Ganachaud et le Dr. Nathalie Mignet pour avoir pris le temps de juger ce travail.

Je remercie la start-up Feroscan pour avoir financé ces trois années de thèse.

Un grand merci à Edith Greleau pour son travail et son aide au quotidien dans les procédures administratives. Merci pour ton énergie et ta franchise.

Le travail présenté n'aurait pu être aussi diversifié sans l'aide de spécialistes avec lesquels j'ai pu travailler. Merci à Bénédicte Lelievre (CHU d'Angers) pour les nombreuses analyses ICP-MS, à Aurélien Dupont (Université de Rennes) pour les images Cryo-TEM et à Claudie Bourgaux (Institut Galien Paris-Sud) pour son aide précieuse lors des analyses SAXS au Synchrotron SOLEIL.

Je remercie également les personnes que j'ai côtoyées quotidiennement au sein de MINT et qui m'ont apporté toute leur expertise :

- A Jean-Christophe Gimel pour son aide précieuse en diffusion de la lumière.
- A Brice Calvignac pour m'avoir encadré et aidé lors des formulations par microfluidique. Merci également pour nos conversations, tes conseils et ton soutien.
- A Florence Franconi pour la diffusométrie RMN. Merci pour ton expertise et ta réactivité.
- A Laurent Lemaire pour les expériences *in vivo* et son expertise IRM.

# REMERCIEMENTS

- A Camille Savary pour son aide en biologie cellulaire. Merci beaucoup pour les cellules BEAS-2B.
- A Samuel Legeay pour avoir toujours cru en mon potentiel en biologie cellulaire. Un grand merci pour tes nombreux conseils tant d'un point de vu professionnel que personnel. Merci de m'avoir écouté et encouragé dans les moments difficiles. Les courses à pied le midi avec toi vont me manquer et j'espère que l'on pourra en partager d'autres ensembles (je te laisse le temps de rattraper mon niveau).
- A Jérôme Bejaud pour son aide à toutes épreuves. Merci pour nos nombreuses conversations en salle de chimie et ta disponibilité. J'ai vraiment apprécié travailler avec toi.

Je souhaite remercier tout particulièrement mes rayons de soleil au laboratoire :

- Merci à toi Nolwenn de m'avoir aidé en chromatographie et spectrométrie de masse. Merci beaucoup pour ton aide, tu m'as énormément apporté d'un point de vu professionnel et personnel. Tu as toujours été là pour m'épauler et me soutenir. Merci pour tous les moments partagés ensemble : les multiples courses à pied, les midis à la piscine, les repas partagés et le weekend au bout du monde.
- Merci Adélie, mon acolyte, pour ton aide en biologie mais également en graphical abstract. Tu as toujours été présente. Merci pour ton rire communicatif, les soirées partagées, les repas et les sorties. Sans toi ma vie au labo n'aurait pas été la même et j'espère pouvoir partager encore beaucoup de choses avec toi.
- Nicolas, mon grand frère du labo. Merci pour tous ces échanges et les vacances au ski. Ton soutien a été très important pour moi. Bon courage pour la suite et j'espère ne pas trop te manquer au bureau.

Merci à toi Hélène, pour ton soutien au quotidien. On a commencé et on va terminer quasi ensemble. La thèse n'a pas été simple mais à la fin on y est arrivé. Merci pour les moments passés pendant ces 3 années de thèse (les kebabs partagés et nos vacances à Rome). Bon courage pour cette dernière ligne droite et pour la suite.

Un remerciement spécial pour mes autres collègues : Florence et Pierre mes collègues de bureau sans qui la fin de thèse n'aurait pas été la même. Claire, Kevin et Mathieu avec qui j'ai passé de superbes moments. Et enfin Audrey, merci beaucoup pour ta joie de vivre.

Merci aux anciens pour leur support moral et les bons moments passés ensemble : Vincent pour ton optimisme et Thomas.

Merci également à Abdallah pour les expérimentations *in vivo*. Agnese et Silvia pour leur précieuse aide lors de la dernière année et Milad. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Je souhaite remercier mes amis qui sont présents depuis le début aussi bien dans les moments difficiles que dans les meilleurs moments, malgré la distance et le temps qui passe : Mélanie, Pauline, Doriane, Tifenn, Maylenn, Anouk, Florence, Valentin et tout le Gilbert fan club (Eva, Fanny, Anna, Charlie, Jacques, Quentin, Pierre, Tanguy, Maxime...).

A toi Flo, ma belle rencontre de cette dernière année de thèse. Merci pour ton soutien. J'espère passer encore de bons moments à tes côtés.

Je clos enfin ces remerciements en exprimant toute ma gratitude à mon frère et à ma mère. Pour leur soutien au quotidien et les attentions de chaque jour.

*« Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements. »*

**Charles Darwin**

# Sommaire

TABLE DES ABRÉVIATIONS.....	1
INTRODUCTION.....	3
1. Les nanomédecines : histoire et législation	3
2. Stratégies pour le développement de nanoparticules innovantes	6
3. Auto-assemblages constitués de peptides : synthèse et activité biologique	14
4. Application thérapeutique envisagée	37
5. Objectifs de la thèse	47
Bibliographie	48
CHAPITRE 1 : « IMPORTANCE OF COMBINING ADVANCED PARTICLE SIZE ANALYSIS TECHNIQUES TO CHARACTERIZE CELL PENETRATING PEPTIDE-FERROCIFEN SELF-ASSEMBLIES ».....	58
1. Quelles méthodes utiliser pour caractériser les nanoparticules ?	59
Abstract	66
Introduction	67
Results and discussion	68
Conclusion	76
Supporting information	82
CHAPITRE 2 : « SELF-ASSEMBLIES OF CELL-PENETRATING PEPTIDES AND FERROCIFENS: DESIGN AND EVALUATION OF AN INNOVATIVE PLATFORM FOR LUNG CANCER TREATMENT » .....	101
Abstract	102
Introduction	103
1. Results and discussion	105
Conclusion	116
2. Materials and methods	117
Supporting Information	125
Diagramme de phase	128
DISCUSSION GÉNÉRALE .....	135
1. Résumé des travaux	135
2. Caractérisation des auto-assemblages <i>versus</i> législation	136
3. Interactions protéines-nanoparticule : la couronne protéique	138
4. Expériences <i>in vivo</i>	139
5. Nébulisation <i>versus</i> inhalation de poudre sèche	141
Bibliographie	143
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	147
TABLE DES MATIÈRES .....	149
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	151
TABLE DES TABLEAUX.....	152
CURRICULUM VITAE .....	153

## Table des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AF4	Fractionnement d'écoulement de champ par écoulement asymétrique
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ASMR	Amélioration du Service Médical Rendu
AUC	Ultracentrifugation analytique
CAC	<i>Critical aggregation concentration</i> – Concentration d'agrégation critique
Chlorpr.	Chlorpromazine hydrochloride
CNT	<i>Classical nucleation theory</i>
CPC	Cancer du poumon à petites cellules
CPNPC	Cancer du poumon non à petites cellules
CPP	Cell Penetrating Peptides
Cryo-TEM	<i>Cryo-transmission electron microscopy</i>
DCS	Centrifugation à sédimentation différentielle
$D_g$	<i>Diameter of gyration</i>
$D_h$	<i>Hydrodynamic diameter</i>
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPI	<i>Dry powder inhalers</i>
EMA	<i>European Medicines Evaluation Agency</i>
EPR effect	<i>Enhanced Permeability and Retention effect</i>
EUNCL	<i>European Nanomedicine Characterisation Laboratory</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HBTU	<i>Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium</i>
HMPA	Poly(N-(2-hydroxypropyl-méthacrylamide)
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ITK	Inhibiteurs de tyrosine kinase
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LNC	<i>Lipid nanocapsule</i>
M	<i>Molar concentration</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight</i>
MALS	<i>Multiangle light scattering</i>
MAP	<i>Model Amphiphatic Peptide</i>



M $\beta$ CD	Methyl- $\beta$ -cyclodextrin
MHLW	<i>Ministry of Health, Labour and Welfare</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
mV	<i>Millivolt</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NCL	<i>Nanotechnology Characterization Laboratory</i>
ND	<i>Not Determined</i>
NEP	<i>Nanoparticles enabled medicinal products</i>
nm	<i>Nanometer</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NR	Non renseigné
NSCLCs	<i>Non-small cell lung cancers</i>
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
Nys.	Nystatin
PDI	<i>Polydispersity index</i>
PEG	Polyéthylène glycol
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RP-HPLC	Reversed phase high-performance liquid chromatography
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SFME	<i>Surfactant-Free MicroEmulsion</i>
SLS	<i>Static Light Scattering</i>
SMR	Service Médical Rendu
SPPS	Solid phase peptide synthesis
Stand. Dev	Standard Deviation
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>
THF	Tetrahydrofuran
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

# Introduction

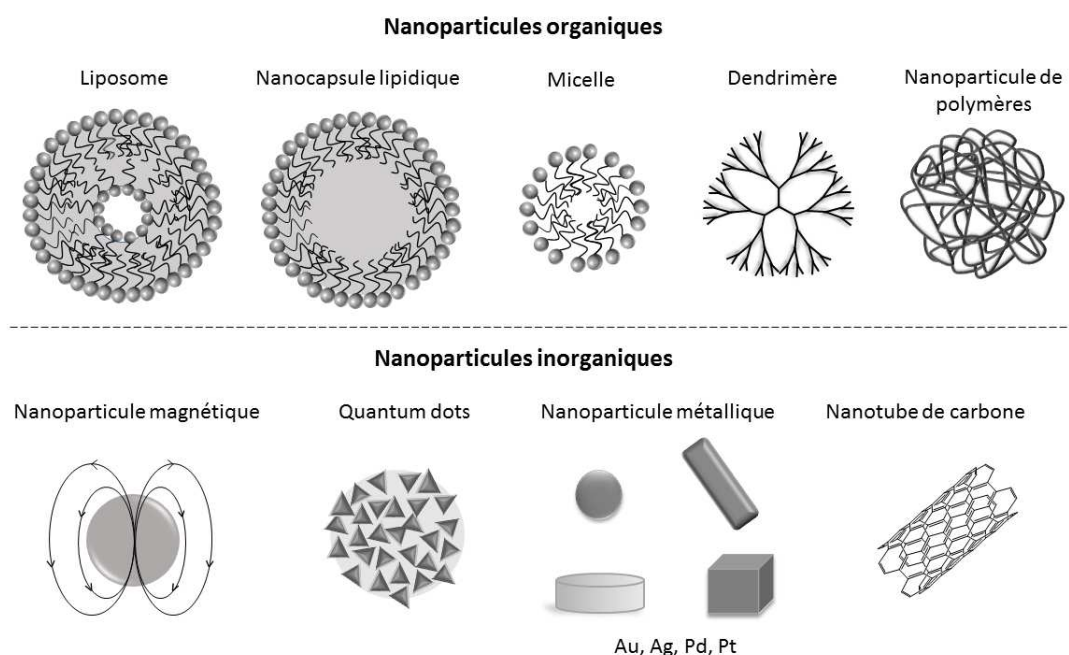
## 1. Les nanomédecines : histoire et législation

« *There's plenty of room at the bottom* », annonçait le physicien Richard Feynman lors de son discours en 1959 : il y a plein de place en bas, dans l'infiniment petit, à l'échelle nanométrique. La nanomédecine, rendue possible par les progrès technologiques, promet des traitements ciblés et personnalisés, notamment en oncologie. Elle consiste à développer des nano-objets afin de pallier les nombreuses difficultés rencontrées lors de l'administration de molécules actives. En effet, lors de l'introduction d'un médicament dans l'organisme, la molécule active rencontre un certain nombre de barrières biologiques naturelles qui peuvent limiter son efficacité, selon la voie d'administration utilisée : élimination hépatique prématurée, distribution non maîtrisée dans les tissus et cellules ou encore instabilité des molécules dans les milieux biologiques, le tout diminuant l'efficacité du médicament et entraînant une potentielle toxicité. Le manque de sélectivité des molécules actives conventionnelles peut affecter les tissus/cellules à division rapide tels que ceux de la moelle osseuse ou de la muqueuse gastro-intestinale provoquant ainsi de nombreux effets secondaires (nausées et vomissement, myéлоdépression et alopecie)<sup>1</sup>. D'autres organes peuvent également être touchés provoquant de la néphrotoxicité ou encore de la neurotoxicité. La dose administrable est ainsi limitée et ajustée en fonction de la sévérité des toxicités.

La notion de nanomédicament existe depuis de nombreuses années et a été notamment initiée par Ehrlich P. en 1908 en émettant l'idée d'une « *magic bullet* » : une « balle magique » permettant de cibler les cellules à traiter<sup>2</sup>. Le Doxil® est le premier nanomédicament à apparaître sur le marché en 1995 contre le cancer de l'ovaire, le cancer du sein métastatique et les myélomes multiples<sup>3</sup>. Depuis 20 ans, ces nanomédicaments font l'objet d'études toujours plus nombreuses : 25000 publications comportant le mot « *nanomedicine* » ont été répertoriées en juillet 2019<sup>4</sup>. Les traitements en cours de développement doivent répondre à des normes et exigences mises en place par l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) ou l'EMA (*European Medicines Evaluation Agency*), ce qui est le cas également des nanomédicaments. La Commission Européenne a ainsi proposé en 2011 une définition pour le terme de « nanomatériau » : un nanomatériau est composé de matière synthétique ou naturelle contenant des particules libres dont au moins 50 % présentent une ou plusieurs de leurs dimensions externes se situant entre 1 et 100 nm<sup>5</sup>. Cela définit ainsi un nanomatériau d'un point de vue purement législatif au sein de la Communauté Européenne. Cependant la communauté scientifique considère cette limite de taille comme assez arbitraire et certains s'accordent à dire que peut être considéré comme nanomatériau toute particule ayant une ou plusieurs dimensions inférieures au micron<sup>6,7</sup>.

Les nanoparticules organiques, telles que les micelles, liposomes ou nanoparticules de polymères ont été très étudiées comme vecteur de molécules actives. Les nanoparticules inorganiques, telles que les

nanoparticules métalliques, les quantum dots ou encore les nanoparticules magnétiques offrent également des résultats prometteurs dans le domaine de l'oncologie (Figure 1)<sup>8-10</sup>.



**Figure 1 :** Exemples de nanoparticules utilisées en nanomédecine : Les nanoparticules organiques (liposome, nanocapsule lipidique, micelle, dendrimère, nanoparticule de polymères) et les nanoparticules inorganiques (nanoparticule magnétique, quantum dots, nanoparticule métallique et nanotube de carbone).

## 1.1. Plusieurs générations de nanomédicaments

Les **nanomédicaments de première génération** sont les premiers vecteurs biodégradables développés dans la littérature : ils permettent de protéger le principe actif d'une dégradation biologique potentielle tout en prolongeant sa libération. Cependant, après administration par voie intraveineuse, ces vecteurs sont identifiés comme des corps étrangers par l'organisme : de nombreuses protéines plasmatiques (comme les opsonines) reconnues sélectivement par les macrophages du foie s'adsorbent alors à la surface des nanoparticules, entraînant ainsi une accumulation au niveau hépatique. Les **nanomédicaments de deuxième génération** ont la caractéristique d'être décorés en surface par des polymères hydrophiles. Ils permettent ainsi d'empêcher l'adsorption des protéines plasmatiques, permettant ainsi de prolonger le temps de demi-vie dans la circulation sanguine jusqu'à 45 h après administration<sup>11</sup>. Dans le contexte du cancer et grâce à la nature de l'environnement tumoral, ces vecteurs sont alors capables de s'accumuler au sein de tumeurs solides et ainsi donner lieu à ce qu'on appelle un ciblage passif *via* l'effet EPR « *Enhanced Permeability and Retention* ». Cet effet a été décrit pour la première fois en 1986 par Maeda *et al.*<sup>12</sup>. Il repose sur deux phénomènes qui piègent les nanovecteurs dans les tissus tumoraux. Tout d'abord le développement anormal et accéléré des vaisseaux sanguins qui engendre une augmentation des défauts dans l'organisation des cellules endothéliales. Des fenestrations entre ces cellules apparaissent alors, ce qui permet le passage des petites particules. De plus, l'inefficacité du drainage lymphatique dans les tissus cancéreux permet d'empêcher l'évasion des particules de la tumeur<sup>13</sup>. Cependant, l'effet EPR est particulièrement questionné

ces dernières années. En effet, plusieurs études ont démontré que cet effet était hétérogène voire inexistant chez les humains, en soulignant les écarts observés entre les modèles utilisés en précliniques et les patients<sup>14,15</sup>. Un troisième type de nanovecteurs est ainsi particulièrement étudié afin de pouvoir cibler spécifiquement la cible tissulaire ou cellulaire désirée : les **nanomédicaments de troisième génération**. Ces nanoparticules sont recouvertes en surface de molécules/ligands spécifiques permettant d'effectuer un ciblage actif et de délivrer la molécule active spécifiquement. Ces nanovecteurs doivent ainsi permettre de limiter la toxicité au niveau des tissus sains.

## 1.2. Législation

Les nanomédicaments sont considérés comme des médicaments « classiques » et doivent donc suivre les recommandations faites par les différentes agences nationales et internationales du médicament (ANSM, EMEA...) et répondre aux cahiers des charges mis en place par la FDA (*Food and Drug Administration*) et la MHLW (*Ministry of Health, Labour and Welfare*). L'étude de la pharmacocinétique des nanoparticules est une étape importante dans le processus de législation. Elle consiste à étudier plusieurs aspects concernant la nanoparticule et sa molécule active : l'absorption/l'exposition, la biodistribution (transport du sang vers les tissus), la métabolisation et l'élimination des produits de dégradation. Les études de biodégradabilité et d'accumulation dans les organes de chacun des constituants du nanomédicament doivent ainsi être menées. En effet, les risques provenant d'une toxicité à long terme liée à une accumulation des particules ou de ses constituants dans l'organisme doivent être pris en compte. En parallèle, une loi entrée en vigueur en 2013 impose de déclarer auprès de l'Agence nationale de sécurité sanitaire (Anses) l'utilisation, la formulation ou la diffusion en France des substances sous forme nanoparticulaire (à partir d'une masse de 100 g) afin de protéger en amont les personnes manipulant les nanovecteurs<sup>16</sup>. Le projet de recherche européen Nanogénotox pour le développement d'une méthode de détection d'un potentiel génotoxique des nanomatériaux est également mené et coordonné par l'Anses. Ce projet est divisé en trois étapes : la caractérisation physico-chimique de 14 nanomatériaux, la distribution des nanomatériaux dans l'organisme vivant ainsi que la réalisation de tests de génotoxicité *in vivo* et la comparaison avec les résultats *in vitro*<sup>17</sup>.

## 1.3. Nanomédicaments sur le marché

L'oncologie est le premier domaine bénéficiant de nanomédicaments sur le marché. Les liposomes ont été la première classe de nanomédicaments à recevoir une autorisation de mise sur le marché par la FDA, pour le traitement du cancer du sein. En effet, le Doxil® ou Caelyx® est un nanomédicament anticancéreux qui a été mis sur le marché en 1995. Ce médicament, constitué de doxorubicine cristallisée et encapsulée dans des liposomes pégylés, est indiqué notamment chez les patients ayant un cancer du sein métastatique avec un risque cardiaque important<sup>3</sup>. Un avantage notable de ce nanovecteur est sa capacité à augmenter le temps de circulation de la doxorubicine dans le sang, permettant ainsi d'améliorer la pharmacocinétique du principe actif *via* l'effet EPR. Depuis 2005, l'Abraxane® qui est formé de nanoparticules d'albumine complexée au

paclitaxel est également utilisée contre le cancer du sein métastatique, en cas d'échec du traitement de première ligne. Grâce à ce nanovecteur, le paclitaxel parvient plus efficacement au niveau des cellules cancéreuses, permettant une augmentation de la spécificité et une diminution de la toxicité au niveau des cellules saines. Chaque nanomédicament est jugé par la commission de transparence afin d'évaluer le service médical rendu (SMR) et l'amélioration du service médical rendu (ASMR) des nouveaux vecteurs. Ainsi, l'Abraxane® a démontré pouvoir apporter un SMR important mais une ASMR faible comparé au paclitaxel injectable dans le traitement de première ligne de l'adénocarcinome du pancréas métastatique (gain absolu de 1,8 mois en termes de survie globale mais augmentation des effets secondaires)<sup>18,19</sup>. Aujourd'hui, environ 10 nanomédicaments contre le cancer sont sur le marché mais de nombreux autres sont en développement clinique<sup>20-22</sup>.

## 1.4. Ce qu'il faut dépasser

Les nanomédicaments représentent un réel espoir notamment en oncologie. Leur essor a mis en avant l'importance d'une recherche pluridisciplinaire associant chimie, physique, galénique, biologie, génomique et pharmacologie afin de pouvoir anticiper les problèmes futurs potentiellement observés lors des différentes phases cliniques. L'une des principales difficultés dans le développement des nanomédicaments réside dans la variabilité des modèles utilisés lors des études précliniques. Les tumeurs humaines diffèrent des modèles tumoraux utilisés (souris/humains). En effet, l'hétérogénéité de la vascularisation tumorale et la différence de densité vasculaire engendrent une modification de l'intensité de l'effet EPR, modifiant ainsi la réponse aux nanovecteurs de deuxième génération utilisés<sup>23</sup>. Le plus souvent, les modèles utilisés dans les études précliniques s'éloignent de la réalité et le transfert vers un traitement clinique est alors un échec. Plusieurs défis liés à la formulation, la complexité chimique des vecteurs mais également au choix et à la spécificité du ligand, sont actuellement à relever. En effet, plus le système contient d'excipients plus l'étude de la toxicité des produits s'avère complexe<sup>24</sup>. Le développement de ces nanovecteurs a permis d'obtenir une meilleure spécificité, mais beaucoup d'études ont montré une grande variabilité pharmacocinétique des formes vectorisées<sup>25</sup>.

## 2. Stratégies pour le développement de nanoparticules innovantes

### 2.1. Les peptides pénétrants

Un des obstacles rencontrés pour l'administration de molécules actives est le passage de la membrane plasmique pour entrer dans les cellules d'intérêt. Une stratégie permettant de pallier à ce problème est l'utilisation de peptides pénétrants, appelés également peptides pénétrateurs de cellules (CPP : *Cell Penetrating Peptides*). Ces peptides, composés de 5 à 30 acides aminés, sont capables de pénétrer à l'intérieur des cellules et de faciliter l'internalisation cellulaire de molécules cargos qui leur seraient

conjuguées. Ils peuvent être internalisés dans les cellules par un ou plusieurs mécanismes, dont certains ne nécessitent pas d'apport d'énergie.

La découverte de protéines pouvant pénétrer dans les cellules a été initiée pour la première fois en 1988 avec l'identification de la protéine TAT présente dans le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Cette protéine pouvant pénétrer efficacement dans les cellules, cette observation a remis en cause le fait que la membrane plasmique était imperméable aux molécules hydrophiles<sup>26,27</sup>. Par la suite, Joliot *et al.* ont montré que la protéine Drosophila antennapedia homeodomain pénètre efficacement dans les cellules neuronales avec la capacité de s'accumuler dans les noyaux cellulaires<sup>28</sup>. Ces découvertes ont conduit à l'identification des premiers CPP : le peptide TAT<sup>29</sup> et la pénétratine<sup>30</sup>. Depuis, de nombreux CPP ont été découverts et peuvent être classés selon leur origine en trois différentes classes : les peptides dérivés de protéines, les peptides chimères formés par la fusion de deux séquences naturelles et les CPP synthétiques. D'autres classifications ont été mises en place, basées sur les caractéristiques physico-chimiques des CPP<sup>31</sup> : caractère amphiphile, hydrophile, cationique ou encore en fonction de la structure secondaire<sup>32</sup>. Un exemple de CPP synthétique souvent utilisé comme peptide modèle est les polyarginines ou les MAP (*model amphiphatic peptide*). La conception de ces peptides a été inspirée des CPP naturels avec l'observation de propriétés physico-chimiques communes de certains acides aminés (basicité et hydrophobicité) nécessaires à la pénétration cellulaire. Aujourd'hui plus de 25 médicaments constitués de CPP conjugués à une molécule active sont en cours de développement clinique dans de nombreuses applications : traitement de l'inflammation<sup>33</sup>, de la douleur<sup>34</sup>, des maladies cardiaques<sup>35</sup>, du vieillissement<sup>36</sup>, du cancer<sup>37</sup>... (Tableau 1).

**Tableau 1** : Exemples d'applications de CPP conjugués à des molécules actives en cours de développement clinique. NR : Non renseigné. (Adapté de Habault & Poyet, 2019<sup>38</sup>).

CPP	Molécule active	Application	Phase des essais cliniques	Nom du composé	ClinicalTrial.gov ID
Arg <sub>7</sub>	Cyclosporine A	Psoriasis	Phase II terminée en 2003	PsorBan ®	NR
TAT	Inhibiteur $\delta$ PKC (protéine kinase C)	Infarctus	Phase II terminée en 2011	KAI-9803	NCT00785954
PTD4	Phosphopeptide HSP20 (protéines de choc thermique)	Cicatrisation	Phase II terminée en 2012	AZX-100	NCT00825916
P28	P28	Tumeurs du système nerveux central	Phase I terminée en 2013	P28	NCT01975116
P28	P28	Tumeurs solides	Phase I terminée en 2014	P28	NCT00914914
NR	NR	Maladie musculaire de Duchenne	Phase II terminée en 2015	AVI-4658 Eteplirsén	NCT00844597

TAT	JNK-1	Inflammation intra-oculaire Douleur	Phase III terminée en 2016	XG-102	NCT02235272
TAT	JNK-1	Baisse et troubles de l'audition	Phase III terminée en 2017	AM-111	NCT02561091
MTS	JNK-1	Dystonie cervicale	Phase II terminée en 2018	R-002	NCT02706795

Pour pouvoir utiliser les CPP comme vecteur d'internalisation d'une molécule active il est important de comprendre les mécanismes qui leur permettent de traverser les membranes cellulaires. Pour cela, plusieurs facteurs doivent être pris en compte comme la structure du peptide ou l'interaction entre les acides aminés et les composants cellulaires. A ce jour, malgré quelques contradictions rencontrées dans la littérature, plusieurs mécanismes d'internalisation ont été identifiés. Il semble acquis que deux grands types d'internalisation cellulaire coexistent : i) la translocation directe au travers de la bicouche lipidique, qui présente l'avantage d'un accès direct et rapide des CPP au cytoplasme des cellules et ii) l'endocytose, qui présente l'inconvénient d'une accumulation cytoplasmique lente et limitée des CPP, avec potentiellement une dégradation lysosomale si c'est un mécanisme d'endocytose dépendant des clathrines. Ces mécanismes sont détaillés dans la partie 2.1.2.

### 2.1.1. Propriétés structurales des CPP

Les interactions électrostatiques entre les CPP, les protéoglycanes et les phospholipides (chargés négativement) de la membrane cellulaire sont connues pour avoir un rôle clé dans le processus d'internalisation<sup>39-43</sup>. En effet, les interactions (électrostatiques et hydrophobes) entre la séquence peptidique et la membrane dépendent de plusieurs critères<sup>44,45</sup> :

#### - Les charges positives

La membrane cellulaire est globalement chargée négativement et peut interagir avec les CPP chargés positivement. Le rôle des charges positives a été démontré par Ryser et Hancock lors de l'étude de l'absorption de l'albumine par les cellules cancéreuses. En effet, cette absorption est améliorée lorsque la protéine est mélangée à des polylysines<sup>46</sup>. Des différences entre les acides aminés chargés positivement ont également été démontrées : l'arginine s'est avérée plus efficace que la lysine. En effet l'efficacité serait liée au guanidinium qui peut former des liaisons hydrogène bidentées avec des groupes phosphate, sulfate et carboxylate situés à la surface des membranes<sup>47-49</sup>. Il a également été montré que le nombre de résidus arginine était important, avec une absorption optimale lorsque les polyarginines sont constitués de 7 à 15 acides aminés<sup>47</sup>.

#### - Le caractère hydrophobe

Les résidus hydrophobes jouent également un rôle majeur dans l'interaction avec la bicouche membranaire plasmique, ce qui améliore le mécanisme de translocation<sup>50-52</sup>. Il a été montré que l'ajout d'un résidu tryptophane à des séquences peptidiques telles que l'Arg<sub>6</sub> ou le TAT entraînait une

modification du mécanisme de translocation<sup>53</sup>. Cependant, il est important de noter que ce caractère hydrophobe peut entraîner une diminution de l'internalisation si les peptides demeurent à l'intérieur de la bicouche membranaire<sup>54</sup>. Parmi les résidus hydrophobes, le tryptophane a démontré avoir des propriétés d'internalisation particulièrement intéressantes du fait de la présence d'un cycle aromatique<sup>55</sup>.

#### - **La structure secondaire**

Les CPP adoptent diverses structures lorsqu'ils entrent en contact avec les lipides de la membrane cellulaire<sup>56-59</sup>. Pour une même séquence peptidique, de nombreuses structures ont pu être observées selon les conditions expérimentales : concentrations, ratio peptide/lipide, pH, température, etc. Ainsi, il a été démontré qu'au contact des membranes, la pénétratine peut adopter deux structures différentes : formation d'hélices  $\alpha$ <sup>60,61</sup> ou de feuilletts  $\beta$ <sup>62</sup>. Le lien entre la structure secondaire du peptide et le mécanisme d'internalisation n'a pas été clairement démontré, cependant il semble y avoir un lien entre la conformation du peptide et le mécanisme d'entrée cellulaire<sup>45</sup>. En effet, il a été montré que les interactions entre le peptide Pep-1 (peptide amphiphile de 21 résidus) et les composants de la membrane, comme les phospholipides, entraînaient un repliement partiel du peptide et la formation d'hélices qui initie le processus de translocation<sup>63</sup>. Brasseur *et al.* ont d'ailleurs émis l'hypothèse que les peptides adaptent leur conformation en fonction de leurs interactions avec les différents environnements lipidiques entraînant ainsi des différences de structures<sup>64</sup>.

### 2.1.2. Mécanismes d'internalisation des CPP

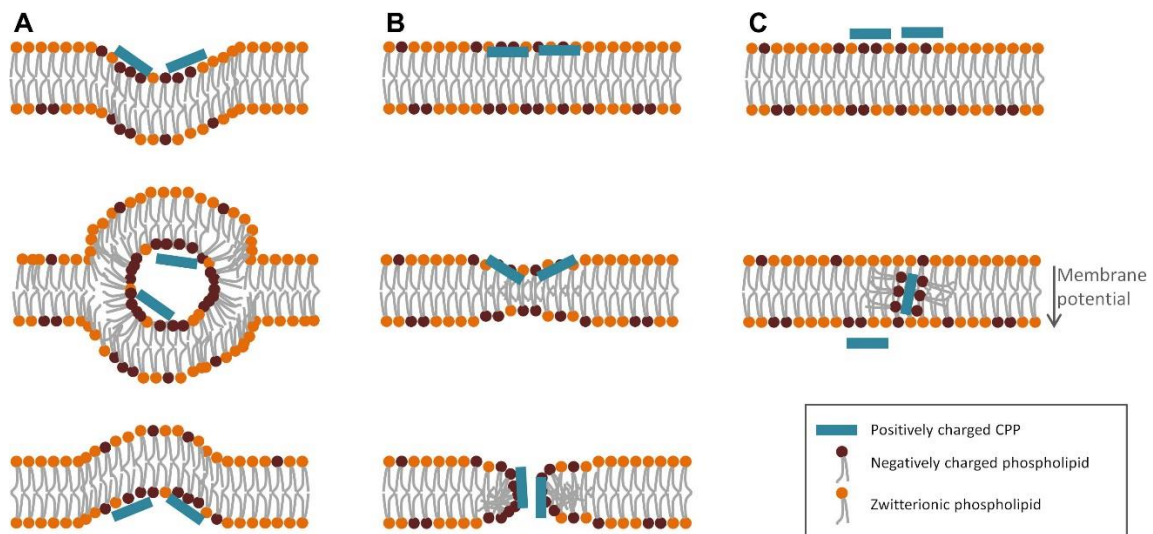
Les premières études, menées sur la pénétratine, le peptide TAT et l'Arg<sub>9</sub> ont montré que ces peptides pénètrent dans les cellules *via* un processus passif d'entrée par translocation directe au travers de la membrane plasmique<sup>29,65,66</sup>. Par la suite, le rôle important de l'endocytose a également été mis en avant : l'endocytose et la translocation directe peuvent se produire simultanément<sup>67-69</sup>. Il est important de noter que les mécanismes d'internalisation impliqués sont impactés par différents paramètres : la nature du CPP, le couplage du CPP avec une molécule cargo, le poids moléculaire de la molécule étudiée, le type de liaison entre le CPP et la molécule mais également la lignée cellulaire étudiée, la concentration en CPP, le temps d'incubation etc<sup>70</sup>... L'internalisation du CPP se fait donc *via* différents mécanismes qui sont interconnectés et qui peuvent avoir lieu de façon simultanée.

#### - **La translocation**

La translocation peut se faire selon différentes approches (Figure 2)<sup>31</sup>. (A) Ce mécanisme implique la formation de micelles inverses, suite à la courbure membranaire imposée par le peptide ; la micelle s'ouvre ensuite dans le cytoplasme. Ce mécanisme semble être produit par l'existence d'un mouvement de flip-flop du peptide<sup>71</sup>. (B) Le modèle de pore transitoire peut également être lié au mouvement de flip-flop, au cours duquel les CPP s'associent à la membrane afin de former des pores transitoires<sup>72</sup>. (C)



Le modèle de fusion membranaire est un modèle dans lequel le peptide s'insère et diffuse à travers la membrane<sup>73</sup>.



**Figure 2** : Mécanismes suggérés d'entrées des CPP par translocation. **(A)** Modèle de micelle inverse, **(B)** Modèle de pore transitoire et **(C)** Modèle de fusion membranaire (Bechara & Sagan, 2013<sup>31</sup>).

### - L'endocytose

L'endocytose des CPP se fait en deux étapes : une entrée endocytaire suivie d'un échappement endosomal. La dernière étape est cruciale car elle permet d'éviter la dégradation de la molécule cargo qui peut ainsi exercer son activité biologique. Le terme endocytose englobe la phagocytose pour les grosses particules et la pinocytose pour les solutés. Quatre types de pinocytose existent : la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la cavéoline ou de la clathrine et l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline<sup>74</sup>. La macropinocytose est notamment impliquée dans le mécanisme d'internalisation des polyarginines<sup>75</sup>.

L'un des obstacles à l'utilisation des CPP comme stratégie de vectorisation est le manque de spécificité. En effet, la plupart des CPP sont internalisés dans tous types de cellules (saines et cancéreuses). Plusieurs stratégies ont été développées afin d'augmenter cette spécificité : conjugaison du CPP avec des ligands tels que le peptide RGD, l'acide folique ou l'acide hyaluronique<sup>76</sup>. Cependant, dans la littérature, certains peptides ont démontrés être spécifiques de certaines lignées cancéreuses comme le peptide RLW dans le cas des cellules cancéreuses du poumon (lignée humaine A549)<sup>77</sup> ou encore le peptide TLS concernant les cellules du cancer de l'ovaire (lignée humaine SKOV3)<sup>78</sup>.

## 2.2. Les prodrogues

Le terme prodrogue, introduit en 1958 par Adrien Albert<sup>79</sup>, désigne tout composé destiné à un usage thérapeutique et nécessitant une modification métabolique avant de pouvoir exercer un effet pharmacologique<sup>80</sup>. Cette approche consiste ainsi à coupler de façon covalente une molécule active à un groupement chimique *via* un lien clivable à l'endroit de la cible d'intérêt pour pouvoir libérer cette molécule

active. Elle permet de contourner certaines limitations et ainsi d'améliorer la solubilité de la molécule active, sa stabilité mais également sa spécificité, *via* un ciblage actif ou passif. Ces deux types de ciblages sont présentés ci-dessous, en détaillant les molécules couramment utilisées pour chaque ciblage.

- Ciblage passif.

Différents polymères ont démontré cliniquement leur efficacité afin d'améliorer la rétention tumorale, la demi-vie plasmatique et diminuer la toxicité systémique. Parmi eux : le polyéthylène glycol (PEG) qui est le plus utilisé notamment pour ses propriétés de furtivité et les poly(acrylamides) tel que le poly(N-(2-hydroxypropyl-méthacrylamide) (HMPA), dont la fonction hydroxyle rend possible la fonctionnalisation avec des molécules actives comme la doxorubicine<sup>81</sup> ou encore le cis-platine<sup>82</sup>.

- Ciblage actif.

Les cellules cancéreuses surexpriment un certain nombre de récepteurs spécifiques à leur surface. L'une des stratégies consiste à utiliser des anticorps ciblant par exemple, les récepteurs CD20 (lymphome de Hodgkin), CD25 (lymphome à cellules T) ou CD33 (leucémie myéloïde aigüe), permettant ainsi de délivrer des radionucléides (Zevalin<sup>®</sup>), des immunotoxines (Ontak<sup>®</sup>) ou des anticorps (Mylotarg<sup>®</sup>) de manière sélective dans les cellules tumorales<sup>83</sup>.

Afin de construire une prodrogue, il est important que le principe actif possède une fonction pouvant former une liaison bioclivable. Cela permet un relargage contrôlé de la drogue, dépendant de la liaison utilisée. Certaines liaisons peuvent être dégradées dans des conditions biologiques particulières qui permettent la libération de la molécule active : la présence d'enzymes spécifiques ou un pH acide. Les liaisons bioclivables couramment utilisées sont les liens esters clivables par les estérases, les fonctions amides (liaison peptidique) clivables par les peptidases, les hydrazones qui sont des liaisons pH-sensibles ou encore les ponts disulfures pouvant être dégradés par le glutathion, surexprimé dans les cellules tumorales<sup>84</sup>.

### 2.3. Les auto-assemblages de molécules amphiphiles

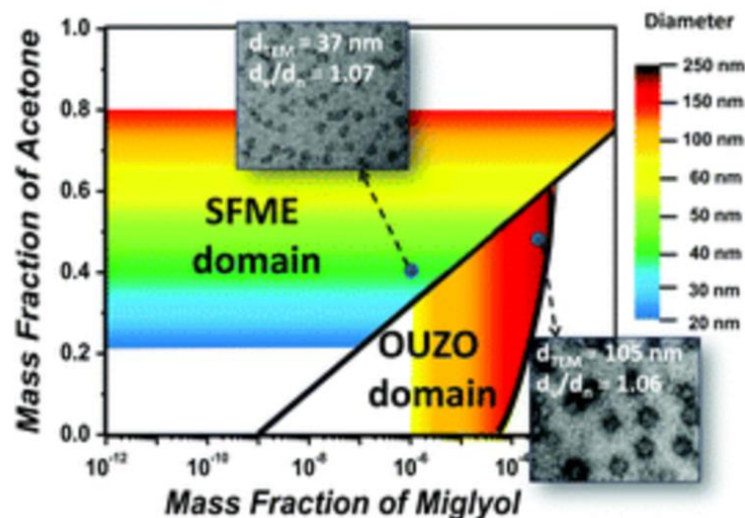
Différentes méthodes de préparation des nanoparticules existent et permettent de formuler des nanostructures ayant des propriétés adéquates pour assurer la délivrance et le ciblage d'une molécule active (l'émulsification-évaporation, le « *salting-out* » ou relargage, l'émulsification-diffusion ou la nanopréciipitation). Selon la méthode et les conditions utilisées il est possible d'obtenir des nanoparticules ayant des propriétés spécifiques<sup>85-87</sup>. Dans ce manuscrit, les composés étudiés seront des molécules amphiphiles, qui possèdent donc deux polarités différentes, une partie hydrophobe et une partie hydrophile. Ces molécules amphiphiles présentent des propriétés spécifiques dans l'eau : elles peuvent s'associer *via* des liaisons hydrogènes, forces de Van der Waals, interactions électrostatiques ou encore interaction hydrophobe<sup>88</sup>. Ces associations peuvent conduire à des structures diverses (micelles sphériques, micelles cylindriques linéaires, vésicules ou encore bicouches) suivant l'air de la tête polaire, le volume de la partie hydrophobe et sa longueur : le paramètre d'empilement permet ainsi de prédire les auto-assemblages obtenus<sup>89</sup>.

La nanoprécipitation est une méthode simple et rapide qui ne nécessite pas l'utilisation de surfactant ni d'apport d'énergie extérieure. En pratique, cette méthode consiste à solubiliser le composé amphiphile dans un solvant organique polaire (généralement de l'éthanol, de l'acétone ou du THF). Cette solution est ensuite ajoutée à un grand volume de non-solvant pour le soluté (généralement de l'eau). Il y a alors une séparation de phase avec la formation de nanoparticules. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation. Ce procédé d'auto-association spontanée a été nommé « effet Ouzo » par Vitale et Katz<sup>90</sup>.

Le mécanisme de formation des nanoparticules est lié à plusieurs paramètres qui auront un impact sur la concentration particulaire, la taille des objets et la polydispersité : la sursaturation, la tension interfaciale, le coefficient de diffusion et le murissement d'Ostwald<sup>91-94</sup>. Ce mécanisme de formation est basé sur les théories classiques de nucléation (CNT) : il y a formation de germes thermodynamiquement instables qui apparaissent et disparaissent tant que la limite critique de sursaturation n'est pas atteinte. Une fois atteinte, une phase de nucléation rapide se produit pendant laquelle des germes stables et homogènes sont formés. Lorsque la limite minimale de nucléation est atteinte la croissance peut alors commencer *via* notamment de la coalescence ou du murissement d'Ostwald<sup>95</sup>.

Il est ainsi possible d'obtenir des nanoparticules ayant une distribution en taille unimodale allant de 50 à 300 nm dans des conditions appropriées définies par le « domaine Ouzo »<sup>96</sup>. Aujourd'hui, de nombreuses études cherchent à identifier les conditions expérimentales permettant de contrôler au mieux la taille et la polydispersité des auto-assemblages obtenus<sup>91,97</sup>.

Ces études portent notamment sur la réalisation de diagrammes de phases de systèmes ternaires (soluté/solvant/eau) et binaires. Il a ainsi été démontré qu'il est possible d'obtenir des nanostructures homogènes en taille dans deux différentes régions du diagramme de phase : le domaine Ouzo et le domaine SFME (*Surfactant-Free MicroEmulsion*) (Figure 3).



**Figure 3** : Différents domaines du diagramme de phase : domaine SFME et domaine Ouzo. Représentation de la fraction massique en acétone en fonction de la fraction massique en huile. Le diamètre des auto-assemblages évolue en fonction de la composition du système (concentration en acétone et en soluté) et du domaine (Ouzo ou SFME) (Yan *et al.*, 2017<sup>98</sup>).

Les microémulsions sont des dispersions thermodynamiquement stables de deux liquides immiscibles qui peuvent être stabilisées par un ou plusieurs tensioactifs. Dans les années 70, Barden *et al.* ont montré grâce à des mesures de conductivité et des tests de centrifugation qu'il était possible de former des microémulsions stables, sans utilisation de tensioactifs, au-dessus de la bionodale (SFME)<sup>99-101</sup> : ces microémulsions se retrouvent dans une large région du domaine monophasique du diagramme de phase (Figure 3). Contrairement aux émulsions métastables préparées dans le domaine Ouzo, les agrégats observés dans le domaine SFME sont thermodynamiquement stables. De plus, il est possible de distinguer visuellement les suspensions formées dans ces différents domaines : le domaine Ouzo est caractérisé par des suspensions opalescentes contrairement au domaine SFME dans lequel les formulations sont macroscopiquement transparentes. Il a été observé que la taille des objets formés dans la zone SFME dépend de la fraction massique en solvant mais ne change pas avec la concentration en soluté. Cette zone permet ainsi la formation de nano-objets de différentes tailles (allant de 20 à 150 nm) dans une large fenêtre du diagramme de phase<sup>98</sup>. Les principales caractéristiques et différences entre le domaine SFME et le domaine Ouzo sont présentées dans le Tableau 2. Cependant l'utilisation et la préparation des SFME n'ont été que récemment étudiées<sup>102</sup>.

**Tableau 2** : Principales caractéristiques des suspensions obtenues dans le domaine SFME ou dans le domaine Ouzo : stabilité, aspect visuel, évolution de la taille des particules en fonction de la concentration en soluté et de la concentration en solvant.

<b>Principales caractéristiques</b>	<b>Domaine SFME</b>	<b>Domaine Ouzo</b>
Stabilité	Thermodynamiquement stable	Métastable
Aspect visuel de la suspension	Transparente	Opalescente
Evolution de la taille des particules en fonction de la concentration en soluté	Pas de modification de la taille des particules en fonction de la concentration en soluté	Augmentation de la taille des particules avec une augmentation de la concentration en soluté
Evolution de la taille des particules en fonction de la concentration en solvant	Augmentation de la taille des particules avec une augmentation de la concentration en solvant	Pas de modification de la taille des particules en fonction de la concentration en solvant
Pourcentage de principe actif précipité	Partiel	Total

### 3. Auto-assemblages constitués de peptides : synthèse et activité biologique

Revue publiée dans *Nano Research* en 2017.

Lien : <https://link.springer.com/article/10.1007/s12274-017-1892-9>

Les peptides sont de plus en plus utilisés pour la formation d'auto-assemblages en raison de leurs propriétés intéressantes (biocompatibilité, diversité chimique et structurelle). Les peptides pénétrants ont notamment démontré leur capacité à surmonter les barrières membranaires et transporter des molécules actives à l'intérieur des cellules. Les peptides sont souvent liés de manière covalente à ces molécules, formant des conjugués amphiphiles pouvant éventuellement s'auto-assembler. Ces nanostructures supramoléculaires formées à partir de peptides sont utilisées dans le domaine des nanomédecines afin de protéger le principe actif mais également d'améliorer sa stabilité, son ciblage et son internalisation cellulaire.

Cette revue bibliographique décrit les auto-assemblages constitués de peptides conjugués à des chaînes aliphatiques ou à des molécules actives. Les différents procédés de synthèse, de formulation et l'activité biologique des nanostructures obtenues sont développés dans cet article.

# Self-assembly of peptide-based nanostructures: Synthesis and biological activity

Léna Guyon, Elise Lepeltier (✉), and Catherine Passirani

*Micro & Nanomédecines Translationnelles-MINT, UNIV Angers, INSERM U1066, CNRS UMR 6021, UBL Université Bretagne Loire, Angers F-49933, France*

**Received:** 8 March 2017  
**Revised:** 20 October 2017  
**Accepted:** 21 October 2017

© Tsinghua University Press and Springer-Verlag GmbH Germany 2017

## KEYWORDS

self-assembly,  
cell penetrating peptide,  
nanoparticle,  
peptide

## ABSTRACT

Peptide-based nanostructures have received much attention in the field of drug targeting. In fact, peptides have many advantages such as simplicity of the structure, biocompatibility, and chemical diversity. Moreover, some peptides, which are called cell-penetrating peptides, can cross cellular membranes and carry small molecules, small interfering RNA, or viruses inside live cells. These molecules are often covalently or noncovalently linked to cargoes, thus forming amphiphilic conjugates that can self-assemble. Supramolecular nanostructures formed from peptides are used in nanomedicine as a carrier to protect a drug and to target cancer cells. This review explores aliphatic-chain-conjugated peptides and drug-conjugated peptides that can self-assemble. Special emphasis is placed on the synthesis procedure, nanostructure formation, and biological activity.

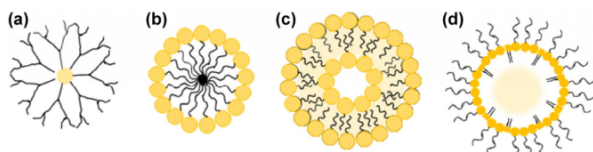
## 1 Introduction

One strategy to obtain nanoparticles is to apply knowledge learned from natural biological systems to building of supramolecular structures, formed by intermolecular forces such as hydrogen bonds (H-bonds), van der Waals forces, and hydrophobic interactions. These interactions can lead to various structures such as dendrimers, micelles, liposomes, or lipid nanocapsules (Fig. 1). Initial research efforts were focused on encapsulating drugs to minimize their degradation and increase drug bioavailability and accumulation at a target site. Historically, the first practical systems were liposomes, discovered in 1965

[1, 2], and micellar formulations [3, 4]. Liposomes can be obtained by hydration of a thin lipid film; the self-assembly of lipids leads to bilayers mimicking a cell membrane [5, 6]. This system has the ability to carry hydrophobic and amphiphilic compounds as cargo in the lipid bilayer and/or hydrophilic molecules in the aqueous internal cavity [7].

Prediction of the structure of a self-assembled object has been the focus of numerous studies [8–15]. An original approach was developed by Israelachvili to predict the supramolecular structures of self-assembled amphiphilic molecules in water [12–15]. Indeed, the study of the supramolecular organization of a nano-assembly is essential for therapeutic purposes; the

Address correspondence to [elise.lepeltier@univ-angers.fr](mailto:elise.lepeltier@univ-angers.fr)



**Figure 1** Schematic presentation of dendrimers (a), micelles (b), liposomes (c) and lipid nanocapsules (d).

structure has an influence on the biological activity of the self-assembly if different parameters are varied by researchers, e.g., stability in biological media, the ability to diffuse through tissues, and internalization by cells [16].

The use of natural building blocks such as phospholipids, oligosaccharides, oligonucleotides, proteins, and peptides has attracted much attention regarding the fabrication of new materials [17–21]. Among all these building blocks, peptides have aroused tremendous interest owing to their simple structure, biocompatibility or biodegradability, and chemical diversity.

In this review, different strategies to design peptide-based conjugates that can self-assemble are discussed. Particular emphasis is placed on i) aliphatic-chain-conjugated peptides and ii) drug-conjugated peptides. For each topic, the synthesis procedure, nanostructure formation, and biological activity will be overviewed.

## 2 Aliphatic-chain-conjugated peptides

This section provides an overview of aliphatic-chain-conjugated peptides that have the ability to self-assemble. The focus is on amphiphilic peptides with biological applications. First, the synthesis of the amphiphilic compounds is examined, followed by an overview of the self-assembly procedure and a description of the structure obtained. Finally, biological-activity studies are reported.

### 2.1 Preparation of amphiphilic compounds

A member of the class of peptide amphiphiles (PAs) consists of a hydrophilic peptide sequence attached to hydrophobic lipid chains through an amide bond. Peptides are biomolecules that have unique chemical and physical properties as a function of their primary structure (amino acid composition), secondary structure

( $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet) and three-dimensional or tertiary structure. Thus, different peptides are used in a wide range of applications.

In most studies, peptides are prepared by solid-phase peptide synthesis using standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry. After this step, two approaches are considered:

- 1) The aliphatic chain is linked using the same strategy (solid-phase synthesis) [22–33].
- 2) The aliphatic chain is linked via chemical reactions after cleavage of the peptide from the resin [34, 35].

#### 2.1.1 Aliphatic-chain-coupling reaction on the resin

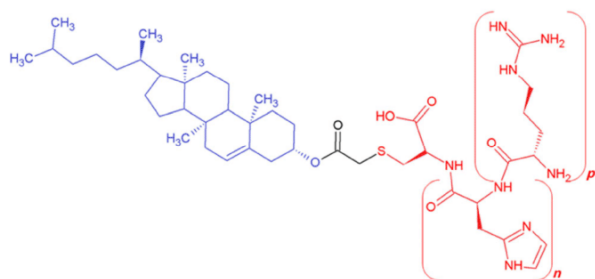
Zongguang Tai et al. applied the first approach [22, 23]. In their studies, the peptide  $H_3CR_5C$  was synthesized on the resin and then the stearyl moiety was attached to the N-terminal extremity of the peptide [22, 23]. Thus, the total synthesis was conducted on the resin, allowing for simplification of the purification step. More often, the conjugates were cleaved from the resin by means of a mixture containing trifluoroacetic acid and purified by preparative reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Nonetheless, a correlation was found between the length of the chain and difficulty of the coupling. In fact, the reaction with a fatty acid containing six carbon atoms was successful after at least 6 h of incubation [24].

#### 2.1.2 Aliphatic-chain-coupling reaction after cleavage

In the second approach, the aliphatic chain needs to be functionalized to react with the peptide. Tang Q. et al. modified cholesterol with acryloyl chloride to obtain cholesterol acrylate, and then they conjugated it with peptides containing a C-terminal cysteine residue through a thiol-acrylate Michael-type reaction, under slightly basic conditions [34]. Using this strategy, those authors synthesized four conjugates containing different peptide sequences:  $Ch-CH_5R_5$ ,  $Ch-CH_3R_3$ ,  $Ch-CR_5$  and  $Ch-CR_3$  (structures are shown in Fig. 2).

Peters D. et al. used the thiol group of cysteine-containing peptides for covalent conjugation to the lipid tail. In fact, DSPE-PEG<sub>2000</sub>-maleimide was conjugated to the peptide via a thioether linkage [36].

Another way is to obtain an alkyne-modified lipid and an azide-modified peptide [35]. These modifications allow investigators to link the peptide and lipid via



**Figure 2** Chemical structure of cholesterol-peptide conjugates Ch-Cys-His<sub>n</sub>-Arg<sub>p</sub> with  $n = 0, 3, 5$  and  $p = 3, 5$ . Cholesterol represented in blue and peptide in red.

a click reaction [37]. With this objective in mind, T. Matsubara et al. synthesized a peptide with an azide group through the side chain of Lys (ARLPRK(N<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>)) according to the Fmoc strategy. To prepare an alkyne-containing lipid, those authors modified the lipid (dipalmitoylphosphatidylethanolamine; DPPE) with 4-pentynoic acid to obtain N-(4-pentynoyl)-DPPE (Fig. 3). After these two steps, the coupling of pentynoyl-DPPE with azide-peptide was performed.

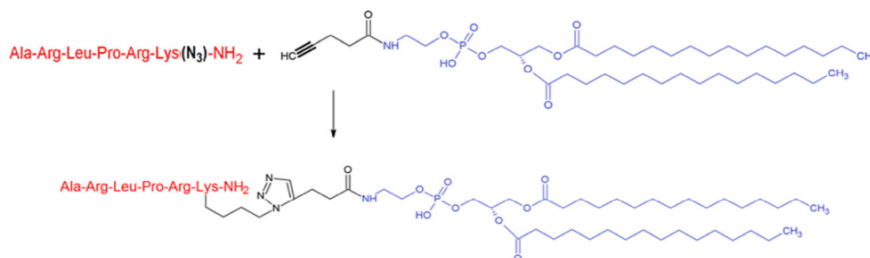
## 2.2 Nanostructures formed by self-assembly

### 2.2.1 Nanofibers

A number of PA molecules have been demonstrated to self-assemble into cylindrical nanofibers, as a result of H-bonding among peptide segments and hydrophobic collapse of alkyl tails [24, 32, 38, 39]. These cylindrical structures were obtained in aqueous media in the presence of suitable stimuli for example, pH induction of self-assembly [24, 40]. Honggang Cui et al. showed that an alkyl segment with 16 carbons (palmitic acid) grafted to a tetrapeptide sequence, containing hydrophobic and negatively charged residues (Val-Glu-Val-Glu), self-assembled into nanobelts in an

aqueous solution at a concentration of 0.1 wt.% [40]. The nanobelts obtained had relatively monodisperse width on the order of 150 nm and length of up to 0.1 mm according to atomic force microscopy (AFM) experiments.

The influence of the self-assembly formulation on the resulting nanostructures is of interest. In this regard, Jeffrey D. Hartgerink et al. described two different modes of self-assembly [24]: Acid-induced self-assembly and divalent-ion induction. For the acid-induced self-assembly, those authors obtain nanofibers with a PA, such as C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>O grafted to C<sub>4</sub>G<sub>3</sub>S(PO<sub>4</sub>)RGD, dissolved in water and exposed to HCl vapor. They showed as well that treatment of a solution of these conjugates with Ca<sup>2+</sup> instantly resulted in gelation of the solution. For this purpose, CaCl<sub>2</sub> was dropwise added to a solution of a PA. After transmission electron microscopy (TEM) examination, it was found that the gel was comprised of nanofibers with the same dimensions as those resulting from acid-induced self-assembly. Thus, nanofibers were obtained with a diameter between 5 and 8 nm; the length and stiffness of the formed fibers depended on the peptide used. This Ca<sup>2+</sup>-induced self-assembly may be particularly helpful for medical applications, where formation of a gel at physiological pH is required [24]. Similarly, PA filaments that are designed to mimic the activity of the vascular endothelial growth factor (VEGF) peptide can form a gel network at low concentrations in aqueous media [32]. In that study, Webber M. J. et al. developed a cell-free therapy based on PA nanostructures for ischemic heart disease. To this end, the K<sub>3</sub>G peptide was covalently linked to the N-terminal extremity of a VEGF-mimetic peptide to increase water solubility, and the C<sub>16</sub>-V<sub>2</sub>A<sub>2</sub> tail was added



**Figure 3** Synthesis of peptide-DPPE conjugates via the click reaction of pentynoyl-DPPE and an azide containing a pentapeptide (adapted with permission from Ref. [35], © Front. Microbiol. 2016).

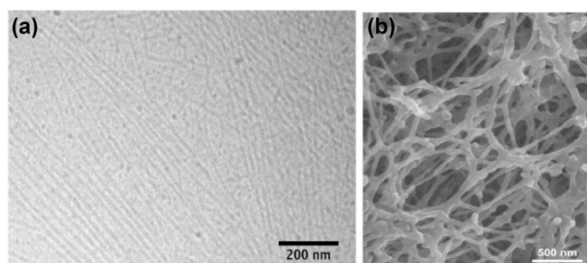


to facilitate self-assembly into cylindrical structures. Accordingly, the following sequence was formed:  $C_{16}\text{-V}_2\text{A}_2\text{K}_3\text{GKLTWQELYQLKYKGI}$  (VEGF PA). The analysis of this PA by TEM experiments revealed formation of cylindrical nanostructures that caused congealing in the presence of divalent counterions ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; Fig. 4).

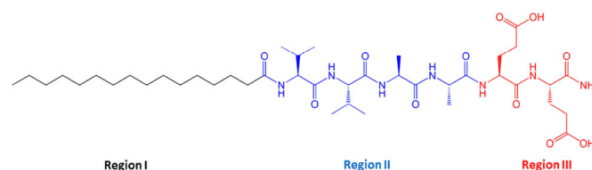
Furthermore, hydrogelation of four PAs was studied by Matson J. B. et al. with regard to drug delivery applications [39]. Figure 5 shows the chemical structure of a PA molecule ( $C_{16}\text{V}_2\text{A}_2\text{E}_2$ ) developed by the Stupp group, and this PA has three key structural features. This peptide sequence,  $C_{16}\text{V}_2\text{A}_2\text{E}_2$ , which contains a derivatized hydrazide has been investigated, and prodan, which is typically used as a dielectric probe for cell membranes, served as a model molecule. To control the drug release, prodan was linked to the peptide through a hydrazine bond at a different position along the backbone of the peptide. This pH-sensitive bond can be destroyed in the acidic environment of a cell compartment. Hydrogel formation was induced by adding a 100 mM  $\text{CaCl}_2$  solution after dissolving PA in NaOH. After small angle X-ray scattering examination, it was shown that the cross-sectional diameter of the gel depended on lysine-hydrazone-prodan residue position; the largest diameter was obtained with  $C_{16}\text{V}_2\text{A}_2\text{E}_2\text{K(Hyd-Prodan)}$  (10.8 nm),  $C_{16}\text{V}_2\text{A}_2\text{K(Hyd-Prodan)E}_2$ , and  $C_{16}\text{V}_2\text{K(Hyd-Prodan)A}_2\text{E}_2$  had the same diameter (10.5 nm), whereas  $C_{16}\text{K(Hyd-Prodan)V}_2\text{A}_2\text{E}_2$  had the smallest size (10.4 nm; Fig. 6).

### 2.2.2 Micelles

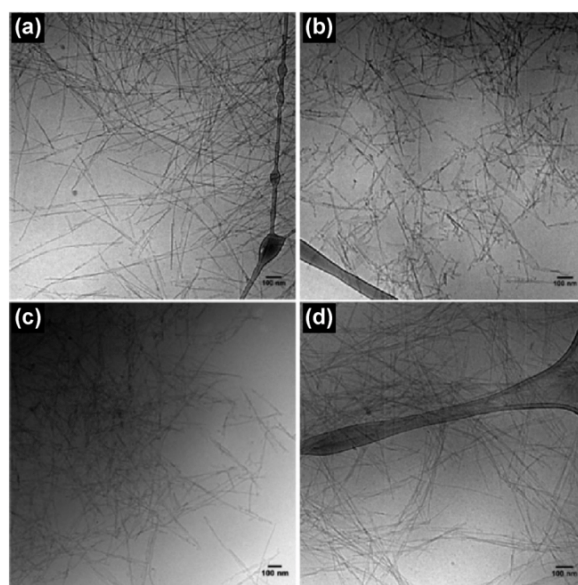
The same amphiphilic conjugates, with the same chemical structure, can be applied to creation of a



**Figure 4** TEM image of nanofibers obtained with VEGF PA and SEM image of entangled nanofiber gel formed. Reprinted with permission from Ref. [32], © National Academy of Sciences 2011.

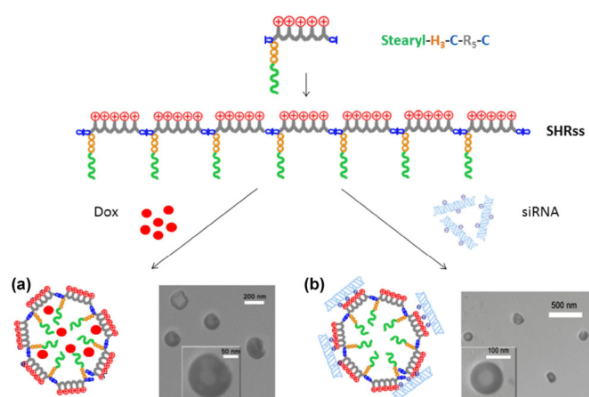


**Figure 5** Chemical structure of a representative PA  $C_{16}\text{V}_2\text{A}_2\text{E}_2$  which is composed of three entities. Region I, hydrophobic tail; region II:  $\beta$ -sheet forming segment; region III, charged groups.



**Figure 6** TEM images of (a)  $C_{16}\text{V}_2\text{A}_2\text{E}_2\text{K(Hyd-Prodan)}$ , (b)  $C_{16}\text{V}_2\text{A}_2\text{K(Hyd-Prodan)E}_2$ , (c)  $C_{16}\text{V}_2\text{K(Hyd-Prodan)A}_2\text{E}_2$ , (d)  $C_{16}\text{K(Hyd-Prodan)V}_2\text{A}_2\text{E}_2$ . Reprinted with permission from Ref. [39], © American Chemical Society 2012.

different self-assembled nanostructure (Fig. 7). In fact, stearyl- $\text{H}_3\text{CR}_5\text{C}$  conjugates that are crosslinked by disulfide bond (SHRss) have been used to form doxorubicin (DOX)-loaded micelles by nanoprecipitation and probe-based ultrasonication methods. The micelles formed by self-assembly are comprised of a hydrophilic shell and a hydrophobic core with an average diameter of 233 nm. DOX is then loaded into the micelles through hydrophobic interactions [22]. On the other hand, stearyl-peptide conjugates may effectively condense small interfering RNA (siRNA) into polyplexes with a hydrodynamic size of 100–300 nm [23]. In both cases, the same principle is followed for self-assembly, based on the nanoprecipitation technique.



**Figure 7** Nanostructures obtained with disulfide cross-linked SHRss. (a) Doxorubicin loaded micelles and (b) nanoparticles with negatively charged siRNA (adapted with permission from Ref. [22], © Elsevier B.V. 2016 and Ref. [23], © Elsevier B.V. 2015).

In the first case, a solution of DOX·HCl in dichloromethane is injected dropwise into the peptide solution followed by ultrasonication and evaporation of the solvent. In the second case, the peptides are complexed with siRNA in phosphate-buffered saline (PBS, 50  $\mu$ L per 0.5  $\mu$ g of siRNA at pH 6.0), and the sample is vortexed.

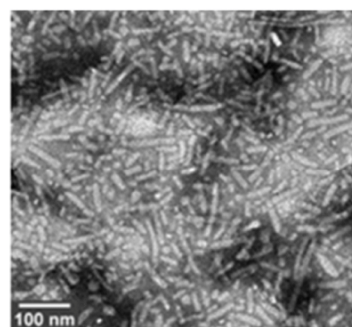
Four amphiphilic cholesterol-peptide conjugates (Ch-CH<sub>3</sub>R<sub>5</sub>, Ch-CH<sub>3</sub>R<sub>3</sub>, Ch-CR<sub>5</sub>, and Ch-CR<sub>3</sub>, structures are shown in Fig. 2) can also self-assemble into cationic micelles at low concentrations in PBS [34]. In that study, the cholesterol-peptide-DNA complexes were formed by mixing equal volumes of cholesterol-peptide in PBS (at 10 mg·mL<sup>-1</sup>) and DNA in nuclease-free water (at 1 mg·mL<sup>-1</sup>). Those authors showed that the size of the obtained complexes with DNA depended on the *R/P* ratio (molar ratio of arginine residues (*R*) in the peptide to phosphate groups (*P*) in the DNA molecule). For example, for Ch-CH<sub>3</sub>R<sub>5</sub>, the size was 718 nm at the *R/P* ratio of 5 and decreased as the *R/P* ratio increased from 10 to 30. Therefore, the smallest complexes were obtained at the *R/P* ratio of 30 with a size of 179 nm.

Formation of micelles with palmitoyl-p53<sub>14-29</sub> has been studied by D. Missirlis et al. [28]. This PA self-assembled in 10 mM phosphate buffer; the hydrophobic interactions induced formation of micelles with a hydrodynamic diameter of 319 nm but also elongated micelles with a diameter of 10 nm and a length of few

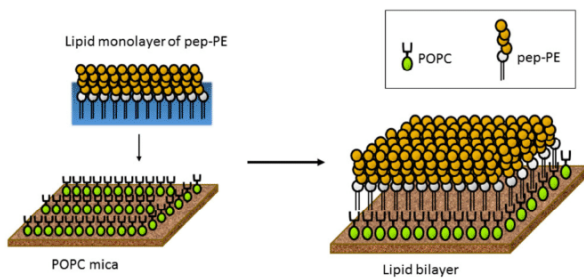
hundred nanometers. Another method for preparation of micelles involves film casting by dissolving PA in an organic solvent such as methanol or chloroform and by evaporating the solvent under an inert gas. Micelle formation proceeds after hydration of the film with water or phosphate buffer followed by a vortexing step [29]. This method was used by A. Trent et al. to construct J<sub>8</sub>-diC<sub>16</sub> micelles comprised of the J<sub>8</sub> peptide (QAEDKVKQSREAKKQVEKALKQLEDKVQK) and a hydrophobic moiety: Dipalmitoylglutamic acid (diC<sub>16</sub>). TEM analysis revealed the formation of cylindrical micelles 5–15 nm in diameter and 25–125 nm in length (Fig. 8). These nanostructures were studied as a self-adjuvant for the development of group A streptococcal (GAS) vaccines to increase an injectable-peptide concentration and protect the peptide from degradation [41].

### 2.2.3 Lipid bilayer

It could be pointed out that, as a supramolecular structure of aliphatic-chain-conjugated peptide self-assemblies, nanofibers and micelles are obtained mainly. Nevertheless, a lipid bilayer may be constructed under certain conditions. Matsubara T. and coworkers described preparation of a lipid bilayer on a mica plate. A POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) lipid monolayer at the air–water interface was prepared by the Langmuir–Blodgett technology and transferred to a freshly cleaved mica plate by horizontal deposition. Then, a second lipid monolayer of a peptide-conjugated lipid (structure shown in Fig. 9) was loaded onto the POPC-coated mica [35, 42, 43]. The Langmuir–Blodgett



**Figure 8** TEM images of cylindrical micelles obtained with J<sub>8</sub>-diC<sub>16</sub>. Reprinted with permission from Ref. [41], © Springer 2014.



**Figure 9** Procedure of construction of pep-PE lipid membrane. A pep-PE monolayer was transferred to the POPC-coated mica to give the pep-PE lipid bilayer (adapted with permission from Ref. [35], © Front. Microbiol. 2016).

deposition was also used with different PAs of the following sequences:  $(C_{18})_2$ -E- $C_2$ -RGD (amino-coupled tripeptide RGD), RGD- $C_2$ -E- $(C_{18})_2$  (carboxyl-coupled RGD), and  $(C_{18})_2$ -E- $C_2$ -RGD- $C_2$ -E- $(C_{18})_2$  (lopped RGD). Those authors obtained monolayers that can act as biomimetic membranes that present a uniformly oriented peptide sequence to the cell [44].

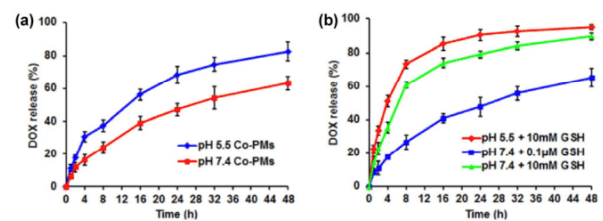
### 2.3 *In vitro* and *in vivo* studies

Self-assembled PAs possess several attractive features for different applications, and many studies are focused on drug or gene therapy in the context of cancer treatment but also on tissue regeneration. This subsection is not an exhaustive selection of biological studies covering various applications.

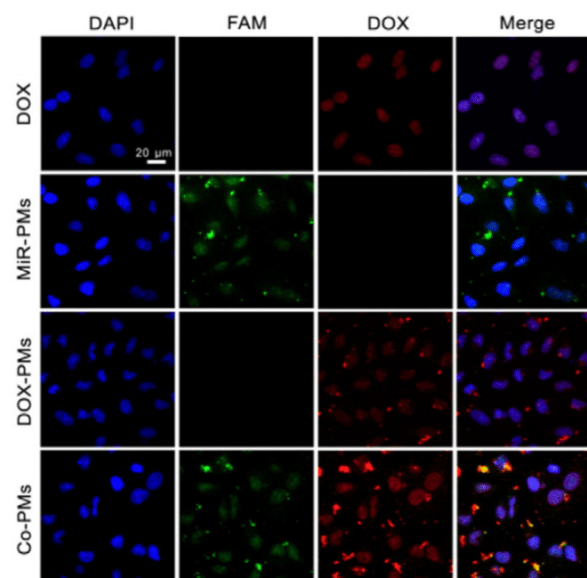
#### 2.3.1 Cancer treatment

DOX-loaded micelles formed from stearyl- $H_3CR_5C$  have been studied in the context of androgen-independent prostate cancer cells [22]. Experiments have been carried out to study some properties of these complexes, such as an *in vitro* drug release. During these experiments, performed in a dialysis bag (molecular weight cutoff 3,500 Da) immersed in PBS containing Tween 80 and GSH (glutathione is a tripeptide used to mimic the cell environment and reduce disulfide bonds), the concentration of the released DOX was quantified by means of a UV spectrometer at selected time intervals. The obtained DOX release profiles showed a strong pH influence (Fig. 10). In fact, a larger amount of drugs was released at pH 5.5 (82.6%) than at pH 7.4 (63.3%). The *in vitro* release behaviors of DOX-loaded micelles suggest that

DOX is released faster at endolysosomal pH than at physiological pH. Cellular uptake has also been investigated by flow cytometry (fluorescence-activated cell sorting) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) on DU145 cells (a human prostate cancer cell line). As shown in Fig. 11, DOX was detected in the nuclear and perinuclear regions of the cytoplasm after 1 h of incubation. Moreover, the results indicated that the uptake of micelles was time-dependent with an intracellular uptake rate higher after 4 h of incubation ( $89.50 \pm 0.99\%$ ) than after 1-h incubation ( $82.56 \pm 1.55\%$ ). It can be concluded that this amphiphilic micellar system stimulates the chemotherapeutic drug



**Figure 10** Dox release profiles of Co-PMs. (a) In PBS at pH 5.5 and 7.4, (b) with the presence of GSH in PBS at pH 5.5 and 7.4. Reprinted with permission from Ref. [22], © Elsevier B.V. 2016.



**Figure 11** Confocal microscopy images. Images of DU145 cells after incubation with DOX, MiR-PMs, DOX-PMs and Co-PMs for 1 h. Reprinted with permission from Ref. [22], © Elsevier B.V. 2016.

release into the cell nucleus, thereby improving the antitumor activity of DOX via the downregulation of SiRT1 and by reducing the cardiotoxicity of DOX.

### 2.3.2 Gene therapy

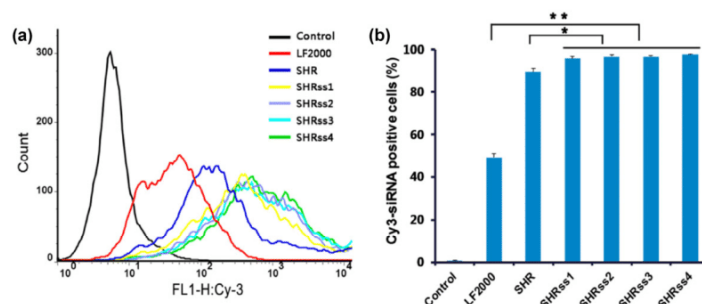
Stearyl peptides can also serve as a delivery carrier of siRNA [23]. Tai, Z. G. et al. compared the cellular uptake of disulfide bond-linked stearyl- $H_3CR_5C$  (SHRss) by means of Lipofectamine 2000 (LF2000), which is a common transfection agent helping to increase the efficiency of transfection of RNA. Flow-cytometric analysis revealed that the cellular uptake efficiency of SHRss was much higher than that of LF2000 in Luc-HeLa cells (a human cervical cancer cell line; Fig. 12). The siRNA silencing efficiency was also evaluated in Luc-HeLa cells and mCherry-HEK293 cells (human embryonic kidney cells that express red fluorescent protein) as reporter cell lines. Experiments indicated that introduction of a disulfide bond between stearyl- $H_3CR_5C$  and XYZ enabled significantly stronger gene silencing. CLSM analysis was also performed and showed the ability of SHRss-siRNA complexes to enhance cellular uptake and release siRNA into the cytoplasm. As for cytotoxicity, SHRss-siRNA complexes yielded higher cell viability than LF2000 did. Moreover, the results indicated that bioreducible disulfide bonds may decrease toxicity and improve biocompatibility. Furthermore, the *in vivo* studies showed that SHRss-siRNA complexes have high efficacy of RNA interference (gene knockdown).

Another system, the one comprised of cholesterol-conjugated peptides, has been investigated as a gene delivery carrier [34]. The DNA-binding ability of

cholesterol-peptides was assessed by an agarose gel retardation assay and the results suggested that the highest DNA-binding ability belongs to the Ch- $R_5H_5$  conjugate. After that, the luciferase expression enhancement by complexes of a cholesterol-peptide with DNA was quantified. This experiment revealed that the cholesterol-peptide conjugate with histidine residues yielded higher luciferase expression than the conjugates without histidine. This result was due to the buffering capacity of histidine, which facilitated DNA escape from endosomes. Elongated PA wormlike micelles formed from palmitoyl- $p53_{14-29}$  have been studied on SJS-1 osteosarcoma cells.

### 2.3.3 Bone and tissue regeneration

The formation of PA gels has been studied for various biological applications such as bone and tissue regeneration [25, 26]. Mata et al. evaluated the bone regeneration potential of a PA in a nonhealing rat femoral defect. The results showed successful formation of biomimetic bone crystals and enhancement of bone regeneration owing to phosphorylated serine residues contained in supramolecular nanofibers [25]. Cell entrapment in PA gels was also evaluated for cell transplantation and other tissue-engineering applications [38]. According to optical micrographs of  $MC_3T_3-E1$  cells (mouse osteoblastic cell line) entrapped in KGE PA gels, the cells adopted a spindle-like shape immediately after entrapment. Moreover, TEM analysis suggested that cells internalized the nanofiber by endocytosis, indicating that nanofibers can be degraded by natural mechanisms without any cytotoxicity. Control of a drug release was assessed by J. B. Matson



**Figure 12** Flow cytometry of SHRss/Cy3-siRNA uptake. Cellular uptake analysis of various Cy3-siRNA complexes ( $N/P = 10$ ) (a) and the ratio of Cy3-siRNA positive cells (b) after 3 h transfection in Luc-HeLa cells (final Cy3-siRNA concentration, 75 nM). The untreated cells were used as the control. Reprinted with permission from Ref. [23], © American Chemical Society 2015.

et al. on filamentous gels comprised of  $C_{16}V_2A_2E_2$  and prodan attached at different positions along the backbone of the PA. The release of prodan from the hydrogel, which requires hydrazone hydrolysis and diffusion from the gel, was studied at physiological pH in phosphate buffer. Fluorescence measurements revealed that a gel formed from  $C_{16}K(\text{Hyd-Prodan})V_2A_2E_2$  PA yielded the fastest hydrolysis. Moreover, circular dichroism experiments showed that the distance between the lysine branch and the alkyl tail had an impact on the properties of the nanostructures. In fact, the lysine-hydrazone-prodan tail position determined packing density, which can regulate the mobility of prodan and the accessibility of hydrazine to the solvent. That study highlights the importance of the formed supramolecular structure for control over a drug release for regenerative-medicine applications [39].

#### 2.3.4 Ischemia treatment

Webber, M. J. et al. designed nanostructures that can mimic the activity of VEGF for therapeutic angiogenesis. Biological activity of the PA nanostructure was investigated *in vitro* in human umbilical vein endothelial cells. Phosphorylation assays indicated that VEGF PA specifically activated VEGF receptors as compared to no-treatment control. For *in vivo* testing, those authors carried out a chicken chorioallantoic membrane assay to estimate the angiogenic activity of the VEGF PA. After 3 days of treatment, they detected a 229% increase in the blood vessel density, thus confirming the proangiogenic properties of this PA. Evaluation of therapeutic properties of these VEGF PA nanostructures in a murine hind-limb ischemia model revealed the potential of this system to restore perfusion in ischemic tissue [32].

#### 2.3.5 Detection of influenza virus

Peptide-conjugated lipids have also been studied as a molecular device for the detection of hemagglutinin (HA), which is a glycoprotein responsible for binding of the influenza virus to the plasma membrane via sialic acid residues [35]. Those authors developed a peptide-conjugated lipid that can fully replace gangliosides in the cell membrane. A sialic-acid-mimicking pentapeptide was conjugated to DPPE

and tested as a constituent of the lipid bilayers, which were immobilized on a mica slice. To study the binding of influenza HA, the surface topography of the obtained membrane was then analyzed by AFM. The results indicated that HA preferentially bound to the sialic-acid-mimicking peptide. In fact, they observed no significant binding to the free DPPE membrane. This peptide-conjugated lipid membrane manifested useful affinity for HA and influenza virus, thereby facilitating the diagnosis and surveillance of influenza or other sugar-related diseases.

#### 2.3.6 Biomimetic coating

The biological activity of looped RGD monolayers as biomimetic coating has been investigated. The metastatic human melanoma cell line (M14#5) was used for *in vitro* testing to evaluate the cell spreading response on films. Results showed that the spatial orientation and molar concentration of the PA were crucial for determination of their ability to promote and prevent cellular response. The treatment of cells with anti-integrin receptor monoclonal antibodies suggested that the PA holds promise for control of cellular behavior via specific receptor-ligand interactions [44].

## 3 Drug-conjugated peptides

Several drugs have been conjugated to different peptides to enhance the cellular uptake and retention of the drug. Moreover, a covalent linkage of drugs to a carrier can improve drug solubility and specificity [45]. In this subsection, we present the most widely studied peptide-drug conjugates that are able to self-assemble. This subsection is organized by function of the drug under study: DOX, paclitaxel, and camptothecin (CPT). For each platform, the synthesis procedure, analysis of the nanostructures formed, and biological activity is discussed.

### 3.1 DOX-conjugated peptides

#### 3.1.1 Preparation of amphiphilic compounds

DOX is a chemotherapeutic agent for the treatment of cancers, including hematopoietic cancers; carcinomas of the breast, lung, ovary, and stomach; and soft tissue

sarcomas [46]. To maximize the therapeutic index, DOX is linked to a macromolecular drug carrier.

In the case of DOX, three peptide types commonly serve as macromolecular carriers to enhance drug delivery of DOX: Elastin-like polypeptides (ELPs), chimeric polypeptides (CPs), and cell-penetrating peptides (CPPs).

When ELPs are used as a macromolecular carrier, the first step is the synthesis of a recombinant ELP. After this step, the ELP is either functionalized or coupled directly via a maleimide/thiol reaction with a lysine residue. For the first method, the ELP is modified with SMCC (succinimidyl 4-(N-maleimido-methyl)cyclohexane-1-carboxylate) to provide a maleimide moiety. DOX hydrochloride is modified with a hydrazone linker that contains a disulfide bond. Finally, ELP-maleimide is reacted with DOX-hydrazone in the presence of Tris(2-carboxyethyl)phosphine, enabling reduction of the disulfide bond (Fig. 13) [47].

In the second method, DOX reacts with  $n$ - $\beta$ -maleimidopropionic acid hydrazide, thereby incorporating an internal, acid-labile hydrazone moiety with a terminal maleimide. Next, the maleimide moiety reacts with the thiol group of the lysine residue of the ELP [48].

Via the same strategy, the chimeric polypeptide SKGPG(XGVPG)<sub>160</sub>WPC(GGC)<sub>8</sub> is conjugated to DOX. The polypeptide segment provides eight drug attachment points via the cysteine residue, as shown in Fig. 14.

Concerning the procedure steps, CP is first synthesized by a recombinant method from a plasmid-borne synthetic gene in *E. coli*. After that, DOX is functionalized

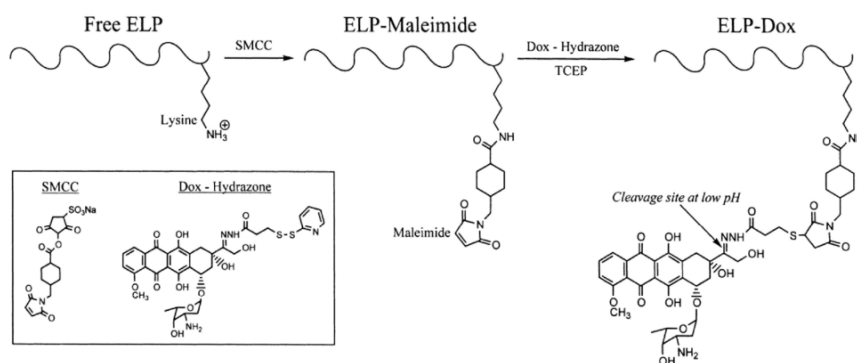
with a hydrazone moiety, which contains a terminal maleimide. The next step is the click reaction between the thiol of CP and the maleimide of functionalized DOX [49, 50].

Cheng, H. et al. described conjugation of an activable cell-penetrating peptide (CR<sub>8</sub>G<sub>3</sub>PK<sub>6</sub>, ACPP), which contained a shielding group of 2,3-dimethylmaleic anhydride (DMA), with DOX. The conjugate synthesis was divided into four steps. First, the peptide synthesis was performed manually by a standard Fmoc solid-phase peptide synthesis method. Then, DOX was functionalized with N-succinimidyl 3-maleimidopropionate (SMP). The third step was the DOX-SMP-ACPP synthesis via a Michael addition reaction between thiol and maleimide. Finally, DMA was linked to ACPP to obtain DOX-ACPP-DMA, for inhibition of the cell-penetrating function of the octa-arginine at physiological pH through intramolecular electrostatic attraction [51]. Peptide-DOX conjugates are often synthesized by coupling a peptide with DOX via a linker of SMP [51–53]. Another popular cross-linker is SMCC. It is used, for example, to conjugate DOX with the Tat peptide (CGGGYGRKKRRQRRR) [54].

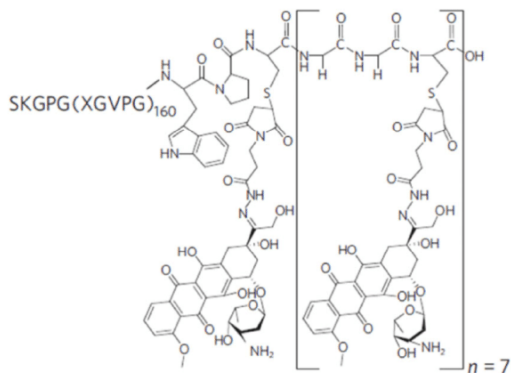
In both cases, the strategy for the conjugation is a thiol-maleimide “click” chemistry reaction.

### 3.1.2 Nanostructures formed by self-assembly

Nanoparticles and especially micelles are mainly constructed from peptide-DOX conjugates to decrease the high cytotoxicity and improve the selectivity of DOX. In general, such nanostructures are obtained by spontaneous self-assembly in PBS. In this regard, Dreher et al. conjugated DOX to an ELP through an



**Figure 13** Conjugation scheme for doxorubicin ELP conjugate. Reprinted with permission from Ref. [47], © American Chemical Society 2003.



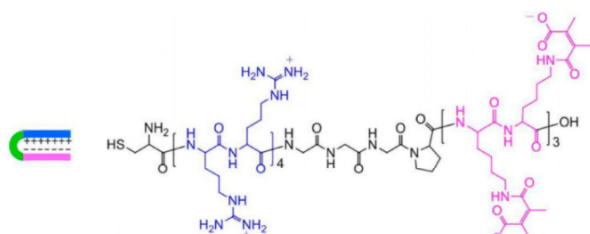
**Figure 14** Chemical structure of chimeric polypeptide-DOX conjugate. Reprinted with permission from Ref. [49], © American Chemical Society 2015.

acid-labile hydrazine bond. Self-assembly of these conjugates was temperature-dependent; ELP-DOX formed micelle structures below its first phase transition ( $T = 39.66\text{ }^{\circ}\text{C}$  at a concentration of 13.3 mM) with an average hydrodynamic radius of 21 nm and a terminal aggregate after its transition temperature [47]. Similarly, upon conjugation to DOX, a chimeric polypeptide comprised of a hydrophilic ELP and a C-terminal C(GGC)<sub>7</sub> peptide segment self-assembled into micelles of 40-nm diameter, according to AFM and dynamic light scattering (DLS) assays [49, 50].

In other cases, self-assembly can be applied to inhibit the cell-penetrating function. Tsien's group conjugated an ACPP to DOX and to a shielding group of DMA, to form DOX-ACPP-DMA conjugates. Consequently, self-assembly, monitored by electrostatic attraction between octa-arginine ( $R_8$ ) and polylysine, could be used to block the cell-penetrating function of octa-arginine (Fig. 15) [51, 52].

### 3.1.3 Biological activity

An ELP-DOX conjugate was tested on squamous cell

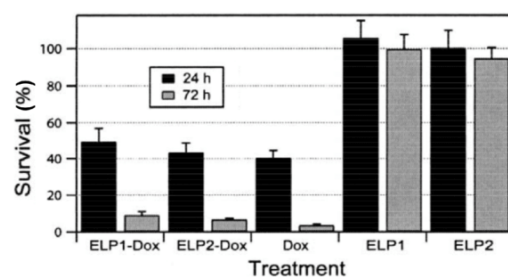


**Figure 15** Structure of DOX-ACPP-DMA. Reprinted with permission from Ref. [51], © American Chemical Society 2015.

carcinoma (FaDu cells) [47]. The conjugation of an ELP to DOX was achieved through an acid-labile hydrazone bond to promote the release of DOX from the ELP at low pH ( $\text{pH} \approx 5$ ). The cytotoxicity analysis of the ELP-DOX conjugate showed cytotoxicity comparable to that of free DOX (Fig. 16).

Besides, the cellular localization of DOX and ELP-DOX has been evaluated to compare the mechanisms of cytotoxicity. In the form of the conjugate, DOX was mostly concentrated in the cytoplasm. On the contrary, free DOX accumulated in the cell nucleus. To further investigate the intracellular localization, those authors utilized Alexa 488, a green fluorescent dye with a molecular weight approximately equal to that of DOX, to label the ELP in order to study its cell distribution within FaDu cells. According to this experiment, internalized ELP and ELP-Alexa 488 were trafficked into lysosomes. Nevertheless, the hydrophobicity of DOX was greater than that of Alexa 488; this situation may result in a modification of the intracellular trafficking of the ELP [47]. By means of RP-HPLC, Darin, Y. et al. studied the pH-triggered release of DOX from an ELP-DOX conjugate by cleavage of the hydrazone bond. In that study, the ELP (SKGPG-ELP[(VPGXG)<sub>10</sub>]<sub>18</sub>-WPC) was linked to DOX via an aliphatic chain of various lengths. Those authors demonstrated that the spacer, and especially its hydrophobicity, affected the DOX release kinetics. In fact, the more hydrophobic the spacer, the smaller was the DOX release [48].

Intracellular localization of chimeric polypeptide SKGPG(XGVPG)<sub>160</sub>WPC(GGC)<sub>8</sub> conjugated to DOX



**Figure 16** Cytotoxicity of ELP1-dox (ELP1[V5A2G3-150]), ELP2-dox (ELP2[V1A8G7-160]), doxorubicin, ELP1 and ELP2 against squamous cell carcinoma (FaDu) at 24 and 72 h post-treatment. Reprinted with permission from Ref. [47], © Elsevier B.V. 2003.

(CP-DOX) has been studied in a murine colon carcinoma cell line (C26) [49]. To this end, the polypeptide was labeled with Oregon Green through a pH-insensitive thioether bond. According to the results obtained by laser scanning confocal fluorescence microscopy, CP was localized into endosomes and lysosomes. Moreover, the results showed slower uptake of CP-DOX compared with that of free DOX. The *in vivo* experiments performed on a mouse model suggested that nanoparticles accumulated in solid tumors, as the free drug did.

Furthermore, the maximum tolerated dose was higher for the CP-DOX nanoparticles. This result may be explained by an increase in tumor exposure and a decrease in heart exposure.

The same chimeric polypeptide (SKGPG(XGVPG)<sub>160</sub>WPC(GGC)<sub>8</sub>) conjugated with 4–6 DOX molecules has been studied by Mastria, E. M. et al. [50]. Free DOX and CP-DOX were injected at their respective maximum tolerated doses into mice that were inoculated with luciferase murine mammary carcinoma cells (4T1). According to the results, DOX conjugated with CP considerably prolonged blood plasma residence time and allowed to increase the DOX concentration within the plasma compartment. Those authors demonstrated the ability of the CP-DOX conjugate to inhibit metastasis of mammary 4T1 carcinoma (4T1) and Lewis lung carcinoma (LLC). For this purpose, mice were inoculated with 4T1-luc or LLC-luc and treated on days 8 and 15 postinoculation with free DOX or CP-DOX. During this experiment, metastasis and primary tumors were assessed two times per week by means of an IVIS Xenogen bioluminescent imaging system. The results revealed the ability of CP-DOX conjugates to inhibit metastasis and improve survival of the mice after a transplant of 4T1 and LLC syngeneic metastatic cell lines.

In addition, the use of an ACP has been investigated as a carrier to translocate an antitumor drug into cells. To this end, an ACP was conjugated with DOX but also to a shielding group (DMA) that could inhibit the activity of the ACP at physiological pH. The antitumor effect of the DOX-ACPP-DMA conjugate was studied *in vitro* and *in vivo*. Evaluation of the enzymatic release of DOX was performed by dialysis in PBS. Cathepsin B, which is present in tumor cells,

enabled up to 70% of the DOX release within 10 h, because of the ability of this kind of protease to hydrolyze the amide bond. At the same time, CLSM analysis of the cellular uptake in HeLa cells (human cervical carcinoma cell line) was performed. After incubation from 6 to 24 h, the quantity of DOX in the cell nuclei increased, pointing to an effective release of DOX from the conjugate. *In vivo* experiments were performed on hepatic tumor cells (H22) in female KM mice. Those authors found that the xenograft tumor volume, during treatment with the DOX-ACPP-DMA conjugate, first increased slowly and then decreased sharply. Without any treatment, the tumor xenograft volume increased to 2,000 mm<sup>3</sup> after 14 days. By contrast, when the tumor was treated with DOX-ACPP-DMA, those authors observed a reduction in tumor volume to 50 mm<sup>3</sup> after 14 days, thereby demonstrating that DOX-ACPP-DMA considerably inhibited tumor growth [51].

Besides, ACP-DOX has been used to develop a conjugate sensitive to matrix metalloproteinases (MMPs) for a tumor-targeting therapy [52]. Flow cytometry and CLSM analyses indicated that the cellular uptake of ACP-DOX increased after enzyme-triggered activation and was higher in HT-1080 cells (human fibrosarcoma cells, overexpressing MMPs) than in MCF-7 cells (human breast adenocarcinoma cells, underexpressing MMPs).

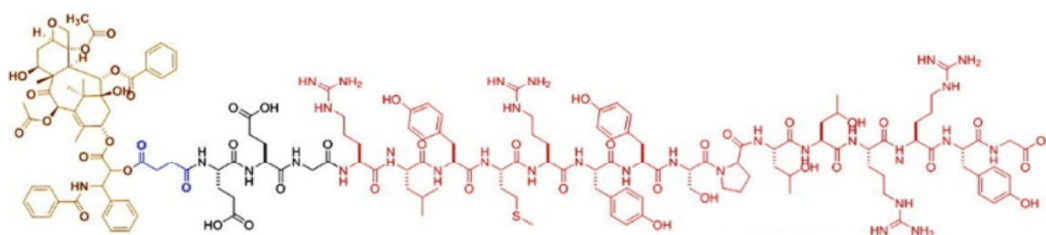
## 3.2 Paclitaxel-conjugated peptides

### 3.2.1 Preparation of amphiphilic compounds

Paclitaxel, an anticancer agent that has potent antileukemic and tumor-inhibitory properties, was linked to peptides [55]. R. Tian et al. described the synthesis of a paclitaxel-CPP conjugate (Fig. 17). For this purpose, the CPP (EEGRLYMRYYSPTTRRYG) was first synthesized via standard Fmoc solid-phase peptide chemistry and was cleaved from the resin.

At the same time, the drug was functionalized with succinic anhydride (SA) to have a carboxylic acid function that can react with the N-terminal extremity of the CPP. Finally, paclitaxel-CPP was obtained through a carbodiimide-mediated coupling reaction between paclitaxel-SA-COOH and EEGRLYMRYYSPTTRRYG [56].



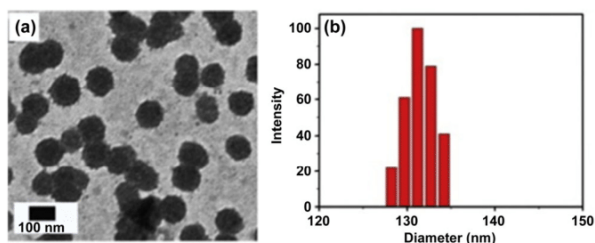


**Figure 17** Chemical structure of Paclitaxel-CPP conjugate (yellow extremity, paclitaxel; blue part, succinic acid; black part, tripeptide EEG; red chain, CPP). Reprinted with permission from Ref. [56], © Elsevier B.V. 2015.

It was also interesting to use a disulfide linker because its cleavage may occur only after cellular entry of the conjugate owing to the abundant presence of reduced glutathione (GSH). Dubikovskaya, E. A. et al. used this strategy to link paclitaxel to a peptide that contained a cysteine residue (Ac-NH-DCys-(DArg)<sub>8</sub>CONH<sub>2</sub>). To form a disulfide bond with paclitaxel, the drug was functionalized with 4-(pyridin-2-yl)disulfanylbutyric acid. Then, a disulfide bond exchange reaction was carried out between thiol of the cysteine and the disulfide bond of the functionalized paclitaxel [57].

### 3.2.2 Nanostructures formed by self-assembly

Similarly to DOX, self-assembling structures with paclitaxel have been developed not only to control a drug release but also to improve water solubility. Self-assembly of peptide-paclitaxel conjugates can be achieved by directly dispersing the amphiphilic compound into distilled water or PBS (pH 7.4) during agitation. Tian, R. et al. developed supramolecular nanospheres of CPP-paclitaxel conjugates with an average diameter of ~120 nm (results obtained by TEM, shown in Fig. 18). According to DLS experiments, the



**Figure 18** (a) Negatively stained TEM image and (b) size distribution of paclitaxel-CPP at the concentration of 100 M in aqueous solution. Reprinted with permission from Ref. [56], © Elsevier B.V. 2015.

mean hydrodynamic diameter of CPP-paclitaxel nanospheres in aqueous media was 131.5 nm. The value obtained by DLS was slightly higher than the one obtained by TEM because the sample was dried for TEM observation [56].

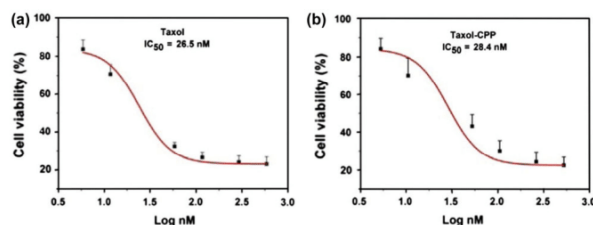
### 3.2.3 Biological activity

The study of biological activity has been carried out on paclitaxel conjugated with a CPP (EEGRLYMRY-YSPTRRRYG). Half-inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) were determined on human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) by direct incubation of HepG2 cells with paclitaxel-CPP nanoparticles or free paclitaxel as a control. Then, evaluation of cell viability was carried out by the 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT) assay. According to the results shown in Fig. 19, the paclitaxel-CPP nanospheres possessed slightly higher IC<sub>50</sub> values as compared to free paclitaxel against HepG2 cancer cells [56].

## 3.3 CPT-conjugated peptides

### 3.3.1 Preparation of amphiphilic compounds

CPT is an alkaloid that inhibits the nuclear enzyme type I DNA topoisomerase. This drug has shown anticancer activity but also low solubility in preliminary



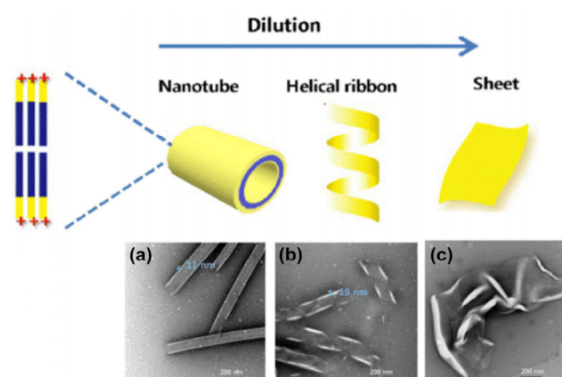
**Figure 19** Cytotoxicity of (a) free paclitaxel (Taxol) and (c) paclitaxel-CPP nanospheres against HepG2 cancer cells. Reprinted with permission from Ref. [56], © Elsevier B.V. 2015.

clinical trials [58]. To alleviate this solubility problem, the anticancer drug was linked to a tripeptide, KCK (Lys-Cys-Lys), via a disulfide linkage [59]. To this end, the drug was functionalized with a pyridyl disulfide bond, and the conjugation was implemented via a thiol-disulfide exchange reaction. Practically, KCK was mixed with CPT at room temperature in dry dimethyl sulfoxide.

As for peptide-aliphatic chain conjugates, all the synthesis could be accomplished on a resin. For example, the tetrapeptide RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) was linked to a hydrophilic tail of tridecane ( $C_{13}H_{27}$ ) to obtain  $C_{13}H_{27}$ -CONH-Arg-Gly-Asp-Ser-Lys-COOH. This synthesis was carried out manually according to the Fmoc solid-phase peptide synthesis method. Then CPT-COOH was linked to the N terminus of lysine by the same coupling method [60].

### 3.3.2 Nanostructures formed by self-assembly

CPT is a hydrophobic drug needing a carrier to enhance the selectivity and cellular internalization. H. Choi et al. showed that it is possible to obtain different morphological features as a function of the prodrug concentration in aqueous media [61]. In fact, various self-assembled nanostructures of KCK-CPT have been observed by TEM: From nanotubes with a diameter of 100 nm at 800  $\mu$ M to nanosheets at 50  $\mu$ M (Fig. 20). Three main driving forces are responsible for the self-assembly: The hydrophilic-hydrophobic



**Figure 20** Schematic representation of self-assembly of KCK-CPT conjugate and TEM images of self-assembled nanostructures obtained: (a) Nanotube (width: 100 nm) formation at 800  $\mu$ M in aqueous solution (b) helical nanoribbon formation and (c) curved sheet nanostructure at 50  $\mu$ M in aqueous solution (adapted with permission from Ref. [59], © Royal Society of Chemistry 2016).

balance, intramolecular H-bonding, and aromatic  $\pi$ - $\pi$  interactions between the CPT units.

Nanofibers with a diameter of 20 nm can be obtained by self-assembly of RGD-CPT conjugates at 80  $\mu$ M [60]. Those authors investigated the self-assembly behavior of free peptides, to determine the participation of each driving force. According to previous results, the formation of nanofibers was mainly driven by the hydrophobic interaction and H-bonding [60].

### 3.3.3 Biological activity

CPT is linked to the tripeptide KCK through a disulfide bond that is cleavable in the intracellular reducing environment. Cellular uptake of the KCK-CPT conjugate has been analyzed in a mouse squamous carcinoma cell line, SCC-7 cells. CLSM experiments indicated rapid internalization of the conjugate by cells and that the nanostructure of the positively charged prodrug (KCK-CPT conjugate) had no selectivity for specific cancer cells. Accordingly, hyaluronic acid (HA) was complexed with the conjugate to improve the selectivity. HA is known as a tumor recognition moiety owing to its interaction with the cell surface receptor, CD44, abundant on most cancer cells [61]. HA is cleaved from HA-KCK-CPT via its degradation in endosomes and lysosomes by hyaluronidase. This change leads to the dissolution of the conjugate, while the positive charges of KCK-CPT allow for its release from the endosome [59].

In addition, biological activity of RGD-CPT has also been studied [60]. For this purpose, the drug release of CPT was investigated at pH 5.2 and 7.0. The results showed slow disassembly of nanofibers in both cases. On the other hand, the drug release rate was faster under acidic conditions owing to the accelerated cleavage of the succinyl linkage. Three cell lines were selected to study the *in vitro* toxicity: Mouse hepatoma H22 cells, human cervical carcinoma HeLa cells, and transformed African green monkey SV40-transformed kidney fibroblast (COS7) cells. According to cell viability assays, the presence of RGD in the prodrug promoted cellular uptake and enhanced cytotoxicity. To study the antitumor effect of the conjugate, those authors carried out *in vivo* studies in H22 tumor-bearing mice. For this purpose, RGD-prodrug was injected subcutaneously into mice.

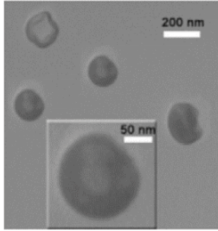
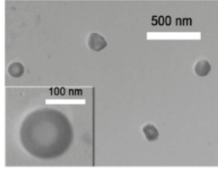
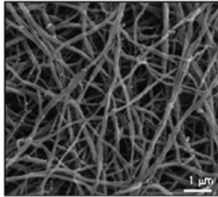
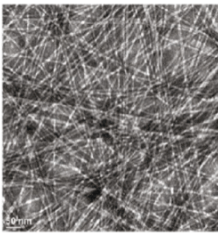
After 24 h, fluorescence intensity distribution revealed the presence of the prodrug not only in the tumor but also in the heart, liver, and kidney. The subcutaneously injected material first entered the lymphatic circulation system and then flowed through the body, which is why the prodrug could reach healthy organs. The *in vitro* and *in vivo* experiments indicated that this nanostructure may exert a substantial tumor suppression effect via the RGDS tetrapeptide with positive targeting

and nanoscale-assistant passive delivery [60].

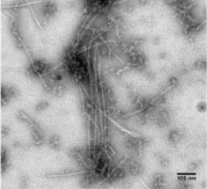
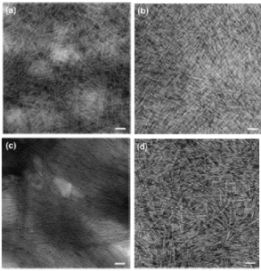
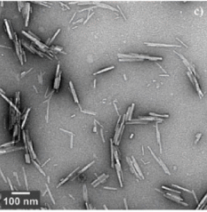
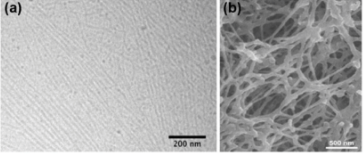
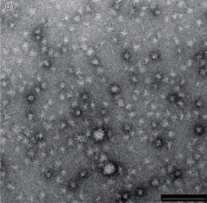
#### 4 Conclusion and perspectives

In summary, the self-assembly of peptide-based conjugates leads to a variety of nanostructures, among which micelles and nanofibers are the most common (Tables 1 and 2). These nanostructures are mainly obtained by pH-induced self-assembly in an aqueous

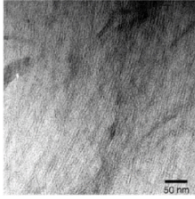
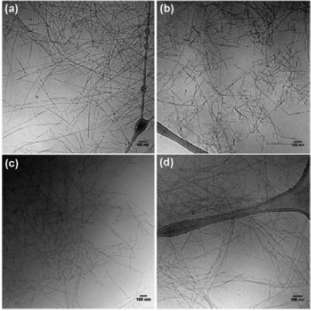
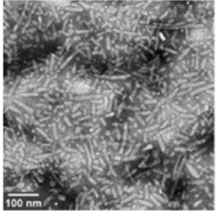
**Table 1** Different types of self-assembled aliphatic-chain conjugated peptides with biomedical application

Conjugates	Synthesis	Nanostructures	Modes of self-assembly	Targeted biomedical applications	Ref.
<i>Aliphatic chain-conjugated peptides</i>					
Disulfide bond linked stearyl-H <sub>3</sub> CR <sub>5</sub> C	SPPS	Doxorubicin-(DOX) and miR-34a-loaded cationic micelles ( $d = 169.8$ nm) 	Probe-based ultrasonication technique	Prostate cancer (PC3 and DU145 cells)	[22]
		siRNA-loaded cationic micelles ( $d = 163$ nm) 	Complexation with siRNA in PBS	Gene therapy Luciferase-expressing (GL3) HeLa cells (Luc-HeLa cells)	[23]
GS(P)E <sub>2</sub> L <sub>3</sub> A <sub>3</sub> -C <sub>16</sub> SDGRK <sub>2</sub> L <sub>3</sub> A <sub>3</sub> -C <sub>16</sub> GSE <sub>2</sub> L <sub>3</sub> A <sub>3</sub> -C <sub>16</sub> GAE <sub>2</sub> L <sub>3</sub> A <sub>3</sub> -C <sub>16</sub>	SPPS	Gels (networks of fibers $d = 30$ nm) 	Gelation with metal cations: 40 mM aqueous PA solutions were mixed with 40 mM CaCl <sub>2</sub> (1:1 by volume)	Bone regeneration	[24]
C <sub>12</sub> -V <sub>2</sub> AGEGDK(pbs)S C <sub>12</sub> -V <sub>2</sub> AGL-NH <sub>2</sub> (Lys-PA)	SPPS	Gels (networks of fibers $d = 7.5$ nm) 	Mixing PA with Ly-PA at 1:2 molar ratios	Tissue regeneration	[25]

(Continued)

Conjugates	Synthesis	Nanostructures	Modes of self-assembly	Targeted biomedical applications	Ref.
$C_{16}\text{-A}_4\text{G}_3\text{-(KLAKLAK)}_2$	SPPS	Nanotubes ( $d = 8\text{--}10$ nm, length = 100–900 nm)	Spontaneous self-assembly in phosphate buffer	Breast cancer (SKBR-3 and MDA-MB-231 cells)	[26]
Palmitoyl-p53 <sub>14-29</sub> p53 <sub>14-29</sub> :LSQETFSDLWK L <sub>2</sub> PEN	SPPS	Micelles ( $d = 319$ nm) and elongated micelles ( $d = 10$ nm, few hundred nanometers long) 	Spontaneous self-assembly in phosphate buffer	Osteosarcoma	[28] [29]
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CONH-GTAGLIGQ-RGDS CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CONH-GTAGLIGQ-DGEA CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CONH-GTAGLIGQ-KRSR CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CONH-GTAGLIGQ-RGES	SPPS	Cylindrical micelle nanofiber ( $d = 6\text{--}10$ nm, length dimension 50-fold greater) 	Solution of PA in distilled water at pH 7.4. PA coating were dried at 37 °C for 2 days after evaporation of the solvent.	Bone tissue regeneration	[30]
DiC <sub>16</sub> -OVA <sub>253-266</sub> OVA <sub>253-266</sub> EQLESI <sub>2</sub> NFEKLTE	Peptide purchased on Rink amide. Dialkyl tails coupled to the N-terminal extremity before cleavage	Cylindrical micelles ( $d = 8$ nm, length = 50–300 nm) 	PA dissolved in PBS at pH 9. The pH was then lowered to 7.4 using 0.1 N HCl in distilled water.	Antigen delivery system	[31]
C <sub>16</sub> -V <sub>2</sub> A <sub>2</sub> -K <sub>3</sub> G-KLTWQELYQLKYGI-NH <sub>2</sub>	SPPS	Gels (network of fibers) 	Gelation in water in the presence of divalent counterions	Therapy for ischemic cardiovascular disease	[32]
1,3-(dipalmitoyl)glycero-2-phosphoethanol-G <sub>2</sub> -HR1 <sub>Ala153-Gln202</sub>	SPPS	Star-like particles ( $d = 20$ nm) 	Spontaneous self-assembly in phosphate buffer	Adjuvant-free stimulation of antigen specific humoral immune response	[33]

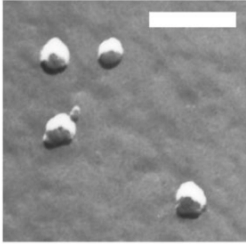
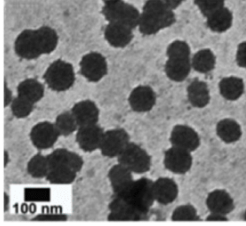
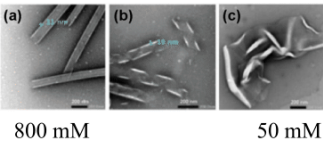
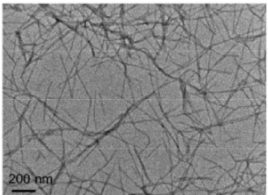
(Continued)

Conjugates	Synthesis	Nanostructures	Modes of self-assembly	Targeted biomedical applications	Ref.
Cholesterol-CH <sub>n</sub> R <sub>p</sub> with $n = 0,3,5$ and $p = 3,5$	SPPS Conjugation through thiol-acrylate Michael type reaction	DNA-loaded cationic micelles. Size depends on the $N/P$ ratio (molar ratio of arginine residue ( $N$ ) in the peptide to phosphate group ( $P$ ) in the DNA molecule)	Mixing equal volume of cholesterol-peptide in PBS buffer (at 10 mg/mL) and DNA in nuclease-free water (at 1 mg/mL)	Gene delivery vectors MCF-7 (human breast adenocarcinoma) and HEK-293 cell lines	[34]
ARLPRK-pentynoyl-DPPE	SPPS and "click" chemistry (copper-catalysed alkyne-azide cycloaddition)	Membrane (height = 8 nm)	The lipid monolayer of peptide-conjugated lipid was loaded onto POPC(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)-coated mica	Detection of Hemagglutinin	[35]
DSPE-PEG <sub>2000</sub> -(FAM)-CREKA	SPPS then DSPE-PEG <sub>2000</sub> -maleimide linked to the cysteine via a thioether linkage	Micelles ( $d = 17$ nm)	Spontaneous self-assembly in aqueous solution	Cardiovascular disease	[36]
Alkyl-A <sub>4</sub> G <sub>3</sub> S <sup>(P)</sup> RGD-COOH	SPPS	Gels (networks of fibers $d = 5-6$ nm) 	Gelation with metal cations: 10 mM aqueous conjugate solutions were mixed with cations	Cell transplantation or other tissue engineering applications	[38]
C <sub>16</sub> -V <sub>2</sub> A <sub>3</sub> E <sub>2</sub> K-Hyd-Prodan	Synthesis of peptide containing hydrazide via SPPS Condensation of Prodan	Gels (cross sectional diameter = 10-11 nm) 	Gelation in presence of divalent counterions: PA dissolved in 10 mM NaOH were mixed with a solution of 100 mM CaCl <sub>2</sub>	Controlled release of small molecules (Prodan)	[39]
diC <sub>16</sub> -J <sub>8</sub>	SPPS diC <sub>16</sub> coupled to the N-terminal extremity of peptide by an amidation reaction	Micelles ( $d = 5-15$ nm, length = 25-125 nm) 	PA were film cast by mehtnaol evaporation and rehydrated to allow micelle formation	Vaccine that protect against GAS	[41]

(Continued)

Conjugates	Synthesis	Nanostructures	Modes of self-assembly	Targeted biomedical applications	Ref.
(C <sub>18</sub> ) <sub>2</sub> -E-C <sub>2</sub> -RGD RGD-C <sub>2</sub> -E-(C <sub>18</sub> ) <sub>2</sub> (C <sub>18</sub> ) <sub>2</sub> -E-C <sub>2</sub> -RGD-C <sub>2</sub> -E- (C <sub>18</sub> ) <sub>2</sub>	Solution-phase-peptide synthesis then dialkyl tail linked to the peptide	Monolayers	Langmuir-Blodgett film deposition with control of surface pressure	Biomimetic coatings	[44]

**Table 2** Different types of self-assembled drug-conjugated peptides with biomedical application

Conjugates	Synthesis	Nanostructures	Modes of self-assembly	Targeted biomedical applications	Ref.
<i>Drug-conjugated peptides</i>					
DOX-ELP	ELP[V <sub>5</sub> A <sub>2</sub> G <sub>3</sub> -150] ELP[V <sub>1</sub> A <sub>8</sub> G <sub>7</sub> -160]	Recombinant synthesis and thiol-maleimide "click" chemistry	Micelles below its first transition ( $R_h = 21$ nm) and a terminal aggregate after its transition	Squamous cell carcinoma (FaDu)	[47]
DOX-CP CP: Chimeric Polypeptide	ELP:SKGPG-ELP [(VPGXG) <sub>10</sub> ] <sub>18</sub> -WPC with X = V, A and G residues with 5:2:3 ratio	Recombinant synthesis and thiol-maleimide "click" chemistry	Micelles ( $d = 40$ nm) 	Temperature-dependent self-assembly in PBS	Colon carcinoma (C26 murine cells)
		Recombinant synthesis and thiol-maleimide "click" chemistry			T1-luciferase murine mammary carcinoma cells Lewis lung carcinoma LL/2-Luc-M38 (LLC) cells
Paclitaxel-CPP CPP: Cell-Penetrating Peptide	CPP: E <sub>2</sub> GRLYMRY <sub>2</sub> SPT <sub>2</sub> R <sub>2</sub> YG	SPPS and carbodiimide-mediated coupling reaction	Nanospheres ( $d = 120$ nm) 	Spontaneous self-assembly in distilled water of phosphate buffer saline (pH 7.4)	Liver hepatocellular carcinoma (HepG2 cells)
Camptothecin-peptide	KCK	SPPS and thiol-disulfide exchange reaction	Morphologies from nanotubes to nanosheets depends on the concentration. 	Spontaneous self-assembly in water	Squamous carcinoma (SCC-7 cells)
	RGDS		Nanofibers ( $d = 20$ nm) 		

solution, but it is also possible to employ a divalent-ion induction process or a probe-based ultrasonication technique to load a drug into the core of the micelles. Concerning the properties of the resultant nanostructures and their biological activity, there are more studies on aliphatic-chain-conjugated peptides than on drug-conjugated peptides. Peptide-based conjugates are an emerging research area. Nevertheless, as shown in Table 2, conjugation of a peptide with a drug to form an amphiphilic conjugate with a potent biological activity has not been explored much. This is true for ferrocene-based molecules, which have antiproliferative effects and reversible redox properties [62, 63]. In fact, B. Adhikari et al. have studied the gel formation of different conjugates containing ferrocenecarboxylic acid or ferrocenylacrylic acid without providing guidance on biological activity [64]. On the other hand, an *in vitro* study was conducted on ferrocenecarboxylic acid conjugated with polyarginine (hexa- or octa-arginine) without a relation between the results obtained and potential formation of nanostructures [65].

In the future, three strategies can help to vectorize a drug: A combination of CPPs, prodrug, and nanoparticle technologies (Fig. 21).

The use of CPPs as building blocks has significant advantages in nanomedical applications because of their biocompatibility, responsiveness to environmental changes, and the ability to facilitate cellular uptake. The coupling of a hydrophilic CPP with a hydrophobic drug should inactivate the drug and enable the release mostly in cancer cells. To this end, the drug may be linked to a CPP via a biocleavable bond, ideally cleavable by enzymes expressed in the intracellular environment of cancer cells. Therefore, this alternative strategy, derived from the prodrug concept, may limit the burst release [66] and allow for an increase in drug loading. Moreover, the choice of the CPP will be crucial to attain specific targeting, and some CPPs are



**Figure 21** Scheme of the synthesis of prodrug nanoparticles.

known to be specific for cancerous cells, such as the TLS peptide for ovarian cancer cells, and RLW for lung cancer cells [67, 68].

## References

- [1] Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238–252.
- [2] Allen, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 36–48.
- [3] Croy, S. R.; Kwon, G. S. Polymeric micelles for drug delivery. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4669–4684.
- [4] Mandal, A.; Bisht, R.; Rupenthal, I. D.; Mitra, A. K. Polymeric micelles for ocular drug delivery: From structural frameworks to recent preclinical studies. *J. Control. Release* **2017**, *248*, 96–116.
- [5] Panahi, Y.; Farshbaf, M.; Mohammadhosseini, M.; Mirahadi, M.; Khalilov, R.; Saghfi, S.; Akbarzadeh, A. Recent advances on liposomal nanoparticles: Synthesis, characterization and biomedical applications. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2017**, *45*, 788–799.
- [6] Mehrabi, M.; Esmailpour, P.; Akbarzadeh, A.; Saffari, Z.; Farahnak, M.; Farhangi, A.; Chiani, M. Efficacy of PEGylated liposomal etoposide nanoparticles on breast cancer cell lines. *Turk. J. Med. Sci.* **2016**, *46*, 567–571.
- [7] Vahed Zununi, S.; Salehi, R.; Davaran, S.; Sharifi, S. Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *71*, 1327–1341.
- [8] Venev, S. V.; Reineker, P.; Potemkin, I. I. Direct and inverse micelles of diblock copolymers with a polyelectrolyte block: Effect of equilibrium distribution of counterions. *Macromolecules* **2010**, *43*, 10735–10742.
- [9] Gennes, P. G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*; Cornell University Press: Ithaca, NY, 1979.
- [10] Birshtein, T. M.; Zhulina, E. B. Scaling theory of supermolecular structures in block copolymer-solvent systems: 1. Model of micellar structures. *Polymer* **1989**, *30*, 170–177.
- [11] Jain, S.; Bates, F. S. On the origins of morphological complexity in block copolymer surfactants. *Science* **2003**, *300*, 460–464.
- [12] Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, *72*, 1525–1568.
- [13] Israelachvili, J. N. Thermodynamic and geometric aspects

- of amphiphile aggregation into micelles, vesicles and bilayers and the interactions between them. In *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions: Proceedings of the International School of Physics, Enrico Fermi, Course Xc*. Degiorgio, V.; Corti, M., Eds.; Elsevier Science Ltd: Amsterdam, 1985; pp 24–58.
- [14] Israelachvili, J. N. 20-Soft and biological structures. In *Intermolecular and Surface Forces*. 3rd Ed. Israelachvili, J. N., Ed.; Academic Press: San Diego, 2011; pp 535–576.
- [15] Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B. Front matter. In *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. 2nd ed. Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2003.
- [16] Lepeltier, E.; Bourgaux, C.; Maksimenko, A.; Meneau, E.; Rosilio, V.; Sliwinski, E.; Zouhiri, F.; Desmaële, D.; Couvreur, P. Self-assembly of polyisoprenoyl gemcitabine conjugates: Influence of supramolecular organization on their biological activity. *Langmuir* **2014**, *30*, 6348–6357.
- [17] Naik, S. S.; Savin, D. A. Poly(Z-lysine)-based organogels: Effect of interfacial frustration on gel strength. *Macromolecules* **2009**, *42*, 7114–7121.
- [18] Nowak, A. P.; Breedveld, V.; Pakstis, L.; Ozbas, B.; Pine, D. J.; Pochan, D.; Deming, T. J. Rapidly recovering hydrogel scaffolds from self-assembling diblock copolypeptide amphiphiles. *Nature* **2002**, *417*, 424–428.
- [19] Holowka, E. P.; Pochan, D. J.; Deming, T. J. Charged polypeptide vesicles with controllable diameter. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12423–12428.
- [20] Denisov, I. G.; Grinkova, Y. V.; Lazarides, A. A.; Sligar, S. G. Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer nanodiscs with controlled size. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3477–3487.
- [21] Sigg, S. J.; Postupalenko, V.; Duskey, J. T.; Palivan, C. G.; Meier, W. Stimuli-responsive codelivery of oligonucleotides and drugs by self-assembled peptide nanoparticles. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 935–945.
- [22] Yao, C.; Liu, J. Y.; Wu, X.; Tao, Z. G.; Gao, Y.; Zhu, Q. G.; Li, J. F.; Zhang, L. J.; Hu, C. L.; Gu, F. F. et al. Reducible self-assembling cationic polypeptide-based micelles mediate co-delivery of doxorubicin and microRNA-34a for androgen-independent prostate cancer therapy. *J. Control. Release* **2016**, *232*, 203–214.
- [23] Tai, Z. G.; Wang, X. Y.; Tian, J.; Gao, Y.; Zhang, L. J.; Yao, C.; Wu, X.; Zhang, W.; Zhu, Q. G.; Gao, S. Biodegradable stearylated peptide with internal disulfide bonds for efficient delivery of siRNA *in vitro* and *in vivo*. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1119–1130.
- [24] Hartgerink, J. D.; Beniash, E.; Stupp, S. I. Peptide-amphiphile nanofibers: A versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5133–5138.
- [25] Mata, A.; Geng, Y. B.; Henrikson, K. J.; Aparicio, C.; Stock, S. R.; Satcher, R. L.; Stupp, S. I. Bone regeneration mediated by biomimetic mineralization of a nanofiber matrix. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6004–6012.
- [26] Mammadov, R.; Mammadov, B.; Toksoz, S.; Aydin, B.; Yagci, R.; Tekinay, A. B.; Guler, M. O. Heparin mimetic peptide nanofibers promote angiogenesis. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3508–3519.
- [27] Standley, S. M.; Toft, D. J.; Cheng, H.; Soukasene, S.; Chen, J.; Raja, S. M.; Band, V.; Band, H.; Cryns, V. L.; Stupp, S. I. Induction of cancer cell death by self-assembling nanostructures incorporating a cytotoxic peptide. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 3020–3026.
- [28] Missirlis, D.; Krogstad, D. V.; Tirrell, M. Internalization of p53<sub>14-29</sub> peptide amphiphiles and subsequent endosomal disruption results in SJS-1 cell death. *Mol. Pharmaceutics* **2010**, *7*, 2173–2184.
- [29] Missirlis, D.; Khant, H.; Tirrell, M. Mechanisms of peptide amphiphile internalization by SJS-1 cells *in vitro*. *Biochemistry* **2009**, *48*, 3304–3314.
- [30] Anderson, J. M.; Kushwaha, M.; Tambralli, A.; Bellis, S. L.; Camata, R. P.; Jun, H. W. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells directed by extracellular matrix-mimicking ligands in a biomimetic self-assembled peptide amphiphile nanomatrix. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2935–2944.
- [31] Black, M.; Trent, A.; Kostenko, Y.; Lee, J. S.; Olive, C.; Tirrell, M. Self-assembled peptide amphiphile micelles containing a cytotoxic t-cell epitope promote a protective immune response *in vivo*. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3845–3849.
- [32] Webber, M. J.; Tongers, J.; Newcomb, C. J.; Marquardt, K. T.; Bauersachs, J.; Losordo, D. W.; Stupp, S. I. Supramolecular nanostructures that mimic VEGF as a strategy for ischemic tissue repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13438–13443.
- [33] Boato, F.; Thomas, R. M.; Ghasparian, A.; Freund-Renard, A.; Moehle, K.; Robinson, J. A. Synthetic virus-like particles from self-assembling coiled-coil lipopeptides and their use in antigen display to the immune system. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 9015–9018.
- [34] Tang, Q.; Cao, B.; Wu, H. Y.; Cheng, G. Cholesterol-peptide hybrids to form liposome-like vesicles for gene delivery. *PLoS One* **2013**, *8*, e54460.



- [35] Matsubara, T.; Shibata, R.; Sato, T. Binding of hemagglutinin and influenza virus to a peptide-conjugated lipid membrane. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 468.
- [36] Peters, D.; Kastantin, M.; Kotamraju, V. R.; Karmali, P. P.; Gujrati, K.; Tirrell, M.; Ruoslahti, E. Targeting atherosclerosis by using modular, multifunctional micelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 9815–9819.
- [37] Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [38] Beniash, E.; Hartgerink, J. D.; Storrer, H.; Stendahl, J. C.; Stupp, S. I. Self-assembling peptide amphiphile nanofiber matrices for cell entrapment. *Acta Biomater.* **2005**, *1*, 387–397.
- [39] Matson, J. B.; Newcomb, C. J.; Bitton, R.; Stupp, S. I. Nanostructure-templated control of drug release from peptide amphiphile nanofiber gels. *Soft Matter* **2012**, *8*, 3586–3595.
- [40] Cui, H. G.; Muraoka, T.; Cheetham, A. G.; Stupp, S. I. Self-assembly of giant peptide nanobelts. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 945–951.
- [41] Trent, A.; Ulery, B. D.; Black, M. J.; Barrett, J. C.; Liang, S. M.; Kostenko, Y.; David, N. A.; Tirrell, M. V. Peptide amphiphile micelles self-adjuvant group a streptococcal vaccination. *AAPS J.* **2015**, *17*, 380–388.
- [42] Matsubara, T.; Iijima, K.; Yamamoto, N.; Yanagisawa, K.; Sato, T. Density of GM1 in nanoclusters is a critical factor in the formation of a spherical assembly of amyloid  $\beta$ -protein on synaptic plasma membranes. *Langmuir* **2013**, *29*, 2258–2264.
- [43] Iijima, K.; Soga, N.; Matsubara, T.; Sato, T. Observations of the distribution of GM3 in membrane microdomains by atomic force microscopy. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *337*, 369–374.
- [44] Pakalns, T.; Haverstick, K. L.; Fields, G. B.; McCarthy, J. B.; Mooradian, D. L.; Tirrell, M. Cellular recognition of synthetic peptide amphiphiles in self-assembled monolayer films. *Biomaterials* **1999**, *20*, 2265–2279.
- [45] Ma, W.; Cheetham, A. G.; Cui, H. G. Building nanostructures with drugs. *Nano Today* **2016**, *11*, 13–30.
- [46] Gewirtz, D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727–741.
- [47] Dreher, M. R.; Raucher, D.; Balu, N.; Colvin Michael, O.; Ludeman, S. M.; Chilkoti, A. Evaluation of an elastin-like polypeptide-doxorubicin conjugate for cancer therapy. *J. Control. Release* **2003**, *91*, 31–43.
- [48] Furgeson, D. Y.; Dreher, M. R.; Chilkoti, A. Structural optimization of a ‘smart’ doxorubicin–polypeptide conjugate for thermally targeted delivery to solid tumors. *J. Control. Release* **2006**, *110*, 362–369.
- [49] MacKay, A. J.; Chen, M. N.; McDaniel, J. R.; Liu, W. G.; Simnick, A. J.; Chilkoti, A. Self-assembling chimeric polypeptide–doxorubicin conjugate nanoparticles that abolish tumours after a single injection. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 993–999.
- [50] Mastria, E. M.; Chen, M. N.; McDaniel, J. R.; Li, X. H.; Hyun, J.; Dewhirst, M. W.; Chilkoti, A. Doxorubicin-conjugated polypeptide nanoparticles inhibit metastasis in two murine models of carcinoma. *J. Control. Release* **2015**, *208*, 52–58.
- [51] Cheng, H.; Zhu, J. Y.; Xu, X. D.; Qiu, W. X.; Lei, Q.; Han, K.; Cheng, Y. J.; Zhang, X. Z. Activable cell-penetrating peptide conjugated prodrug for tumor targeted drug delivery. *Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 16061–16069.
- [52] Shi, N. Q.; Gao, W.; Xiang, B.; Qi, X. R. Enhancing cellular uptake of activable cellpenetrating peptide–doxorubicin conjugate by enzymatic cleavage. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 1613–1621.
- [53] Yang, Y. F.; Yang, Y.; Xie, X. Y.; Cai, X.S.; Zhang, H.; Gong, W.; Wang, Z. Y.; Mei, X. G. PEGylated liposomes with NGR ligand and heat-activable cell penetrating peptide-doxorubicin conjugate for tumor-specific therapy. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4368–4381.
- [54] Liang, J. F.; Yang, V. C. Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5071–5075.
- [55] Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325–2327.
- [56] Tian, R.; Wang, H. M.; Niu, R. F.; Ding, D. Drug delivery with nanospherical supramolecular cell penetrating peptide-taxol conjugates containing a high drug loading. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *453*, 15–20.
- [57] Dubikovskaya, E. A.; Thorne, S. H.; Pillow, T. H.; Contag, C. H.; Wender, P. A. Overcoming multidrug resistance of small-molecule therapeutics through conjugation with releasable octaarginine transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 12128–12133.
- [58] Thomas, C. J.; Rahier, N. J.; Hecht, S. M. Camptothecin: Current perspectives. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1585–1604.
- [59] Choi, H.; Jeena, M. T.; Palanikumar, L.; Jeong, Y.; Park, S.;

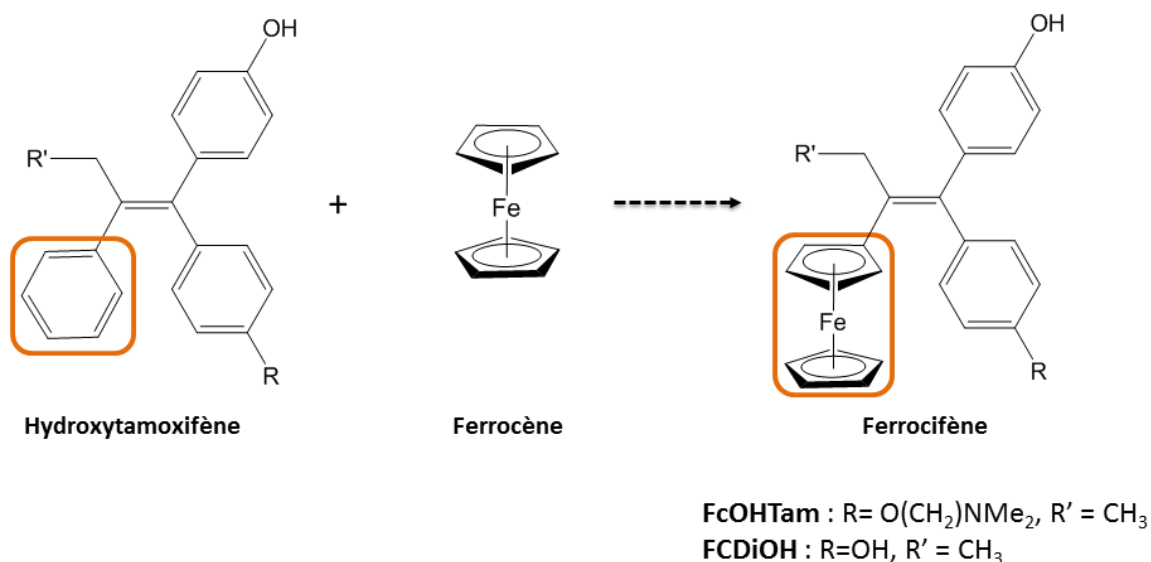
- Lee, E.; Ryu, J. H. The HA-incorporated nanostructure of a peptide–drug amphiphile for targeted anticancer drug delivery. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5637–5640.
- [60] Peng, M. Y.; Qin, S. Y.; Jia, H. Z.; Zheng, D. W.; Rong, L.; Zhang, X. Z. Self-delivery of a peptide based prodrug for tumor-targeting therapy. *Nano Res.* **2015**, *9*, 663–673.
- [61] Ossipov, D. A. Nanostructured hyaluronic acid-based materials for active delivery to cancer. *Expert Opinion Drug Deliv.* **2010**, *7*, 681–703.
- [62] Fish, R. H.; Jaouen, G. Bioorganometallic chemistry: Structural diversity of organometallic complexes with bioligands and molecular recognition studies of several supramolecular hosts with biomolecules, alkali-metal ions, and organometallic pharmaceuticals. *Organometallics* **2003**, *22*, 2166–2177.
- [63] Fouda, M. F. R.; Abd-Elzaher, M. M.; Abdelsamaia, R. A.; Labib, A. A. On the medicinal chemistry of ferrocene. *Appl. Organomet. Chem.* **2007**, *21*, 613–625.
- [64] Adhikari, B.; Singh, C.; Shah, A.; Lough, A. J.; Kraatz, H. B. Amino acid chirality and ferrocene conformation guided self-assembly and gelation of ferrocene-peptide conjugates. *Chem.-Eur. J.* **2015**, *21*, 11560–11572.
- [65] Miklán, Z.; Szabó, R.; Zsoldos-Mády, V.; Reményi, J.; Bánóczy, Z.; Hudecz, F. New ferrocene containing peptide conjugates: Synthesis and effect on human leukemia (HL-60) cells. *Biopolymers* **2007**, *88*, 108–114.
- [66] Huang, X.; Brazel, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J. Control. Release* **2001**, *73*, 121–136.
- [67] Ma, C. Y.; Yin, G. F.; You, F.; Wei, Y.; Huang, Z. B.; Chen, X. C.; Yan, D. H. A specific cell-penetrating peptide induces apoptosis in SKOV3 cells by down-regulation of Bcl-2. *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35*, 1791–1797.
- [68] Gao, H. L.; Zhang, Q. Y.; Yang, Y. T.; Jiang, X. G.; He, Q. Tumor homing cell penetrating peptide decorated nanoparticles used for enhancing tumor targeting delivery and therapy. *Int. J. Pharm.* **2015**, *478*, 240–250.

Pour conclure, les auto-assemblages à base de peptides conduisent à une variété de structures dont une majorité de micelles et de nanofibres. Ces nanostructures sont principalement obtenues par modification du pH, utilisation d'ions divalents ou d'un procédé d'ultrasonication permettant d'obtenir des nanoparticules chargées en principe actif. Concernant l'étude des activités biologiques, celle-ci est beaucoup plus menée sur les auto-assemblages formés de peptide-chaine aliphatique que sur les auto-assemblages formés de peptide-principe actif. Il est intéressant de noter que les études portant sur la conjugaison d'un peptide avec une molécule active pour former un conjugué amphiphile pouvant s'auto-assembler ne sont pas nombreuses. De plus, certaines études sur l'activité biologique des conjugués peptide-principe actif amphiphiles ne font pas l'analyse d'une potentielle auto-association : aucun lien n'est fait entre les résultats biologiques obtenus et la formation potentielle de nanostructures.

## 4. Application thérapeutique envisagée

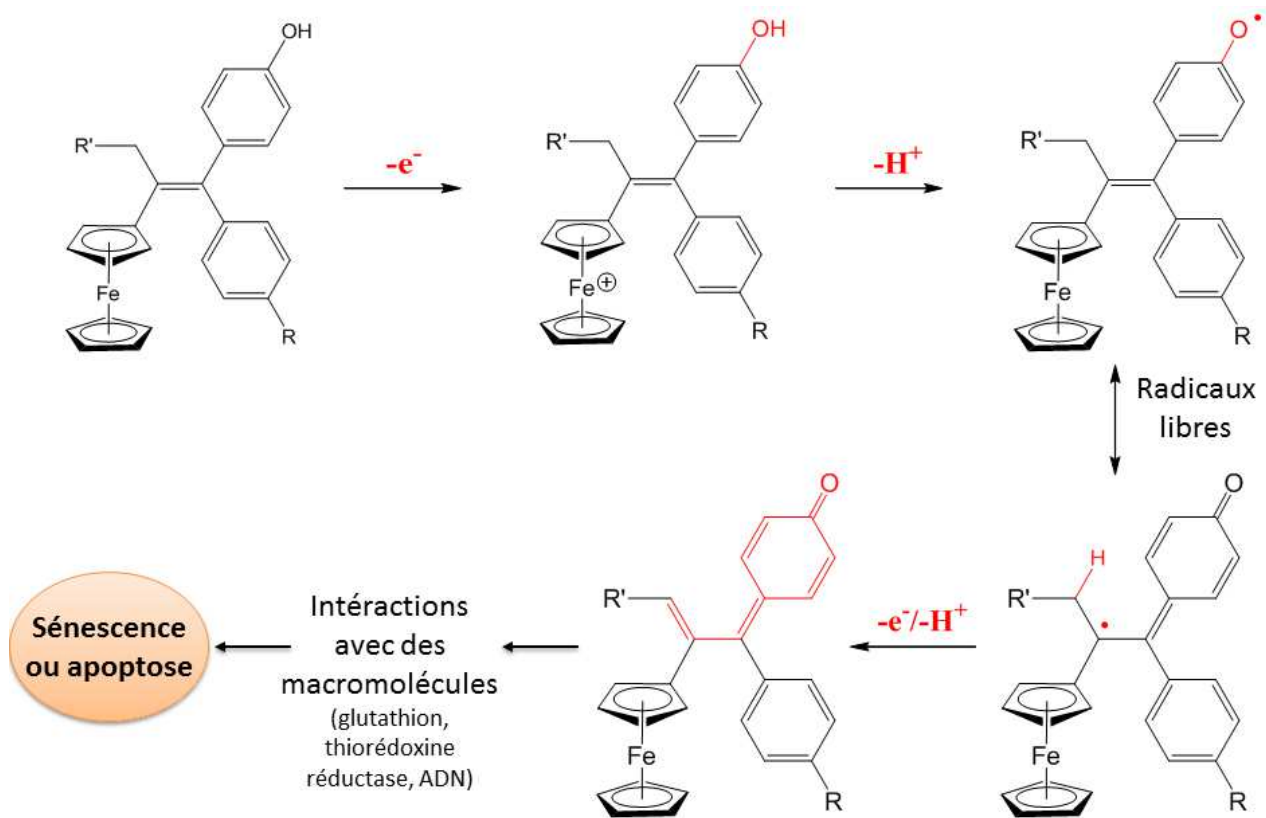
### 4.1. Les ferrocifènes

Depuis le succès du cis-platine, utilisé dans le traitement du cancer depuis une quarantaine d'années, les recherches sur les dérivées organométalliques n'ont cessé de se développer. Les molécules dérivées du platine interagissent avec les guadinines de l'ADN, provoquant une modification structurale de l'ADN et une mort cellulaire par apoptose<sup>103</sup>. Ce mécanisme d'action peut engendrer des effets secondaires, une toxicité élevée et des phénomènes de résistance<sup>104</sup>. Afin de pallier ces difficultés, les chercheurs s'intéressent à d'autres complexes métalliques, dans le but de modifier et varier le mécanisme d'action du médicament<sup>105-108</sup>. Parmi ces composés organométalliques, l'entreprise Feroscan a développé une nouvelle catégorie de molécules, les ferrocifènes, combinaison entre l'hydroxytamoxifène et le ferrocène (Figure 4). Ces molécules ont démontré pouvoir agir préférentiellement sur des protéines cibles et non uniquement sur l'ADN<sup>109</sup>.



**Figure 4** : Structure chimique des ferrocifènes résultant de la substitution d'un groupement phényle de l'hydroxytamoxifène par le ferrocène.

Il est intéressant de noter que le mode d'action supposé de ces nouvelles molécules dépend de leur concentration : à de faibles concentrations, les ferrocifènes agissent par sénescence et évoluent vers un mécanisme d'apoptose ou réaction de Fenton lorsque cette concentration augmente<sup>110</sup>. Le mécanisme d'action supposé de ces molécules est basé sur les propriétés redox du fer et sur l'oxydation réversible Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup><sup>111-113</sup>. Deux oxydations intramoléculaires successives engendrent ensuite la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)<sup>110</sup> et la génération d'une quinone méthide<sup>114</sup>. Cette dernière pourrait à son tour interagir avec des macromolécules telles que le glutathion, la thiorédoxine réductase<sup>115</sup> surexprimée dans les cellules cancéreuses<sup>116</sup> ou encore l'ADN<sup>117</sup> (Figure 5). Ces différents processus font des ferrocifènes des molécules prometteuses pour le traitement des cellules cancéreuses résistantes à la voie apoptotique.



**Figure 5 :** Mécanisme d'action supposé des ferrocifènes.

Le premier ferrocifène à avoir été étudié est le FcOHTam. Ce composé a démontré avoir des  $IC_{50}$  (concentration inhibant la croissance cellulaire à 50 %) de l'ordre du micromolaire sur différentes lignées de cancers du sein et notamment avoir un effet cytotoxique important sur des cellules de cancer du sein triple négatif<sup>118,119</sup>. De plus, il est intéressant de noter que la molécule FcOHTam possède une  $IC_{50}$  inférieure à celles du ferrocène ou de l'hydroxytamoxifène prises séparément<sup>119</sup>. Depuis ces découvertes, l'entreprise a développé de nombreuses molécules ferrocéniques en déclinant différents groupements chimiques greffés sur l'hydroxytamoxifène (groupements R et R', figure 5). Ainsi, le ferrociphénol (FcDiOH) a été développé et a déjà fait ses preuves en termes d'activité thérapeutique sur un modèle de gliome expérimental. En effet, l'administration de ces molécules encapsulées dans le cœur des nanocapsules lipidiques (LNC) a permis d'augmenter considérablement les courbes de survie *in vivo*<sup>116,120,121</sup>. Il a aussi été montré que des contraintes structurelles pouvaient engendrer une modification du mode d'action et ainsi une augmentation de la cytotoxicité. En effet, le complexe ansa-FcDiOH diffère du FcDiOH par une liaison entre les deux cyclopentadiènes. Une comparaison de la cytotoxicité des deux complexes sur 60 lignées cancéreuses a été menée et a mis en évidence une augmentation de l'effet cytotoxique de l'ansa-FcDiOH : quand une  $IC_{50}$  de 0,64  $\mu$ M est obtenue pour le FcDiOH, une  $IC_{50}$  de 0,09  $\mu$ M est obtenue pour l'ansa-FcDiOH sur la lignée cellulaire de cancer du sein hormono-indépendante MDA-MB-231<sup>122</sup>. Ce résultat montre l'importance des études de relation structure-activité afin d'évaluer au mieux les effets cytotoxiques et le mode d'action.

Cependant, un inconvénient majeur à l'utilisation de ces complexes organométalliques est leur caractère lipophile, ce qui nécessite une stratégie de vectorisation adéquate pour une possible administration *in vivo*. Parmi les systèmes nanoparticulaires permettant la vectorisation des ferrocifènes, les nanocapsules lipidiques appelées LNC ont fait l'objet de plusieurs travaux de thèse au sein du laboratoire MINT<sup>121,123-126</sup>. L'encapsulation des ferrocifènes au sein des LNC a montré des résultats satisfaisants dans plusieurs modèles tumoraux, laissant présager une activité prometteuse une fois que le complexe organométallique est vectorisé. Cependant, la faible charge en drogue par rapport aux autres excipients, ainsi que la toxicité potentielle de ces derniers restent des freins majeurs quant à l'application biologique de ces vecteurs.

## 4.2. Le cancer du poumon

### 4.2.1. Epidémiologie du cancer du poumon et facteurs de risque

Le cancer du poumon est le 4<sup>ème</sup> cancer le plus répandu en France avec environ 49 000 nouveaux cas estimés en 2017<sup>127</sup> : environ 32 000 nouveaux cas chez l'homme (2<sup>ème</sup> rang) et 16 800 chez la femme (3<sup>ème</sup> rang). Chez l'homme, le taux d'incidence est quasiment stable depuis 1990 alors que, chez la femme, ce taux est en forte augmentation (+ 5,3 % par an en moyenne). Avec environ 31 000 décès en 2017, le cancer du poumon se situe au 1<sup>er</sup> rang des décès par cancer chez l'homme et au 2<sup>ème</sup> rang chez la femme en France (augmentation du taux de mortalité entre 2005 et 2012)<sup>128</sup>. Selon le rapport de l'Institut de Veille Sanitaire de 2016, la survie à 5 ans du cancer du poumon en France est estimée à 1 patient sur 7 diagnostiqué entre 2005 et 2010 (17 %). La survie après 10 ans est estimée à 1 patient sur 10 diagnostiqué entre 1999 et 2004 (10 %).

Ces différences d'incidence observées entre l'homme et la femme sont directement liées au principal facteur de risque du cancer du poumon : le tabagisme. La consommation de tabac a baissé chez les hommes alors qu'elle augmente chez les femmes. Le tabac étant responsable de huit cancers du poumon sur dix, il est ainsi le premier facteur de risque<sup>129</sup>. D'autres facteurs environnementaux et/ou professionnels sont reconnus comme cancérigène pour les poumons : l'amiante (multiplication par cinq du risque de développer un cancer de poumon), les gaz d'échappement des moteurs, le radon, les hydrocarbures polycycliques aromatiques... Le diagnostic est souvent long et contraignant puisque de nos jours aucun programme de dépistage n'est organisé. Plusieurs examens peuvent ainsi être menés afin de confirmer le diagnostic de cancer du poumon et d'en évaluer le stade (radiographie du thorax, scanner thoracique et/ou biopsie).

### 4.2.2. Les différents types de cancers du poumon

Le cancer du poumon se développe à partir de cellules des bronches. Il existe deux principaux types de cancers du poumon en fonction de l'origine de ces cellules et de leurs morphologies :

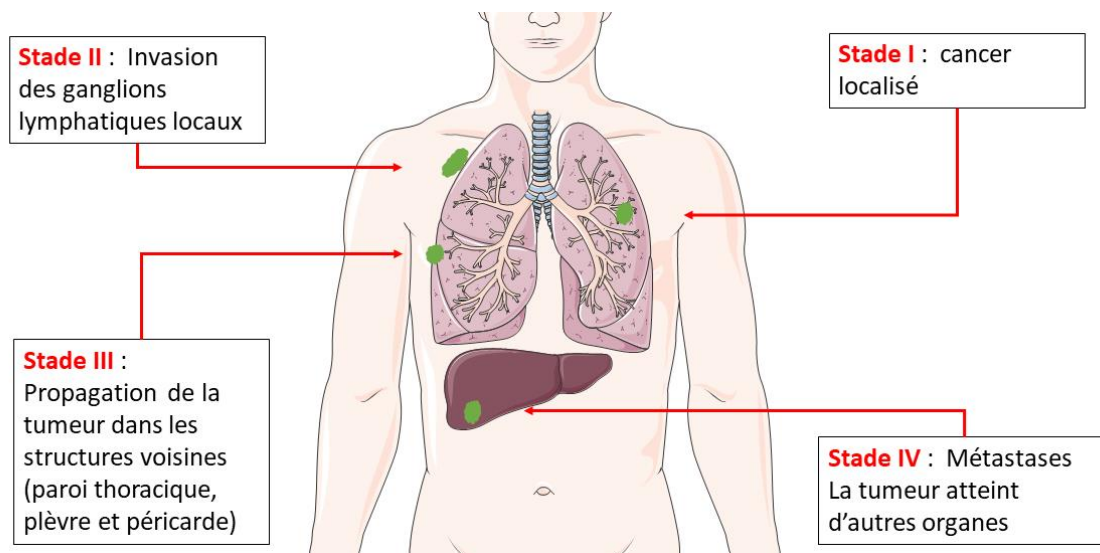
- **Le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC)** qui représente près de 85 % des cancers du poumon. Les formes les plus fréquentes sont : l'adénocarcinome bronchique qui prend généralement naissance au niveau du tissu externe du poumon, le carcinome épidermoïde qui se développe dans les grosses bronches situées au centre du poumon et le carcinome à grande cellules (forme la moins fréquente) qui peut se développer dans toutes les parties du poumon.

- **Le cancer du poumon à petites cellules (CPC)** qui représente environ 15 % des cancers du poumon. Ce type de cancer, même si moins fréquent, est le plus agressif à cause d'une prolifération rapide des cellules cancéreuses qui augmente le risque de métastases<sup>130</sup>.

#### 4.2.3. Les traitements

Trois types de traitements sont utilisés en première intention pour traiter les cancers du poumon : la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicamenteux (chimiothérapie, thérapies ciblées, immunothérapie). Le plus souvent, le cancer du poumon est traité *via* une combinaison de ces différents traitements qui peuvent avoir différents objectifs : la suppression de la tumeur ou des métastases, la réduction du risque de récurrence, le ralentissement du développement ou encore la prévention et le traitement des symptômes et complications (effets secondaires). Les traitements à utiliser sont évalués en fonction du type de cancer dont le patient est atteint et de l'étendue du cancer au moment du diagnostic (atteinte ou non des structures voisines). Pour déterminer le stade, les médecins s'appuient sur un système international appelé TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*). Il existe ainsi quatre stades différents, numérotés de I à IV (figure 6) :

- Les **stades I et II** pour les cas de cancers localisés dans le thorax ;
- Les **stades III** pour les cancers localement avancés avec propagation au niveau des ganglions lymphatiques de voisinage ;
- Les **stades IV** si le cancer s'est propagé à d'autres parties du corps (métastases à distance).



**Figure 6 :** Les différents stades du cancer du poumon.

Chacun des stades, excepté le IV, est subdivisé en deux catégories A et B. Plusieurs possibilités thérapeutiques sont alors envisageables en fonction de l'étendue de la maladie au moment du diagnostic (Tableau 3)<sup>131</sup>.

**Tableau 3** : Traitements possibles en fonction de l'étendue du cancer du poumon.

Stade		Caractéristiques	Traitements
I	A	Tumeur < à 3 cm localisée aux poumons. Pas d'atteinte des ganglions lymphatiques.	<p><b>Stade opérable :</b> Chirurgie (retrait d'une partie du poumon et des ganglions lymphatiques environnants). Chimiothérapie avant et/ou après la chirurgie.</p> <p><b>Stade non opérable :</b> Radiothérapie stéréotaxique ou radiothérapie conformationnelle associée à une chimiothérapie ou thermo-ablation.</p>
	B	Tumeur > à 3 cm Propagation au niveau des régions locales avoisinantes.	
II	A	Tumeur < à 3 cm Invasion des ganglions lymphatiques du même côté de la poitrine.	<p><b>Stade opérable :</b> Chirurgie suivie d'une chimiothérapie et d'une radiothérapie (si la résection n'est pas complète).</p> <p><b>Stade non opérable :</b> Chimiothérapie conventionnelle associée à une radiothérapie. Thérapie ciblée administrée aux patients dont la tumeur présente une altération moléculaire.</p> <p><b>Stade non opérable :</b> Chimiothérapie conventionnelle associée à une radiothérapie. Thérapie ciblée administrée aux patients dont la tumeur présente une altération moléculaire.</p>
	B	Tumeur > à 3 cm Propagation dans les bronches et les ganglions lymphatiques du même côté de la poitrine et les tissus d'autres organes locaux.	
III	A	Propagation de la tumeur aux structures voisines (paroi thoracique, plèvre et péricarde).	<p><b>Stade opérable :</b> Chirurgie suivie d'une chimiothérapie et d'une radiothérapie (si la résection n'est pas complète).</p> <p><b>Stade non opérable :</b> Chimiothérapie conventionnelle associée à une radiothérapie. Thérapie ciblée administrée aux patients dont la tumeur présente une altération moléculaire.</p> <p><b>Stade non opérable :</b> Chimiothérapie conventionnelle associée à une radiothérapie. Thérapie ciblée administrée aux patients dont la tumeur présente une altération moléculaire.</p>
	B	Tumeur étendue touchant le cœur, la trachée, l'œsophage et le médiastin. Epanchement pleural malin.	
IV		Présence de métastases distantes	Chimiothérapie conventionnelle et radiothérapie de tout le cerveau (prévention du développement de micrométastases).

### a) La chirurgie

La chirurgie ne concerne que des formes localisées de cancer du poumon et a pour objectif d'enlever la tumeur dans son intégralité. L'intervention est associée à un curage ganglionnaire qui permet de retirer les ganglions lymphatiques qui se sont développés afin de limiter le risque de récurrence locale<sup>132</sup>. Trois grands



types d'interventions peuvent alors être réalisés en fonction de la taille de la tumeur, de sa localisation et de la potentielle propagation aux ganglions lymphatiques et structures avoisinantes :

- La segmentectomie. Cette intervention s'applique à des tumeurs de petite taille (< à 2 cm) sans atteinte des ganglions lymphatiques. Elle consiste à enlever un ou plusieurs segments du poumon.
- La lobectomie qui est l'intervention la plus réalisée. Elle consiste à enlever le lobe du poumon où siège la tumeur.
- La pneumonectomie. Cette intervention, peu fréquente, consiste à enlever la totalité du poumon où siège la tumeur (résection totale d'un des deux poumons).

## **b) Les traitements médicamenteux**

La chimiothérapie est le traitement de base des patients atteints d'un cancer du poumon à un stade avancé. Trois types de traitements médicamenteux existent en fonction du mode d'action : la chimiothérapie conventionnelle qui agit sur les mécanismes de division cellulaire, les thérapies ciblées qui bloquent les mécanismes spécifiques de croissance/propagation des cellules cancéreuses, ainsi que les molécules d'immunothérapie spécifiques qui sont utilisées pour stimuler les défenses immunitaires.

La chimiothérapie conventionnelle est généralement réalisée après la chirurgie dans le cadre d'un cancer du poumon de stade II et III. Elle est constituée de quatre cycles qui doivent être amorcés dans les quatre à huit semaines suivant l'acte chirurgical.

La thérapie ciblée ainsi que la chimiothérapie conventionnelle sont les traitements de référence dans le cas d'un cancer du poumon de stade IV (métastatique).

### **- Les médicaments de chimiothérapie conventionnelle**

La chimiothérapie conventionnelle consiste en une association de plusieurs médicaments. Le plus souvent, les dérivés du platine (cisplatine ou carboplatine) sont administrés par perfusion intraveineuse et sont associés à d'autres médicaments afin de mettre en place une bithérapie. Les médicaments actuellement utilisés en addition aux dérivés du platine sont : le paclitaxel, le docétaxel, la gemcitabine, la vironelbine ou le pémétréxed<sup>133-135</sup>.

### **- Les médicaments de thérapie ciblée**

Les médicaments de thérapie ciblée actuellement utilisés sont les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), par exemple : l'erlotinib, le gefitinib, l'afatinib ou encore le crizotinib<sup>136,137</sup>.

Un anticorps monoclonal anti-angiogénique peut également être utilisé comme par exemple le bevacizumab. Cet anticorps agit contre l'angiogenèse en empêchant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Par son action, le bevacizumab prive la tumeur des éléments dont elle a besoin pour se développer (oxygène et nutriments)<sup>138,139</sup>.

### **- Les immunothérapies spécifiques<sup>140-142</sup>**

L'immunothérapie, qui consiste à utiliser les défenses immunitaires du patient lui-même pour lutter contre la tumeur, est en plein développement. Le premier médicament ayant reçu une autorisation de mise sur le

marché pour le cancer du poumon en 2015 est le nivolumab. Le pembrolizumab a ensuite été développé peu de temps après pour le traitement du cancer du poumon métastatique étendu.

### c) La radiothérapie

La radiothérapie consiste à utiliser des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses. Elle permet ainsi un traitement localisé en visant la zone à traiter (tumeur et ganglions lymphatiques ou métastases)<sup>143</sup>. Cette technique est souvent utilisée lorsque l'état général du patient ne permet pas une opération chirurgicale dans le cas de cancer du poumon de stade I et II. Elle est également utilisée dans certains cas afin de compléter l'intervention chirurgicale et la chimiothérapie (notamment dans le cas d'un stade III).

Malgré le développement perpétuel de nouveaux traitements et agents thérapeutiques, tels que le pémétréxed et la combinaison du bevacizumab avec les dérivés du cisplatine, le taux de survie reste relativement faible avec un plateau thérapeutique allant de 12 à 14 mois<sup>144</sup>.

Kim *et al.* ont montré un lien entre la concentration tumorale de platine et la réponse thérapeutique de patients ayant un CPNPC traités par du cisplatine ou du carboplatine<sup>145</sup>. En effet le médicament doit être à une concentration suffisante pour exercer son activité thérapeutique<sup>146</sup>. Cependant, les tumeurs solides possèdent une vascularisation anormale et anarchique qui empêche la distribution de l'agent thérapeutique à l'ensemble des cellules cancéreuses<sup>147</sup>. Cette distribution au sein du tissu tumoral est également limitée par un système lymphatique immature et une matrice extracellulaire complexe<sup>148,149</sup>.

De plus, les effets secondaires restent importants notamment dans le cas des chimiothérapies administrées par voie systémique (nausées, lésions de la bouche, chute de cheveux, fatigue...). Ce mode invasif d'administration provoque également des traumatismes aux veines pouvant mener à des thrombophlébites, de la nécrose tissulaire, des infections au niveau de la zone d'introduction du cathéter ou encore des embolies<sup>150,151</sup>. Dans ce cadre, la chimiothérapie par aérosol est une stratégie prometteuse qui pourrait permettre de réduire ces effets secondaires, tout en augmentant l'activité des médicaments<sup>152</sup>.

## 4.3. L'aérosolthérapie

Un aérosol est un ensemble de particules solides ou liquides en suspension dans l'air. L'administration de médicaments par aérosol est habituelle dans le cas des maladies broncho-pulmonaires chroniques comme l'asthme, la bronchopneumonie chronique obstructive, la mucoviscidose et l'hypertension artérielle pulmonaire. Dans le cas de l'asthme, l'inhalation a démontré pouvoir réduire d'un facteur 10 les doses d'agents thérapeutiques à administrer comparée à la voie orale<sup>150</sup>. Le passage systémique du principe actif est relativement faible, avec une administration directe au niveau des bronches, bronchioles et du poumon profond permettant ainsi une diminution des effets secondaires<sup>153</sup>. Cependant, l'application de l'aérosolthérapie dans le domaine de l'oncologie doit faire face à de nombreux critères pour être non

dangereuse et efficace<sup>154</sup>. L'un des points importants à considérer est la toxicité liée aux anticancéreux utilisés. En effet, l'aérosol généré lors d'une séance doit être contrôlé : l'endroit doit être confiné afin d'éviter toute contamination et protéger les personnes extérieures<sup>155</sup>. De plus, une libération à des concentrations élevées en anticancéreux ainsi qu'à des temps très courts peut générer des effets secondaires locaux importants : toux d'irritation, bronchite, dyspnée, etc<sup>156-158</sup>. La toxicité engendrée par l'aérosol doit donc être évaluée et considérée afin de protéger le personnel médical mais également limiter les effets secondaires chez le patient. L'obstruction partielle ou totale des voies respiratoires due à la présence de la tumeur peut également être un obstacle à la déposition de l'aérosol, engendrant ainsi une délivrance hétérogène et non contrôlée de l'anticancéreux<sup>159,160</sup>.

Le développement de générateurs d'aérosols permettant de contrôler et de cibler la déposition des médicaments au niveau des tissus cancéreux est donc une étape cruciale pour le développement de l'aérosolthérapie en oncologie. Il existe trois types de générateurs d'aérosols pour nébulisation (Figure 7) :

- Les nébuliseurs pneumatiques qui fonctionnent selon le principe de l'effet Venturi. La solution thérapeutique est nébulisée sous l'effet d'un gaz comprimé (qui doit être compatible avec la solution) : le gaz projette une petite quantité de la solution sur un impacteur, ce qui engendre la formation de gouttelettes en suspension dans l'air.
- Les nébuliseurs ultrasoniques qui utilisent les ultrasons pour diviser la solution thérapeutique par vibration d'un quartz piézo-électrique.
- Les nébuliseurs électroniques à tamis vibrant. Ces générateurs fonctionnent par vibrations d'un tamis en contact avec la solution à nébuliser. Ce tamis bombé est perforé de trous d'un diamètre de quelques microns. Les mouvements alternatifs du tamis créent un effet d'extrusion qui projette la solution thérapeutique au travers des trous, produisant ainsi un aérosol calibré.



**Figure 7 :** Exemples de générateurs d'aérosols : le nébuliseur pneumatique, le nébuliseur ultrasonique et le nébuliseur électronique à tamis vibrant.

Le tableau 4 répertorie les principales études cliniques menées sur les chimiothérapies inhalées en fonction du principe actif utilisé.

**Tableau 4** : Etudes cliniques menées sur les chimiothérapies administrées par aérosol. NR : Non renseigné. (Adapté de Rosière *et al.*<sup>161</sup>)

Principe actif	Phase des essais cliniques	Dispositif d'aérosol	Formulation / Concentration du principe actif	Déposition et/ou concentration	Référence
5-fluoro-uracile	NR	Nébuliseur ultrasonique	Solution 50 mg/mL	Concentration dans les tissus pulmonaires, les bronches, les ganglions lymphatiques	162
9-nitro-20(S)-camptothecin	I	Nébuliseur pneumatique	Dispersion liposomale 0,4 mg/mL (+20 mg/mL excipients)	Concentration broncho-alvéolaire > concentration sérique	163
Cisplatine	I	Nébuliseur pneumatique	Dispersion liposomale 1 mg/mL (+23,5 mg/mL excipients)	Déposition pulmonaire : 10-15 %	164
	Ib/IIa				165
Doxorubicine	I	Nébuliseur pneumatique	Solution pH 3, 20 % éthanol : 16 et 24 mg/mL	Déposition pulmonaire	166
Doxorubicine (inhalation) + cisplatine et docetaxel (intraveineux)	I/II				167
Gemcitabine	I	Nébuliseur à tamis vibrant	Solution 40 mg/mL	Déposition pulmonaire (42 ± 16 %)	168
Carboplatine	I/II	Nébuliseur pneumatique	Solution 10 mg/mL	Déposition de l'aérosol marqué dans le parenchyme pulmonaire	169

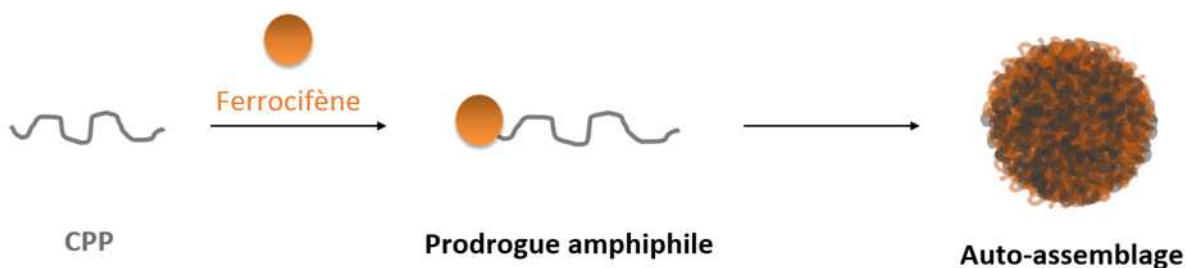
L'administration d'anticancéreux par aérosol permet d'améliorer la pharmacocinétique. En effet, de nombreuses études précliniques (notamment chez la souris, le rat et le chien) ont comparé l'administration par inhalation et l'administration par voie intraveineuse (IV). Il a été démontré que l'aérosol permettait d'augmenter la concentration en anticancéreux au niveau des poumons par rapport à une même dose administrée par la voie IV<sup>153,158,170,171</sup>. Une diminution de la taille des tumeurs ainsi qu'une augmentation des taux de survie ont pu être observées, montrant ainsi une amélioration de l'efficacité du traitement grâce à

l'inhalation<sup>172-174</sup>. Cette amélioration est également liée à une diminution des effets secondaires systémiques. En effet, l'administration par aérosol d'une dispersion colloïdale de liposomes contenant du cisplatine chez 17 patients atteints d'un cancer du poumon n'a pas engendré de toxicité hématologique, de néphrotoxicité, d'ototoxicité ou de myélosuppression<sup>164</sup>. De la même façon, l'absence de toxicité hématologique a été constatée lors de l'administration par aérosolthérapie de liposomes contenant de la 9-nitrocamptothécine<sup>163</sup>. Cependant, d'autres effets indésirables locaux sont à considérer provoquant des toux, une irritation bronchique, une irritation pharyngée ou encore des douleurs thoraciques<sup>163,166</sup>. Ces effets secondaires sont liés à une déposition de l'anticancéreux dans le tractus respiratoire : la quantité déposée au niveau pulmonaire peut être alors relativement faible<sup>150,175</sup>. Par exemple, dans le cas des études cliniques sur la délivrance de liposomes de cisplatine, seulement 10 à 15 % de la dose était retenue au niveau du poumon<sup>164</sup>. Ce pourcentage de médicament déposé a pu être augmenté dans le cas de la gemcitabine nébulisée en solution : 42 % de la dose initiale a pu être administrée dans les poumons avec des concentrations plasmatiques en gemcitabine très faibles<sup>168</sup>.

Ainsi, l'administration d'anticancéreux par aérosol permet d'améliorer la pharmacocinétique et l'efficacité thérapeutique malgré des effets indésirables locaux (toux, dyspnée, etc.) à considérer.

## 5. Objectifs de la thèse

Les ferrocifènes sont des molécules organométalliques qui ont montré une activité biologique intéressante sur de nombreuses lignées cancéreuses (IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire sur un panel de 60 lignées cellulaires NCI). De plus, ces molécules possèdent un mécanisme d'action original permettant d'agir sur différentes cibles intracellulaires. Elles induisent aussi un mécanisme de mort cellulaire par sénescence ou/et apoptose selon la concentration utilisée. Malgré leurs caractéristiques *in vitro* plus que prometteuses, les molécules de ferrocifènes sont hydrophobes et ne peuvent être administrées *in vivo*. L'objectif principal de la thèse est donc de mettre au point une plateforme nanoparticulaire permettant l'administration des molécules de ferrocifène *in vivo*. L'idée est ainsi de développer un nouveau type de nanoparticule en combinant trois stratégies de vectorisation : l'utilisation de peptides pénétrants, la formation d'une prodrogue amphiphile et l'auto-assemblage en nanoparticules (Figure 8).



**Figure 8** : Stratégies de vectorisation pour le développement d'une plateforme innovante permettant l'administration des ferrocifènes.

Ce manuscrit s'articule en deux parties.

La première partie porte sur la synthèse, la formulation et la caractérisation des auto-assemblages formés de peptides pénétrants et de ferrocifène. L'auto-association des conjugués amphiphiles CPP-ferrocifène a été étudiée et optimisée en mettant au point un procédé de nanopréciipitation utilisant un micro-mélangeur. Cette partie s'intéresse tout particulièrement à l'étape de caractérisation des objets formés, avec une comparaison des différentes méthodes quotidiennement employées dans les laboratoires de recherche académique. Ainsi la publication « *Importance of combining advanced particle size analysis techniques to characterize cell penetrating peptide-ferrocifen self-assemblies* » met en évidence l'importance et la complémentarité des méthodes de caractérisation pour pouvoir analyser au mieux les nanostructures réellement formées.

La deuxième partie s'intéresse à la formulation d'une deuxième catégorie d'auto-assemblages, co-nanopréciipités avec du PEG. Les différents auto-assemblages formés ont été analysés sur deux lignées cellulaires cancéreuses et une lignée saine (activité biologique et quantification de l'internalisation cellulaire). Des études *in vivo* ont également été menées sur un modèle murin de cancer bronchique par nébulisation intra-trachéale des suspensions obtenues.

## Bibliographie

- (1) Parfitt, K.; Martindale, W. *Martindale: The Complete Drug Reference*; Pharmaceutical Press: London, 1999.
- (2) Strebhardt, K.; Ullrich, A. Paul Ehrlich's Magic Bullet Concept: 100 Years of Progress. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8* (6), 473–480. <https://doi.org/10.1038/nrc2394>.
- (3) Barenholz, Y. Doxil®--the First FDA-Approved Nano-Drug: Lessons Learned. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2012**, *160* (2), 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- (4) pubmeddev. Advanced search - PubMed - NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/advanced> (accessed Jul 22, 2019).
- (5) Commission Recommendation of 18 October 2011 on the Definition of NanomaterialText with EEA Relevance. 3.
- (6) Soares, S.; Sousa, J.; Pais, A.; Vitorino, C. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Front. Chem.* **2018**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00360>.
- (7) Bleeker, E. A. J.; de Jong, W. H.; Geertsma, R. E.; Groenewold, M.; Heugens, E. H. W.; Koers-Jacquemijns, M.; van de Meent, D.; Popma, J. R.; Rietveld, A. G.; Wijnhoven, S. W. P.; et al. Considerations on the EU Definition of a Nanomaterial: Science to Support Policy Making. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2013**, *65* (1), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.11.007>.
- (8) Bhattacharyya, S.; Kudgus, R. A.; Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. Inorganic Nanoparticles in Cancer Therapy. *Pharm. Res.* **2011**, *28* (2), 237–259. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0318-0>.
- (9) Naz, S.; Shamoan, M.; Wang, R.; Zhang, L.; Zhou, J.; Chen, J. Advances in Therapeutic Implications of Inorganic Drug Delivery Nano-Platforms for Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (4), 965. <https://doi.org/10.3390/ijms20040965>.
- (10) Lombardo, D.; Kiselev, M. A.; Caccamo, M. T. Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2019/3702518/> (accessed Jul 22, 2019). <https://doi.org/10.1155/2019/3702518>.
- (11) Moghimi, S. M.; Szebeni, J. Stealth Liposomes and Long Circulating Nanoparticles: Critical Issues in Pharmacokinetics, Oponization and Protein-Binding Properties. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42* (6), 463–478.
- (12) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46* (12 Pt 1), 6387–6392.
- (13) Padera, T. P.; Stoll, B. R.; Tooredman, J. B.; Capen, D.; di Tomaso, E.; Jain, R. K. Pathology: Cancer Cells Compress Intratumour Vessels. *Nature* **2004**, *427* (6976), 695. <https://doi.org/10.1038/427695a>.
- (14) Nichols, J. W.; Bae, Y. H. EPR: Evidence and Fallacy. *J. Controlled Release* **2014**, *190*, 451–464. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.057>.
- (15) Danhier, F. To Exploit the Tumor Microenvironment: Since the EPR Effect Fails in the Clinic, What Is the Future of Nanomedicine? *J. Controlled Release* **2016**, *244*, 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.015>.
- (16) Haute Autorité de Santé - ABRAXANE (paclitaxel), taxane [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1774154/fr/abraxane-paclitaxel-taxane](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1774154/fr/abraxane-paclitaxel-taxane) (accessed Jun 13, 2019).
- (17) Iglesias, J. Nab-Paclitaxel (Abraxane®): An Albumin-Bound Cytotoxic Exploiting Natural Delivery Mechanisms into Tumors. *Breast Cancer Res. BCR* **2009**, *11* (Suppl 1), S21. <https://doi.org/10.1186/bcr2282>.
- (18) Tran, S.; DeGiovanni, P.-J.; Piel, B.; Rai, P. Cancer Nanomedicine: A Review of Recent Success in Drug Delivery. *Clin. Transl. Med.* **2017**, *6*. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0175-0>.
- (19) Shi, J.; Kantoff, P. W.; Wooster, R.; Farokhzad, O. C. Cancer Nanomedicine: Progress, Challenges and Opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17* (1), 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>.
- (20) Shi, J.; Kantoff, P. W.; Wooster, R.; Farokhzad, O. C. Cancer Nanomedicine: Progress, Challenges and Opportunities. *Nature Reviews Cancer* **2017**, *17* (1), 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>.
- (21) Tran, S.; DeGiovanni, P.-J.; Piel, B.; Rai, P. Cancer Nanomedicine: A Review of Recent Success in Drug Delivery. *Clin Transl Med* **2017**, *6*. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0175-0>.

- (22) Etheridge, M. L.; Campbell, S. A.; Erdman, A. G.; Haynes, C. L.; Wolf, S. M.; McCullough, J. THE BIG PICTURE ON SMALL MEDICINE: THE STATE OF NANOMEDICINE PRODUCTS APPROVED FOR USE OR IN CLINICAL TRIALS. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, *9* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.013>.
- (23) Pautu, V.; Mellinger, A.; Resnier, P.; Lepeltier, E.; Martin, L.; Boussemart, L.; Letournel, F.; Passirani, C.; Clere, N. Melanoma Tumour Vasculature Heterogeneity: From Mice Models to Human. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2019**, *145* (3), 589–597. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2809-z>.
- (24) Kumar, A.; Dailey, L. A.; Forbes, B. Lost in Translation: What Is Stopping Inhaled Nanomedicines from Realizing Their Potential? *Ther. Deliv.* **2014**, *5* (7), 757–761. <https://doi.org/10.4155/tde.14.47>.
- (25) Zamboni, W. C.; Strychor, S.; Maruca, L.; Ramalingam, S.; Zamboni, B. A.; Wu, H.; Friedland, D. M.; Edwards, R. P.; Stoller, R. G.; Belani, C. P.; et al. Pharmacokinetic Study of Pegylated Liposomal CKD-602 (S-CKD602) in Patients with Advanced Malignancies. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2009**, *86* (5), 519–526. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.141>.
- (26) Frankel, A. D.; Pabo, C. O. Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell* **1988**, *55* (6), 1189–1193.
- (27) Green, M.; Loewenstein, P. M. Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein. *Cell* **1988**, *55* (6), 1179–1188. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90262-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90262-0).
- (28) Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H.; Prochiantz, A. Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88* (5), 1864–1868. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1864>.
- (29) Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (25), 16010–16017.
- (30) Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (14), 10444–10450.
- (31) Bechara, C.; Sagan, S. Cell-Penetrating Peptides: 20 Years Later, Where Do We Stand? *FEBS Lett.* **2013**, *587* (12), 1693–1702. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>.
- (32) Milletti, F. Cell-Penetrating Peptides: Classes, Origin, and Current Landscape. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (15), 850–860. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002>.
- (33) Gurney, L. R. I.; Taggart, J.; Tong, W.-C.; Jones, A. T.; Robson, S. C.; Taggart, M. J. Inhibition of Inflammatory Changes in Human Myometrial Cells by Cell Penetrating Peptide and Small Molecule Inhibitors of NFκB. *Front. Immunol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02966>.
- (34) Ma, W.-Y.; Murata, E.; Ueda, K.; Kuroda, Y.; Cao, M.-H.; Abe, M.; Shigemitsu, K.; Hirose, M. A Synthetic Cell-Penetrating Peptide Antagonizing TrkA Function Suppresses Neuropathic Pain in Mice. *J. Pharmacol. Sci.* **2010**, *114* (1), 79–84. <https://doi.org/10.1254/jphs.10119FP>.
- (35) Gurbel Paul A.; Bliden Kevin P.; Turner Susan E.; Tantry Udaya S.; Gesheff Martin G.; Barr Travis P.; Covic Lidija; Kuliopulos Athan. Cell-Penetrating Pepducin Therapy Targeting PAR1 in Subjects With Coronary Artery Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *36* (1), 189–197. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306777>.
- (36) Nasrollahi, S. A.; Fouladdel, S.; Taghibiglou, C.; Azizi, E.; Farboud, E. S. A Peptide Carrier for the Delivery of Elastin into Fibroblast Cells. *Int. J. Dermatol.* **2012**, *51* (8), 923–929. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05214.x>.
- (37) Jia, L.; Gorman, G. S.; Coward, L. U.; Noker, P. E.; McCormick, D.; Horn, T. L.; Harder, J. B.; Muzzio, M.; Prabhakar, B.; Ganesh, B.; et al. Preclinical Pharmacokinetics, Metabolism, and Toxicity of Azurin-P28 (NSC745104) a Peptide Inhibitor of P53 Ubiquitination. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, *68* (2), 513–524. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1518-3>.
- (38) Habault, J.; Poyet, J.-L. Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies. *Molecules* **2019**, *24* (5). <https://doi.org/10.3390/molecules24050927>.
- (39) Yang, H.; Liu, S.; Cai, H.; Wan, L.; Li, S.; Li, Y.; Cheng, J.; Lu, X. Chondroitin Sulfate as a Molecular Portal That Preferentially Mediates the Apoptotic Killing of Tumor Cells by Penetratin-Directed Mitochondria-Disrupting Peptides. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (33), 25666–25676. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.089417>.
- (40) Poon, G. M. K.; Gariépy, J. Cell-Surface Proteoglycans as Molecular Portals for Cationic Peptide and Polymer Entry into Cells. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35* (4), 788–793. <https://doi.org/10.1042/BST0350788>.



- (41) Letoha, T.; Keller-Pintér, A.; Kusz, E.; Kolozsi, C.; Bozsó, Z.; Tóth, G.; Vizler, C.; Oláh, Z.; Szilák, L. Cell-Penetrating Peptide Exploited Syndecans. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2010**, *1798* (12), 2258–2265. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.01.022>.
- (42) Persson, D.; Thorén, P. E. G.; Nordén, B. Penetratin-Induced Aggregation and Subsequent Dissociation of Negatively Charged Phospholipid Vesicles. *FEBS Lett.* **2001**, *505* (2), 307–312. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02843-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02843-5).
- (43) Tiriveedhi, V.; Butko, P. A Fluorescence Spectroscopy Study on the Interactions of the TAT-PTD Peptide with Model Lipid Membranes. *Biochemistry* **2007**, *46* (12), 3888–3895. <https://doi.org/10.1021/bi602527t>.
- (44) Lundin, P.; Johansson, H.; Guterstam, P.; Holm, T.; Hansen, M.; Langel, Ü.; EL Andaloussi, S. Distinct Uptake Routes of Cell-Penetrating Peptide Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (12), 2535–2542. <https://doi.org/10.1021/bc800212j>.
- (45) Deshayes, S.; Decaffmeyer, M.; Brasseur, R.; Thomas, A. Structural Polymorphism of Two CPP: An Important Parameter of Activity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2008**, *1778* (5), 1197–1205. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.01.027>.
- (46) Ryser, H. J.-P.; Hancock, R. Histones and Basic Polyamino Acids Stimulate the Uptake of Albumin by Tumor Cells in Culture. *Science* **1965**, *150* (3695), 501–503. <https://doi.org/10.1126/science.150.3695.501>.
- (47) Mitchell, D. J.; Steinman, L.; Kim, D. T.; Fathman, C. G.; Rothbard, J. B. Polyarginine Enters Cells More Efficiently than Other Polycationic Homopolymers. *J. Pept. Res.* **2000**, *56* (5), 318–325. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2000.00723.x>.
- (48) Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Lewis, R. S.; Murray, B. A.; Wender, P. A. Role of Membrane Potential and Hydrogen Bonding in the Mechanism of Translocation of Guanidinium-Rich Peptides into Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (31), 9506–9507. <https://doi.org/10.1021/ja0482536>.
- (49) Nakase, I.; Takeuchi, T.; Tanaka, G.; Futaki, S. Methodological and Cellular Aspects That Govern the Internalization Mechanisms of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (4), 598–607. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.006>.
- (50) Carrigan, C. N.; Imperiali, B. The Engineering of Membrane-Permeable Peptides. *Anal. Biochem.* **2005**, *341* (2), 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.03.026>.
- (51) Takayama, K.; Nakase, I.; Michiue, H.; Takeuchi, T.; Tomizawa, K.; Matsui, H.; Futaki, S. Enhanced Intracellular Delivery Using Arginine-Rich Peptides by the Addition of Penetration Accelerating Sequences (Pas). *J. Controlled Release* **2009**, *138* (2), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.05.019>.
- (52) Elmquist, A.; Hansen, M.; Langel, Ü. Structure–Activity Relationship Study of the Cell-Penetrating Peptide PVEC. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2006**, *1758* (6), 721–729. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.013>.
- (53) Mishra, A.; Lai, G. H.; Schmidt, N. W.; Sun, V. Z.; Rodriguez, A. R.; Tong, R.; Tang, L.; Cheng, J.; Deming, T. J.; Kamei, D. T.; et al. Translocation of HIV TAT Peptide and Analogues Induced by Multiplexed Membrane and Cytoskeletal Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (41), 16883–16888. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108795108>.
- (54) Walrant, A.; Vogel, A.; Correia, I.; Lequin, O.; Olausson, B. E. S.; Desbat, B.; Sagan, S.; Alves, I. D. Membrane Interactions of Two Arginine-Rich Peptides with Different Cell Internalization Capacities. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2012**, *1818* (7), 1755–1763. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.02.024>.
- (55) White, S. H.; Wimley, W. C. MEMBRANE PROTEIN FOLDING AND STABILITY: Physical Principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28* (1), 319–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.28.1.319>.
- (56) Alves, I. D.; Goasdoué, N.; Correia, I.; Aubry, S.; Galanth, C.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Chassaing, G. Membrane Interaction and Perturbation Mechanisms Induced by Two Cationic Cell Penetrating Peptides with Distinct Charge Distribution. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2008**, *1780* (7), 948–959. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.04.004>.
- (57) Walrant, A.; Correia, I.; Jiao, C.-Y.; Lequin, O.; Bent, E. H.; Goasdoué, N.; Lacombe, C.; Chassaing, G.; Sagan, S.; Alves, I. D. Different Membrane Behaviour and Cellular Uptake of Three Basic Arginine-Rich Peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2011**, *1808* (1), 382–393. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.09.009>.
- (58) Eiríksdóttir, E.; Konate, K.; Langel, Ü.; Divita, G.; Deshayes, S. Secondary Structure of Cell-Penetrating Peptides Controls Membrane Interaction and Insertion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2010**, *1798* (6), 1119–1128. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.03.005>.

- (59) Takechi, Y.; Yoshii, H.; Tanaka, M.; Kawakami, T.; Aimoto, S.; Saito, H. Physicochemical Mechanism for the Enhanced Ability of Lipid Membrane Penetration of Polyarginine. *Langmuir* **2011**, *27* (11), 7099–7107. <https://doi.org/10.1021/la200917y>.
- (60) Letoha, T.; Gaál, S.; Somlai, C.; Czajlik, A.; Perczel, A.; Penke, B. Membrane Translocation of Penetratin and Its Derivatives in Different Cell Lines. *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16* (5), 272–279. <https://doi.org/10.1002/jmr.637>.
- (61) Christiaens, B.; Grooten, J.; Reusens, M.; Joliot, A.; Goethals, M.; Vandekerckhove, J.; Prochiantz, A.; Rosseneu, M. Membrane Interaction and Cellular Internalization of Penetratin Peptides. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271* (6), 1187–1197. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04022.x>.
- (62) Clayton, A. H. A.; Atcliffe, B. W.; Howlett, G. J.; Sawyer, W. H. Conformation and Orientation of Penetratin in Phospholipid Membranes. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12* (3), 233–238. <https://doi.org/10.1002/psc.715>.
- (63) Deshayes, S.; Heitz, A.; Morris, M. C.; Charnet, P.; Divita, G.; Heitz, F. Insight into the Mechanism of Internalization of the Cell-Penetrating Carrier Peptide Pep-1 through Conformational Analysis. *Biochemistry* **2004**, *43* (6), 1449–1457. <https://doi.org/10.1021/bi035682s>.
- (64) Lins, L.; Decaffmeyer, M.; Thomas, A.; Brasseur, R. Relationships between the Orientation and the Structural Properties of Peptides and Their Membrane Interactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2008**, *1778* (7), 1537–1544. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.04.006>.
- (65) Derossi, D.; Calvet, S.; Trembleau, A.; Brunissen, A.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-Independent. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (30), 18188–18193. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.18188>.
- (66) Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. Arginine-Rich Peptides AN ABUNDANT SOURCE OF MEMBRANE-PERMEABLE PEPTIDES HAVING POTENTIAL AS CARRIERS FOR INTRACELLULAR PROTEIN DELIVERY. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (8), 5836–5840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007540200>.
- (67) Richard, J. P.; Melikov, K.; Vives, E.; Ramos, C.; Verbeure, B.; Gait, M. J.; Chernomordik, L. V.; Lebleu, B. Cell-Penetrating Peptides A REEVALUATION OF THE MECHANISM OF CELLULAR UPTAKE. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (1), 585–590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209548200>.
- (68) Thorén, P. E. G.; Persson, D.; Isakson, P.; Goksör, M.; Önfelt, A.; Nordén, B. Uptake of Analogs of Penetratin, Tat(48–60) and Oligoarginine in Live Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *307* (1), 100–107. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01135-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01135-5).
- (69) Guterstam, P.; Madani, F.; Hirose, H.; Takeuchi, T.; Futaki, S.; EL Andaloussi, S.; Gräslund, A.; Langel, Ü. Elucidating Cell-Penetrating Peptide Mechanisms of Action for Membrane Interaction, Cellular Uptake, and Translocation Utilizing the Hydrophobic Counter-Anion Pyrenebutyrate. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2009**, *1788* (12), 2509–2517. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.09.014>.
- (70) EL-Andaloussi, S.; Järver, P.; Johansson, H. J.; Langel, Ü. Cargo-Dependent Cytotoxicity and Delivery Efficacy of Cell-Penetrating Peptides: A Comparative Study. *Biochem. J.* **2007**, *407* (2), 285–292. <https://doi.org/10.1042/BJ20070507>.
- (71) Swiecicki, J.-M.; Bartsch, A.; Tailhades, J.; Di Pisa, M.; Heller, B.; Chassaing, G.; Mansuy, C.; Burlina, F.; Lavielle, S. The Efficacies of Cell-Penetrating Peptides in Accumulating in Large Unilamellar Vesicles Depend on Their Ability to Form Inverted Micelles. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2014**, *15* (6), 884–891. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300742>.
- (72) Deshayes, S.; Plénat, T.; Charnet, P.; Divita, G.; Molle, G.; Heitz, F. Formation of Transmembrane Ionic Channels of Primary Amphipathic Cell-Penetrating Peptides. Consequences on the Mechanism of Cell Penetration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2006**, *1758* (11), 1846–1851. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.08.010>.
- (73) Henriques, S. T.; Castanho, M. A. R. B. Consequences of Nonlytic Membrane Perturbation to the Translocation of the Cell Penetrating Peptide Pep-1 in Lipidic Vesicles. *Biochemistry* **2004**, *43* (30), 9716–9724. <https://doi.org/10.1021/bi036325k>.
- (74) Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated Portals of Entry into the Cell. *Nature* **2003**, *422* (6927), 37. <https://doi.org/10.1038/nature01451>.
- (75) Cellular Uptake of Arginine-Rich Peptides: Roles for Macropinocytosis and Actin Rearrangement - ScienceDirect <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525001604013966> (accessed Jun 13, 2019).

- (76) Svensen, N.; Walton, J. G. A.; Bradley, M. Peptides for Cell-Selective Drug Delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33* (4), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.02.002>.
- (77) Gao, H.; Zhang, Q.; Yang, Y.; Jiang, X.; He, Q. Tumor Homing Cell Penetrating Peptide Decorated Nanoparticles Used for Enhancing Tumor Targeting Delivery and Therapy. *Int. J. Pharm.* **2015**, *478* (1), 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.029>.
- (78) Ma, C.; Yin, G.; You, F.; Wei, Y.; Huang, Z.; Chen, X.; Yan, D. A Specific Cell-Penetrating Peptide Induces Apoptosis in SKOV3 Cells by down-Regulation of Bcl-2. *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35* (11), 1791–1797. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1263-x>.
- (79) Albert, A. Chemical Aspects of Selective Toxicity. *Nature* **1958**, *182* (4633), 421. <https://doi.org/10.1038/182421a0>.
- (80) Zawilska, J. B.; Wojcieszak, J.; Olejniczak, A. B. Prodrugs: A Challenge for the Drug Development. *Pharmacol. Rep. PR* **2013**, *65* (1), 1–14.
- (81) Vasey, P. A.; Kaye, S. B.; Morrison, R.; Twelves, C.; Wilson, P.; Duncan, R.; Thomson, A. H.; Murray, L. S.; Hilditch, T. E.; Murray, T.; et al. Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of PK1 [N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymer Doxorubicin]: First Member of a New Class of Chemotherapeutic Agents-Drug-Polymer Conjugates. Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **1999**, *5* (1), 83–94.
- (82) Rademaker-Lakhai, J. M.; Terret, C.; Howell, S. B.; Baud, C. M.; De Boer, R. F.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M.; Droz, J.-P. A Phase I and Pharmacological Study of the Platinum Polymer AP5280 given as an Intravenous Infusion Once Every 3 Weeks in Patients with Solid Tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2004**, *10* (10), 3386–3395. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0315>.
- (83) Teicher, B. A.; Chari, R. V. J. Antibody Conjugate Therapeutics: Challenges and Potential. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17* (20), 6389–6397. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1417>.
- (84) Mahato, R.; Tai, W.; Cheng, K. Prodrugs for Improving Tumor Targetability and Efficiency. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (8), 659–670. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.002>.
- (85) Vauthier, C.; Bouchemal, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (5), 1025–1058. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>.
- (86) Galindo-Rodriguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharm. Res.* **2004**, *21* (8), 1428–1439. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000036917.75634.be>.
- (87) Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Influence of Process and Formulation Parameters on the Formation of Submicron Particles by Solvent Displacement and Emulsification-Diffusion Methods Critical Comparison. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *163* (2), 90–122. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.02.005>.
- (88) Chandler, D. Interfaces and the Driving Force of Hydrophobic Assembly. *Nature* **2005**, *437* (7059), 640–647. <https://doi.org/10.1038/nature04162>.
- (89) Nagarajan, R. Molecular Packing Parameter and Surfactant Self-Assembly: The Neglected Role of the Surfactant Tail. *Langmuir* **2002**, *18* (1), 31–38. <https://doi.org/10.1021/la010831y>.
- (90) Vitale, S. A.; Katz, J. L. Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid-Liquid Nucleation: “The Ouzo Effect.” *Langmuir* **2003**, *19* (10), 4105–4110. <https://doi.org/10.1021/la026842o>.
- (91) Lepeltier, E.; Bourgaux, C.; Couvreur, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo Effect”: Application to Drug Delivery Devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *71*, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.009>.
- (92) Watzky, M. A.; Finke, R. G. Transition Metal Nanocluster Formation Kinetic and Mechanistic Studies. A New Mechanism When Hydrogen Is the Reductant: Slow, Continuous Nucleation and Fast Autocatalytic Surface Growth. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (43), 10382–10400. <https://doi.org/10.1021/ja9705102>.
- (93) Jun, H.; Fabienne, T.; Florent, M.; Coulon, P.-E.; Nicolas, M.; Olivier, S. Understanding of the Size Control of Biocompatible Gold Nanoparticles in Millifluidic Channels. *Langmuir* **2012**, *28* (45), 15966–15974. <https://doi.org/10.1021/la303439f>.
- (94) Polte, J.; Erler, R.; Thünemann, A. F.; Sokolov, S.; Ahner, T. T.; Rademann, K.; Emmerling, F.; Kraehnert, R. Nucleation and Growth of Gold Nanoparticles Studied via in Situ Small Angle X-Ray Scattering at Millisecond Time Resolution. *ACS Nano* **2010**, *4* (2), 1076–1082. <https://doi.org/10.1021/nn901499c>.

- (95) Liu, Y.; Kathan, K.; Saad, W.; Prud'homme, R. K. Ostwald Ripening of Beta-Carotene Nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98* (3), 036102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.98.036102>.
- (96) Botet, R. The "Ouzo Effect", Recent Developments and Application to Therapeutic Drug Carrying. *J. Phys. Conf. Ser.* **2012**, *352*, 012047. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/352/1/012047>.
- (97) François, G.; Katz, J. L. Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices. *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* **2005**, *6* (2), 209–216. <https://doi.org/10.1002/cphc.200400527>.
- (98) Yan, X.; Alcouffe, P.; Sudre, G.; David, L.; Bernard, J.; Ganachaud, F. Modular Construction of Single-Component Polymer Nanocapsules through a One-Step Surfactant-Free Microemulsion Templated Synthesis. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (8), 1401–1404. <https://doi.org/10.1039/C6CC09701D>.
- (99) Smith, G. D.; Donelan, C. E.; Barden, R. E. Oil-Continuous Microemulsions Composed of Hexane, Water, and 2-Propanol. *J. Colloid Interface Sci.* **1977**, *60* (3), 488–496. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(77\)90313-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(77)90313-7).
- (100) Keiser, B. A.; Varie, David.; Barden, R. E.; Holt, S. L. Detergentless Water/Oil Microemulsions Composed of Hexane, Water, and 2-Propanol. 2. Nuclear Magnetic Resonance Studies, Effect of Added Sodium Chloride. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83* (10), 1276–1280. <https://doi.org/10.1021/j100473a008>.
- (101) Zemb, T. N.; Klossek, M.; Lopian, T.; Marcus, J.; Schöettl, S.; Horinek, D.; Prevost, S. F.; Touraud, D.; Diat, O.; Marčelja, S.; et al. How to Explain Microemulsions Formed by Solvent Mixtures without Conventional Surfactants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (16), 4260–4265. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515708113>.
- (102) Hou, W.; Xu, J. Surfactant-Free Microemulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2016**, *25*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.06.013>.
- (103) Reedijk, J.; Lohman, P. H. M. Cisplatin: Synthesis, Antitumour Activity and Mechanism of Action. *Pharm. Weekbl.* **1985**, *7* (5), 173–180. <https://doi.org/10.1007/BF02307573>.
- (104) Kelland, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7* (8), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>.
- (105) Ndagi, U.; Mhlongo, N.; Soliman, M. E. Metal Complexes in Cancer Therapy – an Update from Drug Design Perspective. *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, *11*, 599–616. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>.
- (106) Zhang, C. X.; Lippard, S. J. New Metal Complexes as Potential Therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (4), 481–489.
- (107) Hillard, E.; Vessières, A.; Le Bideau, F.; Plazuk, D.; Spera, D.; Huché, M.; Jaouen, G. A Series of Unconjugated Ferrocenyl Phenols: Prospects as Anticancer Agents. *ChemMedChem* **2006**, *1* (5), 551–559. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200500035>.
- (108) Miklán, Z.; Szabó, R.; Zsoldos-Mády, V.; Reményi, J.; Bánóczy, Z.; Hudecz, F. New Ferrocene Containing Peptide Conjugates: Synthesis and Effect on Human Leukemia (HL-60) Cells. *Biopolymers* **2007**, *88* (2), 108–114. <https://doi.org/10.1002/bip.20696>.
- (109) Jaouen, G.; Vessières, A.; Top, S. Ferrocifen Type Anti Cancer Drugs. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (24), 8802–8817. <https://doi.org/10.1039/c5cs00486a>.
- (110) Vessières, A.; Corbet, C.; Heldt, J. M.; Lories, N.; Jouy, N.; Laios, I.; Leclercq, G.; Jaouen, G.; Toillon, R.-A. A Ferrocenyl Derivative of Hydroxytamoxifen Elicits an Estrogen Receptor-Independent Mechanism of Action in Breast Cancer Cell Lines. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104* (5), 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.12.020>.
- (111) Jaouen, G.; Top, S. The Ferrocifen Family as Potent and Selective Antitumor Compounds: Mechanisms of Action. In *Advances in Organometallic Chemistry and Catalysis*; Wiley-Blackwell, 2013; pp 563–580. <https://doi.org/10.1002/9781118742952.ch42>.
- (112) Jaouen, G.; Top, S.; Vessières, A.; Pigeon, P.; Leclercq, G.; Laios, I. First Anti-Oestrogen in the Cyclopentadienyl Rhenium Tricarbonyl Series. Synthesis and Study of Antiproliferative Effects. *Chem. Commun.* **2001**, *0* (4), 383–384. <https://doi.org/10.1039/B009553M>.
- (113) Top, S.; Vessières, A.; Pigeon, P.; Rager, M.-N.; Huché, M.; Salomon, E.; Cabestaing, C.; Vaissermann, J.; Jaouen, G. Selective Estrogen-Receptor Modulators (SERMs) in the Cyclopentadienylrhenium Tricarbonyl Series: Synthesis and Biological Behaviour. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2004**, *5* (8), 1104–1113. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400067>.

- (114) Hillard, E.; Vessières, A.; Thouin, L.; Jaouen, G.; Amatore, C. Ferrocene-Mediated Proton-Coupled Electron Transfer in a Series of Ferrocifen-Type Breast-Cancer Drug Candidates. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2005**, *45* (2), 285–290. <https://doi.org/10.1002/anie.200502925>.
- (115) Citta, A.; Folda, A.; Bindoli, A.; Pigeon, P.; Top, S.; Vessières, A.; Salmain, M.; Jaouen, G.; Rigobello, M. P. Evidence for Targeting Thioredoxin Reductases with Ferrocenyl Quinone Methides. A Possible Molecular Basis for the Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on Cancer Cells. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (21), 8849–8859. <https://doi.org/10.1021/jm5013165>.
- (116) Allard, E.; Passirani, C.; Garcion, E.; Pigeon, P.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P. Lipid Nanocapsules Loaded with an Organometallic Tamoxifen Derivative as a Novel Drug-Carrier System for Experimental Malignant Gliomas. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2008**, *130* (2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.027>.
- (117) Zanellato, I.; Heldt, J.-M.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Osella, D. Antiproliferative Effect of Ferrocifen Drug Candidates on Malignant Pleural Mesothelioma Cell Lines. *Inorganica Chim. Acta* **2009**, *362* (11), 4037–4042. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2009.05.047>.
- (118) Top, S.; Tang, J.; Vessières, A.; Carrez, D.; Provot, C.; Jaouen, G. Ferrocenyl Hydroxytamoxifen: A Prototype for a New Range of Oestradiol Receptor Site-Directed Cytotoxics. *Chem. Commun.* **1996**, No. 8, 955–956. <https://doi.org/10.1039/CC9960000955>.
- (119) Top, S.; Vessières, A.; Leclercq, G.; Quivy, J.; Tang, J.; Vaissermann, J.; Huché, M.; Jaouen, G. Synthesis, Biochemical Properties and Molecular Modelling Studies of Organometallic Specific Estrogen Receptor Modulators (SERMs), the Ferrocifens and Hydroxyferrocifens: Evidence for an Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on Both Hormone-Dependent and Hormone-Independent Breast Cancer Cell Lines. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2003**, *9* (21), 5223–5236. <https://doi.org/10.1002/chem.200305024>.
- (120) Laine, A.-L.; Huynh, N. T.; Clavreul, A.; Balzeau, J.; Béjaud, J.; Vessieres, A.; Benoit, J.-P.; Eyer, J.; Passirani, C. Brain Tumour Targeting Strategies via Coated Ferrociphenol Lipid Nanocapsules. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2012**, *81* (3), 690–693. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.04.012>.
- (121) Lainé, A.-L.; Clavreul, A.; Rousseau, A.; Tétaud, C.; Vessieres, A.; Garcion, E.; Jaouen, G.; Aubert, L.; Guilbert, M.; Benoit, J.-P.; et al. Inhibition of Ectopic Glioma Tumor Growth by a Potent Ferrocenyl Drug Loaded into Stealth Lipid Nanocapsules. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2014**, *10* (8), 1667–1677. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.05.002>.
- (122) Görmen, M.; Pigeon, P.; Top, S.; Hillard, E. A.; Huché, M.; Hartinger, C. G.; de Montigny, F.; Plamont, M.-A.; Vessières, A.; Jaouen, G. Synthesis, Cytotoxicity, and COMPARE Analysis of Ferrocene and [3]Ferrocenophane Tetrasubstituted Olefin Derivatives against Human Cancer Cells. *ChemMedChem* **2010**, *5* (12), 2039–2050. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000286>.
- (123) Allard, E.; Huynh, N. T.; Vessières, A.; Pigeon, P.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Dose Effect Activity of Ferrocifen-Loaded Lipid Nanocapsules on a 9L-Glioma Model. *Int. J. Pharm.* **379** (2), 317–323.
- (124) Huynh, N. T.; Passirani, C.; Allard-Vannier, É.; Lemaire, L.; Roux, J.; Garcion, E.; Vessières, A.; Benoit, J.-P. Administration-Dependent Efficacy of Ferrociphenol Lipid Nanocapsules for the Treatment of Intracranial 9L Rat Gliosarcoma. **2012**.
- (125) Resnier, P. Nano-Vectorisation de siRNA via des nanocapsules lipidiques : contournement de la résistance du mélanome aux chimiothérapies conventionnelles. **2014**.
- (126) Karim, R. Design of Nanocarriers to Deliver Small Hydrophobic Molecules for Glioblastoma Treatment. **2017**.
- (127) INCA - Les cancers en France [http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers\\_en\\_france/#page=31](http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=31) (accessed Jun 27, 2019).
- (128) Rapports et synthèses / Publications / Surveillance épidémiologique des cancers / Cancers / Maladies chroniques et traumatismes / Dossiers thématiques / Accueil <http://invs.santepubliquefrance.fr//Dossiers-thematiques/Maladies-chroniques-et-traumatismes/Cancers/Surveillance-epidemiologique-des-cancers/Publications/Rapports-et-syntheses> (accessed Jun 27, 2019).
- (129) Faire prendre conscience des dangers du tabac - Tabac <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Facteurs-de-risque-et-de-protection/Tabac/Faire-prendre-conscience-des-dangers-du-tabac> (accessed Jun 27, 2019).

- (130) van Meerbeeck, J. P.; Fennell, D. A.; De Ruysscher, D. K. Small-Cell Lung Cancer. *The Lancet* **2011**, *378* (9804), 1741–1755. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60165-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60165-7).
- (131) Les traitements possibles en fonction de l'étendue du cancer du poumon - Quels traitements? <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-poumon/Quels-traitements/Traitements-et-etendue-du-cancer> (accessed Jun 28, 2019).
- (132) Howington, J. A.; Blum, M. G.; Chang, A. C.; Balekian, A. A.; Murthy, S. C. Treatment of Stage I and II Non-Small Cell Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* **2013**, *143* (5 Suppl), e278S-e313S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2359>.
- (133) Masters, G. A.; Temin, S.; Azzoli, C. G.; Giaccone, G.; Baker, S.; Brahmer, J. R.; Ellis, P. M.; Gajra, A.; Rackear, N.; Schiller, J. H.; et al. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33* (30), 3488–3515. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.1342>.
- (134) Souquet, P. J.; Couraud, S.; Locatelli-Sanchez, M. Les Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules de Stade IV Hors Addiction Oncogénique: 1re Ligne et Maintenance. *Rev. Mal. Respir. Actual.* **2016**, *8* (5), 351–360. [https://doi.org/10.1016/S1877-1203\(16\)30124-0](https://doi.org/10.1016/S1877-1203(16)30124-0).
- (135) Molina, J. R.; Yang, P.; Cassivi, S. D.; Schild, S. E.; Adjei, A. A. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clin. Proc.* **2008**, *83* (5), 584–594. <https://doi.org/10.4065/83.5.584>.
- (136) Thomas, A.; Rajan, A.; Giaccone, G. Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2012**, *26* (3), 589–605. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2012.02.001>.
- (137) Yang, Z.; Hackshaw, A.; Feng, Q.; Fu, X.; Zhang, Y.; Mao, C.; Tang, J. Comparison of Gefitinib, Erlotinib and Afatinib in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *Int. J. Cancer* **2017**, *140* (12), 2805–2819. <https://doi.org/10.1002/ijc.30691>.
- (138) Russo, A. E.; Priolo, D.; Antonelli, G.; Libra, M.; McCubrey, J. A.; Ferrà, F. Bevacizumab in the Treatment of NSCLC: Patient Selection and Perspectives. *Lung Cancer Targets Ther.* **2017**, *8*, 259–269. <https://doi.org/10.2147/LCTT.S110306>.
- (139) Lauro, S.; Onesti, C. E.; Righini, R.; Marchetti, P. The Use of Bevacizumab in Non-Small Cell Lung Cancer: An Update. *Anticancer Res.* **2014**, *34* (4), 1537–1545.
- (140) Zappa, C.; Mousa, S. A. Non-Small Cell Lung Cancer: Current Treatment and Future Advances. *Transl. Lung Cancer Res.* **2016**, *5* (3), 288–300. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>.
- (141) Chatwal, M. S.; Tanvetyanon, T. Combination Chemotherapy and Immunotherapy in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Setback for Personalized Medicine? *Transl. Lung Cancer Res.* **2018**, *7* (Suppl 3), S208–S210. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.07.15>.
- (142) Corrales, L.; Scilla, K.; Caglevic, C.; Miller, K.; Oliveira, J.; Rolfo, C. Immunotherapy in Lung Cancer: A New Age in Cancer Treatment. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *995*, 65–95. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-02505-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-02505-2_3).
- (143) Maciejczyk, A.; Skrzypczyńska, I.; Janiszewska, M. Lung Cancer. Radiotherapy in Lung Cancer: Actual Methods and Future Trends. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* **2014**, *19* (6), 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2014.04.012>.
- (144) Baxevanos, P.; Mountzios, G. Novel Chemotherapy Regimens for Advanced Lung Cancer: Have We Reached a Plateau? *Ann. Transl. Med.* **2018**, *6* (8). <https://doi.org/10.21037/atm.2018.04.04>.
- (145) Kim, E. S.; Lee, J. J.; He, G.; Chow, C.-W.; Fujimoto, J.; Kalthor, N.; Swisher, S. G.; Wistuba, I. I.; Stewart, D. J.; Siddik, Z. H. Tissue Platinum Concentration and Tumor Response in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30* (27), 3345–3352. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.8120>.
- (146) Minchinton, A. I.; Tannock, I. F. Drug Penetration in Solid Tumours. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (8), 583. <https://doi.org/10.1038/nrc1893>.
- (147) Brown, J. M.; Giaccia, A. J. The Unique Physiology of Solid Tumors: Opportunities (and Problems) for Cancer Therapy. *Cancer Res.* **1998**, *58* (7), 1408–1416.
- (148) Jain, R. K.; Munn, L. L.; Fukumura, D. Dissecting Tumour Pathophysiology Using Intravital Microscopy. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (4), 266. <https://doi.org/10.1038/nrc778>.
- (149) Netti, P. A.; Berk, D. A.; Swartz, M. A.; Grodzinsky, A. J.; Jain, R. K. Role of Extracellular Matrix Assembly in Interstitial Transport in Solid Tumors. *Cancer Res.* **2000**, *60* (9), 2497–2503.

- (150) Jain, K. K. Drug Delivery Systems - An Overview. In *Drug Delivery Systems*; Jain, K. K., Ed.; Methods in Molecular Biology™; Humana Press: Totowa, NJ, 2008; pp 1–50. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-210-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-210-6_1).
- (151) Schulmeister, L. Preventing and Managing Vesicant Chemotherapy Extravasations. *J. Support. Oncol.* **2010**, *8* (5), 212–215.
- (152) Rosière, R.; Hureauux, J.; Levet, V.; Amighi, K.; Wauthoz, N. La Chimiothérapie Inhalée – Partie 1 : Concept et Challenges Technologiques Actuels. *Rev. Mal. Respir.* **2018**, *35* (4), 357–377. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.02.001>.
- (153) Sharma, S.; White, D.; Imondi, A. R.; Placke, M. E.; Vail, D. M.; Kris, M. G. Development of Inhalational Agents for Oncologic Use. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19* (6), 1839–1847. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.6.1839>.
- (154) Dautzenberg, B.; Becquemin, M. H.; Chaumuzeau, J. P.; Diot, P.; Membres du GAT. [Good practice for aerosol therapy by nebulisation]. *Rev. Mal. Respir.* **2007**, *24* (6), 751–757.
- (155) Gagnadoux, F.; Hureauux, J.; Vecellio, L.; Urban, T.; Le Pape, A.; Valo, I.; Montharu, J.; Leblond, V.; Boisdrion-Celle, M.; Lerondel, S.; et al. Aerosolized Chemotherapy. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **2008**, *21* (1), 61–70. <https://doi.org/10.1089/jamp.2007.0656>.
- (156) Zarogoulidis, P.; Chatzaki, E.; Porpodis, K.; Domvri, K.; Hohenforst-Schmidt, W.; Goldberg, E. P.; Karamanos, N.; Zarogoulidis, K. Inhaled chemotherapy in lung cancer: future concept of nanomedicine <https://www.dovepress.com/inhaled-chemotherapy-in-lung-cancer-future-concept-of-nanomedicine-peer-reviewed-article-IJN> (accessed Jun 28, 2019). <https://doi.org/10.2147/IJN.S29997>.
- (157) Darwiche, K.; Zarogoulidis, P.; Karamanos, N. K.; Domvri, K.; Chatzaki, E.; Constantinidis, T. C.; Kakolyris, S.; Zarogoulidis, K. Efficacy versus Safety Concerns for Aerosol Chemotherapy in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Future Dilemma for Micro-Oncology. *Future Oncol.* **2013**, *9* (4), 505–525. <https://doi.org/10.2217/fon.12.205>.
- (158) Levet, V.; Merlos, R.; Rosière, R.; Amighi, K.; Wauthoz, N. Platinum Pharmacokinetics in Mice Following Inhalation of Cisplatin Dry Powders with Different Release and Lung Retention Properties. *Int. J. Pharm.* **2017**, *517* (1), 359–372. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.037>.
- (159) Kleinstreuer, C.; Zhang, Z. Targeted Drug Aerosol Deposition Analysis for a Four-Generation Lung Airway Model With Hemispherical Tumors. *J. Biomech. Eng.* **2003**, *125* (2), 197–206. <https://doi.org/10.1115/1.1543548>.
- (160) Labiris, N. R.; Dolovich, M. B. Pulmonary Drug Delivery. Part I: Physiological Factors Affecting Therapeutic Effectiveness of Aerosolized Medications. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2003**, *56* (6), 588–599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01892.x>.
- (161) Rosière, R.; Hureauux, J.; Levet, V.; Amighi, K.; Wauthoz, N. La Chimiothérapie Inhalée – Partie 2 : Clinique et Applications Potentielles. *Rev. Mal. Respir.* **2018**, *35* (4), 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.02.002>.
- (162) Tatsumura, T.; Koyama, S.; Tsujimoto, M.; Kitagawa, M.; Kagamimori, S. Further Study of Nebulisation Chemotherapy, a New Chemotherapeutic Method in the Treatment of Lung Carcinomas: Fundamental and Clinical. *Br. J. Cancer* **1993**, *68* (6), 1146. <https://doi.org/10.1038/bjc.1993.495>.
- (163) Verschraegen, C. F.; Gilbert, B. E.; Loyer, E.; Huaranga, A.; Walsh, G.; Newman, R. A.; Knight, V. Clinical Evaluation of the Delivery and Safety of Aerosolized Liposomal 9-Nitro-20(S)-Camptothecin in Patients with Advanced Pulmonary Malignancies. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10* (7), 2319–2326. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0929-3>.
- (164) Wittgen, B. P. H.; Kunst, P. W. A.; Born, K. van der; Wijk, A. W. van; Perkins, W.; Pilkiewicz, F. G.; Perez-Soler, R.; Nicholson, S.; Peters, G. J.; Postmus, P. E. Phase I Study of Aerosolized SLIT Cisplatin in the Treatment of Patients with Carcinoma of the Lung. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (8), 2414–2421. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1480>.
- (165) Chou, A. J.; Gupta, R.; Bell, M. D.; Riewe, K. O.; Meyers, P. A.; Gorlick, R. Inhaled Lipid Cisplatin (ILC) in the Treatment of Patients with Relapsed/Progressive Osteosarcoma Metastatic to the Lung. *Pediatr. Blood Cancer* **2013**, *60* (4), 580–586. <https://doi.org/10.1002/pbc.24438>.
- (166) Otterson, G. A.; Villalona-Calero, M. A.; Sharma, S.; Kris, M. G.; Imondi, A.; Gerber, M.; White, D. A.; Ratain, M. J.; Schiller, J. H.; Sandler, A.; et al. Phase I Study of Inhaled Doxorubicin for Patients with Metastatic Tumors to the Lungs. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (4), 1246–1252. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1096>.

- (167) Otterson, G. A.; Villalona-Calero, M. A.; Hicks, W.; Pan, X.; Ellerton, J. A.; Gettinger, S. N.; Murren, J. R. Phase I/II Study of Inhaled Doxorubicin Combined with Platinum-Based Therapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16* (8), 2466–2473. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3015>.
- (168) Lemarie, E.; Vecellio, L.; Hureauux, J.; Prunier, C.; Valat, C.; Grimbert, D.; Boidron-Celle, M.; Giraudeau, B.; Le Pape, A.; Pichon, E.; et al. Aerosolized Gemcitabine in Patients with Carcinoma of the Lung: Feasibility and Safety Study. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **2011**, *24* (6), 261–270. <https://doi.org/10.1089/jamp.2010.0872>.
- (169) Zarogoulidis, P.; Eleftheriadou, E.; Sapardanis, I.; Zarogoulidou, V.; Lithoxopoulou, H.; Kontakiotis, T.; Karamanos, N.; Zachariadis, G.; Mabroudi, M.; Zisimopoulos, A.; et al. Feasibility and Effectiveness of Inhaled Carboplatin in NSCLC Patients. *Invest. New Drugs* **2012**, *30* (4), 1628–1640. <https://doi.org/10.1007/s10637-011-9714-5>.
- (160) Koshkina, N. V.; Waldrep, J. C.; Roberts, L. E.; Golunski, E.; Melton, S.; Knight, V. Paclitaxel Liposome Aerosol Treatment Induces Inhibition of Pulmonary Metastases in Murine Renal Carcinoma Model. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7* (10), 3258–3262.
- (171) Gill, K. K.; Nazzal, S.; Kaddoumi, A. Paclitaxel Loaded PEG5000–DSPE Micelles as Pulmonary Delivery Platform: Formulation Characterization, Tissue Distribution, Plasma Pharmacokinetics, and Toxicological Evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79* (2), 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.04.017>.
- (172) Taratula, O.; Kuzmov, A.; Shah, M.; Garbuzenko, O. B.; Minko, T. Nanostructured Lipid Carriers as Multifunctional Nanomedicine Platform for Pulmonary Co-Delivery of Anticancer Drugs and siRNA. *J. Controlled Release* **2013**, *171* (3), 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.04.018>.
- (173) Wauthoz, N.; Deleuze, P.; Hecq, J.; Roland, I.; Saussez, S.; Adanja, I.; Debeir, O.; Decaestecker, C.; Mathieu, V.; Kiss, R.; et al. In Vivo Assessment of Temozolomide Local Delivery for Lung Cancer Inhalation Therapy. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *39* (5), 402–411. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.01.010>.
- (174) Roa, W. H.; Azarmi, S.; Al-Hallak, M. H. D. K.; Finlay, W. H.; Magliocco, A. M.; Löbenberg, R. Inhalable Nanoparticles, a Non-Invasive Approach to Treat Lung Cancer in a Mouse Model. *J. Controlled Release* **2011**, *150* (1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.10.035>.
- (175) Rubin, B. K. Air and Soul: The Science and Application of Aerosol Therapy. *Respir. Care* **2010**, *55* (7), 911–921.

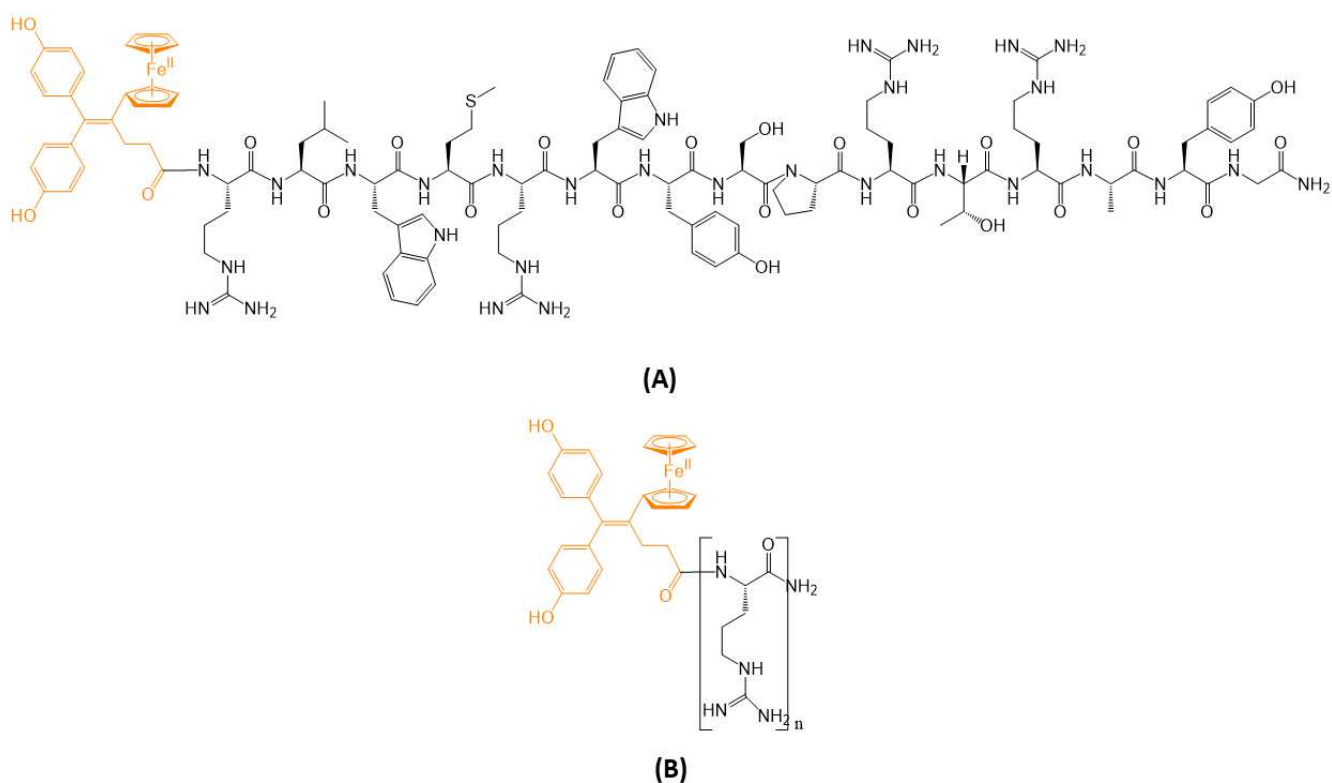


# **Chapitre 1 : « Importance of combining advanced particle size analysis techniques to characterize cell penetrating peptide-ferrocifen self-assemblies »**

L'encapsulation des ferrocifènes au sein de nanocapsules lipidiques (LNC) a fait l'objet de plusieurs travaux de thèse dans le laboratoire MINT. Ces études ont montré des résultats satisfaisants, laissant présager une activité prometteuse une fois que le complexe organométallique est vectorisé. Cependant, la faible charge en drogue ainsi que la toxicité potentielle des excipients restent des freins majeurs quant à l'application biologique de ces vecteurs.

Pour cela, l'objectif de cette partie a été de concevoir un nouveau vecteur nanoparticulaire afin de pouvoir administrer les molécules de ferrocifène *in vivo*. Nous avons tout d'abord décidé d'utiliser des peptides pénétrants (CPP) hydrophiles afin de faciliter l'internalisation cellulaire du ferrocifène. Une prodrogue amphiphile a ainsi été réalisée en couplant chimiquement un ferrocifène, le p54, au peptide pénétrant : la liaison devant être biodégradable, un lien amide a été réalisé. Les polyarginines ayant des propriétés d'internalisation intéressantes lorsqu'ils sont constitués de 6 à 9 unités arginines, ont été utilisés comme peptides pénétrants modèles. Le peptide RLW ayant démontré *in vitro* une capacité à pénétrer spécifiquement dans les cellules du cancer du poumon, a été sélectionné afin de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. Une fois la synthèse et la purification réalisées, nous avons étudié la capacité de ces 5 différentes molécules amphiphiles à former des nanoparticules par auto-association dans l'eau : nous avons ainsi évalué si la balance hydrophile/hydrophobe de notre combinaison CPP-ferrocifène était adéquate. L'idée était de ne pas utiliser d'autres excipients, afin d'obtenir une charge en ferrocifènes la plus élevée possible. Celle-ci est, dans ce projet, d'environ 30 % suivant le peptide utilisé.

Dans cette étude, nous nous sommes donc concentrés sur la capacité des molécules amphiphiles CPP-p54 (structures chimiques figure 9) à s'auto-assembler en déterminant, dans un premier temps, la concentration d'agrégation critique. L'organisation supramoléculaire des auto-assemblages a ensuite été analysée par différentes techniques. Des méthodes classiques couramment utilisées dans de nombreux laboratoires de recherche ont d'abord été utilisées : la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et la microscopie électronique à transmission (Cryo-TEM). Nous avons ensuite appliqué des méthodes complémentaires plus complexes : la diffusion de la lumière sous multiples angles (MALS), l'analyse du suivi individuel des nanoparticules (NTA), la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ainsi que la diffusométrie RMN. La comparaison des résultats obtenus par ces méthodes a ensuite été réalisée afin de mettre en avant la complémentarité et la nécessité d'utiliser ces différentes techniques de caractérisation afin d'obtenir les propriétés physico-chimiques des auto-assemblages au plus proche de la réalité.



**Figure 9** : Structures chimiques des conjugués : **(A)** conjugué RLW-p54, **(B)** conjugué R<sub>n</sub>-p54. Le ferrocifène p54 est représenté en orange et le peptide en noir.

Ces travaux ont été publiés dans *Journal of Physical and Chemistry Letters* en 2019.

Lien : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcllett.9b01493>

## 1. Quelles méthodes utiliser pour caractériser les nanoparticules ?

Aujourd'hui les nanomédicaments ne cessent de se développer, ce qui nécessite la mise en place de protocoles précis et robustes pour leur caractérisation physico-chimique, afin de prédire et reproduire au mieux leur activité biologique. Cependant, la caractérisation de ces nanovecteurs est souvent incomplète car l'analyse précise d'objets nanométriques requiert l'utilisation de plusieurs appareils. Une approche globale est souvent nécessaire pour pouvoir caractériser au mieux les auto-assemblages formés : la combinaison de plusieurs techniques d'analyse s'avère primordiale de par leur complémentarité. Il est important de connaître les forces et les limitations de chaque méthode d'analyse afin de caractériser de manière fiable les auto-assemblages formés. Les deux caractéristiques principales étudiées lors de la formulation d'auto-assemblages sont la taille et la forme/structure supramoléculaire. Il est également possible d'avoir une indication sur la distribution en taille de la suspension (homogénéité) grâce à l'indice de polydispersité (PDI) et la charge en surface des auto-assemblages grâce au potentiel zêta. De nombreuses techniques permettent de caractériser des auto-assemblages en suspension, allant de la diffusion dynamique de la lumière (méthode couramment utilisée en laboratoire car simple d'utilisation) pour caractériser la taille des objets, à la diffusion des rayons X aux petits angles<sup>1</sup> afin d'appréhender la structure supramoléculaire des auto-assemblages formés. Les méthodes de caractérisation discutées dans cette partie sont résumées dans le tableau 5.

**Tableau 5** : Méthodes de caractérisation développées dans cette partie.

DLS : Diffusion dynamique de la lumière, MALS : diffusion de la lumière sous multiples angles, NTA : analyse du suivi individuel de particules, Cryo-TEM : cryo-microscopie électronique à transmission, SAXS : diffusion des rayons X aux petits angles.  $R_h$  : rayon hydrodynamique,  $R_g$  : rayon de giration,  $d$  : diamètre.

Méthode	Paramètres pouvant être déterminés	Avantages	Limites	Références
<b>DLS</b>	Rayon hydrodynamique (5 nm < $R_h$ < 10000 nm) Indice de polydispersité (distribution en intensité)	Rapidité de l'analyse	Intensité diffusée par l'échantillon doit être supérieure à celle de l'eau Dilution nécessaire	2,3
<b>MALS</b>	Rayon hydrodynamique, Rayon de giration (5 nm < $R_g$ < 1000 nm) (distribution en intensité)	Détermination du rayon de giration Analyse à plusieurs angles de diffusion	Forte contribution des grosses particules	4
<b>NTA</b>	Rayon hydrodynamique (30 nm < $R_h$ < 1000 nm) Concentration particulaire (distribution en nombre)	Résolution monoparticulaire, analyse possible d'échantillons polydisperses	Dilution nécessaire	5
<b>Cryo-TEM</b>	Diamètre (1 nm < $d$ < 100 nm) Morphologie/structure	Analyse de l'échantillon dans son état natif (pas de séchage ou de coloration nécessaire)	Très faible rapport signal sur bruit, artéfacts liés à la vitrification, coûts élevés	6-8
<b>SAXS</b>	Rayon de giration (1 nm < $R_g$ < 1000 nm) Distribution en taille (distribution en intensité) Morphologie/structure supramoléculaire	Sensibilité	Accès au rayonnement synchrotron limité, analyse longue, coûts élevés	9,10

## 1.1. Diffusion de la lumière

La diffusion de la lumière repose sur le mouvement Brownien des nanoparticules : les particules en solution suivent un mouvement désordonné et aléatoire provoqué par l'agitation thermique. Une source laser polarisée éclaire alors l'échantillon contenant les nanoparticules en mouvement. La lumière diffusée est ensuite collectée à un angle de diffusion  $\theta$  grâce à un détecteur de photons de haute sensibilité. Les fluctuations d'intensité sont ensuite converties afin de générer une fonction d'autocorrélation permettant de relier la diffusion mesurée au temps. Cette fonction s'écrit sous la forme d'une exponentielle décroissante

$$f(t) = A + \beta e^{-2q^2 D \tau}$$

Avec  $\tau$  l'intervalle de temps,  $D$  le coefficient de diffusion,  $\beta$  une constante liée à la configuration de l'instrument et  $q$  le vecteur d'onde de diffusion donné par l'expression :  $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$  où  $\lambda$  représente la longueur d'onde.

Le traitement des données permet ensuite de « fitter » le corrélogramme et d'extraire les distributions de taille (diamètre hydrodynamique apparent) ainsi que l'indice de polydispersité grâce à la loi de Stokes-Einstein, en supposant des particules sphériques :  $D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$

Avec  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température et  $\eta$  la viscosité du milieu.

Différents algorithmes d'inversion existent afin d'obtenir ces caractéristiques : Cumulants pour des échantillons monomodaux (avec une seule population de taille)<sup>11</sup>, CONTIN pour des échantillons polymodaux (présence de plusieurs populations).

### 1.1.1. La diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS « traditionnelle » est utilisée dans de nombreux laboratoires de recherche depuis plus de 30 ans grâce à un instrument dit de « paillasse » (Figure 10).



**Figure 10** : Appareil de DLS utilisé couramment dans les laboratoires pour la caractérisation des nanoparticules.

Cette technique « pousse-bouton » est simple et facile à mettre en œuvre puisqu'une mesure de distribution de taille ne prend que quelques minutes. Une fois l'échantillon placé dans une cuve, un faisceau laser de lumière visible (généralement 4 mW, 633 nm) irradie la suspension. La détection de la lumière diffusée se fait ensuite habituellement à un angle de  $173^\circ$ <sup>2</sup>. Une des limitations de cette configuration est le fait de devoir fortement diluer son échantillon pour le rendre mesurable. En effet, les phénomènes de diffusion multiple liés à la turbidité peuvent biaiser les résultats obtenus. De plus, l'intensité diffusée par l'échantillon doit être assez élevée (supérieure à celle de l'eau) afin d'avoir des résultats interprétables. Il est important de noter que cette technique permet d'obtenir une distribution en intensité qui donne une forte contribution aux grosses nanoparticules. Il est donc nécessaire d'avoir une analyse critique des résultats obtenus par DLS car ceux-ci sont affectés par de nombreux facteurs (forme de la particule ici supposée sphérique, composition de la surface des nanoparticules, polydispersité de l'échantillon...)<sup>1,12,13</sup>.

### 1.1.2. La diffusion de la lumière sous multiples angles (MALS)

La diffusion statique de la lumière (SLS) est étudiée grâce à la diffusion de la lumière sous multiples angles (MALS) et permet d'obtenir des informations complémentaires sur la suspension. Cette méthode est basée sur la mesure de l'intensité de diffusion en fonction de l'angle de diffusion  $\theta$ . Les mesures sont effectuées avec un spectromètre LS avec des angles pouvant aller de 20° à 150° et un laser plus puissant que celui utilisé pour la DLS « traditionnelle » (500 mW, 660 nm). Cette technique permet de déterminer le rayon de giration qui est la racine carré du rayon moyen et d'avoir une indication sur la forme des auto-assemblages<sup>4</sup>. En effet, le ratio du rayon de giration ( $R_g$ ) et du rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) permet d'obtenir le facteur de forme :

$$\rho = \frac{R_g}{R_h}.$$

De plus, il est également possible d'estimer la valeur de l'indice de polydispersité grâce à la formule suivante :  $PDI = (SD/D_h)^2$ , avec SD l'écart type et  $D_h$  le diamètre hydrodynamique.

Cependant cette méthode d'analyse possède les mêmes limitations que la DLS : les échantillons doivent être relativement monodisperses pour obtenir des résultats exploitables et l'intensité diffusée par l'échantillon doit être supérieure à celle de l'eau.

### 1.1.3. Analyse du suivi individuel de particules (NTA)

L'analyse du suivi individuel de particules (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) est également basée sur les propriétés de la lumière diffusée et du mouvement Brownien pour calculer la distribution en taille et la concentration particulaire. L'appareil mesure la diffusion en suivant le mouvement aléatoire de chacune des nanoparticules prises individuellement, grâce à un microscope à grossissement 20x, équipé d'une caméra<sup>14</sup>. Cette méthode permet de détecter des particules dont la taille est comprise entre 20 nm et 2000 nm. De plus il est important de noter que, contrairement à la DLS et la MALS, cette méthode permet d'obtenir une distribution en nombre et non en intensité. Le NTA possède deux avantages majeurs : il est adapté aux échantillons polymodaux et il est possible d'obtenir la concentration particulaire (contrairement à la DLS et à la MALS). Cependant cette technique demande une dilution importante de l'échantillon pour pouvoir avoir une concentration allant de  $10^8$  à  $10^9$  particules/mL. Cette dilution peut entraîner une modification des auto-assemblages formés et il est donc nécessaire de s'assurer de la stabilité de la suspension après dilution. De plus, il est important que les nanoparticules diffusent suffisamment la lumière pour pouvoir être détectés sous le faisceau laser et que la densité de ces nanoparticules ne soit pas trop élevée.

## 1.2. Microscopie électronique

Les nanoparticules en suspension sont difficiles à analyser par les méthodes de microscopie électronique traditionnelles (TEM, SEM) car la préparation de l'échantillon doit être prise en compte. En effet, l'échantillon est souvent analysé sous forme sèche, ce qui peut entraîner une modification importante de la structure et donc impacter la fiabilité des observations. Parmi les techniques existantes, la cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-TEM) a été mise au point dans les années 1980 pour permettre de visualiser des

suspensions particulières (échantillons biologiques) dans leur état natif avec la résolution du microscope électronique à transmission (0,1-2 nm)<sup>7,15-18</sup>. Pour la préparation de l'échantillon, une goutte de suspension concentrée est déposée sur une grille à trous (400 mesh) recouverte d'un film de collodion et de carbone. L'excès d'échantillon est ensuite absorbé avec un papier filtre puis la grille est plongée très rapidement dans l'éthane liquide à l'aide d'un procédé de congélation à haute pression. La grille est ensuite transférée dans le porte-objet avant d'être introduite dans le Cryo-microscope, un Tecnai G2 Sphera - FEI haut contraste fonctionnant à 200 kV, sous azote liquide. Grâce à ce procédé, l'eau est sous forme vitreuse, donc transparente au faisceau d'électrons, afin de n'observer que les auto-assemblages formés. Cependant, ce procédé présente plusieurs limitations : coût élevé de l'analyse, accessibilité des appareils et faible nombre de particules analysées.

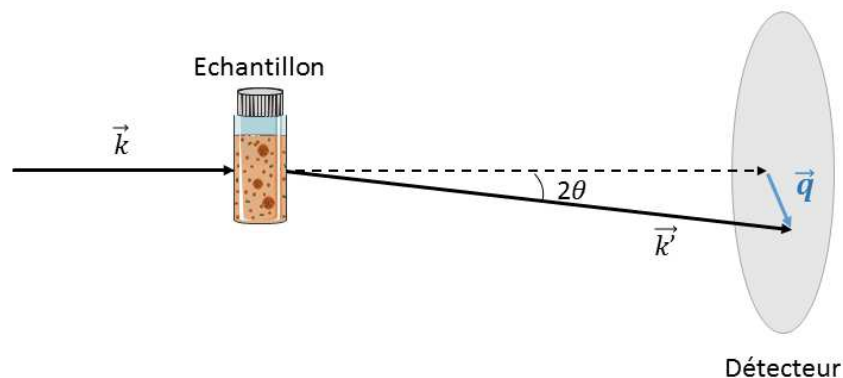
### 1.3. Diffusion des rayons X aux petits angles

#### 1.3.1. Interaction des rayons X avec la matière

Les rayons X, découverts en 1895 par le physicien allemand Wilhelm Röntgen, sont couramment utilisés pour étudier les propriétés structurales de solides, liquides ou de gels. Les rayons X sont une forme de rayonnement électromagnétique à haute fréquence dont la longueur d'onde est comprise entre 0,1 Å et 100 Å. Les rayons X sont diffusés par les électrons de la matière et fournissent des informations sur la fluctuation des densités électroniques de cette matière. Tout atome rencontrant une onde X voit ses électrons entrer en vibration à la même fréquence que l'onde, c'est-à-dire sans changement d'énergie. Une partie de cette onde diffuse alors dans toutes les directions et il y a réémission d'une onde électromagnétique de même longueur d'onde. On parle aussi de diffusion cohérente (diffusion de Rayleigh ou de Thomson).

Soit un faisceau incident monochromatique de vecteur d'onde  $\vec{k}$ , qui traverse l'échantillon. Chaque atome devient alors une source secondaire de rayons X et l'intensité diffusée par l'onde sphérique produite est collectée en fonction de l'angle de diffusion  $2\theta$  (Figure 11). Le paramètre utilisé pour analyser l'interaction est le vecteur de transfert ou vecteur de diffusion  $\vec{q}$  défini par la formule suivante :

$q = |\vec{k}' - \vec{k}| = 4\pi \frac{\sin \theta}{\lambda}$  avec  $\vec{q}$  le vecteur de diffusion,  $\vec{k}$  le vecteur d'onde incident,  $\vec{k}'$  le vecteur d'onde diffusé,  $\lambda$  la longueur d'onde du faisceau incident.

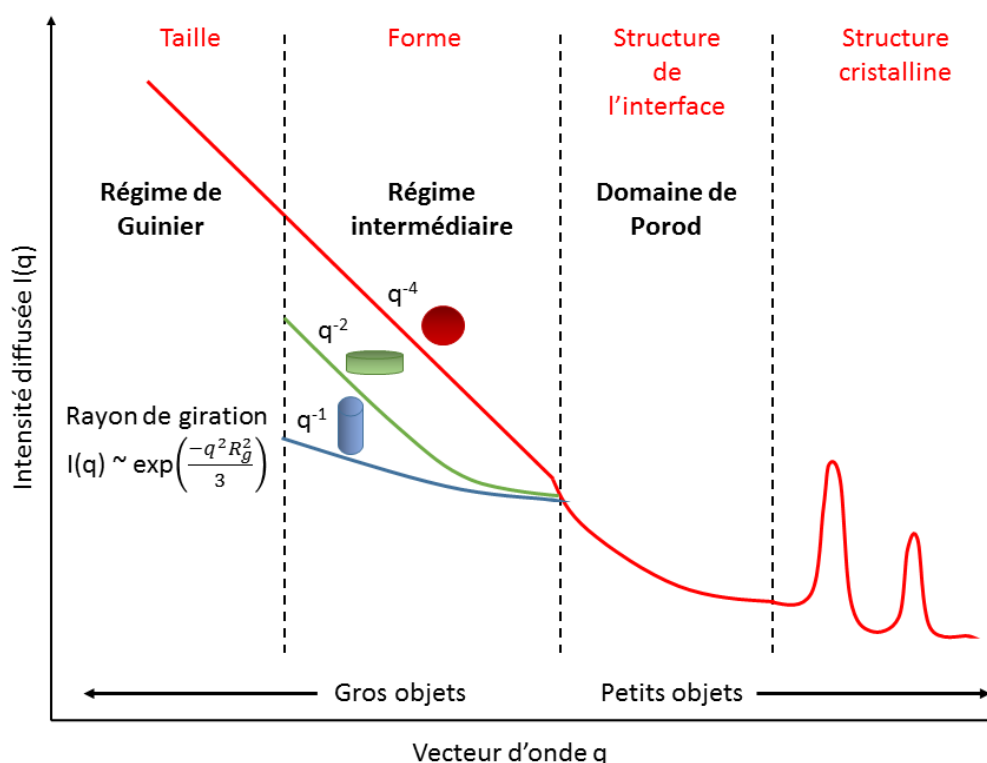


**Figure 11** : Représentation schématique d'une expérience de diffusion avec  $\vec{q}$  le vecteur de diffusion,  $\vec{k}$  le vecteur d'onde incident et  $\vec{k}'$  le vecteur d'onde diffusé.

### 1.3.2. Que mesure-t-on grâce à la diffusion des rayons X aux petits angles ?

La diffusion aux petits angles permet de décrire les inhomogénéités de la densité électronique dont les tailles sont comprises entre environ 10 Å et 1000 Å : les dimensions des objets étudiés doivent être plus grandes que la longueur d'onde des rayons X. La figure 12 montre un exemple de profil obtenu grâce au SAXS : l'intensité diffusée  $I(q)$  est représentée en fonction du module du vecteur d'onde, dans le domaine  $q_{\min}$ - $q_{\max}$  (définie par les paramètres expérimentaux). Trois domaines peuvent alors être définis,  $R$  étant le rayon de la particule<sup>19</sup> :

- Le régime de Guinier à des valeurs de  $q$  très faibles ( $qR < 1$ ).
- Le régime intermédiaire ( $R^{-1} < q$ ) ; le facteur de forme  $P(q)$  peut être mesuré ; ce domaine renseigne sur la taille, la forme et la structure interne des objets formés.
- Le domaine de Porod à des valeurs de  $q$  très élevées. Le facteur de structure  $S(q)$  permet d'avoir des informations sur la structure à l'interface et les interactions entre les particules.



**Figure 12** : Schéma d'un profil obtenu en SAXS. L'intensité diffusée est représentée en fonction du vecteur d'onde  $q$  lié à l'angle de diffusion  $2\theta$  par la relation  $q = 4\pi \frac{\sin \theta}{\lambda}$ , où  $\lambda$  est la longueur d'onde des rayons X.

### 1.3.3. Facteur de forme

Le facteur de forme  $P(q)$  peut être déterminé en solution diluée, lorsqu'il n'y a pas d'interaction entre les particules (particules admises comme identiques). En effet, en régime dilué, les particules peuvent être considérées comme des diffuseurs indépendants et l'intensité  $I(q)$  est alors proportionnelle au contraste, à la fraction volumique et au volume d'une particule ainsi qu'au facteur de forme d'une particule. Les facteurs de formes peuvent être calculés pour des formes géométriques élémentaires (sphères, cylindres, lamelles...).

#### 1.3.4. Régime de Guinier

Dans le domaine de Guinier, l'expression du facteur de forme  $P(q)$  peut être simplifiée :  $P(q) \approx e^{-q^2 R_g^2/3}$  avec  $R_g$  le rayon de giration. Ce rayon correspond au rayon de la sphère qui aurait le même moment d'inertie que l'objet étudié. Par exemple, pour une sphère pleine de rayon  $R$ , les diffuseurs élémentaires ne sont pas situés uniquement à la périphérie mais également à des distances plus faibles du centre. On obtient alors la formule suivante :  $R_g^2 = \frac{3}{5}R^2$ .

#### 1.3.5. Facteur de structure et interactions entre les particules

La détermination du facteur de structure  $S(q)$  permet d'évaluer différentes propriétés : type d'interactions entre les particules (attractives, répulsives, électrostatiques) mais également effet de la température, de sels ou de la pression sur l'auto-assemblage formé. Dans le cas d'une suspension de particules identiques centrosymétriques, l'intensité diffusée est alors proportionnelle au produit du facteur de forme  $P(q)$  et du facteur de structure  $S(q)$  :  $I(q) = P(q).S(q)$ .

Lorsqu'il n'y a pas d'interaction entre les particules, comme par exemple dans le cas d'une suspension de particules suffisamment diluée, le facteur de structure est égal à 1. En présence d'interactions,  $S(q)$  tend vers 1 aux grands angles.

Il est ainsi possible d'obtenir différentes caractéristiques : la taille des nanoparticules, la distribution en taille, la morphologie ou encore la concentration (l'intensité diffusée est proportionnelle à la quantité de nanoparticules présentes). Cette méthode permet d'analyser des échantillons solides ou en suspension. De plus, la mesure est généralement non destructive et peut souvent être utilisée *in situ*<sup>9,10,20</sup>. Contrairement à la microscopie, cette méthode permet d'analyser plusieurs milliards de particules.



# Importance of combining advanced particle size analysis techniques to characterize cell penetrating peptide-ferrocifen self-assemblies

Léna Guyon<sup>a</sup>, Elise Lepeltier<sup>\*a</sup>, Jean-Christophe Gimel<sup>a</sup>, Brice Calvignac<sup>a</sup>, Florence Franconi<sup>ab</sup>, Nolwenn Lautram<sup>a</sup>, Aurélien Dupont<sup>c</sup>, Claudie Bourgaux<sup>d</sup>, Pascal Pigeon<sup>e</sup>, Patrick Saulnier<sup>a</sup>, Gérard Jaouen<sup>e</sup>, Catherine Passirani<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Micro et Nanomédecines Translationnelles, MINT, UNIV Angers, UMR INSERM 1066, UMR CNRS 6021, Angers, France

<sup>b</sup>PRISM Plate-forme de recherche en imagerie et spectroscopie multi-modales, PRISM-Icat, Angers et PRISM-Biosit CNRS UMS 3480, INSERM UMS 018, Rennes, UBL Université Bretagne, Loire, France.

<sup>c</sup>Univ Rennes, CNRS, Inserm, BIOSIT - UMS 3480, US\_S 018, F-35000 Rennes, France

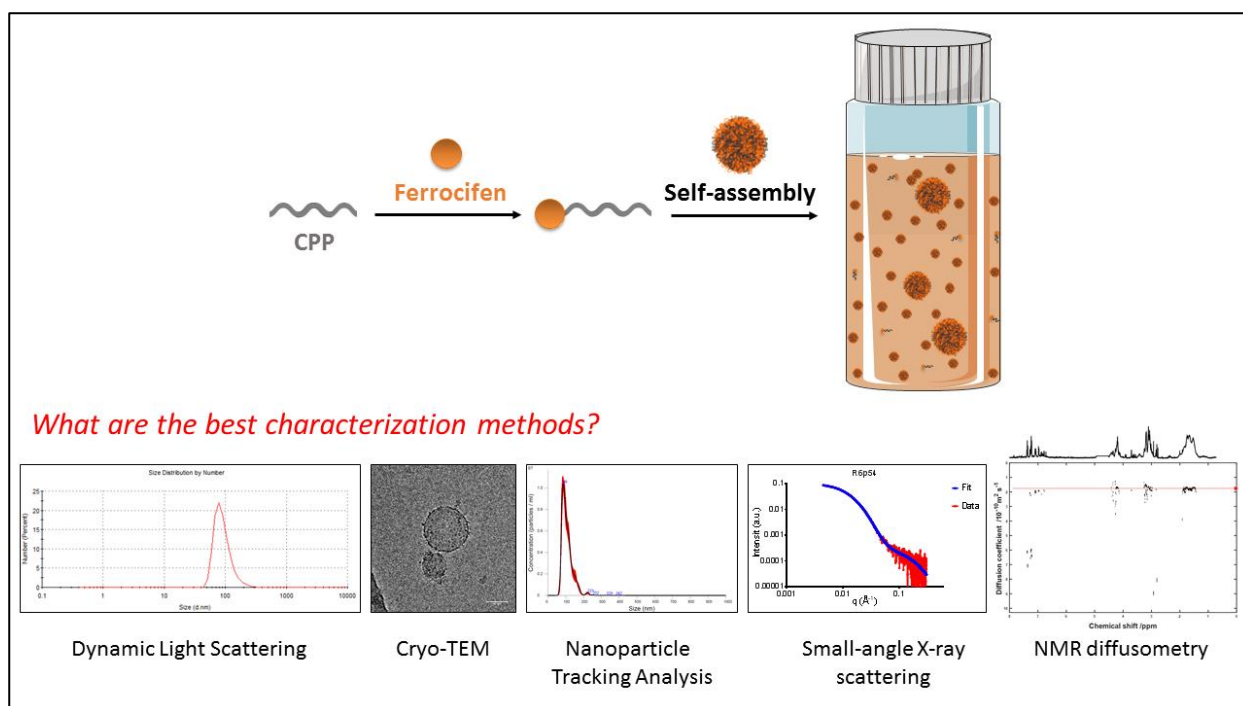
<sup>d</sup>Institut Galien Paris-Sud, UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud XI, Châtenay-Malabry, France

<sup>e</sup>Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, UMR 8232, IPCM and PSL Chimie Paris Tech, Paris, France

\*E-mail: [elise.lepeltier@univ-angers.fr](mailto:elise.lepeltier@univ-angers.fr)

## Abstract

The design of simple platform able to target the delivery of notably hydrophobic drugs into cancer cells is an ultimate goal. Here, three strategies were combined in a same nanovector, in limiting the use of excipients: a combination of cell-penetrating peptides (CPPs), amphiphilic prodrug and self-assembly. Light scattering and cryogenic transmission electron microscopy revealed one size population of object around 100 nm with a narrow size distribution. However, in-depth analysis of the suspension by nanoparticle tracking analysis (NTA), small angle X-ray scattering (SAXS) and NMR diffusometry demonstrated the presence of another population of small objects (< 2 nm). It has been shown that these small self-assemblies represented more than 99% of the matter! According to these results, a minor population of the suspension was revealed by light scattering. This study highlights the importance and the complementary contribution of each characterization methods in order to reflect the reality of the studied nanoassembly.



**KEYWORDS** Cell-penetrating peptide, ferrocifen, self-assemblies, light scattering, small angle X-ray scattering, NMR diffusometry

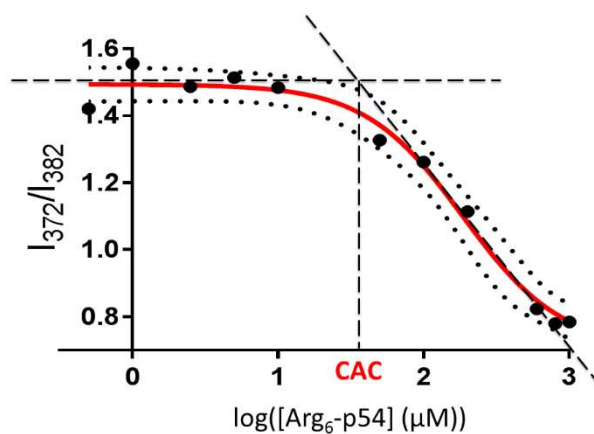
## Introduction

The use of nanocarrier-based drug delivery system presents several considerable advantages such as the specific targeting of a drug, its protection and its controlled release in order to improve the antitumor effect<sup>21</sup>. Moreover, this strategy would allow for an increase in drug loading with the controlled release in order to limit the burst phenomena<sup>22</sup>. The use of natural building blocks such as peptides has caught major attention for the fabrication of new materials<sup>23–26</sup>. In fact, peptides have attractive properties due to their simple structure, biocompatibility by nature and chemical diversity. Depending upon the amino acid sequence, the peptide can have various physicochemical properties such as the ability to interact with cell membranes<sup>27</sup>. These peptides, called cell-penetrating peptides (CPPs), were first discovered in 1988 from the HIV and gained much attention because of their ability to facilitate cellular uptake of a conjugated cargo<sup>28,29</sup>. These CPPs can be used to transport various hydrophobic anticancer drugs such as promising organometallic molecules: ferrocifen which combine hydroxytamoxifen and ferrocene together<sup>30,31</sup>. They present major properties as stability in non-oxidative environment, reversible oxidation-reduction (redox) potential, and impressive antiproliferative effects on various cancer cells<sup>32–34</sup>. The action mechanism of ferrocifens can be related to the oxidation state of iron in the ferrocene moiety. The oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$  by  $\text{O}_2$  leads to the generation of reactive radicals that could damage DNA strand. On the other side, the formation of reactive oxygen species causes the generation of selective electrophilic metabolites called quinone methides, that are responsible for biological alteration in cancer cell<sup>35–37</sup>.

In the present study, CPP-ferrocifen self-assemblies were designed and prepared for the efficient and targeted delivery of the drug into human lung cancer cells. For that purpose, a hydrophilic CPP was covalently linked with a hydrophobic ferrocifen (p54, chemical structure and synthesis scheme by saponification of its published ester<sup>38,39</sup> were described in Figure S1 and section S1) in order to form an amphiphilic conjugate that could self-assemble into nanocarriers. RLW (RLWMRWYSPRTRAYG) was used as a specific CPP target human lung cancer cells (A549)<sup>40-42</sup>. Polyarginines containing between 6 and 9 arginine units (Arg<sub>n</sub>, n=6-9), were used for comparison as CPP models<sup>43</sup>. In fact, these polycationic peptides have demonstrated to enter cells more effectively than other homopolymers, due to the guanidinium moiety<sup>44</sup>. The capacity of these conjugates to self-assemble was then evaluated by using a solvent displacement technique. The supramolecular organization of the nanostructures formed was fully characterized in order to correlate their physico-chemical properties with their biological effects and to predict their efficacy<sup>45,46</sup>. First by classical methods commonly used: dynamic light scattering (DLS) and cryogenic transmission electron microscopy (Cryo-TEM). Then by complementary and more complex technics: multiangle light scattering (MALS), nanoparticle tracking analysis (NTA), small angle X-ray scattering (SAXS) and nuclear magnetic resonance (NMR) diffusometry. The comparison of these methods was then achieved reflecting the importance of each experiment and underlying an important point: dynamic light scattering cannot be the only method used in order to reflect the size of self-assemblies. In fact, as it was mentioned in a previous study: several complementary methods should be used to provide reliable information needed for pre-clinical studies<sup>47</sup>.

## Results and discussion

Conjugates were successfully synthesized using standard solid phase peptide synthesis protocol (SPPS) with a Fmoc strategy on rink amide resin<sup>48</sup>. An automated microwave peptide synthesizer was used to reduce synthesis time and increase the crude peptide purity<sup>49</sup>. The identification of the products was achieved by mass spectrometry (LC-MS/MS) and NMR experiments (sections S1, S2, Figure S2 and Table S1 in Supporting Information). CPP-p54 were obtained with a yield of around 22 % and a purity ranging from 88 % to 98 % (Table S1 in Supporting Information). The properties of CPP-p54 to self-assemble was investigated by the pyrene fluorescence 1:3 ratio method (Supporting Information, Table S1)<sup>50</sup>. To ensure the assembly, the critical aggregation concentration (CAC) of each conjugate was determined. To this end, the ratio of vibronic band intensities ( $I_{372}/I_{382}$ ) was plotted and fitted by a Boltzmann-type sigmoid (for more detailed information, see section S3 and Figure S3 in Supporting Information)<sup>48-50</sup>. The CAC of each system was determined as the first sharp decrease point (Figure 1)<sup>6</sup>. The conjugate concentrations corresponding to the CAC values are listed in Table 1.



**Figure 1.** Boltzmann-type sigmoid obtained for Arg<sub>6</sub>-p54 suspension in water showing the CAC value, corresponding to the first sharp decrease point.

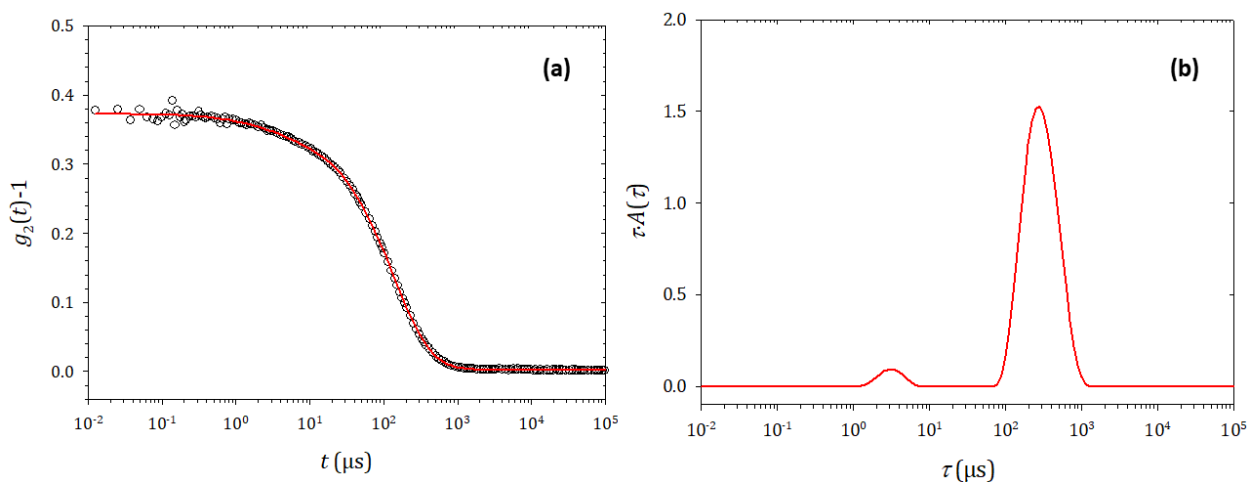
**Table 1.** CAC measurements of the different conjugates used and ferrocifen alone. The concentration was determined using pyrene as fluorescent dye.

Compound	CAC (μg/mL)	CAC (μM)
Arg <sub>6</sub> -p54	52	37
Arg <sub>7</sub> -p54	75	48
Arg <sub>8</sub> -p54	170	99
Arg <sub>9</sub> -p54	210	113
RLW-p54	771	314
p54	325	694

The fluorescence method showed not solely the influence of the concentration on the self-assembly but also the impact of each part (peptide and ferrocifen) on the nanostructure formation. According to results obtained in Table 1, the peptide length has an impact on the CAC value: an increase of the CAC was observed when the peptide length increased. Moreover, this experiment was also performed with peptide alone and ferrocifen as controls. For peptide alone, the fluorescence intensity was constant, whatever the concentration used, indicating by this technique that no assembly structures were observed (Figure S4 in Supporting Information). Interestingly, data obtained for ferrocifen alone are well fitted by a Boltzmann-type sigmoid showing the onset of self-assembly at 325 μg/mL. However, a precipitate was clearly observed and the fluorescence measurement was obviously only performed on the part in suspension. This very low stability with ferrocifen alone showed the important role of the peptide moiety. In fact, conjugates suspensions have shown to be stable at least one month at 4 °C (Figure S5 in the Supporting Information). According to this, peptides would bring stability to self-assemblies thanks to potential hydrogen bonds between amino acid sequences<sup>51,52</sup>. Additionally, the ferrocifen would drive the self-assembly mechanism, via notably a π-π stacking from ferrocene moiety<sup>16,53,54</sup>.

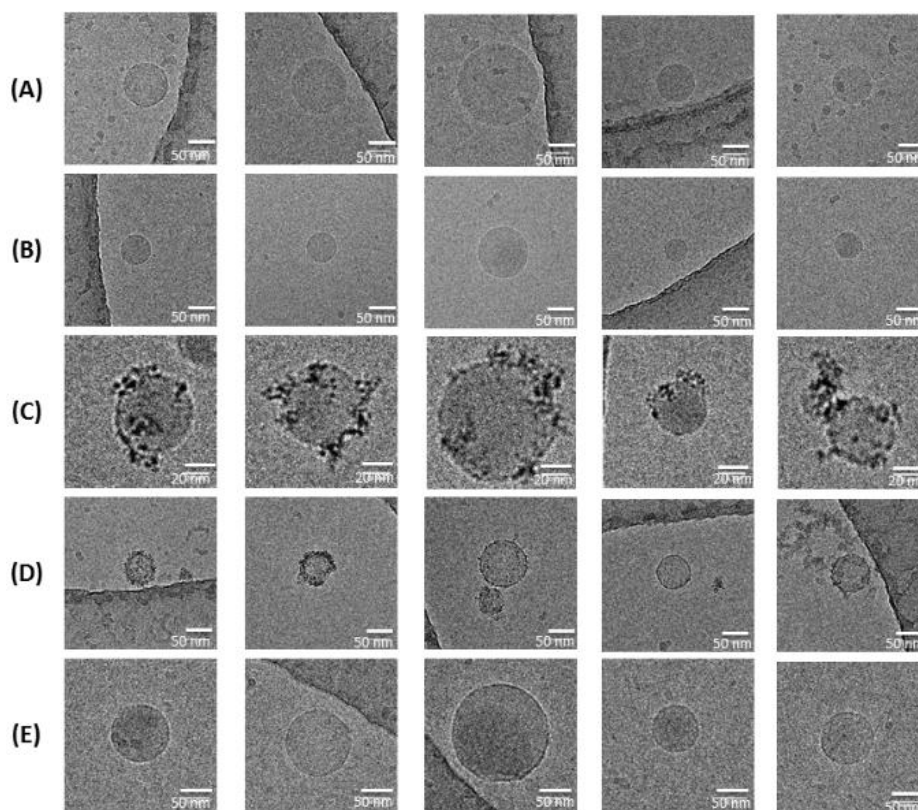
Self-assemblies were formulated by nanoprecipitation method. In this microfluidic formulation process, conjugates are used alone, without adding any other excipients in order to have a theoretical drug loading of around 30 % in mol. This strategy allows to reach a high drug loading compared to conventional nanocarriers such as liposomes<sup>55</sup>. The purified conjugates were solubilized in acetone (3 mg/mL) and this organic solution was added to water via a microfluidic mixer. The organic solvent was then removed using a rotary evaporator and the final concentrations obtained were of 1 mg/mL for all the different suspensions, above the CAC values (see Table 1 and Section S4 in Supporting Information).

First step of the self-assembly characterization was performed on a classical and daily used DLS Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments S.A., UK) with a 4 mW, 633 nm laser and a scattering angle at 173°. The hydrodynamic diameter and the particle size polydispersity index (PDI) of each suspension were determined using the cumulant analysis<sup>56</sup>. Interestingly, CPP-p54 suspensions showed nanostructures in size ranging from 111 to 128 nm depending on the conjugate used in the formulation process (Table 2). Moreover, PDI obtained were smaller than 0.25, indicating a limited polydispersity. The high zeta potential (+ 30 mV) of self-assemblies was related to positively charged guanidino groups, creating repulsion between particles and improvement of the suspension stability. Moreover, this high zeta potential could increase cellular internalization by facilitating a charge-based interaction with negatively charged cell membrane surface<sup>57</sup>. Due to the fact that the signal intensity obtained by DLS was very low for each measurement (not enough scattered photons), MALS was also used to gain complementary information. This method is based on the measurement of the scattering intensity as a function of the scattering angles. Measurements were performed on a LS Spectrometer with a 500 mW, 660 nm laser using 20 angles ranging from 20° to 150° (LS Instruments AG, Switzerland). Results were analyzed using the Guinier relationship<sup>58</sup> (Table 2). The evolution of the average relaxation rate ( $\Gamma$ ) as a function of the square scattering vector ( $q^2$ ) has been provided in Supporting Information (Figure S6) for Arg<sub>6</sub>-p54 after a 200 nm filtration. A linear dependence is clearly evidenced demonstrating the Brownian behavior of the scattering. Moreover, MALS was also performed after filtration on 0.02  $\mu\text{m}$  pore size membrane but the scattered intensity of our self-assemblies was too close to the one of the solvent to measure a correlogram. The intercept of  $g_2(t)$  falls to 0.4 after a 0.1  $\mu\text{m}$  filtration and an inverse Laplace transform (ILT) was performed on correlograms at 150° (Figure 2 and Supplementary Section S5). Inverse Laplace Transform (ILT) on DLS signals were performed using a constrained regularization calculation algorithm called REPES<sup>59</sup>. ILT is mathematically ill-conditioned and very sensitive to noise in the data especially in the case of multimodal relaxation processes<sup>60</sup>. A 3 % fast contribution in intensity arises but it is not enough to give a reliable size measurement (around 1 nm). We have tried to concentrate the 0.02  $\mu\text{m}$  filtered solution (initially 1 mg/mL) to have more scattering, but spurious aggregates are reformed preventing any good DLS measurements.



**Figure 2.** MALS analysis of Arg<sub>6</sub>-p54 suspension after filtration through 0.1 μm. **(a)** Autocorrelation function of the scattering intensity at  $\theta = 150^\circ$  for a filtered Arg<sub>6</sub>-p54 solution in water 20 °C. The red line corresponds to the fit of the experimental points using the REPES ILT algorithm and **(b)** corresponding relaxation time distribution obtained from an ILT of the autocorrelation function displayed in figure 2 a, using the REPES algorithm. The contribution of the fast mode is around 4 % and the hydrodynamic diameter is of the order of 1 nm while the slow mode (96 %) gives an average hydrodynamic diameter close to 65 nm.

Cryo-TEM analysis were performed to observe the objects in their native form (for more detailed information, see section S6 in the Supporting Information). Consistent with the results obtained by light scattering, Cryo-TEM images of the self-assemblies showed the predominance of particles with a size of  $79 \pm 30$  nm and a slight polydispersity. Furthermore, spherical morphology of self-assemblies was observed with some dense electron objects at the surface of nanostructures for Arg<sub>8</sub>-p54 and Arg<sub>9</sub>-p54 (Figure 3). These objects could be polyarginine fibrils or aggregates. In fact, it was demonstrated that Arg<sub>9</sub> was partly unstructured in pure water but could be present in a random coil structure<sup>61</sup>. Short polyarginines could remain unstructured when they have less than 8 arginine units. Interestingly, spherical morphology for all CPP-p54 self-assemblies were obtained (Arg<sub>n</sub>-p54 and RLW-p54) despite the difference in primary structure and in peptide length. Moreover, no significant modification of size was observed between each conjugate. However, in carefully looking Figure 3 A, really small spherical objects were observed: these small particles could be artefacts or micelles.



**Figure 3.** Cryo-TEM images of self-assemblies formed with different conjugates: Arg<sub>6</sub>-p54 **(A)**, Arg<sub>7</sub>-p54 **(B)**, Arg<sub>8</sub>-p54 **(C)**, Arg<sub>9</sub>-p54 **(D)** and RLW-p54 **(E)** at a concentration of 10 mg/mL (post-formulation concentration).

NTA measurements were also performed (see section S7 and Figure S7 in the Supporting Information). This method allows to determine not solely the number size distribution but also the concentration of nanoparticle population<sup>62</sup>. However, it is important to note that this technique does not detect all particles. In fact, particles that are not scattering in the laser beam, either because they are too small or because their refractive index is very close to water, are not detected. Thanks to these measurements, and assuming spherical homogeneous objects with a density close to 1 g/mL, the nanoparticle volume and mass concentrations were evaluated in order to estimate the amount of matter involved in the nanoparticles observed (Table 2).

**Table 2.** Features of CPP-p54 self-assemblies after filtration through 0.20  $\mu\text{m}$  obtained by DLS, MALS and NTA.  $D_h$  is the hydrodynamic diameter,  $D_g$  is the diameter of gyration and PDI the particle size polydispersity index. Volume of particle and percentage of matter forming self-assemblies are calculated from the features obtained by NTA, assuming that homogeneous spheres with an electron density of 1 were obtained. PDI obtained by NTA were calculated according to the following equation:  $(\text{SD}/\text{mean})^2$ . Measurements are expressed as the average  $\pm$  SD.

Conjugate	DLS			MALS			NTA			
	$D_h$ (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	$D_h$ (nm)	$D_g$ (nm)	PDI	$D_h$ (nm)	PDI	Concentration (particles/mL)	Percentage of matter forming visible self- assemblies (%)
Arg <sub>6</sub> -p54	128 $\pm$ 26	0.16 $\pm$ 0.03	23 $\pm$ 2	75.9 $\pm$ 0.6	62.2 $\pm$ 0.6	0.08 $\pm$ 0.02	59.2 $\pm$ 1.6	0.05 $\pm$ 0.01	5 x 10 <sup>10</sup> $\pm$ 7 x 10 <sup>9</sup>	0.6 $\pm$ 0.1
Arg <sub>7</sub> -p54	114 $\pm$ 15	0.19 $\pm$ 0.02	19 $\pm$ 6	79.1 $\pm$ 0.6	66.0 $\pm$ 0.5	0.11 $\pm$ 0.1	91.0 $\pm$ 7	0.10 $\pm$ 0.01	9 x 10 <sup>9</sup> $\pm$ 8 x 10 <sup>8</sup>	0.5 $\pm$ 0.1
Arg <sub>8</sub> -p54	117 $\pm$ 24	0.18 $\pm$ 0.02	35 $\pm$ 2	59.4 $\pm$ 0.4	51.2 $\pm$ 0.6	0.14 $\pm$ 0.1	78.0 $\pm$ 1	0.06 $\pm$ 0.01	3 x 10 <sup>10</sup> $\pm$ 2 x 10 <sup>9</sup>	1.0 $\pm$ 0.1
Arg <sub>9</sub> -p54	111 $\pm$ 17	0.15 $\pm$ 0.04	32 $\pm$ 3	78.7 $\pm$ 0.7	57.6 $\pm$ 0.6	0.14 $\pm$ 0.2	71.0 $\pm$ 1	0.03 $\pm$ 0.00	6 x 10 <sup>9</sup> $\pm$ 8 x 10 <sup>8</sup>	0.1 $\pm$ 0.1
RLW-p54	122 $\pm$ 6	0.19 $\pm$ 0.04	41 $\pm$ 1	63.9 $\pm$ 0.7	58.8 $\pm$ 0.4	0.21 $\pm$ 0.2	77.0 $\pm$ 2	0.06 $\pm$ 0.01	6 x 10 <sup>9</sup> $\pm$ 1 x 10 <sup>9</sup>	0.2 $\pm$ 0.1

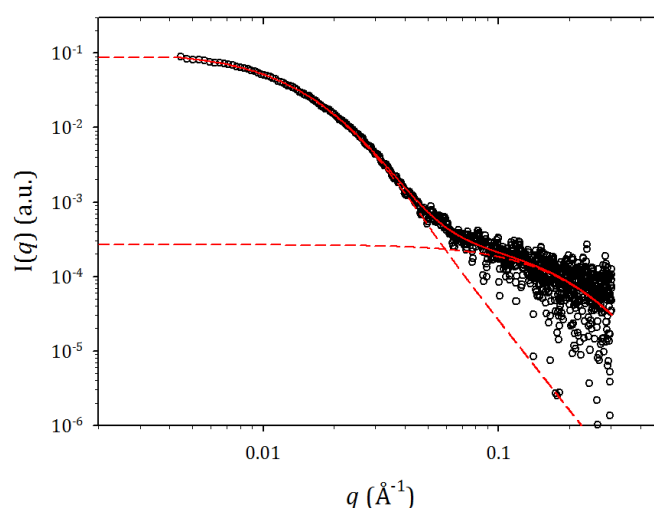
According to these measurements, the nanoparticle population observed represents only less than 3 % of the initial matter in solution. To understand this loss of material, a basic but powerful quantification by successive filtrations was performed through 0.2  $\mu\text{m}$ , 0.1  $\mu\text{m}$  and 0.02  $\mu\text{m}$  filter pore sizes (Whatman™ Anotop™ syringe filter). Suspension was analyzed more deeply for Arg<sub>6</sub>-p54 using light scattering (NTA, DLS and MALS) after each filtration and freeze-dried. However, after a filtration on 0.02  $\mu\text{m}$ , the scattered intensity became very weak and it was impossible to measure a correlation function in DLS. After a filtration on 0.1  $\mu\text{m}$ , the size (53  $\pm$  1 nm) decreases, the PDI values (0.40  $\pm$  0.01) increases and the intercept of the correlation function drops to 0.37. Size and PDI values were obtained using a cumulant analysis (which calculate averages in the frequency domain) and the small fast contribution obtained by ILT can explain the increase of the polydispersity. This weak fast contribution makes the determination of the corresponding size unreliable. It corresponds to particles around 1 nm diameter. This step proved again the DLS limitations with a low scattering material. Results obtained were unmistakable: around 100 % of conjugate was still present in the suspension after filtration through 0.02  $\mu\text{m}$  (same amount of conjugate compared to initial suspension without filtration). These results were in agreement with NTA measurements: visible self-assemblies represent an insignificant fraction of the conjugate mass (Table 3).



**Table 3.** Features of Arg<sub>6</sub>-p54 self-assemblies obtained without filtration, after filtration through 0.20 μm, 0.10 μm and 0.02 μm. Characteristics were obtained by NTA, MALS and after freeze-drying.  $D_h$  is the hydrodynamic diameter and PDI the particle size polydispersity index. The percentage of matter forming visible self-assemblies are calculated assuming that homogeneous spheres with an electron density of 1 were obtained. Measurements are expressed as the average ± SD. ND: Not Determined.

Arg <sub>6</sub> -p54	MALS		NTA			Freeze-drying
	$D_h$ (nm)	PDI	$D_h$ (nm)	Concentration (particles/mL)	Percentage of matter forming visible self-assemblies (%)	Concentration (mg/mL)
Without filtration	ND	ND	98 ± 3	$6 \times 10^9 \pm 3 \times 10^8$	0.4	0.65 ± 0.16
0.2 μm	83 ± 1	0.08 ± 0.01	84 ± 1	$5 \times 10^9 \pm 8 \times 10^8$	0.2	0.64 ± 0.15
0.1 μm	53 ± 1	0.40 ± 0.01	56 ± 1	$2 \times 10^9 \pm 1 \times 10^8$	0.02	0.63 ± 0.15
0.02 μm	ND	ND	ND	ND	ND	0.67 ± 0.16

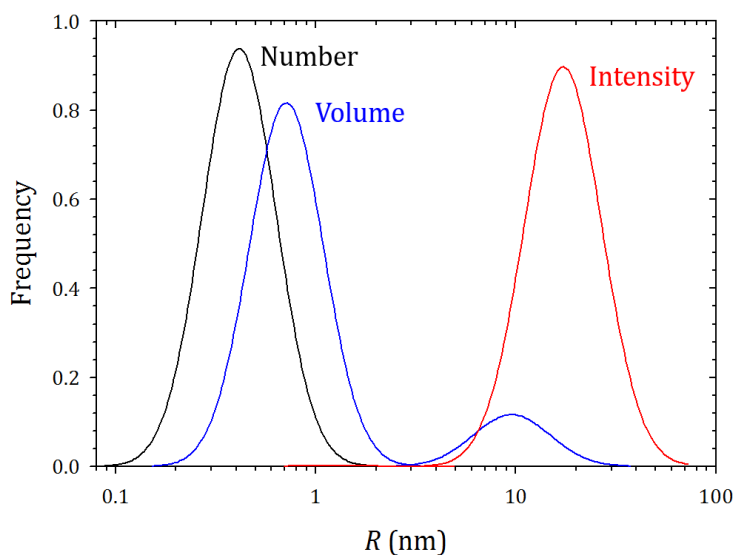
In addition to these analysis, SAXS experiments were conducted on the SWING beamline at the SOLEIL synchrotron (Saint Aubin, France). Data were collected as a function of the scattering vector (see section S8 and Figure S8 in Supporting Information). Water scattering was subtracted from sample patterns. Curves were fitted with log-normal distributions of homogeneous spheres all with the same electron density. A bimodal size distribution had to be used for Arg<sub>6</sub>-p54, Arg<sub>7</sub>-p54, Arg<sub>8</sub>-p54, Arg<sub>9</sub>-p54 to take into account the scattering intensity at high  $q$ . From figure 4, we clearly see that small objects contribute to the scattered intensity only for  $q$  above  $0.005 \text{ \AA}^{-1}$ . At low  $q$ , the scattered intensity is dominated by aggregates.



**Figure 4.** Small-angle X-ray scattering pattern recorded at room temperature and fitted curve obtained for Arg<sub>6</sub>-p54. Open circles are experimental data and the full red line represents the fit to the data using two log-normal distributions of spheres. Red dotted lines represent individual contributions of both distributions.

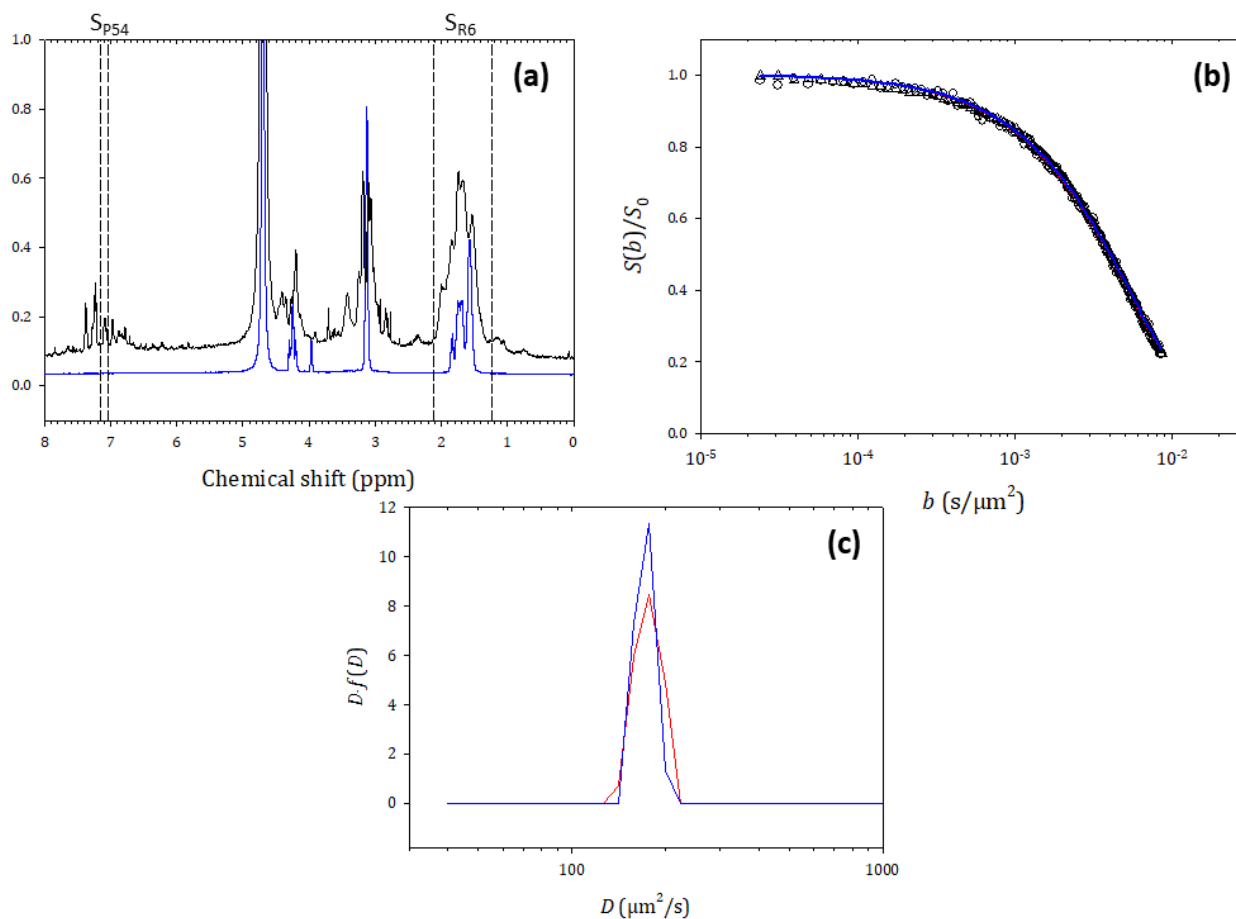
Figure 5 gives an example of distribution curves obtained for Arg<sub>6</sub>-p54. The intensity distribution gives a strong contribution to big self-assemblies, compared to the number distribution that gives a strong

contribution to small objects (see Table S2 in Supporting Information). According to these measurements, two populations of spherical objects were observed for Arg<sub>n</sub>-p54: one population with a radius lower than 2 nm and another population with a radius around 20-25 nm. According to a simple linear model of the Arg<sub>9</sub>-p54 molecule, its length was estimated to be of 3 nm, fitting to a potential micelle structure. These results are in agreement with NTA analysis and the quantification after filtration: the conjugate self-assembled mainly into nanoobjects smaller than 5 nm (mass fraction higher than 0.99).



**Figure 5.** Distribution curves obtained for Arg<sub>6</sub>-p54 by SAXS measurements: number distribution (black curve), volume distribution (blue curve) and intensity distribution (red curve). The area below curves has been normalized to unity.

Finally, Arg<sub>6</sub>-p54 self-assembly suspension was investigated using NMR diffusometry<sup>63</sup> (see section S9 in Supplementary Information): smaller self-assemblies should diffuse faster compared to larger nanostructures and should give the major contribution in term of protons. Inverse Laplace Transform (ILT) on DOSY signals were performed using a constrained regularization calculation algorithm called REPES<sup>59</sup>. DOSY results in D<sub>2</sub>O (Figure 6) reveal particles with a hydrodynamic diameter close to 2.3 nm while in deuterated acetone (where both Arg<sub>6</sub> and p54 are soluble) they have only 1.6 nm hydrodynamic diameter (see Figure S9 in Supporting Information). Therefore, the self-assembled structures (demonstrated by the pyrene fluorescence measurements) should have a low aggregation number.



**Figure 6.** Results obtained by NMR diffusometry in  $D_2O$ : (a)  $^1H$  NMR spectra in  $D_2O$  of Arg<sub>6</sub> (blue curve) and Arg<sub>6</sub>-p54 (black curve). Dashed lines display integration domains used to characterize proton signals from p54 ( $S_{P54}$ : 7.155 - 7.033 ppm) and Arg<sub>6</sub> ( $S_{R6}$ : 2.111 - 1.237 ppm) in DOSY experiments. (b) PFG-NMR experiments in  $D_2O$  at 25°C. Attenuation of integrated NMR signals as a function of the diffusion weighted factor,  $b$ , for p54 (circles) and Arg<sub>6</sub> (triangles). Lines correspond to the fit of the experimental points, p54 (red) and Arg<sub>6</sub> (blue) using the REPES ILT algorithm. (c) Corresponding diffusion coefficient distributions obtained from the ILT of signals displayed in figure 6 b, p54 (red) and Arg<sub>6</sub>-p54 (blue). Average diffusion coefficients are  $172 \mu m^2/s$  (blue) and  $176 \mu m^2/s$  (red). Both correspond to objects with a hydrodynamic diameter close to 2.3 nm.

## Conclusion

In summary, an innovative platform was set up to transport a hydrophobic anticancer drug. The synthesis of amphiphilic conjugates (CPP-p54) formed by two different types of cell-penetrating peptides Arg<sub>n</sub>-p54 ( $n = 6$  to 9) and RLW-p54, their self-assembly in water as well as the complete characterization of the objects formed were studied. This study highlights the importance of the method used to characterize the suspension. Based on recent analysis, dynamic light scattering has been the most common method used to characterize the size of nanoparticles enabled medicinal products (NEP) thanks to that its fast and inexpensive analysis. In fact, this technique and microscopy were used in respectively 48 % and 14 % of reporting applications: only 8 % of NEP were characterized by other complementary methods<sup>64</sup>. In this project, dynamic light scattering is not adapted to characterize self-assemblies. Indeed, it is important to note that this method gives strong contribution to big objects even if these objects represent less than 1 % of the

initial matter used. According to this, DLS, known to be a low-resolution technique, must be used only for an initial analysis<sup>65-68</sup>: it is essential to perform complementary methods such as SAXS, quantification after filtration or NMR diffusometry to obtain a reliable characterization, unlike what is traditionally done in the nanomedicine field.

## **ASSOCIATED CONTENT**

Supporting Information: materials, synthesis, purification, CAC determination, stability, characterization methods.

## **ACKNOWLEDGMENT**

This work benefited from the support of a CIFRE project (n° 2016/68) managed by ANRT (Association Nationale Recherche Technologique). We acknowledge SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities and we would like to thank Javier Perez for assistance using the beamline SWING (Proposal ID: 20170722). We would like also to acknowledge Benjamin Siegler (ASTRAL-SFR Matrix, Angers) for his technical support.

## REFERENCES

- (1) Mourdikoudis, S.; Pallares, R. M.; Thanh, N. T. K. Characterization Techniques for Nanoparticles: Comparison and Complementarity upon Studying Nanoparticle Properties. *Nanoscale* **2018**, *10* (27), 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/C8NR02278J>.
- (2) Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. *Biophys. Rev.* **2016**, *8* (4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- (3) Ramos, A. P. 4 - Dynamic Light Scattering Applied to Nanoparticle Characterization. In *Nanocharacterization Techniques*; Da Róz, A. L., Ferreira, M., de Lima Leite, F., Oliveira, O. N., Eds.; Micro and Nano Technologies; William Andrew Publishing, 2017; pp 99–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49778-7.00004-7>.
- (4) Wyatt, P. J. Measurement of Special Nanoparticle Structures by Light Scattering. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (15), 7171–7183. <https://doi.org/10.1021/ac500185w>.
- (5) Filipe, V.; Hawe, A.; Jiskoot, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharm. Res.* **2010**, *27* (5), 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>.
- (6) Patterson, J. P.; Xu, Y.; Moradi, M.-A.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Friedrich, H. CryoTEM as an Advanced Analytical Tool for Materials Chemists. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (7), 1495–1501. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00107>.
- (7) Stewart, P. L. Cryo-Electron Microscopy and Cryo-Electron Tomography of Nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9* (2), e1417. <https://doi.org/10.1002/wnan.1417>.
- (8) Cheng, Y. Single-Particle Cryo-EM-How Did It Get Here and Where Will It Go. *Science* **2018**, *361* (6405), 876–880. <https://doi.org/10.1126/science.aat4346>.
- (9) Li, T.; Senesi, A. J.; Lee, B. Small Angle X-Ray Scattering for Nanoparticle Research. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (18), 11128–11180. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00690>.
- (10) Kratky, O. X-Ray Small Angle Scattering with Substances of Biological Interest in Diluted Solutions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1963**, *13*, 105-IN1. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(63\)80015-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(63)80015-2).
- (11) Koppel, D. E. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57* (11), 4814–4820. <https://doi.org/10.1063/1.1678153>.
- (12) Lim, J.; Yeap, S. P.; Che, H. X.; Low, S. C. Characterization of Magnetic Nanoparticle by Dynamic Light Scattering. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8* (1), 381. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-381>.
- (13) Fischer, K.; Schmidt, M. Pitfalls and Novel Applications of Particle Sizing by Dynamic Light Scattering. *Biomaterials* **2016**, *98*, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.003>.
- (14) Qian, H.; Sheetz, M. P.; Elson, E. L. Single Particle Tracking. Analysis of Diffusion and Flow in Two-Dimensional Systems. *Biophys. J.* **1991**, *60* (4), 910–921.
- (15) Adrian, M.; Dubochet, J.; Lepault, J.; McDowell, A. W. Cryo-Electron Microscopy of Viruses. *Nature* **1984**, *308* (5954), 32. <https://doi.org/10.1038/308032a0>.
- (16) Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J.-J.; Homo, J.-C.; Lepault, J.; McDowell, A. W.; Schultz, P. Cryo-Electron Microscopy of Vitrified Specimens. *Q. Rev. Biophys.* **1988**, *21* (2), 129–228. <https://doi.org/10.1017/S0033583500004297>.
- (17) Jeng, T.-W.; Crowther, R. A.; Stubbs, G.; Chiu, W. Visualization of Alpha-Helices in Tobacco Mosaic Virus by Cryo-Electron Microscopy. *J. Mol. Biol.* **1989**, *205* (1), 251–257. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90379-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90379-3).
- (18) Vogel, R. H.; Provencher, S. W.; Bonsdorff, C.-H. von; Adrian, M.; Dubochet, J. Envelope Structure of Semliki Forest Virus Reconstructed from Cryo-Electron Micrographs. *Nature* **1986**, *320* (6062), 533. <https://doi.org/10.1038/320533a0>.
- (19) Espinat, D. Application des techniques de diffusion de la lumière des rayons x et des neutrons à l'étude des systèmes colloïdaux. Deuxième partie : étude des différents systèmes : polymères en solution à l'état solide, solutions micellaires, systèmes fractals. *Rev. Inst. Fr. Pétrole* **1991**, *46* (5), 595–635. <https://doi.org/10.2516/ogst:1991030>.
- (20) *X-Ray and Neutron Techniques for Nanomaterials Characterization*; Kumar, C. S. S. R., Ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2016.

- (21) Hossen, S.; Hossain, M. K.; Basher, M. K.; Mia, M. N. H.; Rahman, M. T.; Uddin, M. J. Smart Nanocarrier-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy and Toxicity Studies: A Review. *Journal of Advanced Research* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.06.005>.
- (22) Huang, X.; Brazel, C. S. On the Importance and Mechanisms of Burst Release in Matrix-Controlled Drug Delivery Systems. *Journal of Controlled Release* **2001**, *73* (2–3), 121–136. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00248-6).
- (23) Guyon, L.; Lepeltier, E.; Passirani, C. Self-Assembly of Peptide-Based Nanostructures: Synthesis and Biological Activity. *Nano Res.* **2018**, *11* (5), 2315–2335. <https://doi.org/10.1007/s12274-017-1892-9>.
- (24) Edwards-Gayle, C. J. C.; Hamley, I. W. Self-Assembly of Bioactive Peptides, Peptide Conjugates, and Peptide Mimetic Materials. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (28), 5867–5876. <https://doi.org/10.1039/c7ob01092c>.
- (25) Wang, Y.; Cheetham, A. G.; Angacian, G.; Su, H.; Xie, L.; Cui, H. Peptide-Drug Conjugates as Effective Prodrug Strategies for Targeted Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *110–111*, 112–126. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.015>.
- (26) Fan, Q.; Ji, Y.; Wang, J.; Wu, L.; Li, W.; Chen, R.; Chen, Z. Self-Assembly Behaviours of Peptide-Drug Conjugates: Influence of Multiple Factors on Aggregate Morphology and Potential Self-Assembly Mechanism. *R Soc Open Sci* **2018**, *5* (4), 172040. <https://doi.org/10.1098/rsos.172040>.
- (27) Bechara, C.; Sagan, S. Cell-Penetrating Peptides: 20 Years Later, Where Do We Stand? *FEBS Lett.* **2013**, *587* (12), 1693–1702. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>.
- (28) Frankel, A. D.; Pabo, C. O. Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell* **1988**, *55* (6), 1189–1193.
- (29) Green, M.; Loewenstein, P. M. Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein. *Cell* **1988**, *55* (6), 1179–1188. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90262-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90262-0).
- (30) Braga, S. S.; Silva, A. M. S. A New Age for Iron: Antitumoral Ferrocenes. *Organometallics* **2013**, *32* (20), 5626–5639. <https://doi.org/10.1021/om400446y>.
- (31) Jaouen, G.; Vessières, A.; Top, S. Ferrocifen Type Anti Cancer Drugs. *Chem Soc Rev* **2015**, *44* (24), 8802–8817. <https://doi.org/10.1039/c5cs00486a>.
- (32) Jaouen, G.; Top, S. The Ferrocifen Family as Potent and Selective Antitumor Compounds: Mechanisms of Action. In *Advances in Organometallic Chemistry and Catalysis*; Wiley-Blackwell, 2013; pp 563–580. <https://doi.org/10.1002/9781118742952.ch42>.
- (33) Wang, Y.; Heinemann, F.; Top, S.; Dazzi, A.; Policar, C.; Henry, L.; Lambert, F.; Jaouen, G.; Salmain, M.; Vessieres, A. Ferrocifens Labelled with an Infrared Rhenium Tricarbonyl Tag: Synthesis, Antiproliferative Activity, Quantification and Nano IR Mapping in Cancer Cells. *Dalton Trans.* **2018**, *47* (29), 9824–9833. <https://doi.org/10.1039/C8DT01582A>.
- (34) Singh, A.; Lumb, I.; Mehra, V.; Kumar, V. Ferrocene-Appended Pharmacophores: An Exciting Approach for Modulating the Biological Potential of Organic Scaffolds. *Dalton Trans.* **2019**, *48* (9), 2840–2860. <https://doi.org/10.1039/C8DT03440K>.
- (35) Osella, D.; Ferrali, M.; Zanello, P.; Laschi, F.; Fontani, M.; Nervi, C.; Cavigliolo, G. On the Mechanism of the Antitumor Activity of Ferrocenium Derivatives. *Inorganica Chimica Acta* **2000**, *306* (1), 42–48. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)00147-X).
- (36) Hillard, E.; Vessières, A.; Thouin, L.; Jaouen, G.; Amatore, C. Ferrocene-Mediated Proton-Coupled Electron Transfer in a Series of Ferrocifen-Type Breast-Cancer Drug Candidates. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (2), 285–290. <https://doi.org/10.1002/anie.200502925>.
- (37) Messina, P.; Labbé, E.; Buriez, O.; Hillard, E. A.; Vessières, A.; Hamels, D.; Top, S.; Jaouen, G.; Frapart, Y. M.; Mansuy, D.; et al. Deciphering the Activation Sequence of Ferrociphenol Anticancer Drug Candidates. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18* (21), 6581–6587. <https://doi.org/10.1002/chem.201103378>.
- (38) Wang, Y.; Pigeon, P.; Top, S.; McGlinchey, M. J.; Jaouen, G. Organometallic Antitumor Compounds: Ferrocifens as Precursors to Quinone Methides. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (35), 10230–10233. <https://doi.org/10.1002/anie.201503048>.
- (39) Jaouen, G.; Pigeon, P.; Top, S. Metallocene Derivatives with Anticancer Activity, May 7, 2015.
- (40) Gao, H.; Zhang, Q.; Yang, Y.; Jiang, X.; He, Q. Tumor Homing Cell Penetrating Peptide Decorated Nanoparticles Used for Enhancing Tumor Targeting Delivery and Therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *478* (1), 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.029>.
- (41) Yang, W.; Xia, Y.; Fang, Y.; Meng, F.; Zhang, J.; Cheng, R.; Deng, C.; Zhong, Z. Selective Cell Penetrating Peptide-Functionalized Polymersomes Mediate Efficient and Targeted Delivery of Methotrexate Disodium to Human Lung Cancer In Vivo. *Advanced Healthcare Materials* **2018**, *7* (7), 1701135. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701135>.

- (42) Kondo, E.; Saito, K.; Tashiro, Y.; Kamide, K.; Uno, S.; Furuya, T.; Mashita, M.; Nakajima, K.; Tsumuraya, T.; Kobayashi, N.; et al. Tumour Lineage-Homing Cell-Penetrating Peptides as Anticancer Molecular Delivery Systems. *Nat Commun* **2012**, *3*, 951. <https://doi.org/10.1038/ncomms1952>.
- (43) Futaki, S.; Nakase, I.; Tadokoro, A.; Takeuchi, T.; Jones, A. T. Arginine-Rich Peptides and Their Internalization Mechanisms. *Biochemical Society Transactions* **2007**, *35* (4), 784–787. <https://doi.org/10.1042/BST0350784>.
- (44) Mitchell, D. J.; Steinman, L.; Kim, D. T.; Fathman, C. G.; Rothbard, J. B. Polyarginine Enters Cells More Efficiently than Other Polycationic Homopolymers. *The Journal of Peptide Research* **2000**, *56* (5), 318–325. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2000.00723.x>.
- (45) Gioria, S.; Caputo, F.; Urbán, P.; Maguire, C. M.; Bremer-Hoffmann, S.; Prina-Mello, A.; Calzolari, L.; Mehn, D. Are Existing Standard Methods Suitable for the Evaluation of Nanomedicines: Some Case Studies. *Nanomedicine* **2018**, *13* (5), 539–554. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0338>.
- (46) Halamoda-Kenzaoui, B.; Holzwarth, U.; Roebben, G.; Bogni, A.; Bremer-Hoffmann, S. Mapping of the Available Standards against the Regulatory Needs for Nanomedicines. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2019**, *11* (1), e1531. <https://doi.org/10.1002/wnan.1531>.
- (47) Caputo, F.; Clogston, J.; Calzolari, L.; Rösslein, M.; Prina-Mello, A. Measuring Particle Size Distribution of Nanoparticle Enabled Medicinal Products, the Joint View of EUNCL and NCI-NCL. A Step by Step Approach Combining Orthogonal Measurements with Increasing Complexity. *J Control Release* **2019**, *299*, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.030>.
- (48) Carpino, L. A.; Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (19), 5748–5749. <https://doi.org/10.1021/ja00722a043>.
- (49) Pedersen, S. L.; Tofteng, A. P.; Malik, L.; Jensen, K. J. Microwave Heating in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (5), 1826–1844. <https://doi.org/10.1039/C1CS15214A>.
- (40) Glushko, V.; Thaler, M. S. R.; Karp, C. D. Pyrene Fluorescence Fine Structure as a Polarity Probe of Hydrophobic Regions: Behavior in Model Solvents. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1981**, *210* (1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90160-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90160-0).
- (51) Mandal, D.; Shirazi, A. N.; Parang, K. Self-Assembly of Peptides to Nanostructures. *Org Biomol Chem* **2014**, *12* (22), 3544–3561. <https://doi.org/10.1039/c4ob00447g>.
- (52) Mallamace, D.; Fazio, E.; Mallamace, F.; Corsaro, C. The Role of Hydrogen Bonding in the Folding/Unfolding Process of Hydrated Lysozyme: A Review of Recent NMR and FTIR Results. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19* (12), 3825. <https://doi.org/10.3390/ijms19123825>.
- (53) Smith, A. M.; Williams, R. J.; Tang, C.; Coppo, P.; Collins, R. F.; Turner, M. L.; Saiani, A.; Ulijn, R. V. Fmoc-Diphenylalanine Self Assembles to a Hydrogel via a Novel Architecture Based on  $\pi$ - $\pi$  Interlocked  $\beta$ -Sheets. *Advanced Materials* **2008**, *20* (1), 37–41. <https://doi.org/10.1002/adma.200701221>.
- (54) Huang, C.-W.; Mohamed, M. G.; Zhu, C.-Y.; Kuo, S.-W. Functional Supramolecular Polypeptides Involving  $\pi$ - $\pi$  Stacking and Strong Hydrogen-Bonding Interactions: A Conformation Study toward Carbon Nanotubes (CNTs) Dispersion. *Macromolecules* **2016**, *49* (15), 5374–5385. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b01060>.
- (55) Panahi, Y.; Farshbaf, M.; Mohammadhosseini, M.; Mirahadi, M.; Khalilov, R.; Saghfi, S.; Akbarzadeh, A. Recent Advances on Liposomal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Biomedical Applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2017**, *45* (4), 788–799. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1282496>.
- (56) Koppel, D. E. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57* (11), 4814–4820. <https://doi.org/10.1063/1.1678153>.
- (57) Xu, C.; Wang, P.; Zhang, J.; Tian, H.; Park, K.; Chen, X. Pulmonary Codelivery of Doxorubicin and siRNA by PH-Sensitive Nanoparticles for Therapy of Metastatic Lung Cancer. *Small* **2015**, *11* (34), 4321–4333. <https://doi.org/10.1002/smll.201501034>.
- (58) Kratky, O. X-Ray Small Angle Scattering with Substances of Biological Interest in Diluted Solutions. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **1963**, *13*, 105-1N1. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(63\)80015-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(63)80015-2).
- (59) Jakeš, J. Regularized Positive Exponential Sum (REPES) Program - A Way of Inverting Laplace Transform Data Obtained by Dynamic Light Scattering. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1995**, *60* (11), 1781–1797. <https://doi.org/10.1135/cccc19951781>.
- (60) Brown, W. *Dynamic Light Scattering: The Method and Some Applications*; Clarendon Press ; Oxford University Press: Oxford [England]; New York, 1993.
- (61) Eiríksdóttir, E.; Konate, K.; Langel, Ü.; Divita, G.; Deshayes, S. Secondary Structure of Cell-Penetrating Peptides Controls Membrane Interaction and Insertion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2010**, *1798* (6), 1119–1128. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.03.005>.

- (62) Gross, J.; Sayle, S.; Karow, A. R.; Bakowsky, U.; Garidel, P. Nanoparticle Tracking Analysis of Particle Size and Concentration Detection in Suspensions of Polymer and Protein Samples: Influence of Experimental and Data Evaluation Parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2016**, *104*, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.04.013>.
- (63) Franconi, F.; Lemaire, L.; Siegler, B.; Gimel, J.-C.; Saulnier, P. NMR Diffusometry Data Sampling Optimization for Mixture Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2018**, *148*, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.028>.
- (64) D'Mello, S. R.; Cruz, C. N.; Chen, M.-L.; Kapoor, M.; Lee, S. L.; Tyner, K. M. The Evolving Landscape of Drug Products Containing Nanomaterials in the United States. *Nature Nanotechnology* **2017**, *12* (6), 523–529. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.67>.
- (65) Leong, H. S.; Butler, K. S.; Brinker, C. J.; Azzawi, M.; Conlan, S.; Dufés, C.; Owen, A.; Rannard, S.; Scott, C.; Chen, C.; et al. On the Issue of Transparency and Reproducibility in Nanomedicine. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14* (7), 629–635. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0496-9>.
- (66) Mehn, D.; Caputo, F.; Rösslein, M.; Calzolari, L.; Saint-Antonin, F.; Courant, T.; Wick, P.; Gilliland, D. Larger or More? Nanoparticle Characterisation Methods for Recognition of Dimers. *RSC Adv.* **2017**, *7* (44), 27747–27754. <https://doi.org/10.1039/C7RA02432K>.
- (67) Varenne, F.; Makky, A.; Gaucher-Delmas, M.; Violleau, F.; Vauthier, C. Multimodal Dispersion of Nanoparticles: A Comprehensive Evaluation of Size Distribution with 9 Size Measurement Methods. *Pharm Res* **2016**, *33* (5), 1220–1234. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1867-7>.
- (68) Maguire, C. M.; Rösslein, M.; Wick, P.; Prina-Mello, A. Characterisation of Particles in Solution – a Perspective on Light Scattering and Comparative Technologies. *Science and Technology of Advanced Materials* **2018**, *19* (1), 732–745. <https://doi.org/10.1080/14686996.2018.1517587>.



# Supporting information

## Importance of combining advanced particle size analysis techniques to characterize cell penetrating peptide-ferrocifen self-assemblies

Léna Guyon<sup>a</sup>, Elise Lepeltier<sup>\*a</sup>, Jean-Christophe Gimel<sup>a</sup>, Brice Calvignac<sup>a</sup>, Florence Franconi<sup>ab</sup>, Nolwenn Lautram<sup>a</sup>, Aurélien Dupont<sup>c</sup>, Claudie Bourgaux<sup>d</sup>, Pascal Pigeon<sup>e</sup>, Patrick Saulnier<sup>a</sup>, Gérard Jaouen<sup>e</sup>, Catherine Passirani<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Micro et Nanomédecines Translationnelles, MINT, UNIV Angers, UMR INSERM 1066, UMR CNRS 6021, Angers, France

<sup>b</sup>PRISM Plate-forme de recherche en imagerie et spectroscopie multi-modales, PRISM-Icat, Angers et PRISM-Biosit CNRS UMS 3480, INSERM UMS 018, Rennes, UBL Université Bretagne, Loire, France.

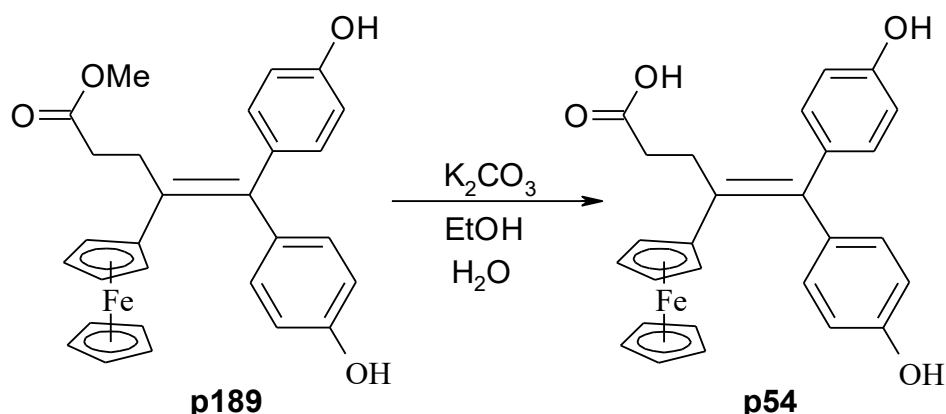
<sup>c</sup>Univ Rennes, CNRS, Inserm, BIOSIT - UMS 3480, US\_S 018, F-35000 Rennes, France

<sup>d</sup>Institut Galien Paris-Sud, UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud XI, Châtenay-Malabry, France

<sup>e</sup>Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, UMR 8232, IPCM and PSL Chimie Paris Tech, Paris, France

\*E-mail: [elise.lepeltier@univ-angers.fr](mailto:elise.lepeltier@univ-angers.fr)

### Supplementary Figure S1: Chemical structure and synthesis of the ferrocifen p54



### Materials

Rink amid p-methylbenzhydrylamine (MBHA) resin (0.69 mmol/g) were purchased from MultisynTech GmbH (Germany). Dimethylformamide (DMF), methyl alcohol (MeOH), trifluoroacetic acid (TFA), thioanisole, triisopropyl silane (TIS) and acetonitrile (ACN) were purchased from Thermo Fisher Scientific (USA). All amino acids derivatives, piperidine, 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) and diisopropylethylamine (DIEA) were purchased from Iris Biotech GmbH (Germany). Phenol was collected from Merck KGaA (Germany). Diethyl ether, LC-MS grade water and ULC/MS grade ACN were purchased from Biosolve (France). Deionized water was obtained from a Milli-Q plus system (Merck-Millipore, Germany). Formic acid, potassium carbonate, acetone and pyrene were obtained from Sigma-Aldrich (France). Ethyl acetate, petroleum ether, ethanol and hydrochloric acid were obtained from VWR (France).

### Supplementary Section S1: Synthesis of p54, CPP and CPP-p54 conjugates.

4-Ene-4-ferrocenyl-5,5-bis-(4-hydroxyphenyl)-pentanoic acid, p54. A mixture of ester p189 (0.464 g, 0.962 mmol), potassium carbonate (0.532 g, 3.8 mmol), water (10 mL) and ethanol (35 mL) was refluxed for 6 hours. After cooling, water and ethyl acetate were added and the mixture was shaken with acidification by slow addition of concentrated hydrochloric acid. The mixture was then decanted. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate and the combination of organic layers was dried on magnesium sulfate, filtered then concentrated under reduced pressure. The crude solid was dissolved into ethyl acetate and was cooled to -30 °C after addition of petroleum ether. The crystallized p54 (0.43 g, yield 96 %) was recovered by filtration and dried under reduced pressure.  $^1H$  NMR (300 MHz, acetone- $d_6$ ) :  $\delta$  2.46 (t,  $J$  = 8.2 Hz, 2H,  $CH_2$ ), 2.97 (t,  $J$  = 8.2 Hz, 2H,  $CH_2$ ), 3.03 (s broad, 1H, OH), 4.00 (t,  $J$  = 1.9 Hz, 2H,  $C_5H_4$ ), 4.13 (t,  $J$  = 1.9 Hz, 2H,  $C_5H_4$ ), 4.18 (s, 5H, Cp), 6.74 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H,  $C_6H_4$ ), 6.86 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H,  $C_6H_4$ ), 6.91 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H,  $C_6H_4$ ), 7.12 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H,  $C_6H_4$ ), 8.30 (s, 1H, OH), 8.35 (s, 1H, OH).  $^{13}C$  NMR (75 MHz, acetone- $d_6$ ) :  $\delta$  31.7 ( $CH_2$ ), 35.8 ( $CH_2$ ), 69.6 (2CH  $C_5H_4$ ), 70.6 (5CH Cp), 70.7 (2CH  $C_5H_4$ ), 88.9 (C  $C_5H_4$ ), 116.5 (2CH  $C_6H_4$ ), 116.8 (2CH  $C_6H_4$ ), 131.9 (2CH

C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 132.5 (2CH C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.4 (C), 137.4 (C), 137.9 (C), 140.9 (C), 157.6 (2C), 175.1 (CO). MS (Cl, NH<sub>3</sub>) m/z: 469 [M+H]<sup>+</sup>, 485 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

CPPs were synthesized on a Rink Amide MBHA resin (0.69 mmol/g) via a standard Fmoc solid phase peptide synthesis (SPPS) method, with an automated microwave peptide synthesizer (CEM). First, the resin was immersed in DMF and gently stirred to swell the resin beads for 2 h at room temperature. The first step is the Fmoc deprotection using 20 % piperidine/DMF (v/v). Then, the resin was washed several times with DMF. Subsequently, the amino acid coupling reaction was done by adding a DMF-mixed solution of Fmoc-protecting amino acid (5 equiv.), HBTU (4.5 equiv.), and DIEA (10 equiv.). These steps were performed using a microwave assisted system and cycles of deprotection-washing-coupling-washing were repeated until the desired amino-acid sequence was obtained. After this step, we can either keep the peptide free or conjugate the ferrocifen molecule to the N-terminal extremity of the peptide. For that, after the final Fmoc deprotection with piperidine/DMF, the ferrocifen (2 equiv.) was solubilized in DMF in presence of HBTU (2 equiv.). In order to activate the carboxylic acid function, the solution was stirred for 5 min before adding DIEA (3 equiv.). The coupling mixture was immediately added to the resin beads and the coupling reaction was performed for 2 h at 37°C. Finally, the resin was washed with DMF and MeOH three times, respectively, and dried under vacuum for 48 h. Peptides and conjugates were cleaved from the resin by adding the appropriate cleavage cocktail based on the amino acid sequence. For polyarginine, reagent K was used (mixture of TFA, phenol, water, thioanisole and TIS in the volume ratio of 82.5:5:5:5:2.5) and reagent B (mixture of TFA, phenol, water and TIS in the volume ratio of 88:5:5:2) was used for RLW. After adding the cleavage cocktail (5 mL of solution for 0.5 g of resin), the resin was stirred at 37°C during 1-4 h. The crude peptide was precipitated by adding the cleavage mixture dropwise to at least a 10-fold excess of cold diethyl ether: the resulting precipitate was centrifuged for 30 min at 4°C at 2000 rpm. Afterward, the crude product was dissolved in water/ACN before freeze-drying.

#### **Supplementary Section S2: Purification and characterization of CPP and CPP-p54 conjugates.**

The crude products were purified by semi-preparative reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a Waters (France) instrument. Purification was performed at room temperature using XBridge BEH C18 Prep column (250 x 30 mm) with 5 µm particle and 130 Å pore size. Eluent (A) was 0.1 % TFA in water while eluent (B) contained 0.1% TFA in ACN. A gradient elution was developed for both RLW based products and Arg<sub>n</sub> based products (peptides and conjugates) (Table 1). The crude product was dissolved in 95 % (A) and 5 % (B) at a concentration of 4 mg/mL. The sample was vortexed, sonicated and filtered with a 0.22 µm Millex-LG filter (Merck, Germany). Flow rate was 44 mL/min and injection volume was 2.5 mL. Peaks were detected at a wavelength of 214 nm for peptides (amide bond) and 450 nm for conjugates (ferrocifen part).

**Table 1.** Gradient elution of the RP-HPLC method

Time (minutes)	Flow (mL/minute)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	44	95	5
12	44	80	20
45	44	70	30
47	44	0	100
57	44	0	100
59	44	95	5
75	44	95	5

Notes: Phase (A) contained 0.1% TFA in water and phase (B) 0.1% TFA in ACN

The LC-MS/MS method was developed on an Alliance® 2695 system (Waters) with a 150 × 2.0 mm, 5 µm Uptisphere C18 5ODB column (Interchim, France). The mobile phase consisted of a mixture of (A) 0.1 % formic acid in water and (B) 0.1 % formic acid in ACN. The gradient elution used was adapted function of the peptide used (Tables 2 and 3). The purified product was dissolved in 95 % (A) and 5 % (B) at a concentration of 1 mg/mL. The sample was vortexed, sonicated and filtered with a 0.22 µm Millex-LG filter (Merck, Germany). Flow rate was 0.2 mL/min and the injection volume was set at 5 µL. The total HPLC effluent was injected into a Quattro Micro® triple quadrupole mass spectrometer (Waters, France). Ionization was achieved using electrospray in positive ion mode in the m/z 200–1500 range (full scan acquisition). An option of cone ramp was used between 20 and 60 V to optimize the acquisition.

**Table 2.** Gradient elution of the LC-MS/MS method for RLW based products

Time (minutes)	Flow (mL/minute)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	0.3	0	100
5	0.3	0	100

**Table 3.** Gradient elution of the LC-MS/MS method for Arg<sub>n</sub> based products

Time (minutes)	Flow (mL/minute)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	0.2	50	50
8	0.2	50	50
9	0.2	0	100
12	0.2	0	100
13	0.2	50	50
15	0.2	50	50

Notes: Phase (A) contained 0.1 % formic acid in water and phase (B) 0.1% formic acid in ACN

An UPLC-UV method was developed to quantify the purity of peptides and conjugates. An UPLC Acquity H-Class Bio (Waters, France) composed of a quaternary solvent manager, a sample manager, a photo diode array detector and a column manager was used. The system was managed by Empower®3 software (Waters). The column used was an Acquity®UPLC BEH C18 100 x 2.1 mm, 1.7 µm (Waters). The mobile phase was composed of a mixture of 0.1 % TFA in water (A) and 0.1 % TFA in ACN. The purified product was dissolved in 95 % (A) and 5 % (B) at a concentration of 1 mg/mL. The sample was vortexed, sonicated and filtered with a

0.22  $\mu\text{m}$  Millex-LG filter (Merck-Millipore, Germany). Flow rate was 0.2 mL/min and injection volume was set to 1  $\mu\text{L}$ . The gradient elution changed with the peptide used (Tables 4 and 5). Detection was fixed at 214 nm and 450 nm.

**Table 4.** Gradient elution of the UPLC-UV method for RLW based products

Time (minutes)	Flow (mL/minute)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	0.2	80	20
10	0.2	0	100
11	0.2	80	20
18	0.2	80	20

Notes: Phase (A) contained 0.1% TFA in water and phase (B) 0.1% TFA in ACN

**Table 5.** Gradient elution of the UPLC-UV method for Arg<sub>n</sub> based products

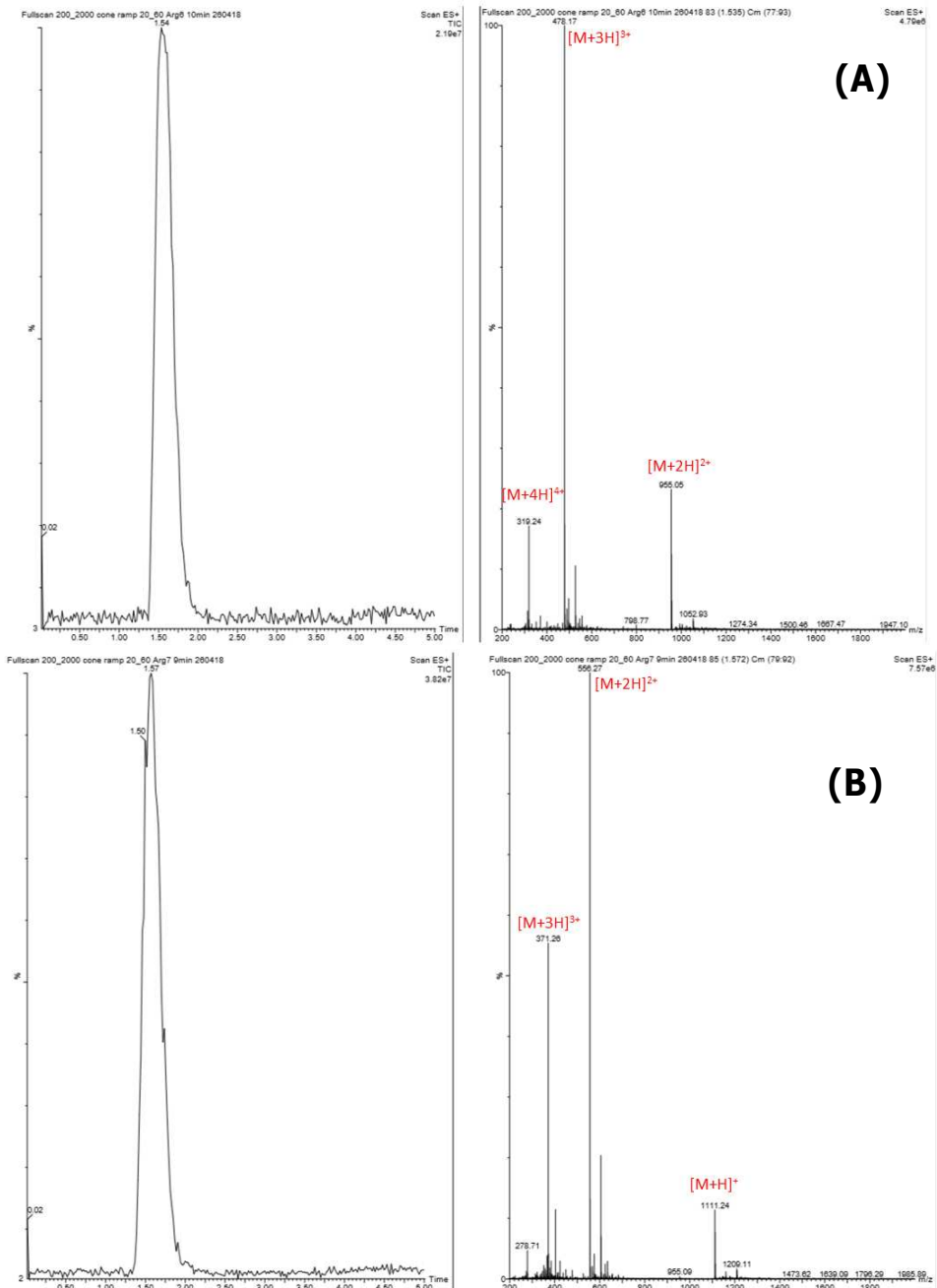
Time (minutes)	Flow (mL/minute)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	0.2	95	5
5	0.2	78	22
10	0.2	78	22
15	0.2	0	100
20	0.2	0	100
21	0.2	95	5
25	0.2	95	5

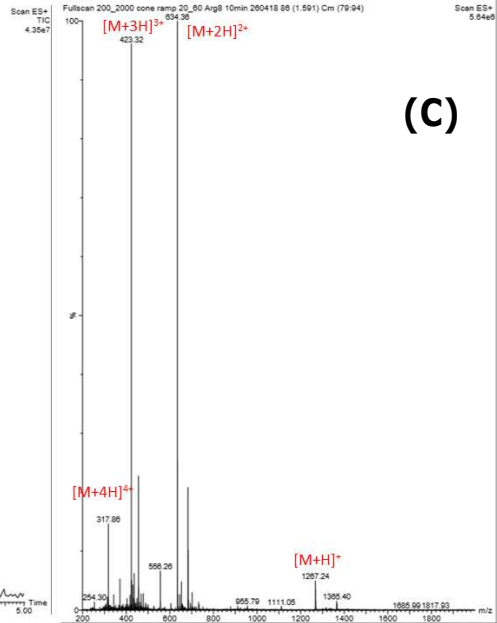
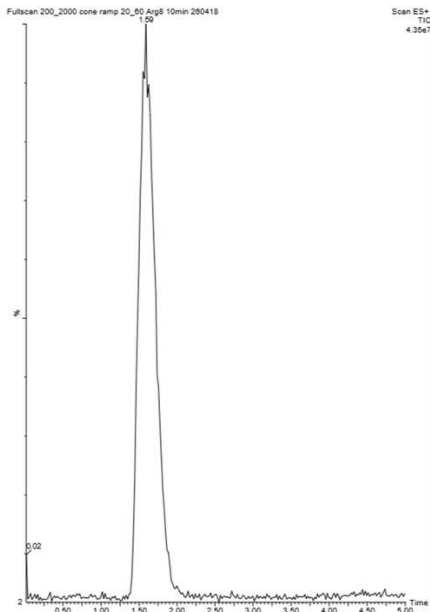
Notes: Phase (A) contained 0.1% TFA in water and phase (B) 0.1% TFA in ACN

*Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.*

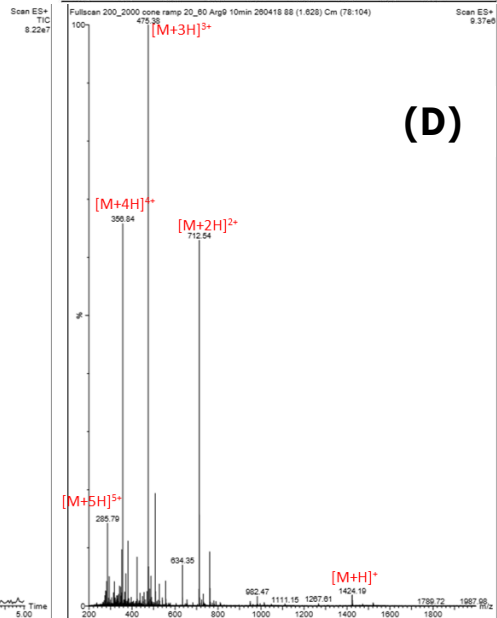
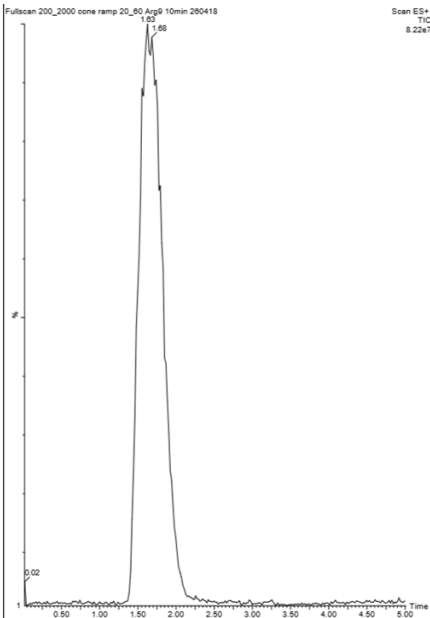
<sup>1</sup>H NMR spectra were recorded in deuterated dimethyl sulfoxide and deuterated water at 250 MHz or 400 MHz in the FT mode with a Bruker 500MHz AVANCE III HD spectrometer (Wissembourg, France) equilibrated at 25 °C. Spectra were analyzed using the software MestReNova®.

Supplementary Figure S2: Chromatograms and spectra obtained for CPP and CPP-p54 by LC-MS/MS. (A) Arg<sub>6</sub>, (B) Arg<sub>7</sub>, (C) Arg<sub>8</sub>, (D) Arg<sub>9</sub>, (E) RLW, (F) Arg<sub>6</sub>-p54, (G) Arg<sub>7</sub>-p54, (H) Arg<sub>8</sub>-p54, (I) Arg<sub>9</sub>-p54, (J) RLW-p54.

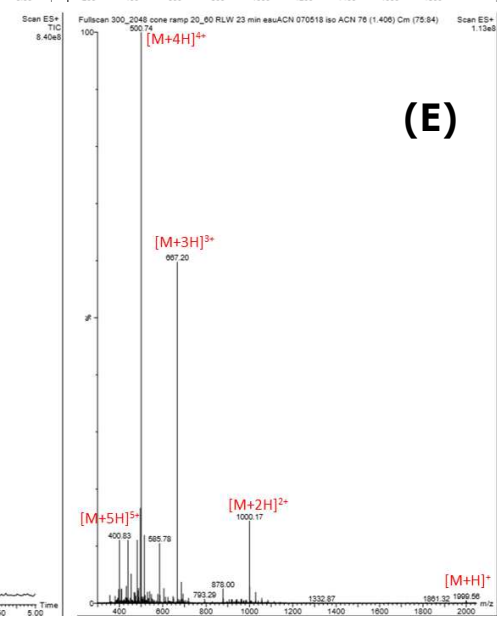
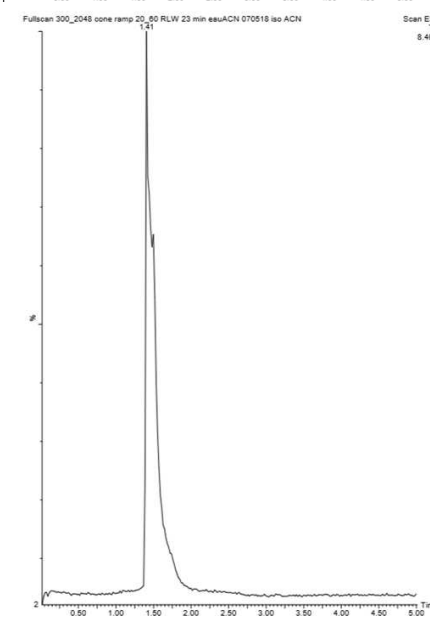




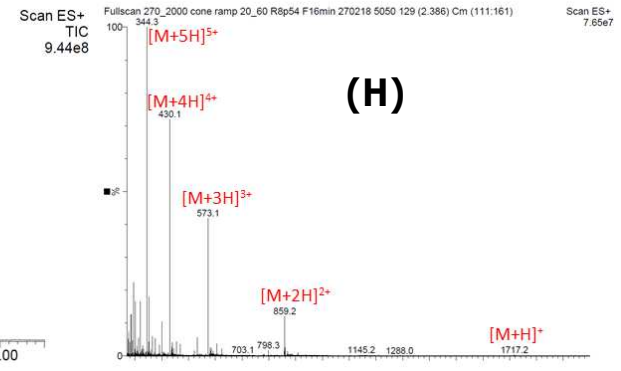
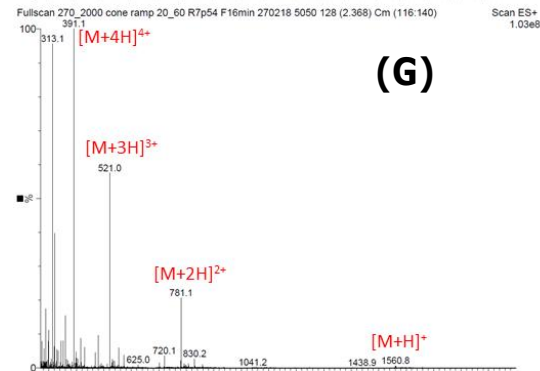
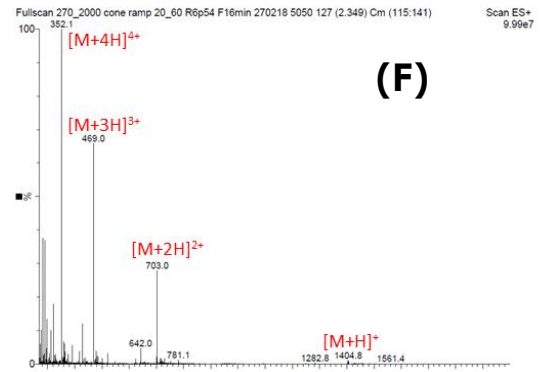
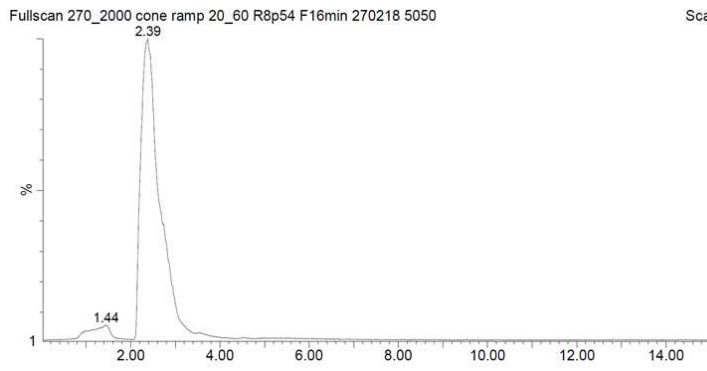
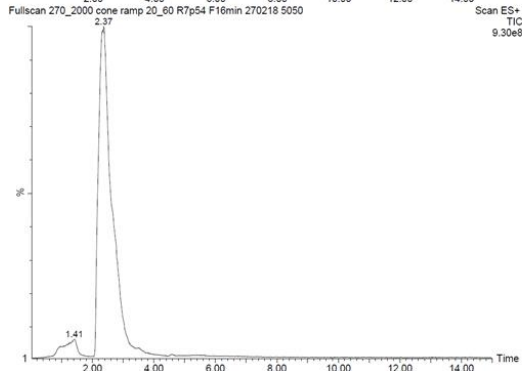
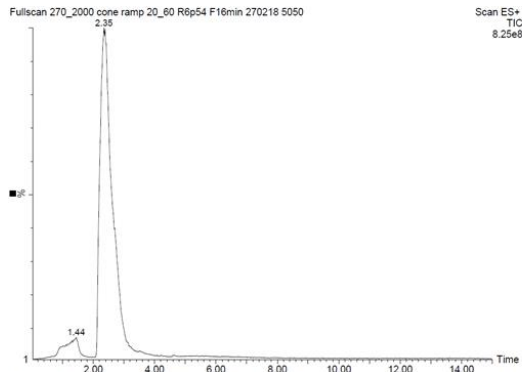
(C)



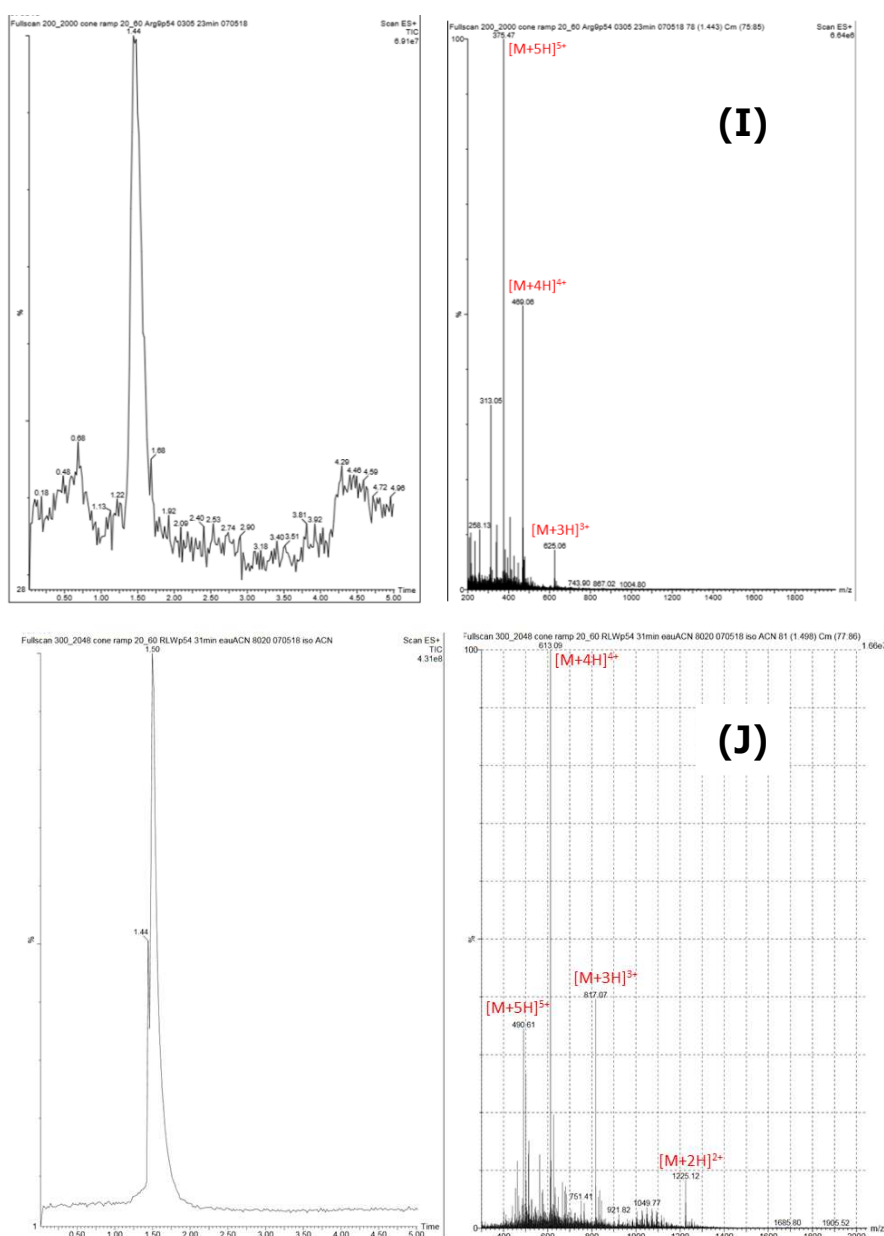
(D)



(E)







**Supplementary Table S1: Yield and purity of CPP and CPP-p54 obtained.**

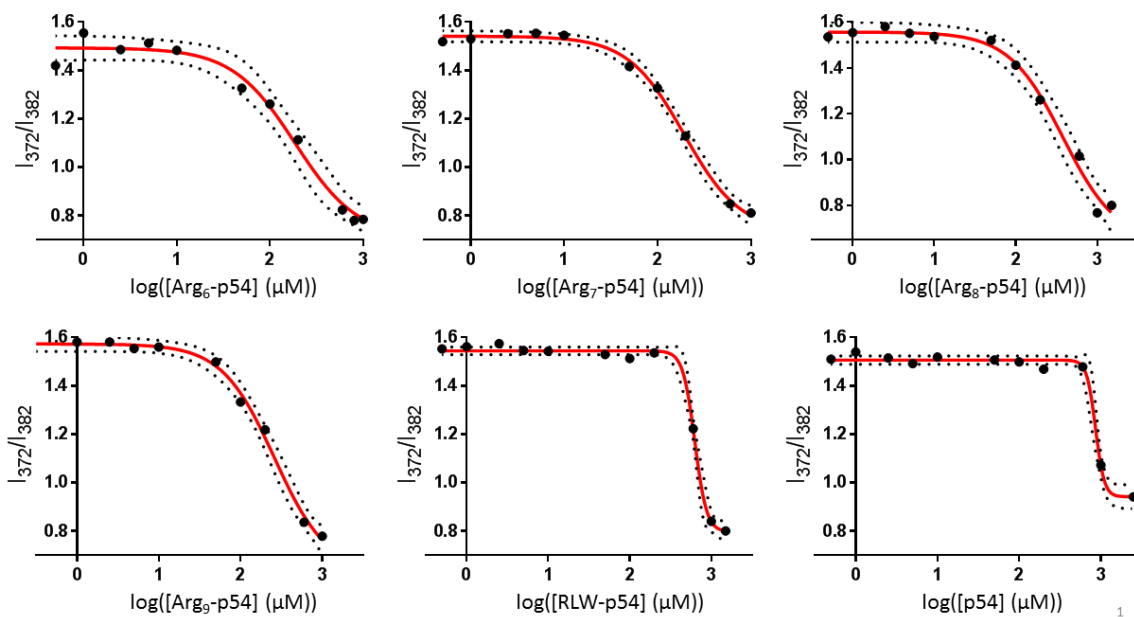
	CPP					CPP-p54 conjugates				
	Arg <sub>6</sub>	Arg <sub>7</sub>	Arg <sub>8</sub>	Arg <sub>9</sub>	RLW	Arg <sub>6</sub> -p54	Arg <sub>7</sub> -p54	Arg <sub>8</sub> -p54	Arg <sub>9</sub> -p54	RLW-p54
Yield	55 %	64 %	70 %	78 %	19 %	20 %	21 %	23 %	24 %	23 %
Purity	97 %	97 %	89 %	85 %	99 %	88 %	89 %	98 %	94 %	88 %

**Supplementary Section S3: determination of critical aggregation concentration (CAC).**

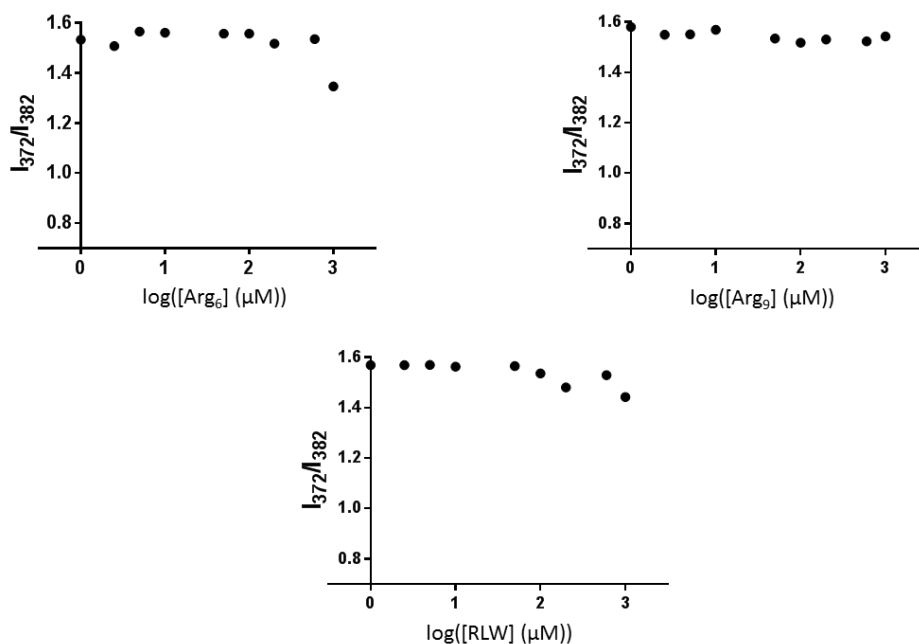
The critical aggregation concentration (CAC) of CPP-p54 suspensions was determined using pyrene as a fluorescent probe. Briefly, 6  $\mu$ L of pyrene stock solution in acetone (50  $\mu$ M) was added into tubes. Then, acetone in tubes was evaporated in dark condition. Different suspension of CPP-p54 with a concentration ranging from 0.5 to 1500  $\mu$ M were added into tubes and mixed overnight at 37°C. The final concentration of

pyrene was 1  $\mu\text{M}$ . After 30 min of equilibration at room temperature, a fluorescence spectrophotometer (Fluoromax-4, Horiba, Japan) was used to measure the fluorescence intensities of pyrene at an excitation wavelength of 336 nm. The emission spectra were recorded in the range 350-500 nm. The slit opening for the excitation was set at 1 nm and 3 nm for the emission. Intensity ratios of pyrene at  $I_{372}/I_{382}$  ( $I_1/I_3$ ) were plotted against the log of the concentration.

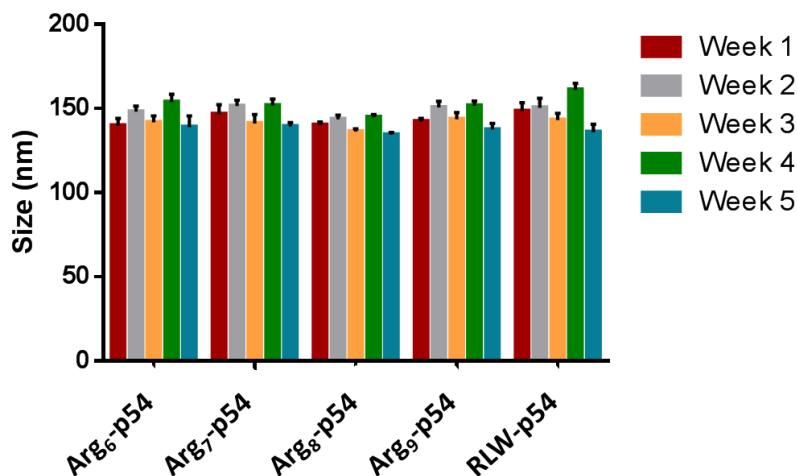
**Supplementary Figure S3: Quotient of vibrational band intensities ( $I_1/I_3$ ) as a function of log [CPP-p54] and log[p54].**



**Supplementary Figure S4: Quotient of vibrational band intensities ( $I_1/I_3$ ) as a function of log[CPP].**



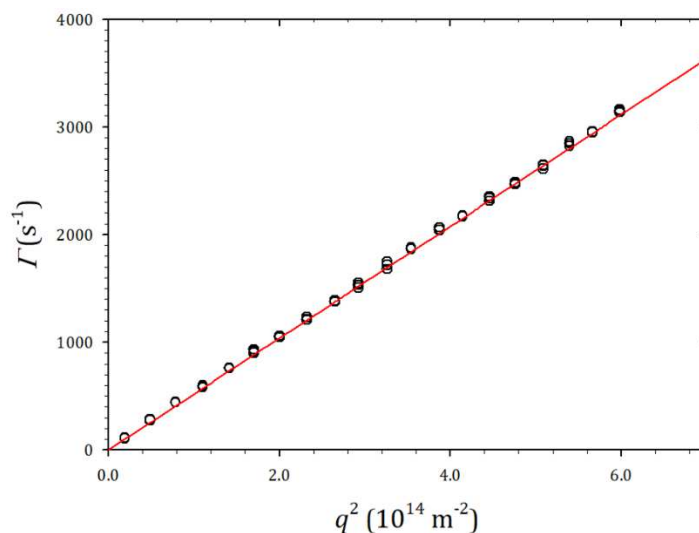
**Supplementary Figure S5: Stability study of CPP-p54 self-assemblies. Stability was assessed by measuring the hydrodynamic diameter (nm) by DLS (n=3).**



#### **Supplementary Section S4: Self-assembly formulations process.**

Nanoassemblies were formulated by nanoprecipitation using a solvent displacement technique. For that, conjugates (Arg<sub>n</sub>-p54 and RLW-p54) were solubilized in acetone at a concentration of 3 mg/mL. This organic solution was added in a microfluidic mixer (IDEX U-466-02, USA) at a flow rate of 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  with a syringe pump (Harvard Apparatus PHD 2000 infusion, USA). In the same time, water was added at a flow rate of 1200  $\mu\text{L}/\text{min}$  with a second syringe pump (Harvard Apparatus PHD Ultra, USA). In fact, the individual flow rates of each channel were selected to have an acetone/water volume ratio of 4 for all experiments. The organic solvent was then removed using a rotary evaporator.

**Supplementary Figure S6: DLS measurement in water at 20 °C of a 200 nm filtered Arg<sub>6</sub>-p54 suspension. Evolution of the average relaxation rate,  $\Gamma$ , as a function of the square scattering vector,  $q^2$ .  $\Gamma$  was calculated using the cumulant method. The red line corresponds to a linear fit. Its slope gives the z average diffusion coefficient  $D = 5.19 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$  corresponding to a hydrodynamic diameter  $D_H = 86.2 \pm 0.5 \text{ nm}$ . 1.002 mPa·s was used for the water viscosity at 20 °C.**



### **Supplementary Section S5: Dynamic light scattering.**

The autocorrelation function of the scattering intensity,  $g_2(t)$  is related to the autocorrelation function of the electric field,  $g_1(t)$ , by the Siegert relation:  $g_2(t) = 1 + \beta \cdot g_1(t)^2$  where  $\beta$  is called the intercept. This intercept is usually close to unity but can be low for weakly scattering samples.

$g_1(t)$  can be written as the Laplace transform of a relaxation time distribution  $A(\tau)$ :  $g_1(t) = \int A(\tau) \cdot \exp(-t/\tau) \cdot d\tau$   
For suspensions of dilute rigid particles, each relaxation time is related to a diffusion coefficient  $D = 1/(\tau \cdot q^2)$ . Using the Stokes-Einstein relation, an intensity weighted hydrodynamic size distribution can be obtained. The shape of this distribution can be influenced by the form factor when particles are big compared to the  $q^{-1}$ .<sup>1</sup>

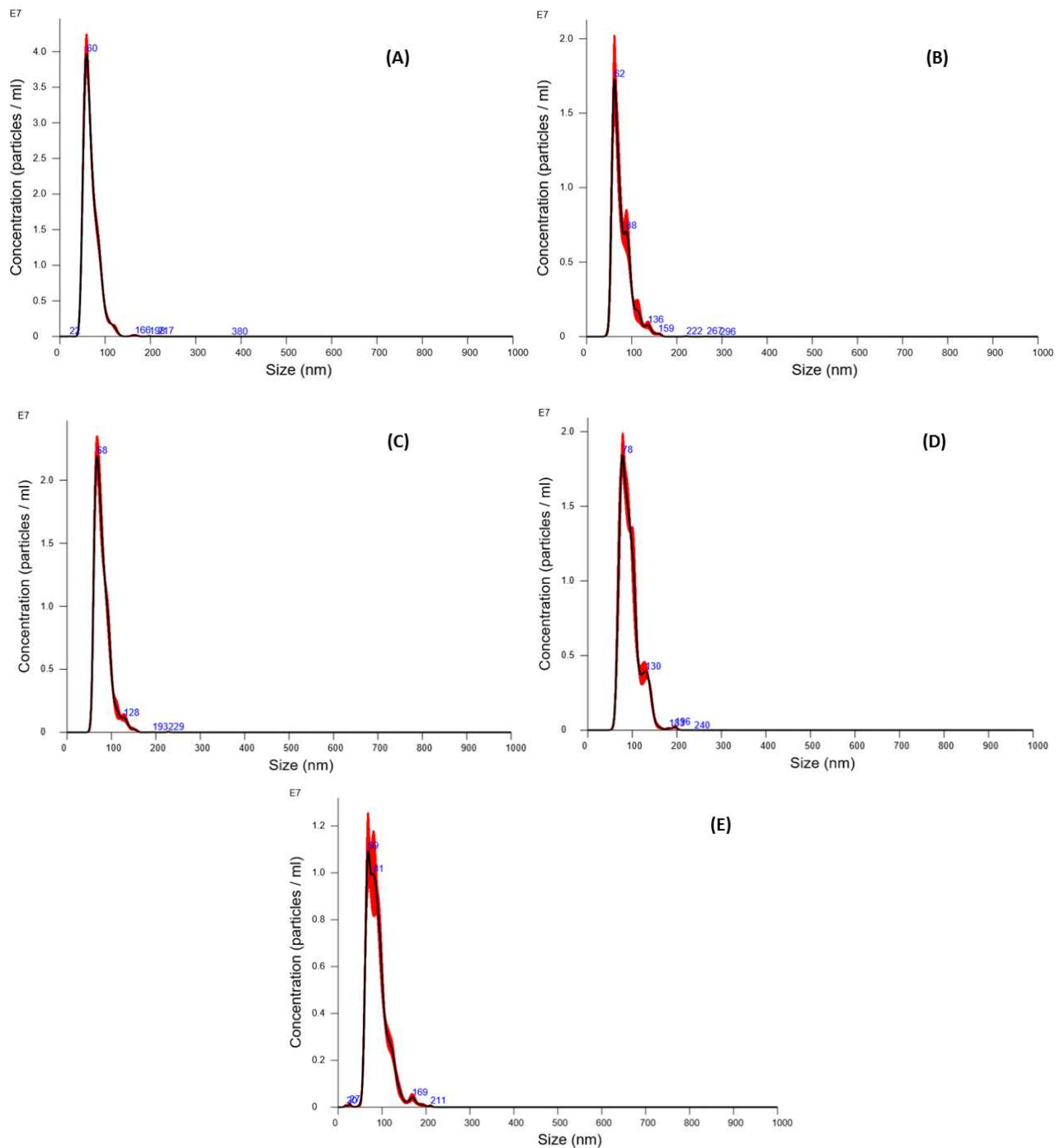
### **Supplementary Section S6: Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM).**

Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) investigations were performed with a Cryo-TEM (Tecnai™ G2 Sphera, FEI, USA), at the Microscopy Rennes Imaging Center (Biogenouest, Rennes). A drop (4  $\mu$ L) of the (10 mg/mL) sample was deposited on the surface of a carbon-coated copper grid. This grid was held under controlled humidity and temperature conditions by tweezers on a guillotine device. A filter paper was then pressed against the sample to remove the excess liquid. Afterward, the filter paper is removed, and the plunger was allowed to drop into the liquid ethane in order to vitrify the sample. The grid was then transferred to a cryo-holder. Observations were made at an accelerating voltage of 200 kV under low electron dose. Analysis was performed with the ImageJ software.

### **Supplementary Section S7: Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).**

The NTA was carried out using the NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd, UK). The suspensions were diluted in ultrapure water in order to have optimum concentration ranging between  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  particles per mL to allow analysis of the software to track the movement of particle. Prior to each analysis, samples were filtered using a 0.20  $\mu$ m Whatman™ Anotop™ filter. Ultrapure water and suspensions were infused in the sample chamber using a syringe pump at 80  $\mu$ L/min rate. A 405 nm laser was used to illuminate the particles, and their Brownian motion was recorded into 60 s videos (25 fps) using the sCMOS type camera of the instrument. Subsequently, the NTA software (NTA 3.2 Dev Build 3.2.16) allowed for processing of the data. The nanoparticle concentration was obtained after correction by the dilution factor. The experiment was performed in triplicate.

**Supplementary Figure S7: Concentration (particles/mL) function of the size of self-assemblies obtained by NTA. (A) Arg<sub>6</sub>-p54, (B) Arg<sub>7</sub>-p54, (C) Arg<sub>8</sub>-p54, (D) Arg<sub>9</sub>-p54 and (E) RLW-p54.**



**Supplementary Section S8: Small-angle X-ray scattering (SAXS).**

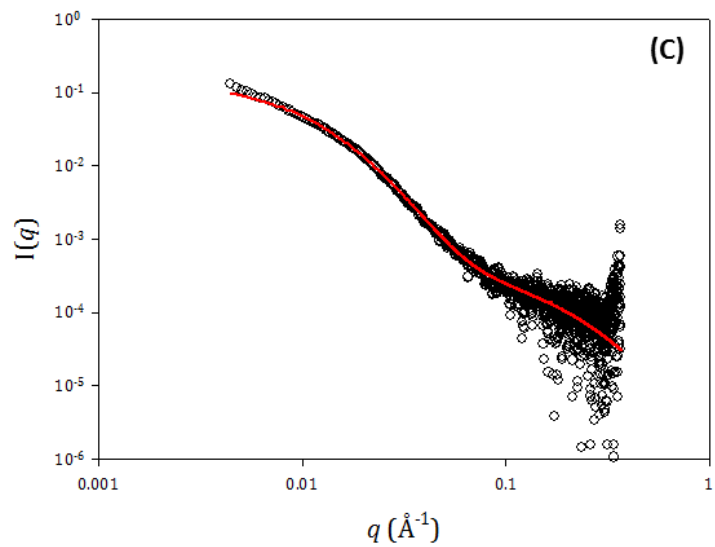
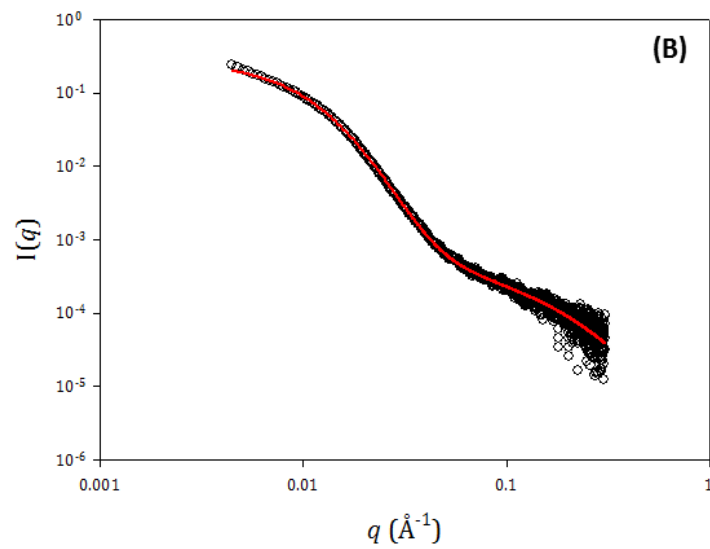
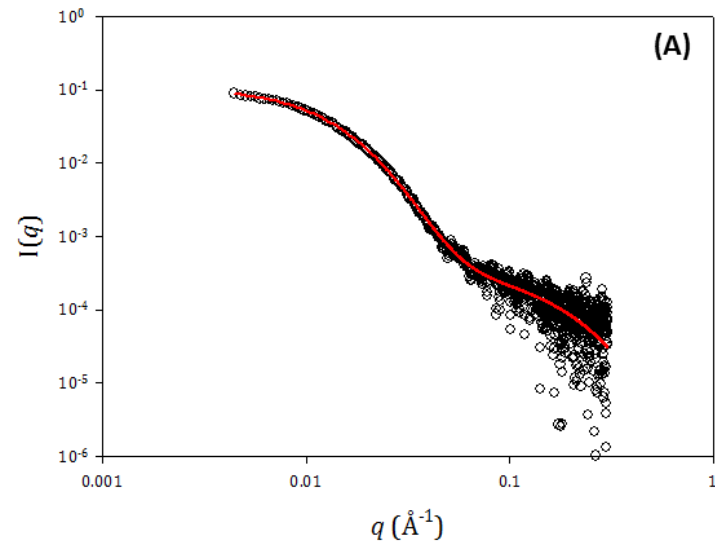
SAXS experiments were conducted on the SWING beamline at the SOLEIL synchrotron (Saint Aubin, France). The Avicx charge-coupled device detector was positioned at a distance of 1.8 m. Data were collected as a function of the scattering vector  $q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$ , where  $2\theta$  is the scattering angle and  $\lambda$  the wavelength of the incident beam. Silver behenate standard was used to calibrate the  $q$  range. Samples were injected via an automated sample changer into a quartz capillary (1.5 mm internal diameter,

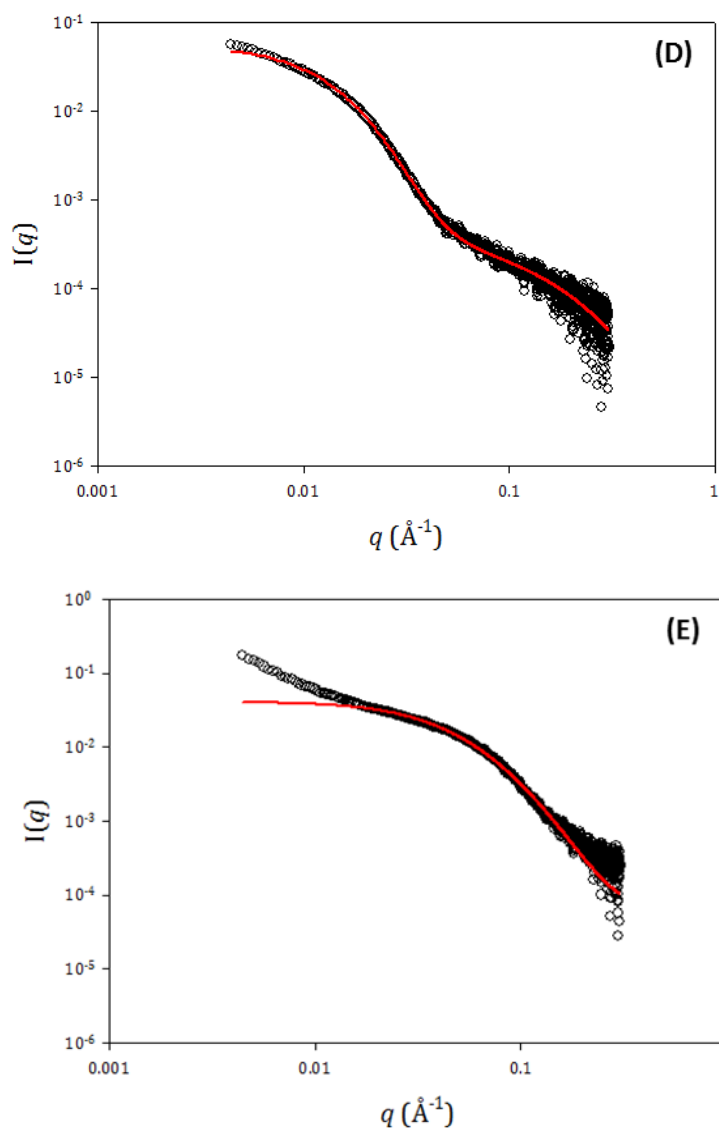
10  $\mu\text{m}$  wall thickness). Suspensions were streamed at a constant flow rate through the capillary during beam exposure to avoid possible degradation under X-ray irradiation. The SAXS beamline was operated at 11 keV. Data were collected by a two-dimensional CCD detector. Intensity values were normalized taking into account the beam intensity, acquisition time and sample transmission. The scattered intensity from a capillary filled with water was subtracted from the sample scattering curves. The analysis of the SAXS data was carried out using the FOXTROT software.

**Supplementary Table S2: Features of CPP-p54 self-assemblies obtained by SAXS experiments: number fraction, mass fraction, intensity fraction, gyration radius, hydrodynamic radius obtained by the inverse Laplace transformation, hydrodynamic radius obtained by the method of cumulants and polydispersity index. These results were determined assuming that homogeneous sphere with the same electron density were obtained.**

	Arg <sub>6</sub> -p54		Arg <sub>7</sub> -p54		Arg <sub>8</sub> -p54		Arg <sub>9</sub> -p54		RLW-p54
	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D1
Number fraction	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000
Mass fraction	0.871	0.129	0.929	0.071	0.939	0.061	0.949	0.051	1.000
Intensity fraction	0.003	0.997	0.001	0.999	0.002	0.998	0.006	0.994	1.000
$\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z}$ (nm)	1.1	16.2	1.8	23.0	1.5	25.3	1.5	14.8	4.7
$\langle R_h \rangle_z$ (nm)	1.3	18.9	1.9	25.5	1.6	27.6	1.6	17.7	5.4
$\langle R_h^{-1} \rangle_z^{-1}$ (nm)	1.1	15.6	1.3	18.7	1.1	19.4	1.2	15.1	4.1
Pdl	0.198	0.217	0.523	0.216	0.472	0.428	0.368	0.173	0.317

Supplementary Figure S8: Small-angle X-ray scattering patterns recorded at room temperature and fitted curves obtained for (A) Arg<sub>6</sub>-p54, (B) Arg<sub>7</sub>-p54, (C) Arg<sub>8</sub>-p54, (D) Arg<sub>9</sub>-p54 and (E) RLW-p54. Open circles are experimental data and the full red line represents the fit to the data using two log-normal distributions of spheres. Red dotted lines represents individual contributions of both distributions.





### Supplementary Section S9: NMR diffusometry.

$^1\text{H}$  NMR pulsed field gradient acquisition (PFG-NMR), also called diffusion ordered spectroscopy (DOSY), was performed on Arg<sub>6</sub>-P54 self-assemblies (9 mg/mL) in deuterated water at 25 °C after a 200 nm filtration. A Bruker 500 MHz AVANCE III HD spectrometer (Wissembourg, France) equipped with a 5 mm-BBFO probe at the ASTRAL NMR facility from Angers University was used. In DOSY measurements, diffusion coefficients are estimated related to chemical shift by the observation of the exponential decay of the NMR signal due to the self-diffusion behaviour taking place between the two gradients of magnetic field<sup>2</sup>.

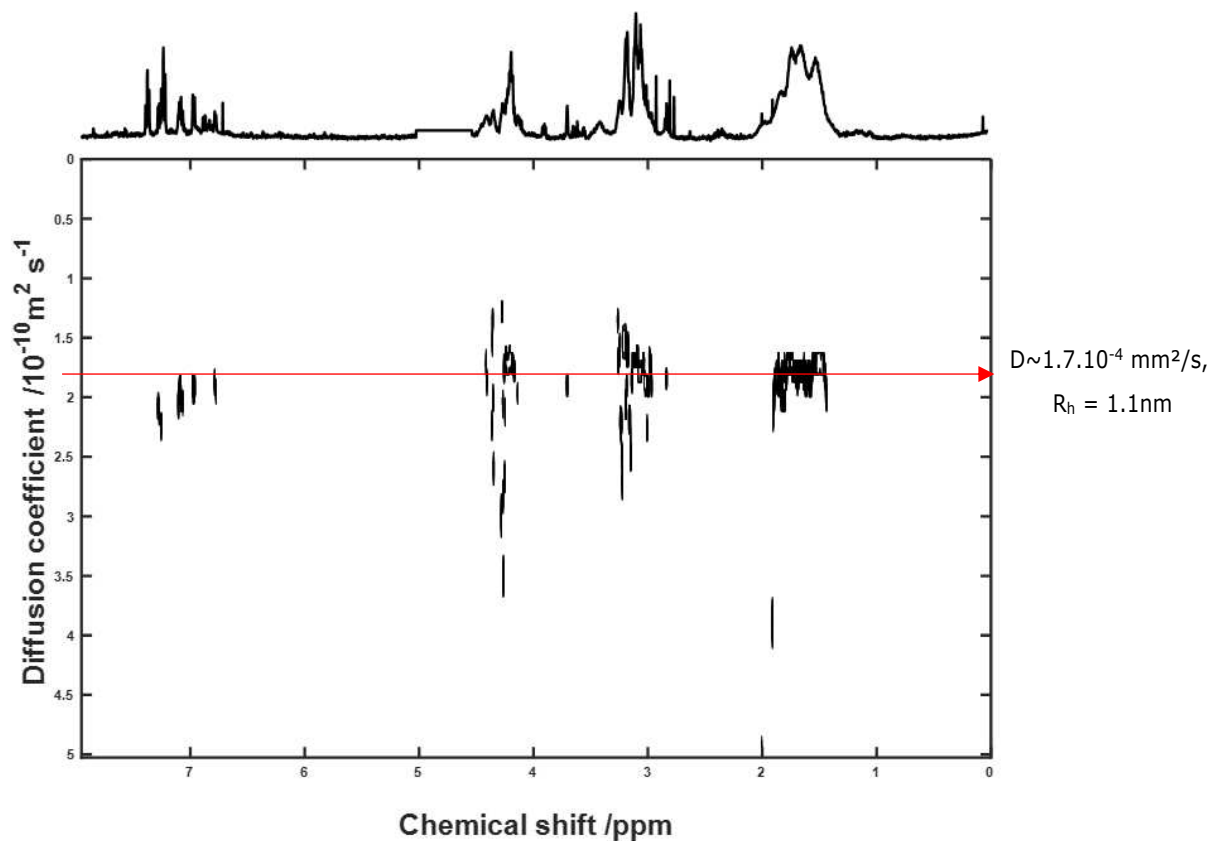
In case of a mixture, the signal can be represented by a the Laplace transform of a diffusion coefficient distribution,  $f(D)$ , of species that contribute to the signal:  $S(b) = S_0 \cdot \int f(D) \cdot \exp(-D \cdot b) \cdot dD$ , where  $b$  is called the diffusion weighted factor.  $b$  is expressed as:  $b = \gamma^2 \cdot g^2 \cdot \delta^2 \cdot (\Delta - \delta/3)$ , with  $\gamma$  the gyromagnetic ratio,  $g$  the gradient intensity,  $\delta$  the gradient duration and  $\Delta$  the gradient separation.

Diffusion experiments were performed using the stimulated echo sequence with longitudinal Eddy current delay (LED), *ledgp2s*. As the larger objects diffusivity was not possible to estimate due to their small contribution, the acquisition parameters were chosen to optimally estimate diffusion coefficients of the

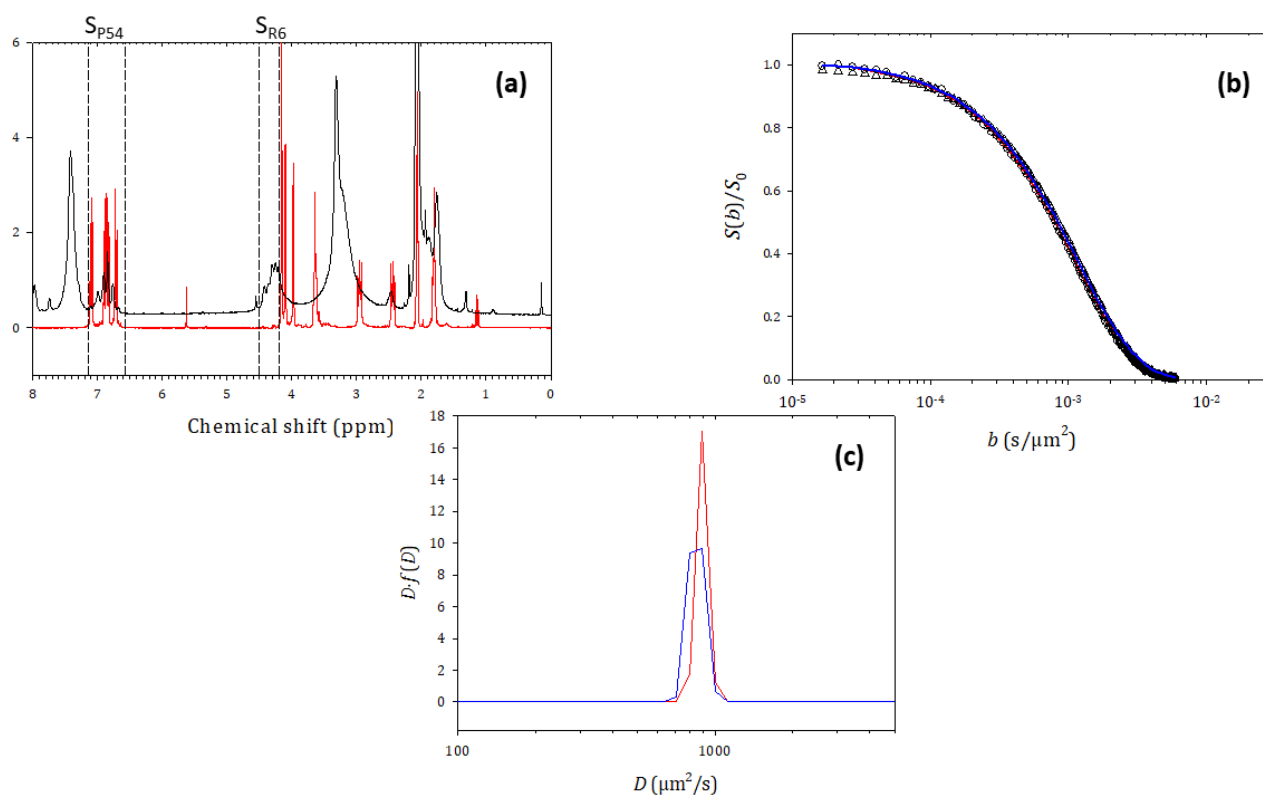


smaller objects<sup>3</sup>. The diffusion time  $\Delta$  was 200 ms, the diffusion gradient duration  $\delta$  was 2.4 ms, the gradient shape ramp was linear with 128 steps and the number of averages was 96. The gradient magnitude ranged from 5 to 95 % of the maximum gradient intensity (50 G.cm<sup>-1</sup>). The relevant integrated domain of spectra signals were measured using TOPSPIN 3.6.1 (Bruker, Wissembourg) then analysed using the REPES ILT algorithm.

Hydrodynamic diameters were calculated from the estimated diffusion coefficient  $D$  according to Stokes-Einstein relation (using 1.10 mPa·s for D<sub>2</sub>O viscosity at 25 °C and 0.31 mPa·s for deuterated acetone viscosity at 25 °C).



Supplementary Figure S9: Results obtained by NMR diffusometry in deuterated acetone: (a)  $^1\text{H}$  NMR spectra in deuterated acetone of p54 (red curve) and Arg<sub>6</sub>-p54 (black curve). Dashed lines display integration domains used to characterize proton signals from p54 ( $S_{\text{P54}}$ : 7.149 - 6.580 ppm) and Arg<sub>6</sub> ( $S_{\text{R6}}$ : 4.514 - 4.198 ppm) in DOSY experiments. (b) DOSY experiments in deuterated acetone 25 °C. Attenuation of integrated NMR signals as a function of the diffusion weighted factor,  $b$ , for p54 (circles) and Arg<sub>6</sub> (triangles). Lines correspond to the fit of the experimental points, p54 (red) and Arg<sub>6</sub> (blue) using the REPES ILT algorithm. (c) Corresponding diffusion coefficient distributions obtained from the ILT of signals displayed in figure S9 b, p54 (red) and Arg<sub>6</sub> (blue). Average diffusion coefficients are 847  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  (blue) and 890  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  (red). Both correspond to objects with a hydrodynamic diameter close to 1.6 nm.



## REFERENCES

- (1) Glatter, O. *Scattering Methods and Their Application in Colloid and Interface Science*; 2018, Amsterdam: Elsevier.
- (2) Stejskal, E. O.; Tanner, J. E. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42* (1), 288–292. <https://doi.org/10.1063/1.1695690>.
- (3) Franconi, F.; Lemaire, L.; Siegler, B.; Gimel, J.-C.; Saulnier, P. NMR Diffusometry Data Sampling Optimization for Mixture Analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *148*, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.028>.

Nous avons ainsi mis en place une plateforme innovante permettant de transporter une molécule hydrophobe. Nous avons constaté que la DLS permettait d'observer moins de 1 % de la matière présente qui s'auto-assemblait en nanoparticules de 100 nm de diamètre. Une analyse plus approfondie de la suspension (analyse NTA, SAXS, quantification après filtration et diffusométrie RMN) a montré la présence de petits objets d'un diamètre inférieur à 4 nm.

Cette étude souligne l'importance de la méthode utilisée pour caractériser la suspension. La diffusion dynamique de la lumière, méthode rapide et peu coûteuse, peut ainsi être appliquée comme analyse préliminaire, mais il est important d'effectuer des analyses complémentaires afin d'obtenir des résultats fiables quant à la taille des auto-assemblages obtenus et l'homogénéité de la suspension.

## **Chapitre 2 : « *Self-assemblies of cell-penetrating peptides and ferrocifens: design and evaluation of an innovative platform for lung cancer treatment* »**

Pour des raisons de temps et de coût et afin de pouvoir avancer sur la caractérisation biologique des différents auto-assemblages, nous avons décidé, pour la suite du projet, de caractériser les auto-assemblages par DLS, mais en gardant bien à l'esprit que le diamètre présenté ne représente qu'une fraction négligeable de l'échantillon étudié. Pour autant, cette caractéristique nous permettra de comparer nos différentes suspensions, afin de valider la formulation.

Dans ce chapitre, l'activité biologique des suspensions a été évaluée sur deux lignées pulmonaires cancéreuses et une lignée pulmonaire saine. La quantification de l'internalisation a été étudiée afin de déterminer la spécificité du peptide pénétrant RLW. De plus, un auto-assemblage de deuxième génération a été réalisé en incorporant du polyéthylène glycol (PEG) dans la structure des objets. En effet, la voie d'administration privilégiée dans cette étude est la voie pulmonaire : le PEG permettrait d'échapper aux cellules ciliées, aux macrophages, de diffuser à travers le mucus, tout en protégeant le peptide d'une dégradation enzymatique prématurée. La conjugaison du PEG avec le p54 a été effectuée *via* un lien ester, clivable par les estérases. La co-nanoprécipitation CPP-p54/PEG-p54 a été étudiée à différents ratios molaires, et les différentes suspensions ont été testées *in vitro* afin de déterminer la plus efficace. Ces études ont permis de sélectionner une suspension pour les études *in vivo* : la suspension Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 avec pour ratio molaire 10/1. Enfin, l'administration de la suspension par nébulisation intratrachéale a été étudiée sur un modèle murin orthotopique de cancer bronchique.

# Self-assemblies of cell-penetrating peptides and ferrocifens: design and evaluation of an innovative platform for lung cancer treatment

Léna Guyon<sup>a</sup>, Elise Lepeltier<sup>\*a</sup>, Abdallah Ladaycia<sup>a</sup>, Agnese Bosio<sup>a</sup>, Laurent Lemaire<sup>a</sup>, Bénédicte Lelièvre<sup>b</sup>, Nolwenn Lautram<sup>a</sup>, Aurélien Dupont<sup>c</sup>, Pascal Pigeon<sup>d</sup>, Patrick Saulnier<sup>a</sup>, Gérard Jaouen<sup>d</sup>, Catherine Passirani<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Micro et Nanomédecines Translationnelles, MINT, UNIV Angers, UMR INSERM 1066, UMR CNRS 6021, Angers, France

<sup>b</sup>Centre régional de pharmacovigilance, Laboratoire de pharmacologie-toxicologie, CHU Angers, 4 rue Larrey, F-49100 Angers, France

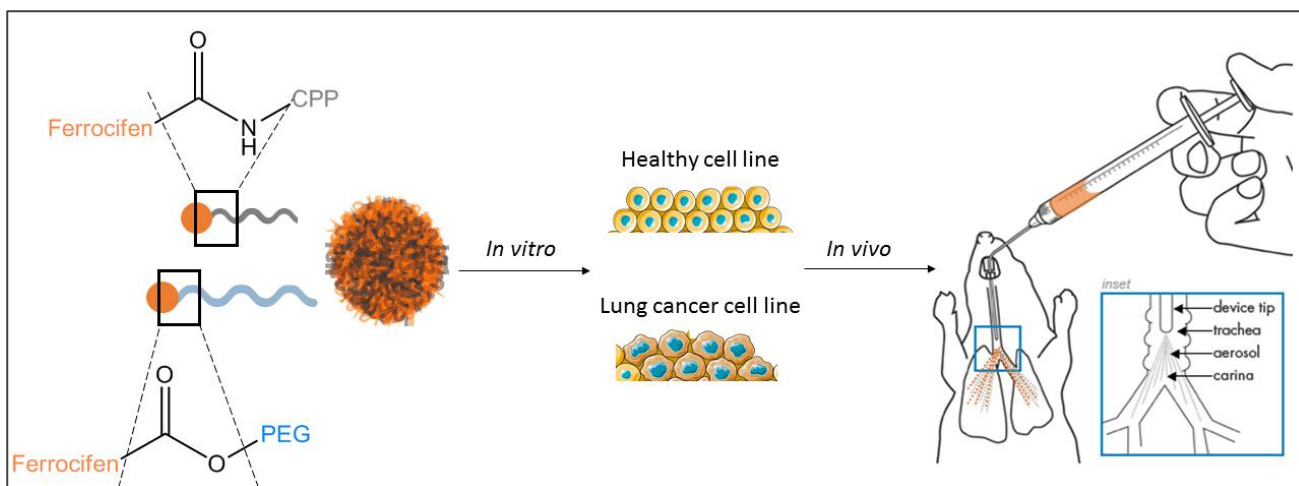
<sup>c</sup>Univ Rennes, CNRS, Inserm, BIOSIT - UMS 3480, US\_S 018, F-35000 Rennes, France

<sup>d</sup>Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, UMR 8232, IPCM and PSL Chimie Paris Tech, Paris, France

\*E-mail: [elise.lepeltier@univ-angers.fr](mailto:elise.lepeltier@univ-angers.fr)

## Abstract

Chemotherapy currently used for the lung cancer treatment often consists of a combination of drugs, with a moderate efficacy and several severe side effects. In fact, a major drawback of the classical inorganic drugs used are their hydrophobicity that leads to a very low targeting efficiency. To overcome this constraint, a platform was set up in order to vectorize a ferrocifen drug called p54, an organometallic tamoxifen derivatives known for its really potent *in vitro* activity, but known as well for its really poor water solubility. The covalent conjugation of a cell-penetrating peptide (CPP) to this ferrocifen was performed, leading to an amphiphilic prodrug, potentially able to self-assemble. CPP used in this project are polyarginines (Arg<sub>n</sub>, n=6-9), used as CPP models, and RLW (RLWMRWYSPRTRAYG), known to specifically target A549 cells. Moreover, in order to bring stealth and mucopenetration properties, polyethylene glycol (PEG) was also incorporated into the structure by a covalent link between the hydrophilic PEG chain and the hydrophobic ferrocifen. The co-nanoprecipitation of CPP-p54 and PEG-p54 was investigated to obtain self-assemblies. A comparison of the biological activity of the different suspensions was assessed *in vitro* on a healthy cell line (BEAS-2B) and on two different lung cancer cell lines (A549 and NCI-H460). The biological activity of p54 was increased by a factor 9 with the Arg<sub>9</sub>-p54 suspension, by increasing the cell internalization. Moreover, the preliminary *in vivo* study on mice bearing NCI-H460 tumor showed that the intratracheal nebulization of Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 suspension (10/1 in moles) led to a decrease in tumor volume by a factor 3, without any sign of toxicity.



## Introduction

Lung carcinoma is the major cause of cancer-related death worldwide<sup>1</sup>, more particularly the non-small cell lung cancers (NSCLCs), accounting for about 85 % of all lung cancers diagnosis<sup>2</sup>. The chemotherapy treatment currently used consists of a combination of drugs: usually, cisplatin or carboplatin are used in combination with vinorelbine, gemcitabine, paclitaxel, docetaxel or pemetrexed<sup>3-5</sup>. Despite continuous improvements in cancer treatments, the prognosis is poor, the efficacy is moderated and there are a lot of side effects. Thus, the development of new approaches is needed. In the last decade, numerous nanocarriers have been designed as a transport module for anticancer drugs. Among them, self-assemblies formed by peptides and more particularly cell-penetrating peptides (CPP) have recently emerged as promising systems for controlled delivery of drug<sup>6</sup>. In fact, peptides have attractive properties due to their simple structure, biocompatibility and chemical diversity. In addition, CPP have the ability to cross cell membranes and enhance the intracellular delivery of conjugated cargos<sup>7,8</sup>. The CPP are usually short peptides, containing a high relative abundance of positively charged amino acids such as arginine and/or lysine<sup>9</sup>. Nowadays, two main strategies for formulating drug loaded nanostructures formed by peptides can be used. The first one is to physically encapsulate drug into nanostructures formed of peptides. Stupp *and al.* used this strategy and synthesized amphiphilic peptides that can self-assemble into nanofibers. These nanostructures were used as a vector in order to carry camptothecin<sup>10</sup>. The second one is to covalently link the peptide to a drug in order to form peptide-drug conjugates. The amphiphilic conjugates could potentially then self-assemble into nanostructures<sup>11</sup>. To this end, Cui's group has designed and synthesized a taxol-peptide conjugate that self-assembled into supramolecular filaments with a final drug loading of 41 %<sup>12</sup>. This last strategy allows to have an increase of the drug loading, compared to the drug-encapsulated peptide nanoparticles.

Over the past few years, Pr. Jaouen and his team have developed potent bioorganometallic complexes for anticancer application. Their chemistry is based on the coupling between a ferrocene moiety and a hydroxytamoxifen molecule in order to form ferrocifen molecules<sup>13,14</sup>. The mechanism of action is related to the redox features of Fe through the reversible Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> oxidation, leading to the production of ROS species

and to a quinone methide, known to perform macromolecular interactions with thioredoxin reductase system, glutathione or DNA. Interestingly, ferrocifens are able to act by senescence at low concentrations and by apoptosis or Fenton reaction at increasing concentrations<sup>15</sup>. Moreover, ferrocifens have shown impressive *in vitro* biological activity. For instance, FcOHTam, one of the first studied ferrocifens, had IC<sub>50</sub> of 0.5  $\mu$ M against hormone-dependent breast cancer cells<sup>16</sup>, highly interesting compared with ferrocene and hydroxytamoxifen taken separately (160  $\mu$ M and 30  $\mu$ M, respectively). However, ferrocifens are highly insoluble in water, requiring a formulation stage before being *in vivo* administrated.

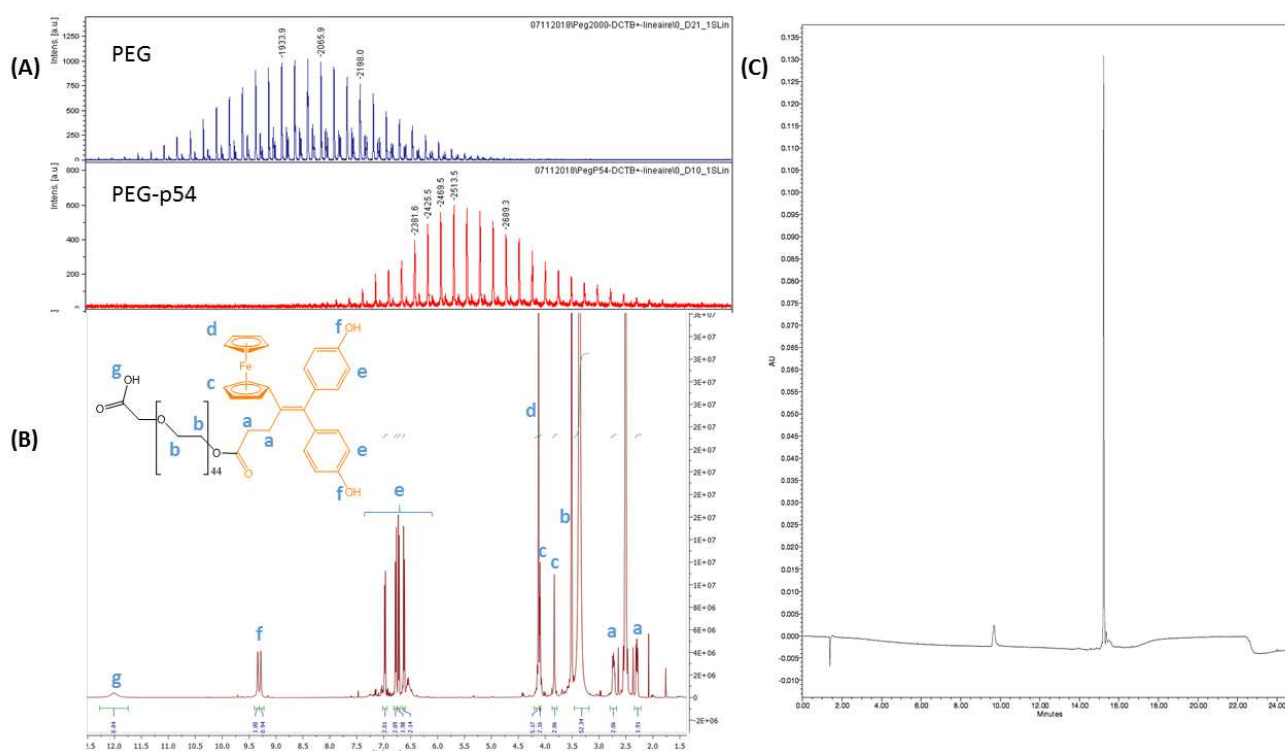
Recently, we proposed the design of an innovative platform in order to transport a hydrophobic ferrocifen (p54)<sup>17</sup>. In this previous study, the synthesis of amphiphilic conjugates (CPP-p54) formed by two different cell-penetrating peptides Arg<sub>n</sub>-p54 (n = 6 to 9) and RLW-p54, their self-assembly in water as well as the complete characterization of the nano-objects formed were performed. RLW (with a primary sequence of RLWMRWYSPRTRAYG) was known in literature to specifically target A549 cells<sup>18-20</sup>. Polyarginines (Arg<sub>n</sub>, n=6-9), known to possess remarkable internalization properties when they have between 6 and 9 arginine units, were used for comparison as CPP models<sup>21</sup>. In fact, these polycationic peptides have even demonstrated to enter cells more effectively than other homopolymers<sup>22</sup>.

The biological activity of the nanocarriers was assessed against two non-small cell lung cancer cell lines (A549 and NCI-H460) and against one human bronchial epithelium cell line (BEAS-2B). Quantification of the internalization was evaluated in order to characterize the potential specificity of CPP. Moreover, incorporation of polyethylene glycol (PEG) into a selected CPP-p54 nanostructure was investigated *in vitro* and *in vivo*. Indeed, PEG will bring stealth and mucopenetration<sup>23-25</sup> properties to the formulated nanosystem<sup>26</sup>. To this end, PEG-p54 conjugates was synthesized and the co-nanoprecipitation of CPP-p54 and PEG-p54 was investigated using a solvent displacement technique at different mole ratios of CPP-p54 versus PEG-p54. *In vitro* studies were performed on healthy and NCI-H460 cell lines. Finally, *in vivo* experiments were carried out on an orthotopic NCI-H460 tumor immunodepressed murine model<sup>27</sup>. The intratracheal administration route<sup>28-30</sup> allowed the suspension to be sprayed directly into the lung, using a MicroSprayer™ aerolizer and resulting in a nanoparticle deposition in the smaller airways (bronchi and bronchioles).

# 1. Results and discussion

## 1.1. Synthesis and characterization of conjugates

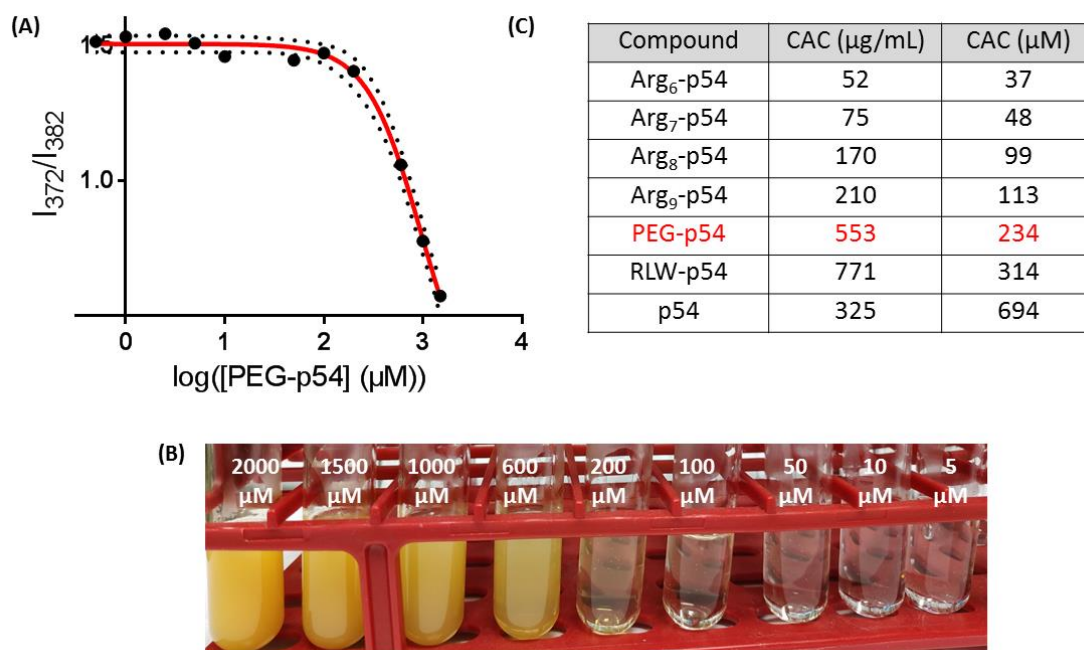
CPP were covalently linked to p54 moiety through an amide bond during the solid phase peptide synthesis<sup>17</sup>. PEG was linked to p54 via an ester bond, using HBTU as a coupling reagent. After purification by RP-HPLC, PEG-p54 was analyzed by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and mass spectrometry (Figure 1A and 1B, for more detailed information see section S1 in the Supporting Information). The MALDI-TOF spectra of free PEG was compared to the PEG-p54 spectra. A shift of the PEG signal peaks confirmed that the coupling reaction was successful (Figure 1A). Moreover, UPLC experiment was performed to quantify the purity of the PEG-p54 (Figure 1B). Finally, PEG-p54 was obtained with a yield of around 11 % and a purity of 90 %. The yield obtained was low because HO-PEG-COOH could obviously react on itself.



**Figure 1.** Characterization of purified PEG-p54: **(A)** MALDI-TOF spectra of free PEG and PEG-p54 in linear mode, **(B)** <sup>1</sup>H NMR spectrum in deuterated dimethyl sulfoxide and **(C)** UPLC chromatogram of PEG-p54 at 450 nm.

PEG-p54 being amphiphilic, its propensity to self-assemble was investigated using the pyrene fluorescence 1:3 ratio method<sup>31</sup>. Thus, the critical aggregation concentration (CAC) of PEG-p54 was determined and was compared with results previously obtained from CPP-p54 (Figure 2). Data obtained were well fitted by a Boltzmann-type sigmoid, showing the onset of self-assembly at 234  $\mu$ M. CAC value obtained for PEG-p54 was between Arg<sub>9</sub>-p54 (113  $\mu$ M) and RLW-p54 (314  $\mu$ M). These results were in agreement with previous studies<sup>32,33</sup>: an increase of the CAC was observed with an increase of the hydrophilic part.



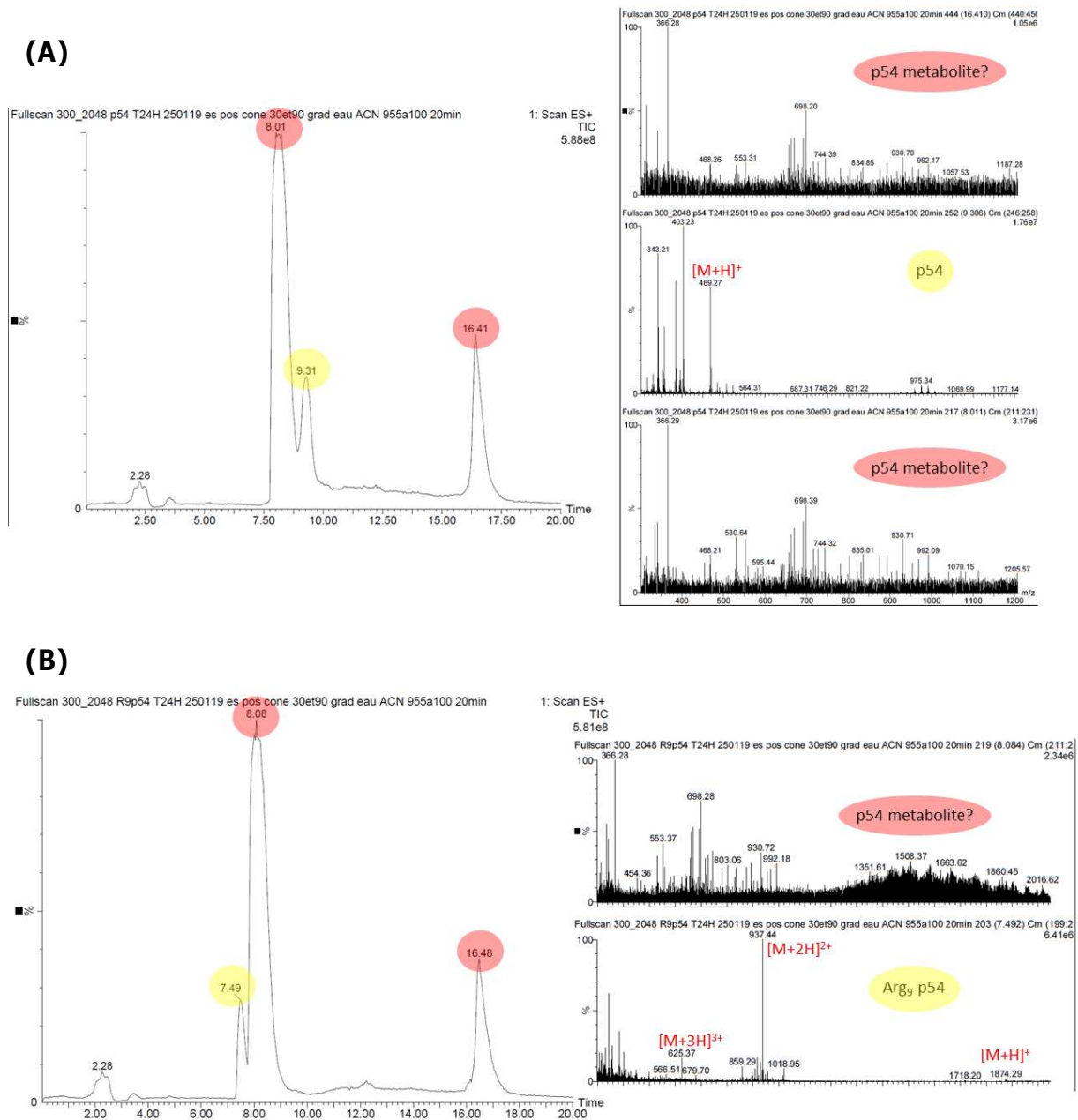


**Figure 2.** CAC determination using the pyrene fluorescence 1:3 ratio method. **(A)** Quotient of vibrational band intensities ( $I_{372}/I_{382}$ ) as a function of  $\log [\text{PEG-p54}]$ , **(B)** suspensions used for the CAC determination and **(C)** comparison of the PEG-p54 CAC obtained with CPP-p54 concentrations.

According to these results, the formulation process was performed at a concentration above all these CAC values.

## 1.2. Stability study of CPP-p54 and PEG-p54 in biological medium

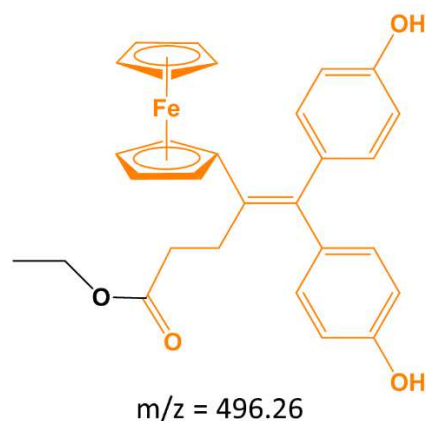
To investigate the stability of CPP-p54 in biological medium and to know if the amide bond could be cleaved, conjugates in ethanol were diluted in RPMI. After 0, 2, 6 and 24 hours, conjugates in medium were analyzed by LC-MS/MS. Chromatograms revealed the disappearance of the CPP-p54 signal after 24 h in negative mode and at 450 nm. To go further, the same analysis was performed in positive mode and results were compared with p54 alone (Figure 3). Spectra obtained for p54 alone after 24 hours in medium revealed the presence of another compound, a p54 metabolite ( $m/z = 698$  and  $366$ ). Two different compounds were observed for Arg<sub>9</sub>-p54 in medium after 24 hours: one minor, intact Arg<sub>9</sub>-p54, and one major corresponding to the p54 metabolite ( $m/z = 698$  and  $366$ ). This metabolite, bigger than p54 alone, was observed at two different retention times on the chromatogram. According to this result, p54 metabolite could be an amphiphilic molecule that self-assemble under the HPLC conditions.



**Figure 3.** Chromatograms and mass spectra obtained by LC-MS/MS after 24 hours in RPMI medium for **(A)** p54 alone and **(B)** Arg<sub>9</sub>-p54.

As a result, the amide bond may be cleaved after 24 hours in biological medium with a production of a p54 metabolite. It could be interesting to isolate this metabolite and to perform NMR analysis in order to precisely identify the molecule.

The stability of PEG-p54 was also investigated in RPMI medium (Supporting Information, Figure S1). In this case, a progressive disappearance of PEG signal was observed with the apparition of a new signal after 24 hours ( $m/z = 496$ ). Due to the fact that this signal was not present in the p54 spectra after 24 hours, this metabolite could be a result of a new product: p54 and a part of PEG (Figure 4).



**Figure 4.** Suggested chemical structure of p54 metabolite obtained after 24 h of PEG-p54 in RPMI medium.

According to these results two different metabolites could be produced either by CPP-p54 or PEG-p54 after 24 hours in biological medium.

### 1.3. Biological activity of CPP-p54 suspensions: viability assay and internalization quantification

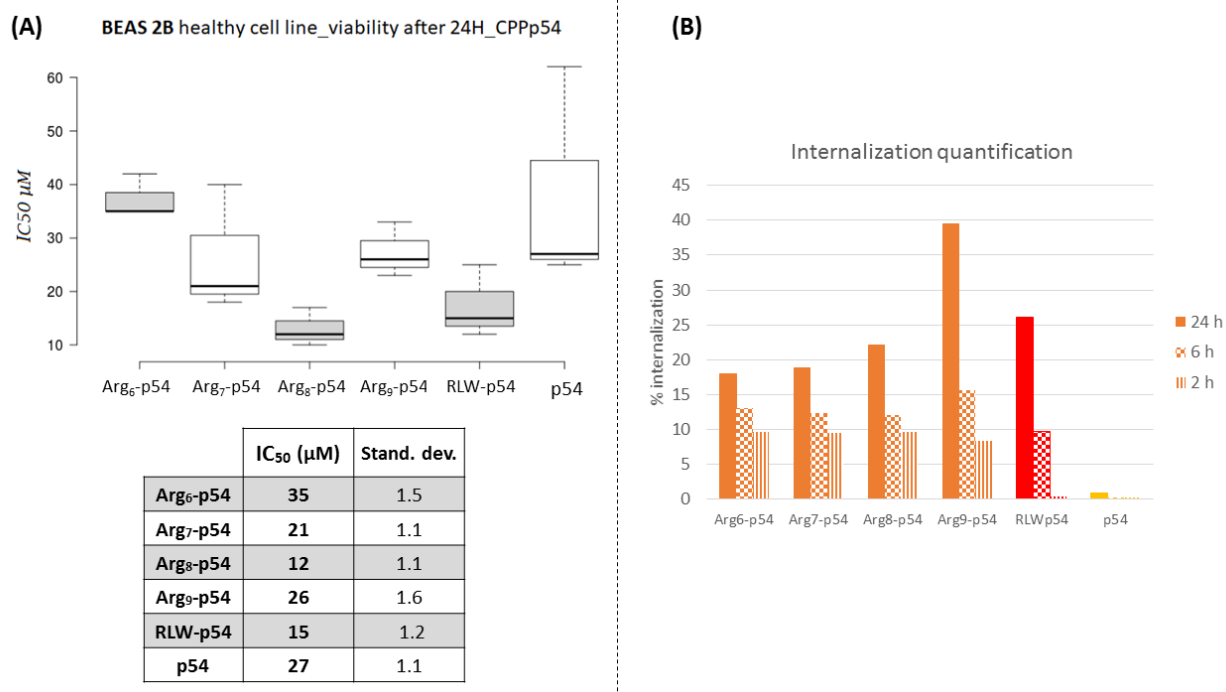
Self-assemblies of Arg<sub>n</sub>-p54 (n = 6 to 9) and RLW-p54 were obtained and characterized by dynamic light scattering (DLS). CPP-p54 suspensions showed spherical nanostructures with a size range between 111 and 128 nm and a polydispersity index lower than 0.25. The biological activity of these suspensions was assessed against three different cell lines: a healthy human bronchial epithelium cell line (BEAS-2B) and two human lung cancer cell lines (A549 and NCI-H460).

#### 1.3.1. Cytotoxicity and internalization evaluation on healthy cell line

The influence of the peptide length on the cytotoxic activity was investigated in a human bronchial epithelium cell line (BEAS-2B) and the results were compared with the free p54. First of all, a cell viability assay was performed using a MTT assay after 24 hours of treatment with various concentrations and showed no significant difference between CPP-p54 suspensions and free p54 (Figure 5A). All the IC<sub>50</sub> values were in the same range and no tendency was observed in function of the peptide length. Moreover, no specificity of RLW was observed, even if this peptide was supposed to less enter than Arg<sub>n</sub>-p54<sup>20</sup>. This could be a result of the N-ter modification of the RLW peptide, due to the covalent linkage between RLW and p54: in literature, this specificity has only been proven with free RLW or after a C-ter conjugation<sup>34</sup>. Even if the specificity mechanism is not known, this study raised the importance of the terminal amine.

In order to go deeply, the cell internalization was quantified by ICP-MS, by directly following the iron Fe<sup>II</sup> (<sup>56</sup>Fe) from the ferrocifen moiety. Compared with traditional methods using fluorescent dyes, where we never know if a leak of the dye or a destabilization of the nanosystem<sup>35,36</sup> could happen, here self-assemblies are observed as is. An ICP-MS method has been performed at different time points and showed that the higher internalization percentage was obtained after 24 h (Figure 5B). Furthermore, for polyarginine, the peptide length had an impact on the internalization: an increase of the internalization was observed when

the peptide length increased, in accordance with literature<sup>22,37</sup>. Free p54 was not able to enter in cells without the presence of CPP, even after 24 h. However, its IC<sub>50</sub> was closed to the Arg<sub>9</sub>-p54 one, suggesting different mechanisms of action. In fact, free p54 could disturb the cell membrane while Arg<sub>9</sub>-p54 suspension could act intracellularly through known ferrocifen mechanisms<sup>14,15</sup>.



**Figure 5.** Biological activities of CPP-p54 suspensions on BEAS-2B cell line. **(A)** Cell viability assay with corresponding IC<sub>50</sub> (n=3) and **(B)** internalization quantification by ICP-MS (n=1).

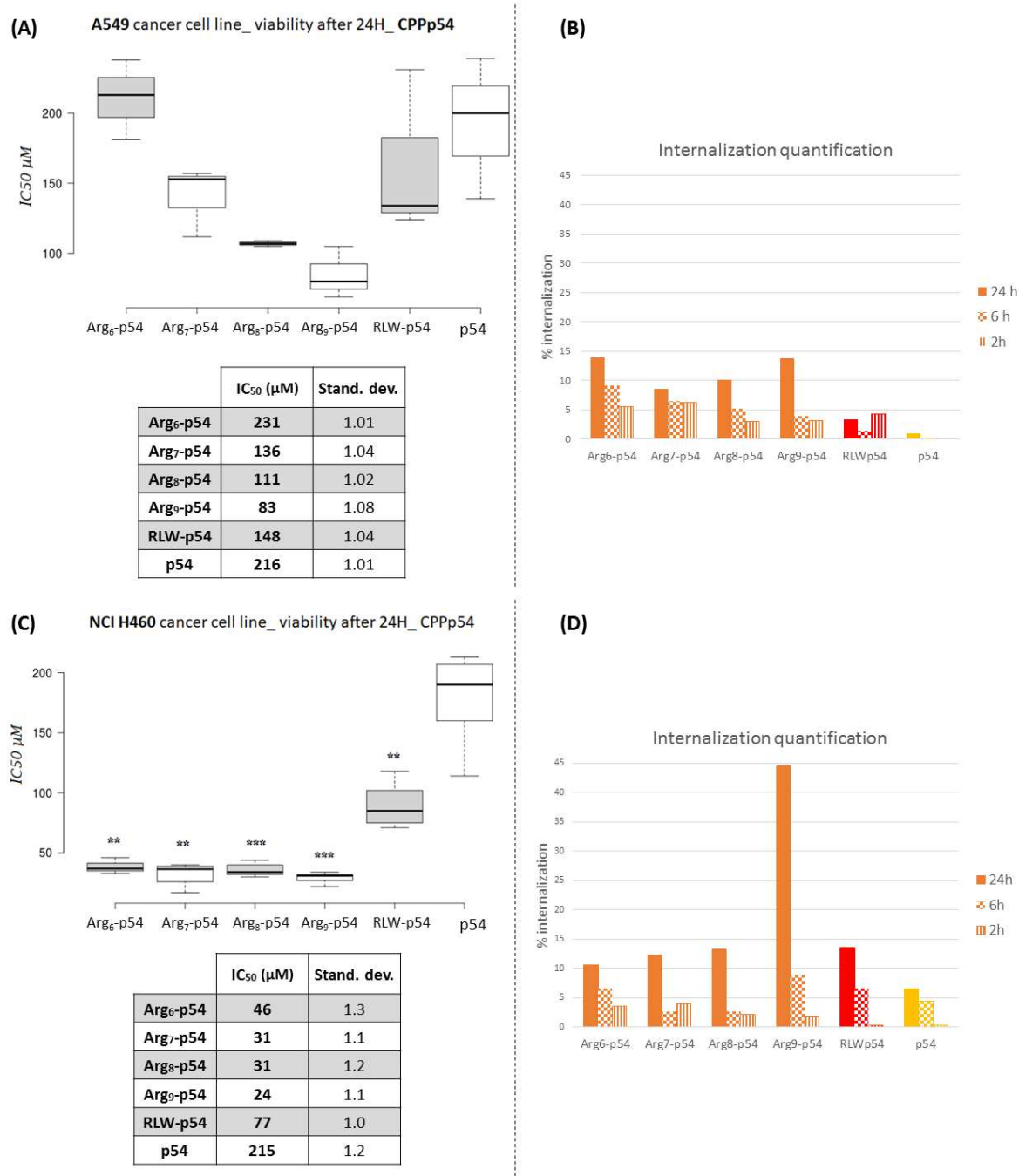
### 1.3.2. Cell viability and internalization quantification on lung cancer cells

The same experiments were performed on two different non-small-cell lung cancer cells lines: A549, an adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell line and NCI-H460, a large-cell carcinoma line.

A comparison of the biological activity of p54 alone and drugs that are usually used in clinic (paclitaxel and cisplatin) revealed that p54 was not very active alone in terms of IC<sub>50</sub><sup>38-40</sup>. Viability assay performed on A549 showed that the peptide length had an impact on the toxicity: an increase of the peptide length resulted in increased the Arg<sub>n</sub>-p54 suspension toxicities (Figure 6A). In fact, Arg<sub>9</sub>-p54 was more efficient than the other suspensions. However, no statistically significant difference was observed between suspensions and free p54. In order to see if the toxicity was linked to the cell internalization, ICP-MS was performed on A549, at several treatment times (2 h, 6 h and 24 h). The percentage of internalization observed was lower than 20 % for all suspensions, even after 24 h of treatment (Figure 6B). Additionally, these experiments confirmed the non-specificity of the RLW peptide, when this CPP is covalently link to the ferrocifen moiety. Moreover, these results highlighted again the important role of the CPP for the ferrocifen internalization. Interestingly, the lowest IC<sub>50</sub> obtained for Arg<sub>9</sub>-p54 suspension did not show any difference in terms of cell uptake, compared with the other Arg<sub>n</sub>-p54 lengths. This result proved again that an improved *in vitro* biological activity is not only due to a better cell internalization and could be explained by the potential different nature of

internalization pathways between the self-assemblies, leading or not to an inactivation of the drug once internalized<sup>41</sup>.

These results were confirmed on NCI-H460 cells. In fact, the same trend was observed for the peptide length and RLW efficacy: Arg<sub>9</sub>-p54 suspension has shown to be the most efficient (Figure 6C). However, free p54 had a very high IC<sub>50</sub>, which was statistically different from conjugates. For this cell line, ICP-MS experiments were in accordance with the IC<sub>50</sub> obtained, with a higher percentage of internalization for Arg<sub>9</sub>-p54: with this suspension, it was possible to increase the internalization of p54 by a factor 7 after 24 h of treatment (Figure 6D).



**Figure 6.** Biological activities of CPP-p54 suspensions on two lung cancer cell lines. **(A)** Cell viability assay on A549 cell line (n=4), **(B)** internalization quantification results obtained in A549 cell line by ICP-MS (n=1), **(C)** cell viability assay on NCI-H460 (n=4) and **(D)** internalization quantification results obtained in NCI-H460 cells (n=1). The significance value

was calculated using a Mann-Whitney test \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$ .  $n=4$ . Statistical analysis was performed using p54 as reference.

## 1.4. Co-nanoprecipitation of CPP-p54/PEG-p54

Regarding to the *in vitro* results obtained for CPP-p54, Arg<sub>9</sub>-p54 was chosen to study the co-nanoprecipitation with PEG-p54. In fact, in order to overcome the polycation dilemma<sup>42</sup>, to protect the peptide, evade detection by macrophages<sup>43</sup> and to cross the mucus<sup>44</sup>, the idea was to incorporate PEG in the structure of self-assemblies. Suspensions with different molar ratios of CPP-p54/PEG-p54 were formulated: 10/1, 2/1, 1/1 and 1/2. Self-assemblies obtained were characterized by DLS (Figure 7). Self-assemblies of PEG-p54 alone were obtained with a size of 146 nm. A slight increase of the size was observed with the incorporation of PEG-p54 in the Arg<sub>9</sub>-p54 nanostructures. In fact, particles with a size of 203 nm were obtained with the larger amount of PEG-p54 (Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 : 1/2). However, a decrease in suspension stability was observed with an increase of the molar ratio of PEG-p54: a precipitate was clearly observed and the DLS measurement was only performed on the part in suspension (Figure S1 in the Supporting Information).

Suspension	DLS	
	Size (nm)	PDI
Arg <sub>9</sub> -p54	111 ± 17	0.15 ± 0.04
PEG-p54	146	0.16
Arg <sub>9</sub> -p54/PEG-p54 <b>10/1</b>	151	0.17
Arg <sub>9</sub> -p54/PEG-p54 <b>2/1</b>	145	0.10
Arg <sub>9</sub> -p54/PEG-p54 <b>1/1</b>	165	0.05
Arg <sub>9</sub> -p54/PEG-p54 <b>1/2</b>	203	0.06

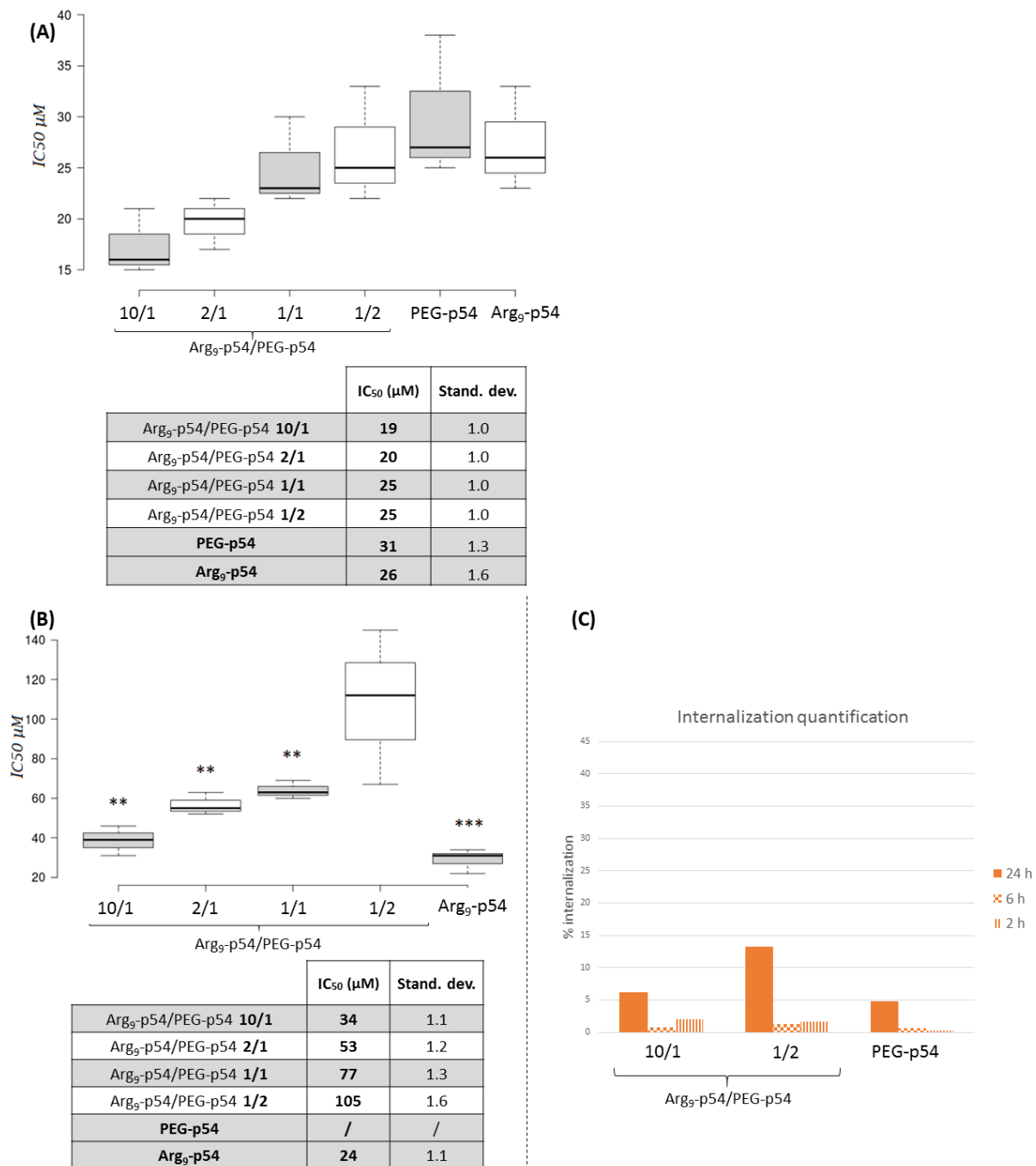
**Figure 7.** Features of Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 suspensions obtained by DLS. PDI is the particle size polydispersity index.

### 1.4.1. Biological activity of Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 suspensions: viability assay and internalization quantification

In this part, all the results were expressed in function of the p54 concentration, knowing that the molar ratio between Arg<sub>9</sub> and p54 is 1/1, as for PEG-p54 conjugate.

Viability assays were performed on healthy cell line (BEAS-2B cells) and on lung cancer cells (NCI-H460). A549 cell line was not used due to the fact that these cells were resistant to p54 (Figure 6). Suspension toxicities on BEAS-2B cell line were shown in Figure 8A. Interestingly, PEG-p54 suspension (without Arg<sub>9</sub>) had an effect on cell viability with an IC<sub>50</sub> closed to Arg<sub>9</sub>-p54 (31 μM for PEG-p54 and 26 μM for Arg<sub>9</sub>-p54). Moreover the incorporation of PEG-p54 in the structure of self-assemblies had no impact on the cytotoxicity.

On NCI-H460, the presence of PEG had a significant impact on the IC<sub>50</sub> values: higher IC<sub>50</sub> was obtained with a higher amount of PEG, assuming that PEG could hide CPP, causing a decrease of the biological activity<sup>45-48</sup> (Figure 8B). In fact, PEG could shield the cell penetrating peptide feature of Arg<sub>9</sub>-p54, resulting in a decrease of cell internalization. Moreover, it is known that PEG decreases the cell uptake<sup>49,50</sup>. It is important to note that no toxicity was observed for PEG-p54 alone in this range of concentration and the highest IC<sub>50</sub> was obtained for the suspension containing the highest amount of PEG (Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 : 1/2). Moreover, all the results obtained for Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 suspensions were statistically significant compared to free p54. The internalization quantification was also investigated with Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 suspensions (10/1 and 1/2) and PEG-p54 suspension, on NCI-H460 cells (Figure 8C) after 2, 6, and 24 hours. As it was shown, almost the same percentage of internalization (lower than 14 %) was obtained. According to these results, different cell internalization pathways could be hypothesized.



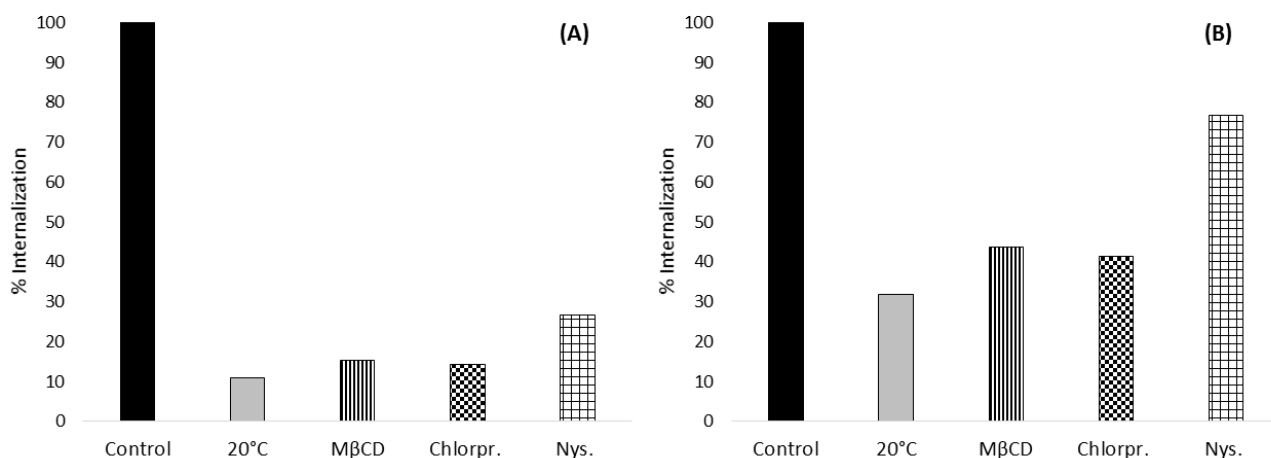
**Figure 8.** Biological activities of Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 suspensions at different molar ratios. **(A)** Cell viability assay on BEAS-2B cell line (n=3), **(B)** cell viability assay on NCI-H460 (n=3) and **(C)** internalization quantification results obtained in NCI-H460 cells (n=1). The significance value was calculated using a Mann-Whitney test \*p ≤ 0.05; \*\*p ≤ 0.01; \*\*\*p ≤ 0.005. n=3. Statistical analysis was performed using p54 as reference.

#### 1.4.2. Internalization pathways

To define whether a particular pathway (clathrin, caveolin-coated pits and macropinocytosis) could be used by the selected conjugate (Arg<sub>9</sub>-p54 suspension) to penetrate in BEAS-2B or A549 cells, the cellular uptake mechanism was investigated after 24 hours. Cells were pre-treated with different uptake inhibitors. Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) was used to perturb the formation of both clathrin-coated pits and caveolin-coated endocytic vesicles<sup>51-53</sup>. Chlorpromazine hydrochloride (Chlorpr.) has been reported to inhibit clathrin-



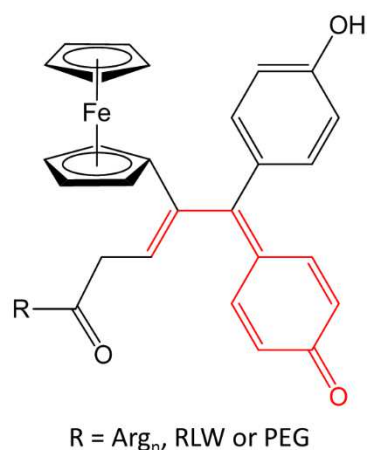
dependent endocytosis<sup>52,54</sup> and nystatin (Nys.) was used to inhibit caveolin-dependent endocytosis<sup>55</sup>. Additionally, treated cells were incubated at 20 °C to discriminate active from passive pathways. Results are reported in Figure 9A for BEAS-2B and Figure 9B for A549.



**Figure 9.** The Arg<sub>9</sub>-p54 suspension internalization in **(A)** BEAS-2B (n=1) and **(B)** A549 cells (n=1). Cells were pre-treated with 10 μM methyl-β-cyclodextrin (MβCD), 50 μM chlorpromazine (chlorpr.) and 27 μM nystatin (nys.) during 30 min. Then, they were incubated with 5 μM of Arg<sub>9</sub>-p54 suspension during 24 h. Control: untreated. 20 °C: untreated with inhibitors and incubated with 5 μM of Arg<sub>9</sub>-p54 suspension during 24 h at 20 °C. Cellular uptake was assessed by ICP-MS analysis and percentage of internalization was determined comparatively with control.

ICP-MS analysis revealed that the uptake was strongly reduced in A549 and BEAS-2B cells at 20 °C, meaning that the internalization of Arg<sub>9</sub>-p54 was temperature and energy dependent. This result highlighted that self-assemblies penetrated in cells mainly through an active internalization pathway, rather than diffusion across cell membrane. Moreover, MβCD inhibits the self-assemblies uptake by 85 % in BEAS-2B cells and 68 % in A549, showing that the entry was performed through clathrin and caveolin-dependent endocytosis. To further confirm these results, chlorpromazine and nystatin were used. When healthy cells (BEAS-2B) and lung cancer cells (A549) were treated with these inhibitors, Arg<sub>9</sub>-p54 self-assembly uptake was affected. Results obtained confirmed that the uptake occurs mainly via clathrin and caveolin-dependent endocytosis. In both cell lines, clathrin-dependent endocytosis would appear as the preferred pathway for Arg<sub>9</sub>-p54 self-assemblies. Usually, direct penetration is suggested for the free peptide Arg<sub>9</sub><sup>56</sup> but it was also demonstrated in several other studies that arginine rich CPP could penetrate through endocytic pathways even if this peptide was covalently linked to a cargo molecule<sup>57-60</sup>. It is important to note that the nature of the cells as well as the presence and cargo type may impact the uptake mechanism used by the CPP<sup>61</sup>.

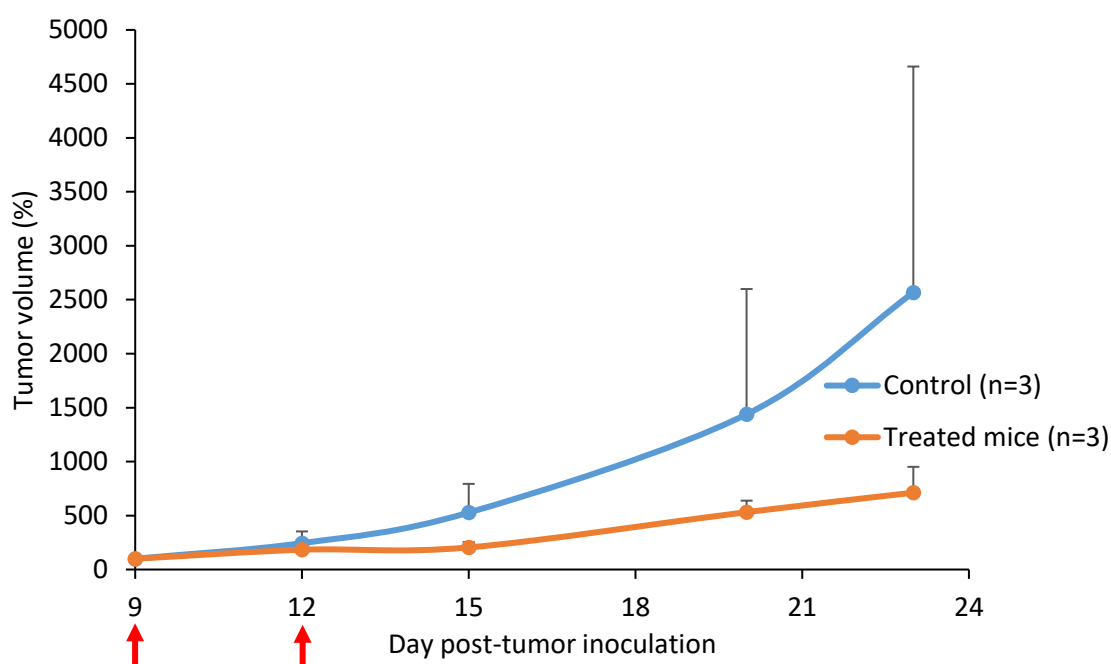
The difference of biological activities and internalization between CPP-p54 suspensions and CPP-p54/PEG-p54 suspensions could be explained by the difference of metabolites produced. The p54 could produce reactive oxygen species and quinone methide with CPP or PEG covalently linked (Figure 10). However, the potential degradation of p54 could change, function of the internalization pathways.



**Figure 10.** Chemical structure of the quinone methide obtained with CPP-p54 and PEG-p54.

### 1.5. Preliminary *in vivo* study

The antitumor activity of Arg<sub>9</sub>-P54/PEG-P54 : 10/1 suspension was assessed *in vivo* in a NCI-H460 subcutaneous xenograft model in nude mice<sup>27</sup>. First of all, the mice weight curve over the treatment period showed that no toxicity of Arg<sub>9</sub>-P54/PEG-P54 10/1 suspension was observed (Figure S3). Treatment was administrated through the intratracheal route at day 9 and day 12. The tumor evolution for each group (control and treated mice) was plotted in Figure 11.



**Figure 11.** Tumor volume evolution on an orthotopic lung cancer murine model. Mice were injected with NCI-H460 in Matrigel at day 0. At day 9 and 12, mice were treated through the intratracheal route with physiological water or with Arg<sub>9</sub>-P54/PEG-P54 10/1 suspension (red arrows). The tumor size evolution was analyzed by MRI at day 9, 12, 15, 20 and 23. The number of animals used for each group was 3.

Tumor volumes increased dramatically for mice treated with physiological water (control group). Interestingly, Arg<sub>9</sub>-P54/PEG-P54 10/1 suspension treatment markedly delayed the tumor growth compared to the control group. As a result, the hampered tumor growth rate led to an impressive low tumor volume at

day 23 compared to untreated mice. To conclude on this preliminary *in vivo* study, the intratracheal administration route<sup>28-30</sup> allowed the suspension Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 to be sprayed directly into the lung. A decrease in tumor volume was observed without any sign of toxicity. In order to complete this study, the same *in vivo* experiments will be performed with p54 alone. However, this molecule being hydrophobic, a surfactant will have to be used. Moreover, in order to prove the benefit of the lung delivery, an intravenous administration will have to be done.

## Conclusion

In this work, it has been described for the first time the self-assembly of CPP-ferrocifen co-nanoprecipitated with PEG-ferrocifen. Through this study, we have demonstrated that it was possible to improve the action of p54 (until 9 times *in vitro* with Arg<sub>9</sub>-p54 suspension on NCI-H460 cells) by increasing the percentage of internalization thanks to CPP and self-assembly. The incorporation of PEG allowed to shield the cationic character of CPP, resulting in a decrease of cell internalization. However, it was possible to play on the molar ratio between CPP-p54 and PEG-p54 in order to improve the biological activity. The innovative method used to quantify the internalization allowed to follow directly the iron of the ferrocifen moiety without any disruption of the self-assembly structure. To go deeper, it could be interesting to investigate the structure of p54 metabolites. Moreover, the *in vitro* results revealed that RLW did not show any specificity to lung cancer cells, contrary to what was described in literature. Finally, the *in vivo* study revealed an impressive delay in the tumor growth, after intratracheal administration of the Arg<sub>9</sub>-P54/PEG-P54 10/1 suspension, proving that this nanosystem is really promising. The nanoplatform set up in this project could even be modulated by playing on the peptide sequence used in order to have a better specificity, ferrocifen driving the self-assembly process<sup>17</sup>.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Polyethylene glycol (HO-PEG-COOH, MW 2kDa) was purchased from Creative PEGWorks (USA). Dimethylformamide (DMF), trifluoroacetic acid (TFA) and acetonitrile (ACN) were obtained from Thermo Fisher Scientific (USA). All amino acids derivatives, hexafluorophosphate (HBTU) and diisopropylethylamine (DIEA) were purchased from Iris Biotech GmbH (Germany). Phenol was collected from Merck KGaA (Germany). Diethyl ether, LC-MS grade water and ULC/MS grade ACN were purchased from Biosolve (France). Deionized water was obtained from a Milli-Q plus system (Merck-Millipore, Germany). Ferrocifen was provided by PSL Chim ParisTech (France). Formic acid, acetone and pyrene were obtained from Sigma-Aldrich (France).

A549, NCI-H460 and BEAS-2B (ATCC® CRL9609™) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (USA). Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) medium was purchased from LGC Standards (France). BEGMTM Bronchial Epithelial BulletKit™ containing BEBMTM Bronchial Epithelial Cell Growth Basal Medium (CC-3171) and BEGMTM Bronchial Epithelial Cell Growth Medium SingleQuots™ Supplements and Growth Factors (CC-4175) were purchased from Lonza (Switzerland). Fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin and phosphate-buffered saline (PBS) were obtained from Gibco (Fisher, France). Amphotericin B was obtained from PAA Cell Culture Company (Fisher, France). MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Trypsin-EDTA 10X was obtained from Biowest (France).

### 2.2. Conjugate synthesis and characterization

#### 2.2.1. Synthesis and purification

CPP-p54 were synthesized according to the previous study<sup>17</sup>. The ferrocifen molecule was conjugated with the PEG moiety using the same strategy than for CPP-p54. In order to activate the carboxylic acid function, the ferrocifen p54 (5 equiv.), containing a carboxylic acid function, was solubilized with HBTU (5 equiv.) in DMF. After 30 min, DIEA (10 equiv.) was added to the coupling mixture and immediately after, PEG in DMF (5 μM) was incorporated in the solution. The reaction was stopped after 2 h and DMF was removed by rotary evaporator.

The obtained oil was then purified by semi-preparative reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a Waters (France) instrument. Purification was performed at room temperature using SymmetryPrep C8 column (250 x 30 mm) with 7 μm particle and 100 Å pore size. Eluent (A) was 0.1 % TFA in water while eluent (B) contained 0.1 % TFA in ACN. A gradient elution was used with a flow rate of 3 mL/min and an injection volume of 1 mL (Table 1). Peaks were detected at a wavelength of 450

nm (detection of the ferrocene part). The crude oil was solubilized in 90 % (A) and 10 % (B) at a concentration of 4 mg/mL. The sample was vortexed and sonicated prior to injection.

**Table 1.** Gradient elution of the RP-HPLC method for the purification of PEG-p54.

Time (minutes)	Flow (mL/minutes)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	3	97	3
26	3	25	75
40	3	10	90
42	3	10	90
43	3	97	3
50	3	97	3

Notes: Phase (A) contained 0.1 % TFA in water and phase (B) 0.1 % TFA in ACN

### 2.2.2. Characterization

**Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.**  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded in deuterated dimethyl sulfoxide at 400 MHz in the FT mode with a Bruker 500MHz AVANCE III HD spectrometer (Wissembourg, France) equilibrated at 25 °C. Spectra were analyzed using the software MestReNova®.

**Mass spectrometry (MS).** Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) spectra was recorded by using a Bruker Biflex III spectrometer with a wavelength laser of 337 nm. 2-[(2E)-3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile (DCTB) was used as a matrix. Positive ion spectra was acquired in linear mode, PEG-p54 was solubilized in dichloromethane prior to acquisition.

**Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC).** An UPLC-UV method was developed to quantify the purity of PEG-p54. The apparatus consisted of an UPLC Acquity H-Class Bio (Waters, France) composed of a quaternary solvent manager, a sample manager, a photo diode array detector and a column manager. The system was managed by Empower®3 software (Waters). The column used was an Acquity®UPLC BEH C18 100 x 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$  (Waters). The mobile phase was composed of a mixture of 0.1 % TFA in water (A) and 0.1 % TFA in ACN. Flow rate was 0.2 mL/min and injection volume was set to 10  $\mu\text{L}$ . Detection was performed at 450 nm. The purified product was dissolved in 95 % (A) and 5 % (B) at a concentration of 1 mg/mL.

**Table 2.** Gradient elution of the UPLC-UV method.

Time (minutes)	Flow (mL/minute)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	0.2	95	5
5	0.2	78	22
10	0.2	78	22
15	0.2	0	100
20	0.2	0	100
21	0.2	95	5
25	0.2	95	5

Notes: Phase (A) contained 0.1 % TFA in water and phase (B) 0.1 % TFA in ACN

**Critical aggregation concentration (CAC).** The critical aggregation concentration (CAC) was determined as reported previously using pyrene as a fluorescent probe<sup>17</sup>. To this end, 6  $\mu\text{L}$  of pyrene stock solution in

acetone (50  $\mu\text{M}$ ) was added into tubes. Then, acetone was evaporated in dark condition. Different suspension of PEG-p54 with a concentration ranging from 0.5 to 2000  $\mu\text{M}$  were added into tubes and mixed overnight at 37°C in order to have a final pyrene concentration of 1  $\mu\text{M}$ . After 30 min of equilibration at room temperature, a fluorescence spectrophotometer (Fluoromax-4, Horiba, Japan) was used to measure the fluorescence intensities of pyrene at an excitation wavelength of 336 nm. The emission spectra were recorded in the range 350-500 nm. The slit opening for the excitation was set at 1 nm and 3 nm for the emission. Intensity ratios of pyrene at  $I_{372}/I_{382}$  ( $I1/I3$ ) were plotted against the log of the concentration and results were fitted by a Boltzmann-type sigmoid. The CAC value was determined as the first sharp decrease point<sup>62</sup>.

## 2.3. Self-assembly formulations and characterization

### 2.3.1. Formulation protocol

Co-nanoprecipitation of CPP-p54 and PEG-p54 was performed using a solvent displacement method<sup>17</sup>. To achieve this, CPP-p54 and PEG-p54 were solubilized in acetone at different molar ratio of CPP-p54/PEG-p54. The CPP-p54 concentration in acetone was kept at 3 mg/mL. For the suspension Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 10/1, Arg<sub>9</sub>-p54 and PEG-p54 were solubilized in acetone at a concentration of 1.6 mM and 0.16 mM respectively. This organic mixture was then added in a mixing chamber (IDEX U-466-02, USA) at a flow rate of 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  with a syringe pump (Harvard Apparatus PHD 2000 infusion, USA). At the same time, water was added at a flow rate of 1200  $\mu\text{L}/\text{min}$  with a second syringe pump (Harvard Apparatus PHD Ultra, USA). In fact, the individual flow rates of each channel were selected to have an acetone/water volume ratio of 4 for all experiments. The organic solvent was then removed using a rotary evaporator.

### 2.3.2. Self-assembly characterization

**Dynamic Light Scattering (DLS).** Hydrodynamic diameter (Z-average size) and particle size polydispersity (PDI) were determined by dynamic light scattering on a Zetasizer<sup>®</sup> Nano serie DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., UK) at a scattering angle of 173°. Three consecutive measurements were performed for each sample.

**Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM).** The morphology of self-assemblies was observed by Cryo-TEM (Tecnai G2 Sphera - FEI) electron microscope, at the Microscopy Rennes Imaging Center (Biogenouest, Rennes). 4  $\mu\text{L}$  of the (10 mg/mL) suspension was deposited on the surface of a carbon-coated copper grid. This grid was held under controlled humidity and temperature conditions by tweezers on a guillotine device. The excess of solution was then removed using a filter paper. Afterward, the plunger was allowed to drop into the liquid ethane in order to vitrify the sample. The grid was then transferred to a cryosample holder. Observations were made at an accelerating voltage of 200 kV under low electron dose.

## 2.4. Stability of conjugates in biological medium

CPP-p54 were solubilized in ethanol (16 mg/mL) and the organic solution was diluted in RPMI medium to have a final concentration corresponding to the highest concentration used *in vitro*. Then the solution was kept in the incubator at 37°C and analyzed after 0, 2, 6 and 24 hours using mass spectrometry. To this end, a LC-MS/MS method was developed on an Alliance® 2695 system (Waters) with a 150 × 2.0 mm, 5 µm Uptisphere C18 50DB column (Interchim, France). The mobile phase consisted of (A) 0.1 % formic acid in water and (B) 0.1 % formic acid in ACN. A gradient elution of 20 min (Table 5), a flow rate of 0.2 mL/min and an injection volume of 5 µL were used. The total HPLC effluent was injected into a Quattro Micro® triple quadrupole mass spectrometer (Waters, France). Ionization was achieved using electrospray in negative and positive ion mode in the m/z 300 – 2048 range (full scan acquisition). Two cone energy values were used: 30 and 90 V to optimize the acquisition. A photo diode array detector was used to detect the ferrocifen moiety at a detection wavelength of 450 nm.

**Table 3.** Gradient elution of the LC-MS/MS method for CPP-p54 conjugates.

Time (minutes)	Flow (mL/minute)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	0.2	95	5
1	0.2	95	5
3	0.2	0	100
10	0.2	0	100
11	0.2	95	5
20	0.2	95	5

Notes: Phase (A) contained 0.1 % TFA in water and phase (B) 0.1 % TFA in ACN

## 2.5. *In vitro* cell viability

The toxicity of self-assemblies was compared to free ferrocifen p54 on the human lung adenocarcinoma cells (A549), human large-cell lung carcinoma (NCI-H460) and human lung epithelial cells (BEAS-2B). A549 and NCI-H460 cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) medium containing 10 % fetal bovine serum (FBS) and 1 % antibiotics. BEAS-2B cells were maintained in Bronchial Epithelial Cell Growth Basal Medium with all the additives as recommended by the supplier. Each cell line was maintained in a humidified incubator with an atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub> at 37°C. BEAS-2B cells were subcultured once a week, while A549 and NCIH460 twice a week, using 0.25 % trypsin in EDTA (dilution 1:6 in HBSS). The cell viability was determined with a colorimetric assay using succinate dehydrogenase activity of viable cells by the reduction of the yellow colored tetrazolium salt, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide to a purple colored formazan crystal (MTT assay). Briefly, cells were plated in 96-well plates at densities of 10x10<sup>3</sup> cells/well (A549), 10x10<sup>3</sup> cells/well (NCI-H460) and 20x10<sup>3</sup> cells/well (BEAS-2B). After 24 h, cells were treated for 24 h with different concentrations (Tables 3 and 4) of the self-assemblies. Then cells were incubated for 3 h with MTT solution (0.5 mg/mL in RPMI or BEBM medium). The medium was removed and DMSO (100 µL/well) was added to solubilize formazan crystals. Samples were finally analyzed with

absorbance detection at 580 nm on a plate reader (SpectraMax® M2 System, Molecular Devices, UK). The control was performed with cells cultured with medium, without any treatment. Four independent experiments were conducted for CPP-p54 and three independent experiments for CPP-p54 : PEG-p54, each with triplicate samples. The half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was determined from the dose-response curve. No toxic effect was observed for free peptides.

**Table 4.** Range of concentrations of CPP-p54 suspensions and ferrocifen used for *in vitro* viability assay function of the cell line.

Products	Arg <sub>6</sub> -p54	Arg <sub>7</sub> -p54	Arg <sub>8</sub> -p54	Arg <sub>9</sub> -p54	RLWp54	p54
Range of concentrations on BEAS-2B (μM)	0.07-356.20	0.06-320.55	0.06-291.39	0.05-267.09	0.04-204.32	0.2-1067.7
Range of concentrations on A549 (μM)	0.07-498.7	0.64-448.8	0.58-396.3	0.05-373.9	0.04-286.1	0.21-1067.7
Range of concentrations on NCI-H460 (μM)	0.07-213.72	0.064-192.3	0.058-174.8	0.53-160.25	0.41-204.3	0.21-1345.29

**Table 5.** Range of concentrations of CPP-p54/PEG-p54 suspensions and PEG-p54 suspension used for *in vitro* viability assay function of the cell line. Concentrations are expressed in function of p54.

Products	Arg <sub>9</sub> -p54/PEG-p54 10/1	Arg <sub>9</sub> -p54/PEG-p54 2/1	Arg <sub>9</sub> -p54/PEG-p54 1/1	Arg <sub>9</sub> -p54/PEG-p54 1/2	PEG-p54
Range of concentrations (μM)	0.052-260.92	0.052-244.88	0.052-236.08	0.045-227.33	0.042-211.6

## 2.6. Internalization quantification

Briefly, cells were incubated in 24-well plates at densities of  $40 \times 10^3$  cells/well (A549),  $40 \times 10^3$  cells/well (NCI-H460) and  $70 \times 10^3$  cells/well (BEAS-2B) during 24 h. Then, cells were treated with self-assemblies at a concentration below the  $IC_{50}$  values. After different exposure times (2 h, 6 h and 24 h), medium was removed and cells were washed twice with PBS before being harvested by trypsinization and counted. Cells lysis was performed using sonication during 30 min. Finally, cellular uptake of self-assemblies was quantified by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) method (7500A, Agilent and Elan DRC-e, PerkinElmer) through the quantification of iron ( $^{56}Fe$ ) in cells. Plasma torch argon purity was higher than 99.999 % (Linde gas). Water was purified using a MilliQ reference A+ system (Millipore). All element standard solutions (Certiprep spex) were purchased from Horiba. The results obtained were expressed as a percentage of internalization according to the following equation:



$$\% \text{ internalization} = \frac{C_{Fe,nano} - C_{Fe}^-}{C_{Fe}^+ - C_{Fe}^-}$$

$C_{Fe,nano}$  ( $\mu\text{g}/\text{cell}$ ): iron concentration in treated cells with self-assemblies.

$C_{Fe}^-$  ( $\mu\text{g}/\text{cell}$ ): iron concentration in non-treated cells.

$C_{Fe}^+$  ( $\mu\text{g}/\text{cell}$ ): maximal iron concentration (function of the conjugate used).

## 2.7. Internalization pathways

To study the internalization pathways of self-assemblies, different inhibitors were used. Cells were incubated in 24-well plates at a densities of  $40 \times 10^3$  cells/well (A549) and  $70 \times 10^3$  cells/well (BEAS-2B) during 24h. Then, cells were treated with inhibitors for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ .  $10 \mu\text{M}$  of methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD),  $50 \mu\text{M}$  of chlorpromazine (chlorpr.) and  $27 \mu\text{M}$  of nystatin (nys.) were used to inhibit clathrin and caveolin-dependent endocytosis. Cells were then treated for 24 h at  $37^\circ\text{C}$  with suspension at a concentration of  $5 \mu\text{M}$  (same concentration than the one used for the internalization quantification). To discriminate active to passive uptake, cells were treated with the suspension and incubated 24 h at  $20^\circ\text{C}$ . Cells were then washed twice with PBS, collected after trypsinization and counted. Cells lysis was performed using sonication during 30 min. Finally, cellular uptake of self-assemblies was quantified by ICP-MS and expressed as a percentage of internalization (see section 4.c. for more details).

## 2.8. In vivo experiments

### 2.8.1. Animals

Female nude mice Rj: NMRI-Foxn1 nu/nu of 7 weeks (JANVIER LABS, Saint Berthevin, France) were housed in the Angers University Hospital animal facility. They were provided with food and water and followed a regular 12-hour day/night cycle. After a week of acclimatization, the animals were used for percutaneous intrapulmonary lung cell cancer administration and intratracheal administration. Animal experiments were performed while respecting the ethics and regulation of animal experimentation (authorization no. 201805281630885).

### 2.8.2. Preparation of the Matrigel solution

Matrigel is a basement membrane matrix preparation extracted from Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma (ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma, Sigma, E6909). It was mixed with the cells suspension in order to improve their attachment to the lung tissue and favor the formation of a mass. The received product was stocked at  $-80^\circ\text{C}$ , and placed at  $4^\circ\text{C}$ , 24 hours before its use. The received Matrigel solution (with an initial concentration of 8-12 mg of protein/mL) was diluted 1/3 v/v in HBSS with calcium and magnesium before mixing with cells.

### 2.8.3. Preparation of cell suspension for its injection

The human lung cancer cell line NCI-H460 was chosen to induce primary human lung cancer in nude mice. The cells received at least two passages between thawing and their injection (same media and multiplication time mentioned before were respected). 24 h before the injection of the tumor cells, the Matrigel and the HBSS were stored at 4 °C, the Eppendorfs, the tips of pipettes and the syringes were stored at -20 °C in order to avoid any Matrigel gelification before the injection. On the day of injection, 35 µL of 10<sup>6</sup> NCI-H460 cells in HBSS with calcium and magnesium was mixed with 35 µL of a solution of Matrigel<sup>®</sup> diluted as previously described in cold HBSS with calcium and magnesium. The mixing was performed in an ice bath at 4°C so to keep the Matrigel<sup>®</sup> in a liquid form. The mice were anesthetized by a continuous air flow (0.5–0.8 L/min) and 20 % isoflurane, placed on their ventral side on a heating support to preserve their corporal temperature. The cells suspension prepared was slowly injected (7-10 seconds to inject 70 µL in order to allow the gelification of the Matrigel<sup>®</sup> inside the lung) percutaneously using a syringe<sup>27</sup> into the left lateral thorax, 3 mm above the line separating the lung from the liver. The needle was inserted 4 mm into the thorax and was quickly removed after the injection. Once the injection done, the mouse was waked up from the anesthesia and observed until total recovery. The mice weight, their behavior, respiratory rate and the response to normal stimulus were regularly checked.

### 2.8.4. Intratracheal administration

9 days after the injection of the tumor cells, an administration, via intratracheal route, has been performed<sup>30</sup>. Two different compounds have been nebulized: the Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 (10/1 molar ration) at a concentration of 2 mg/mL for the mice designed as “treated”. And physiological water for mice designed as “control”.

Mice were anesthetized by a continuous air flow (0.5–0.8 L/min) and 20 % isoflurane. The mice were fixed on an inclined support: it allowed visualizing the trachea of the mouse once its moth is opened and the tongue is moved away from the field of vision. A laryngoscope was used to open the animal’s mouth and to take the tongue out of the way of vision. Once the trachea is clear, the syringe was introduced between the two vocal cords, and the injection was performed.

In order to create an aerosol and mimic the nebulizer, a micro-sprayer system was used (High pressure syringe), allowing to create microdrops of the compound, dispersing into the two lungs via an aerosol. The volume nebulized was of 50 µL.

When the nebulization is over, the animal was waked up on a heating support and his behavior was carefully controlled until perfect recovery. Two nebulizations has been performed: at day 9 and day 12 after the injection of the tumor cells. Finally the tumor size evolution was analyzed by MRI.

MR imaging was performed using a 7T scanner (Biospec 70/20 Avance III, Bruker Wissembourg, France) equipped with BGA12S gradient system (675 mT/m) and a 35 mm diameter resonator. For the duration of all MR experiments under isoflurane anaesthesia, animal temperature was regulated by a heated water-

circulating system. After a set of scout images, retrospectively gated T<sub>1</sub>-weighted images were acquired to follow the volume of tumours using an IntraGate® FLASH 3D sequence (TR = 110 ms; TE = 1.6 ms;  $\alpha$  = 50°; FOV = 25 x 25 mm; matrix = 192 x 192; nine slices of 0.7 mm).

## **ACKNOWLEDGMENT**

The authors would like to acknowledge the PRISM core facility (Rennes-Angers, France) for support in the MRI experiments.

## Supporting Information

### Self-assemblies of cell-penetrating peptides and ferrocifens: design and evaluation of an innovative platform for lung cancer treatment

Léna Guyon<sup>a</sup>, Elise Lepeltier\*<sup>a</sup>, Abdallah Ladaycia<sup>a</sup>, Agnese Bosio<sup>a</sup>, Laurent Lemaire<sup>a</sup>, Bénédicte Lelièvre<sup>b</sup>, Nolwenn Lautram<sup>a</sup>, Aurélien Dupont<sup>c</sup>, Pascal Pigeon<sup>d</sup>, Patrick Saulnier<sup>a</sup>, Gérard Jaouen<sup>d</sup>, Catherine Passirani<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Micro et Nanomédecines Translationnelles, MINT, UNIV Angers, UMR INSERM 1066, UMR CNRS 6021, Angers, France

<sup>b</sup>Centre régional de pharmacovigilance, Laboratoire de pharmacologie-toxicologie, CHU Angers, 4 rue Larrey, F-49100 Angers, France

<sup>c</sup>Univ Rennes, CNRS, Inserm, BIOSIT - UMS 3480, US\_S 018, F-35000 Rennes, France

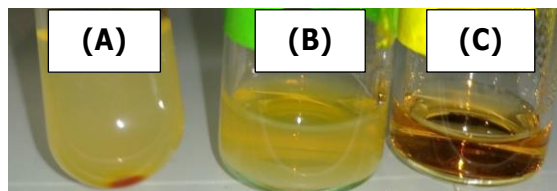
<sup>d</sup>Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, UMR 8232, IPCM and PSL Chimie Paris Tech, Paris, France

\*E-mail: [elise.lepeltier@univ-angers.fr](mailto:elise.lepeltier@univ-angers.fr)

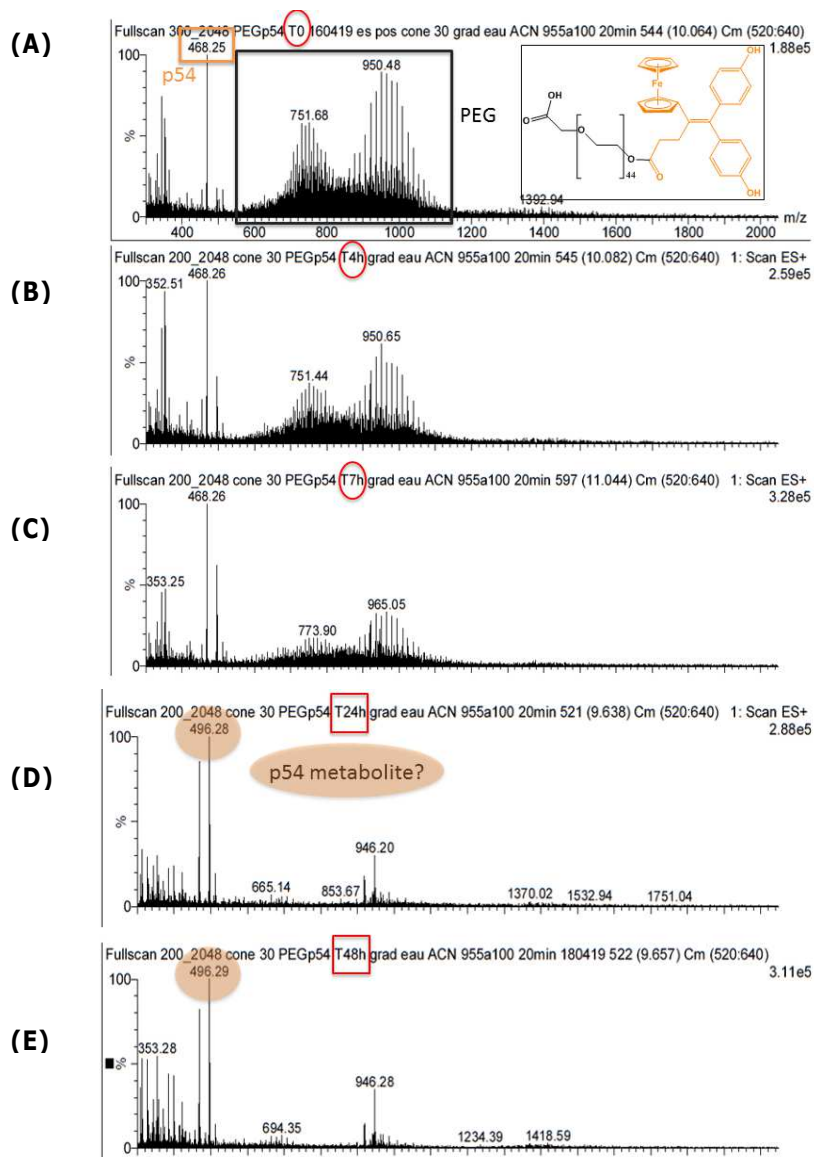
### Supplementary Section S1: $^1\text{H}$ NMR analysis of PEG-p54.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) :  $\delta$  2.30 (t, 2 H,  $\text{CH}_2$  of p54), 2.73 (t, 2 H,  $\text{CH}_2$  of p54), 3.51 (s, 185H,  $\text{CH}_2$  of PEG), 3.83 (t, 2H,  $\text{C}_5\text{H}_4$  of p54), 4.09 (t, 2H,  $\text{C}_5\text{H}_4$  of p54), 4.12 (s, 5H, Cp of p54), 6.61 (d, 2H,  $\text{C}_6\text{H}_4$  of p54), 6.71 (d, 2H,  $\text{C}_6\text{H}_4$  of p54), 6.77 (d, 2H,  $\text{C}_6\text{H}_4$  of p54), 6.97 (d, 2H,  $\text{C}_6\text{H}_4$  of p54), 9.28 (s, 1H, OH), 9.34 (s, 1H, OH), 12.01 (s broad, 1H, OH).

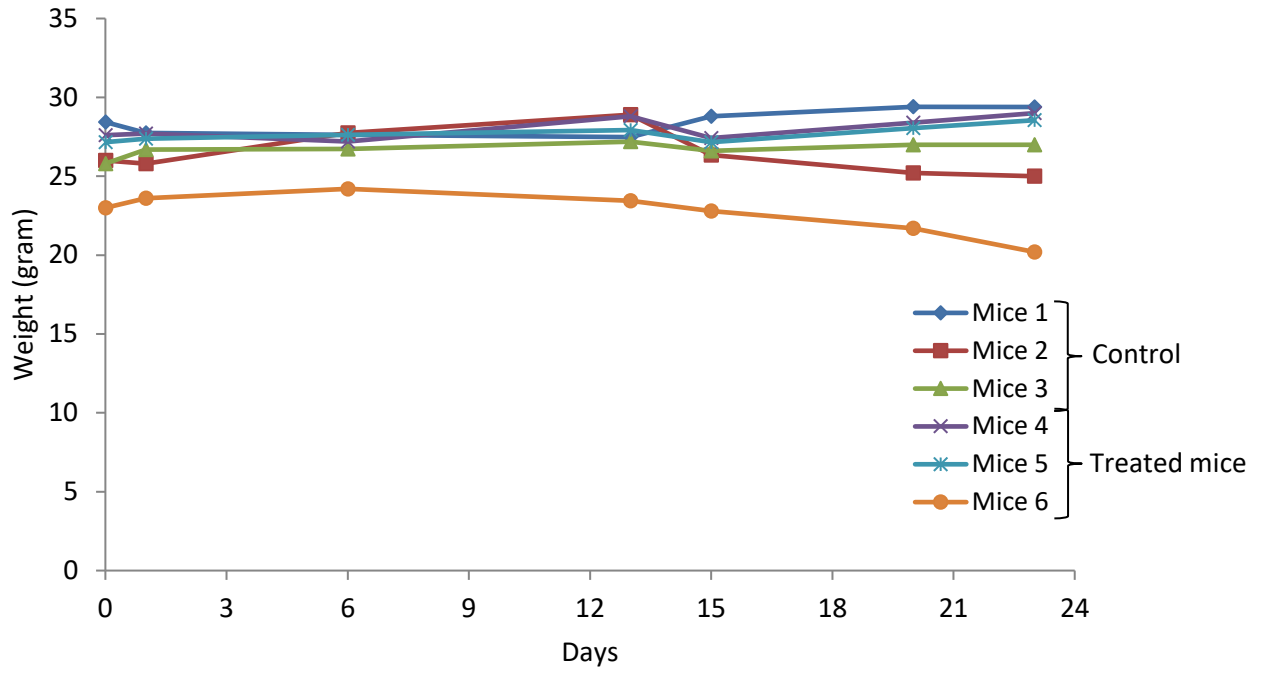
Supplementary Figure S1: Pictures of (A) PEG-p54, (B) Arg<sub>9</sub>-p54 : PEGp54 1/2 and (C) Arg<sub>9</sub>-p54 suspensions after 6 days at 4 °C.



Supplementary Figure S2: Spectra obtained by LC-MS/MS after different incubation times of PEG-p54 in RPMI medium (A) 0 h, (B) 4 h, (C) 7 h, (D) 24 h and (E) 48 h.



Supplementary Figure S3: Mice body weight curve obtained during 23 days for the 6 mice.

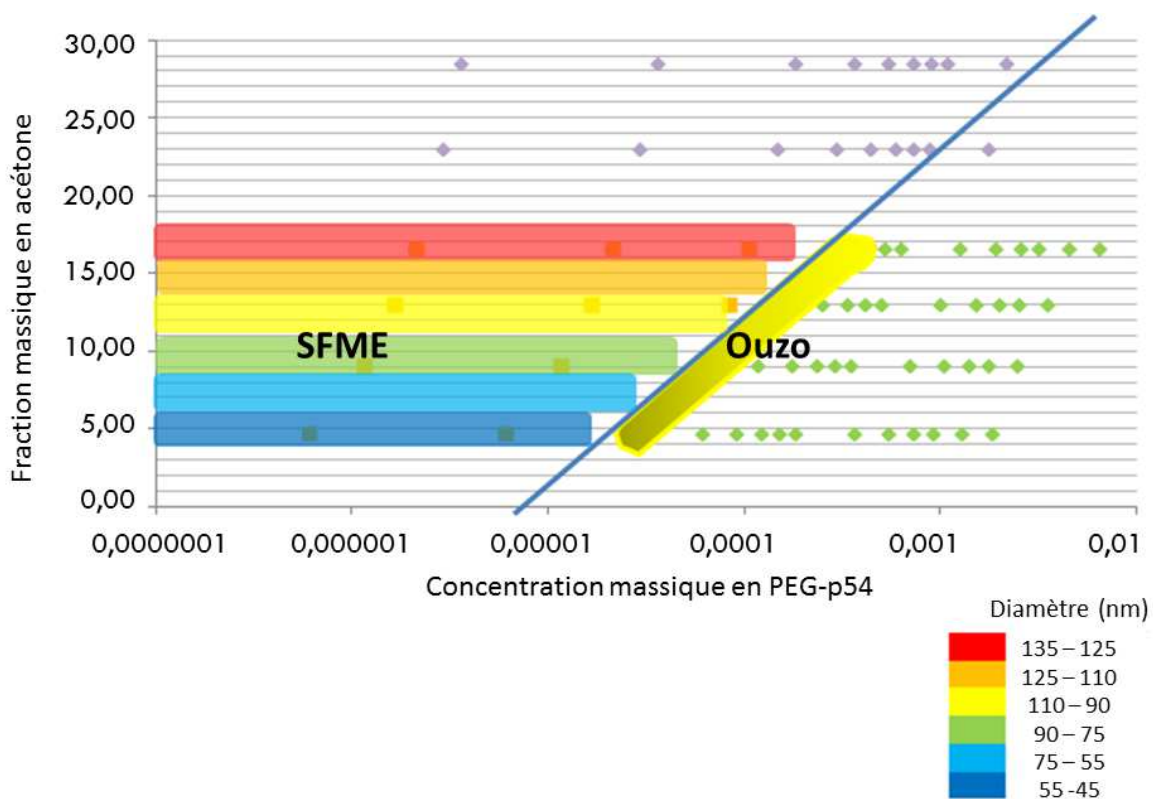


Cette étude s'est intéressée à l'activité biologique des suspensions CPP-p54 et à l'impact de l'incorporation du PEG-p54 dans la structure des auto-assemblages. Nous avons démontré que l'activité du ferrocifène pouvait être significativement améliorée en augmentant le pourcentage d'internalisation, grâce aux peptides pénétrants et à l'auto-assemblage (diminution de l'IC<sub>50</sub> d'un facteur 9 grâce à la suspension Arg<sub>9</sub>-p54). L'incorporation de PEG dans la structure a entraîné une diminution de l'internalisation cellulaire. Cette diminution peut s'expliquer par le fait que les chaînes de PEG hydrophiles peuvent protéger et cacher les charges positives des CPP. Le ratio molaire CPP-p54/PEG-p54 a ainsi été optimisé afin d'améliorer l'activité biologique. Les résultats *in vitro* n'ont pas montré de spécificité du peptide pénétrant RLW contrairement à ce qui est décrit dans la littérature. Enfin, l'étude préliminaire *in vivo* a montré des résultats vraiment prometteurs avec une diminution du volume tumoral d'un facteur 3 grâce à la suspension Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 (10/1).

La plateforme mise en place dans ce projet pourra ainsi être modulée en jouant sur la séquence peptidique utilisée, tout en conservant les propriétés d'auto-assemblage des conjugués.

## Diagramme de phase

Afin d'identifier les conditions permettant de contrôler au mieux la taille et la polydispersité des auto-assemblages, le diagramme de phase du conjugué PEG-p54 a été étudié. Nous avons ainsi cherché à identifier les deux régions du diagramme de phase : le domaine Ouzo et le domaine SFME (Surfactant-Free MicroEmulsion). Pour cela, nous avons tout d'abord identifié la binodale, en déterminant visuellement la limite de solubilité du conjugué. La limite Ouzo a ensuite été déterminée en analysant la suspension par diffusion dynamique de la lumière (DLS), avant et après filtration (filtre avec pores de 0,45 µm). L'intensité diffusée correspondant au nombre de photons détectés par seconde (DCR : derived count rate) est ensuite analysée : si ce nombre diminue après la filtration, cela signifie que nous sommes hors domaine Ouzo (agrégats avec un diamètre supérieur à 450 nm). Si le nombre de photons détectés après filtration est identique à celui détecté avant filtration, le point se situe alors dans le domaine Ouzo<sup>63</sup>. La figure 13 montre le diagramme de phase obtenu pour le PEG-p54.



**Figure 13** : Diagramme de phase obtenu pour le PEG-p54. La droite bleue représente la binodale. Les domaines Ouzo et SFME sont représentés ainsi que l'évolution du diamètre des nanoparticules en fonction de la concentration massique finale en PEG-p54 et de la fraction massique en acétone.

Nous avons pu obtenir des auto-assemblages avec un diamètre compris entre 45 nm et 135 nm dans le domaine SFME et un diamètre compris entre 75 nm et 90 nm dans le domaine Ouzo. Comme décrit précédemment par Yan *et al.*<sup>63</sup>, nous avons constaté que le diamètre augmentait avec la fraction massique en acétone dans le domaine SFME et que celui-ci ne dépendait pas de la concentration massique en PEG-P54. Au contraire, dans la zone Ouzo, le diamètre des auto-assemblages augmentait avec la concentration massique en PEG-p54.

Lors des formulations des nanoparticules CPP-p54, les suspensions obtenues ont toujours été visuellement transparentes et nous avons donc supposé que nous étions dans le domaine SFME. Afin de conforter ce résultat, la détermination du diagramme de phase pour le conjugué Arg<sub>9</sub>-p54 a été entreprise. Des difficultés ont été rencontrées lors de la détermination du diagramme de phase pour le conjugué Arg<sub>9</sub>-p54 : la limite de solubilité du conjugué n'a pu être déterminée visuellement et la binodale n'a donc pu être construite. Il pourrait être intéressant d'étudier, par la suite, la formation de la binodale en analysant la turbidité de la suspension, grâce au spectrophotomètre à différents ratios acétone/eau. Par la suite, les diagrammes de phase obtenus pour le PEG-p54 et l'Arg<sub>9</sub>-p54 pourraient être superposés afin de prédire les conditions de formulation optimales, lors de la co-nanoprécipitation Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54, permettant de se situer soit dans la zone Ouzo, soit dans la zone SFME.



## REFERENCES

- (1) Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68* (1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>.
- (2) Crinò, L.; Weder, W.; van Meerbeeck, J.; Felip, E.; ESMO Guidelines Working Group. Early Stage and Locally Advanced (Non-Metastatic) Non-Small-Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2010**, *21 Suppl 5*, v103–115. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq207>.
- (3) Huang, C.-Y.; Ju, D.-T.; Chang, C.-F.; Muralidhar Reddy, P.; Velmurugan, B. K. A Review on the Effects of Current Chemotherapy Drugs and Natural Agents in Treating Non-Small Cell Lung Cancer. *BioMedicine* **7** (4). <https://doi.org/10.1051/bmdcn/2017070423>.
- (4) Spira, A.; Ettinger, D. S. Multidisciplinary Management of Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350* (4), 379–392. <https://doi.org/10.1056/NEJMra035536>.
- (5) Mahalingam, D.; Mita, A.; Mita, M. M.; Nawrocki, S. T.; Giles, F. J. Targeted Therapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancers: Historical Perspective, Current Practices, and Future Development. *Curr. Probl. Cancer* **2009**, *33* (2), 73–111. <https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2009.03.001>.
- (6) Guyon, L.; Lepeltier, E.; Passirani, C. Self-Assembly of Peptide-Based Nanostructures: Synthesis and Biological Activity. *Nano Res.* **2018**, *11* (5), 2315–2335. <https://doi.org/10.1007/s12274-017-1892-9>.
- (7) Bechara, C.; Sagan, S. Cell-Penetrating Peptides: 20 Years Later, Where Do We Stand? *FEBS Lett.* **2013**, *587* (12), 1693–1702. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>.
- (8) Xu, J.; Khan, A. R.; Fu, M.; Wang, R.; Ji, J.; Zhai, G. Cell-Penetrating Peptide: A Means of Breaking through the Physiological Barriers of Different Tissues and Organs. *J. Controlled Release* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.020>.
- (9) Lindgren, M.; Hällbrink, M.; Prochiantz, A.; Langel, U. Cell-Penetrating Peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21* (3), 99–103.
- (10) Soukasene, S.; Toft, D. J.; Moyer, T. J.; Lu, H.; Lee, H.-K.; Standley, S. M.; Cryns, V. L.; Stupp, S. I. Antitumor Activity of Peptide Amphiphile Nanofiber-Encapsulated Camptothecin. *ACS Nano* **2011**, *5* (11), 9113–9121. <https://doi.org/10.1021/nn203343z>.
- (11) Cheetham, A. G.; Zhang, P.; Lin, Y.; Lock, L. L.; Cui, H. Supramolecular Nanostructures Formed by Anticancer Drug Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (8), 2907–2910. <https://doi.org/10.1021/ja3115983>.
- (12) Lin, R.; Cheetham, A. G.; Zhang, P.; Lin, Y.; Cui, H. Supramolecular Filaments Containing a Fixed 41% Paclitaxel Loading. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (43), 4968–4970. <https://doi.org/10.1039/C3CC41896K>.
- (13) Jaouen, G.; Vessières, A.; Top, S. Ferrocifen Type Anti Cancer Drugs. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (24), 8802–8817. <https://doi.org/10.1039/c5cs00486a>.
- (14) Jaouen, G.; Top, S. The Ferrocifen Family as Potent and Selective Antitumor Compounds: Mechanisms of Action. In *Advances in Organometallic Chemistry and Catalysis*; Wiley-Blackwell, 2013; pp 563–580. <https://doi.org/10.1002/9781118742952.ch42>.
- (15) Vessières, A.; Corbet, C.; Heldt, J. M.; Lories, N.; Jouy, N.; Laïos, I.; Leclercq, G.; Jaouen, G.; Toillon, R.-A. A Ferrocenyl Derivative of Hydroxytamoxifen Elicits an Estrogen Receptor-Independent Mechanism of Action in Breast Cancer Cell Lines. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104* (5), 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.12.020>.
- (16) Top, S.; Vessières, A.; Leclercq, G.; Quivy, J.; Tang, J.; Vaissermann, J.; Huché, M.; Jaouen, G. Synthesis, Biochemical Properties and Molecular Modelling Studies of Organometallic Specific Estrogen Receptor Modulators (SERMs), the Ferrocifens and Hydroxyferrocifens: Evidence for an Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on Both Hormone-Dependent and Hormone-Independent Breast Cancer Cell

Lines. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2003**, *9* (21), 5223–5236.  
<https://doi.org/10.1002/chem.200305024>.

- (14) Guyon, L.; Lepeltier, E.; Gimel, J.-C.; Calvignac, B.; Franconi, F.; Lautram, N.; Dupont, A.; Bourgaux, C.; Pigeon, P.; Saulnier, P.; et al. Importance of Combining Advanced Particle Size Analysis Techniques To Characterize Cell-Penetrating Peptide–Ferrocifen Self-Assemblies. *J. Phys. Chem. Lett.* **2019**, 6613–6620. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.9b01493>.
- (18) Yang, W.; Xia, Y.; Fang, Y.; Meng, F.; Zhang, J.; Cheng, R.; Deng, C.; Zhong, Z. Selective Cell Penetrating Peptide-Functionalized Polymersomes Mediate Efficient and Targeted Delivery of Methotrexate Disodium to Human Lung Cancer In Vivo. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7* (7), 1701135. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701135>.
- (19) Kondo, E.; Saito, K.; Tashiro, Y.; Kamide, K.; Uno, S.; Furuya, T.; Mashita, M.; Nakajima, K.; Tsumuraya, T.; Kobayashi, N.; et al. Tumour Lineage-Homing Cell-Penetrating Peptides as Anticancer Molecular Delivery Systems. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 951. <https://doi.org/10.1038/ncomms1952>.
- (20) Gao, H.; Zhang, Q.; Yang, Y.; Jiang, X.; He, Q. Tumor Homing Cell Penetrating Peptide Decorated Nanoparticles Used for Enhancing Tumor Targeting Delivery and Therapy. *Int. J. Pharm.* **2015**, *478* (1), 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.029>.
- (21) Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. Arginine-Rich Peptides AN ABUNDANT SOURCE OF MEMBRANE-PERMEABLE PEPTIDES HAVING POTENTIAL AS CARRIERS FOR INTRACELLULAR PROTEIN DELIVERY. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (8), 5836–5840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007540200>.
- (22) Mitchell, D. J.; Steinman, L.; Kim, D. T.; Fathman, C. G.; Rothbard, J. B. Polyarginine Enters Cells More Efficiently than Other Polycationic Homopolymers. *J. Pept. Res.* **2000**, *56* (5), 318–325. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2000.00723.x>.
- (23) Lai, S. K.; O’Hanlon, D. E.; Harrold, S.; Man, S. T.; Wang, Y.-Y.; Cone, R.; Hanes, J. Rapid Transport of Large Polymeric Nanoparticles in Fresh Undiluted Human Mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (5), 1482–1487. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608611104>.
- (24) Wang, Y.-Y.; Lai, S. K.; Suk, J. S.; Pace, A.; Cone, R.; Hanes, J. Addressing the PEG Mucoadhesivity Paradox to Engineer Nanoparticles That “Slip” through the Human Mucus Barrier. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (50), 9726–9729. <https://doi.org/10.1002/anie.200803526>.
- (25) Yang, M.; Lai, S. K.; Wang, Y.-Y.; Zhong, W.; Happe, C.; Zhang, M.; Fu, J.; Hanes, J. Biodegradable Nanoparticles Composed Entirely of Safe Materials That Rapidly Penetrate Human Mucus. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (11), 2597–2600. <https://doi.org/10.1002/anie.201006849>.
- (26) Suk, J. S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L. M. PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99* (Pt A), 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>.
- (27) Hureaux, J.; Urban, T. Mise Au Point d’un Modèle de Cancer Bronchique Orthotopique Chez La Souris. *Rev. Mal. Respir.* **2015**, *32*, A96. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2014.10.549>.
- (28) Hureaux, J.; Lacoeyille, F.; Lagarce, F.; Rousselet, M.-C.; Contini, A.; Saulnier, P.; Benoit, J.-P.; Urban, T. Absence of Lung Fibrosis after a Single Pulmonary Delivery of Lipid Nanocapsules in Rats. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 8159–8170. <https://doi.org/10.2147/IJN.S146740>.
- (29) Bivas-Benita, M.; Zwier, R.; Junginger, H. E.; Borchard, G. Non-Invasive Pulmonary Aerosol Delivery in Mice by the Endotracheal Route. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2005**, *61* (3), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.04.009>.
- (30) Gagnadoux, F.; Le Pape, A.; Urban, T.; Montharu, J.; Vecellio, L.; Dubus, J.-C.; Leblond, V.; Diot, P.; Grimbert, D.; Racineux, J.-L.; et al. Safety of Pulmonary Administration of Gemcitabine in Rats. *J. Aerosol Med. Off. J. Int. Soc. Aerosols Med.* **2005**, *18* (2), 198–206. <https://doi.org/10.1089/jam.2005.18.198>.

- (31) Glushko, V.; Thaler, M. S. R.; Karp, C. D. Pyrene Fluorescence Fine Structure as a Polarity Probe of Hydrophobic Regions: Behavior in Model Solvents. *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *210* (1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90160-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90160-0).
- (32) Mohajeri, E.; Noudeh, G. D. Effect of Temperature on the Critical Micelle Concentration and Micellization Thermodynamic of Nonionic Surfactants: Polyoxyethylene Sorbitan Fatty Acid Esters <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2012/961739/abs/> (accessed Aug 5, 2019). <https://doi.org/10.1155/2012/961739>.
- (33) Goto, A.; Takemoto, M.; Endo, F. A Thermodynamic Study on Micellization of Nonionic Surfactant in Water and in Water–Ethanol Mixture by Gel Filtration. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58* (1), 247–251. <https://doi.org/10.1246/bcsj.58.247>.
- (34) Qiu, M.; Ouyang, J.; Wei, Y.; Zhang, J.; Lan, Q.; Deng, C.; Zhong, Z. Selective Cell Penetrating Peptide-Functionalized Envelope-Type Chimeric Lipopepsomes Boost Systemic RNAi Therapy for Lung Tumors. *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *0* (0), 1900500. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900500>.
- (35) Snipstad, S.; Hak, S.; Baghirov, H.; Sulheim, E.; Mørch, Y.; Lélou, S.; Haartman, E. von; Bäck, M.; Nilsson, K. P. R.; Klymchenko, A. S.; et al. Labeling Nanoparticles: Dye Leakage and Altered Cellular Uptake. *Cytometry A* **2017**, *91* (8), 760–766. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22853>.
- (36) Bastiat, G.; Pritz, C. O.; Roeder, C.; Fouchet, F.; Lignièrès, E.; Jesacher, A.; Glueckert, R.; Ritsch-Marte, M.; Schrott-Fischer, A.; Saulnier, P.; et al. A New Tool to Ensure the Fluorescent Dye Labeling Stability of Nanocarriers: A Real Challenge for Fluorescence Imaging. *J. Controlled Release* **2013**, *170* (3), 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.06.014>.
- (37) Suzuki, T.; Futaki, S.; Niwa, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. Possible Existence of Common Internalization Mechanisms among Arginine-Rich Peptides. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (4), 2437–2443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110017200>.
- (38) Georgiadis, M. S.; Russell, E. K.; Gazdar, A. F.; Johnson, B. E. Paclitaxel Cytotoxicity against Human Lung Cancer Cell Lines Increases with Prolonged Exposure Durations. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3* (3), 449–454.
- (39) Liebmann, J. E.; Cook, J. A.; Lipschultz, C.; Teague, D.; Fisher, J.; Mitchell, J. B. Cytotoxic Studies of Paclitaxel (Taxol) in Human Tumour Cell Lines. *Br. J. Cancer* **1993**, *68* (6), 1104–1109.
- (40) Jiang, L.; Li, X.; Liu, L.; Zhang, Q. Thiolated Chitosan-Modified PLA-PCL-TPGS Nanoparticles for Oral Chemotherapy of Lung Cancer. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8* (1), 66. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-66>.
- (41) Foroozandeh, P.; Aziz, A. A. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2018**, *13*. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2728-6>.
- (42) Bernkop-Schnürch, A. Strategies to Overcome the Polycation Dilemma in Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *136–137*, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.017>.
- (43) Sanchez, L.; Yi, Y.; Yu, Y. Effect of Partial PEGylation on Particle Uptake by Macrophages. *Nanoscale* **2017**, *9* (1), 288–297. <https://doi.org/10.1039/c6nr07353k>.
- (44) Xu, Q.; Ensign, L. M.; Boylan, N. J.; Schön, A.; Gong, X.; Yang, J.-C.; Lamb, N. W.; Cai, S.; Yu, T.; Freire, E.; et al. Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus Ex Vivo and Distribution in Vivo. *ACS Nano* **2015**, *9* (9), 9217–9227. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03876>.
- (45) Kesharwani, P.; Gupta, U. *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Brain Tumors*; Academic Press, 2018.
- (46) Bode, S. A.; Löwik, D. W. P. M. Constrained Cell Penetrating Peptides. *Drug Discov. Today Technol.* **2017**, *26*, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.11.005>.
- (47) Zhu, L.; Kate, P.; Torchilin, V. P. Matrix Metalloprotease 2-Responsive Multifunctional Liposomal Nanocarrier for Enhanced Tumor Targeting. *ACS Nano* **2012**, *6* (4), 3491–3498. <https://doi.org/10.1021/nn300524f>.

- (48) Zhu, L.; Wang, T.; Perche, F.; Taigind, A.; Torchilin, V. P. Enhanced Anticancer Activity of Nanopreparation Containing an MMP2-Sensitive PEG-Drug Conjugate and Cell-Penetrating Moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110* (42), 17047–17052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304987110>.
- (49) Yang, Q.; Jones, S. W.; Parker, C. L.; Zamboni, W. C.; Bear, J. E.; Lai, S. K. Evading Immune Cell Uptake and Clearance Requires PEG Grafting at Densities Substantially Exceeding the Minimum for Brush Conformation. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (4), 1250–1258. <https://doi.org/10.1021/mp400703d>.
- (50) Pelaz, B.; del Pino, P.; Maffre, P.; Hartmann, R.; Gallego, M.; Rivera-Fernández, S.; de la Fuente, J. M.; Nienhaus, G. U.; Parak, W. J. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano* **2015**, *9* (7), 6996–7008. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01326>.
- (51) Rodal, S. K.; Skretting, G.; Garred, O.; Vilhardt, F.; van Deurs, B.; Sandvig, K. Extraction of Cholesterol with Methyl-Beta-Cyclodextrin Perturbs Formation of Clathrin-Coated Endocytic Vesicles. *Mol. Biol. Cell* **1999**, *10* (4), 961–974. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.4.961>.
- (52) 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), 848–866. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00572.x>.
- (53) Grimmer, S.; Deurs, B. van; Sandvig, K. Membrane Ruffling and Macropinocytosis in A431 Cells Require Cholesterol. *J. Cell Sci.* **2002**, *115* (14), 2953–2962.
- (54) Larkin, J. M.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L.; Anderson, R. G. W. Depletion of Intracellular Potassium Arrests Coated Pit Formation and Receptor-Mediated Endocytosis in Fibroblasts. *Cell* **1983**, *33* (1), 273–285. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90356-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90356-2).
- (55) Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. | *Molecular Biology of the Cell* <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.7.11.1825> (accessed Aug 5, 2019).
- (56) Guterstam, P.; Madani, F.; Hirose, H.; Takeuchi, T.; Futaki, S.; EL Andaloussi, S.; Gräslund, A.; Langel, Ü. Elucidating Cell-Penetrating Peptide Mechanisms of Action for Membrane Interaction, Cellular Uptake, and Translocation Utilizing the Hydrophobic Counter-Anion Pyrenebutyrate. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2009**, *1788* (12), 2509–2517. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.09.014>.
- (57) Säälik, P.; Elmquist, A.; Hansen, M.; Padari, K.; Saar, K.; Viht, K.; Langel, U.; Pooga, M. Protein Cargo Delivery Properties of Cell-Penetrating Peptides. A Comparative Study. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (6), 1246–1253. <https://doi.org/10.1021/bc049938y>.
- (58) Dietz, G. P. H.; Bähr, M. Delivery of Bioactive Molecules into the Cell: The Trojan Horse Approach. *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, *27* (2), 85–131. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.03.005>.
- (59) Fittipaldi, A.; Ferrari, A.; Zoppé, M.; Arcangeli, C.; Pellegrini, V.; Beltram, F.; Giacca, M. Cell Membrane Lipid Rafts Mediate Caveolar Endocytosis of HIV-1 Tat Fusion Proteins. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (36), 34141–34149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303045200>.
- (60) Nakase, I.; Niwa, M.; Takeuchi, T.; Sonomura, K.; Kawabata, N.; Koike, Y.; Takehashi, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Simpson, J. C.; et al. Cellular Uptake of Arginine-Rich Peptides: Roles for Macropinocytosis and Actin Rearrangement. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2004**, *10* (6), 1011–1022. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.010>.
- (61) Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, Ü.; Futaki, S.; Gräslund, A. Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *J. Biophys.* **2011**, *2011*. <https://doi.org/10.1155/2011/414729>.
- (62) Fan, Q.; Ji, Y.; Wang, J.; Wu, L.; Li, W.; Chen, R.; Chen, Z. Self-Assembly Behaviours of Peptide-Drug Conjugates: Influence of Multiple Factors on Aggregate Morphology and Potential Self-Assembly Mechanism. *R. Soc. Open Sci.* **2018**, *5* (4), 172040. <https://doi.org/10.1098/rsos.172040>.

- (63) Yan, X.; Alcouffe, P.; Sudre, G.; David, L.; Bernard, J.; Ganachaud, F. Modular Construction of Single-Component Polymer Nanocapsules through a One-Step Surfactant-Free Microemulsion Templated Synthesis. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (8), 1401–1404. <https://doi.org/10.1039/C6CC09701D>.

# Discussion générale

## 1. Résumé des travaux

Au cours des dernières années, le Pr. Jaouen et son équipe ont développé des molécules organométalliques anticancéreuses qui sont des dérivés de l'hydroxytamoxifène, dont un des groupements phényle est substitué par un groupement ferrocène  $[\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]$ <sup>1,2</sup>. Ces molécules, appelées ferrocifènes, ont démontré pouvoir agir par sénescence à de faibles concentrations et par apoptose ou réaction de Fenton à des concentrations plus élevées, *via* la production de ROS et d'un métabolite, la quinone méthide<sup>3</sup>. De plus, ces nouveaux composés présentent des effets antiprolifératifs considérables sur des lignées de cellules hormono-dépendantes mais également hormono-indépendantes<sup>4</sup>. Cependant, un inconvénient majeur à l'utilisation de ces molécules est leur caractère lipophile, ce qui nécessite une stratégie de vectorisation adéquate pour une possible administration *in vivo*.

Dans ces travaux, nous avons proposé la conception d'une plateforme innovante afin de transporter les molécules de ferrocifènes. Ainsi, pour un même objet, trois stratégies ont été mises en œuvre, tout en limitant l'emploi d'excipients : l'utilisation de peptides pénétrants (CPP), la formation d'une prodrogue amphiphile et la potentielle auto-association en nano-objets. Nous avons pour cela synthétisé des conjugués amphiphiles (CPP-p54) formés de deux types de peptides pénétrants différents,  $\text{Arg}_n$  ( $n = 6$  à  $9$ ) et RLW. Leur auto-assemblage dans l'eau ainsi que la caractérisation complète des nano-objets formés ont été étudiés. La diffusion de la lumière (DLS, NTA) et la microscopie électronique à transmission ont révélé une population d'objets d'environ 100 nm de diamètre et relativement monodisperse. Cependant, l'étude approfondie de la suspension par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et par diffusométrie RMN a démontré la présence d'une autre population de petits objets (2 nm de diamètre). Il a été démontré que ces petits auto-assemblages représentaient *in fine* plus de 99 % de la matière. Cette première étude souligne l'importance et la complémentarité de chaque méthode de caractérisation.

Dans un deuxième temps, l'objectif a été de tester cette plateforme d'auto-assemblages pour une application particulière : le traitement du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) *via* la technique de nébulisation. L'activité biologique des nanovecteurs a donc été évaluée sur deux lignées de cellules pulmonaires cancéreuses (A549 et NCI-H460) et sur une lignée pulmonaire saine (BEAS-2B). La quantification de l'internalisation intracellulaire a été réalisée afin de caractériser la spécificité potentielle du peptide RLW. De plus, l'incorporation du polyéthylène glycol (PEG) dans la suspension  $\text{Arg}_9$ -p54 a été effectuée à différents ratios molaires  $\text{Arg}_9$ -p54/PEG-p54 et des analyses *in vitro* ont été menées.

Nous avons démontré que l'activité du ferrocifène pouvait être nettement améliorée grâce à la suspension  $\text{Arg}_9$ -p54 et que le ratio molaire optimal en PEG-p54 était le ratio 10/1 ( $\text{Arg}_9$ -p54/PEG-p54). Enfin, les études préliminaires *in vivo* ont montré le potentiel thérapeutique de la suspension  $\text{Arg}_9$ -p54/PEG-p54 (10/1) lors

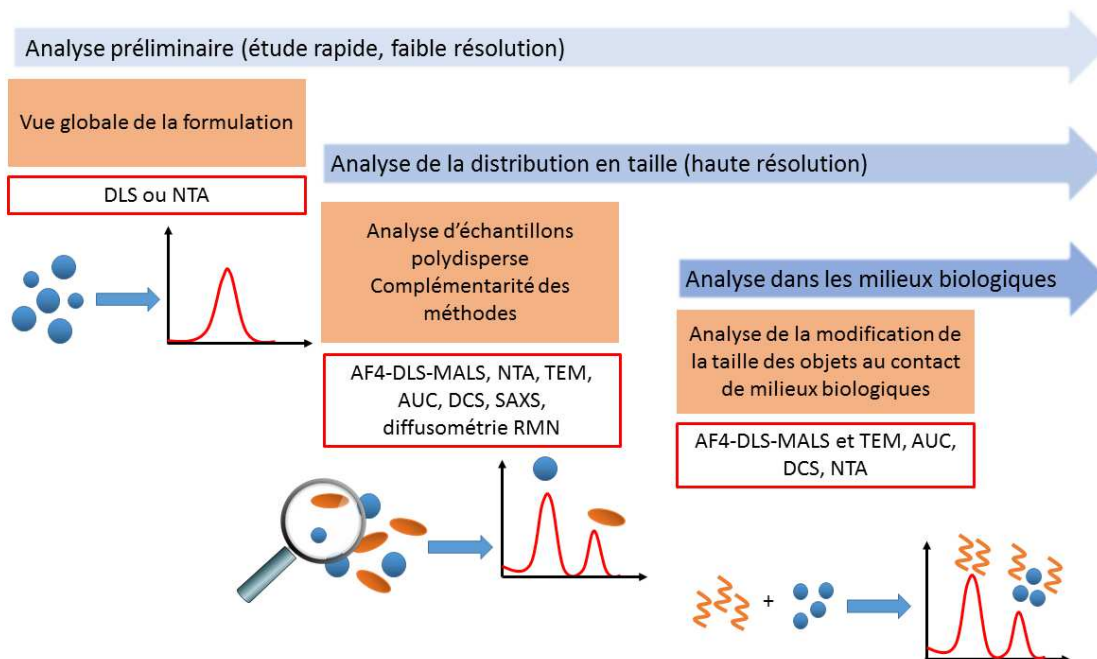
de son administration par nébulisation. En effet, une diminution du volume tumoral d'un facteur 3 a pu être observée.

## 2. Caractérisation des auto-assemblages versus législation

Malgré les recherches toujours plus importantes sur les nanoparticules à des fins thérapeutiques, la part des nanomédicaments sur le marché reste minimale<sup>5</sup>. Parmi les études publiées dans la littérature, seulement 50 candidats ont pu passer la « vallée de la mort », c'est-à-dire évoluer d'un stade de découverte universitaire vers un développement industriel pour une éventuelle mise sur le marché. Ce problème du développement industriel des nanomédicaments peut en partie s'expliquer par le manque de caractérisation physico-chimique des objets obtenus. En effet, ces caractérisations sont primordiales pour pouvoir corrélérer les propriétés physico-chimiques aux effets biologiques et ainsi pouvoir prédire l'efficacité thérapeutique des nanomédicaments<sup>6-8</sup>. Il a ainsi été démontré qu'il était important de déterminer les propriétés physico-chimiques (taille, stabilité, propriétés de surface et libération de la molécule active) post-formulation mais également dans les milieux biologiques. De plus, Dormont *et al.* ont mis en avant les défis rencontrés lors du passage au développement industriel<sup>9</sup>. Ils ont ainsi comparé deux lots de nanoparticules : l'un formulé à l'échelle du gramme au laboratoire, l'autre à l'échelle du kilogramme en industrie. Les auteurs ont montré qu'une différence de pureté, obtenue lors de la synthèse du conjugué adénosine-squalène à l'échelle industrielle, entraînait une modification des propriétés des nanoparticules (modification de la structure interne) et ainsi une modification de l'activité biologique.

Nous avons ainsi pu soulever dans ce projet les difficultés rencontrées lors de la caractérisation d'un paramètre aussi essentiel que la taille des auto-assemblages, entraînant de nombreuses interrogations vis-à-vis de la législation. En effet, la Commission Européenne définit un nanomatériau d'un point de vue purement législatif comme un objet dont la taille est inférieure à 100 nm. Mais à partir de quelle méthode cette taille doit-elle être déterminée ? Sur quelle(s) technique(s) doit-on baser les études ? La diffusion de la lumière est-elle suffisante pour obtenir des résultats fiables ? Dans ce contexte, l'institut américain du cancer (NCI) a mis en place un laboratoire national de caractérisation (NCL) qui travaille avec le laboratoire Européen de caractérisation des nanomédecines (EUNCL) afin d'élaborer des protocoles de caractérisation physico-chimiques en accord avec la réglementation<sup>10</sup>. Tous les protocoles développés sont ainsi disponibles en ligne<sup>11,12</sup>.

La stratégie élaborée s'articule autour de 3 étapes en fonction de la complexité des systèmes étudiés (figure 14). Le plus souvent, les méthodes de fractionnement (comme l'ultracentrifugation), qui séparent les échantillons en fractions mono-dispersées, sont couplées à un système d'analyse approprié.



**Figure 14** : Stratégie développée par le NCI-NCL et l'EUNCL afin de mesurer la distribution en taille des auto-assemblages : approche progressive en trois étapes en fonction de la complexité du système. Le but de chaque étape est décrit et des exemples de méthodes utilisées pour la caractérisation sont cités.

DLS : diffusion dynamique de la lumière, NTA : analyse du suivi individuel des nanoparticules, AF4 : fractionnement d'écoulement de champ par écoulement asymétrique, MALS : diffusion de la lumière sous multiples angles, TEM : microscopie électronique à transmission, AUC : ultracentrifugation analytique, DCS : centrifugation à sédimentation différentielle, SAXS : diffusion des rayons X aux petits angles, RMN : Résonance magnétique nucléaire. (Adapté de Caputo *et al.*)<sup>10</sup>.

Nous avons pu constater, dans une étude récente qui analyse les dossiers présentés à la FDA de 1973 à 2015, que la DLS était la méthode la plus utilisée pour déterminer la taille des objets formés (méthode utilisée dans 48 % des applications) suivie par la diffraction de la lumière (30 %) et la microscopie (14 %)<sup>6,10</sup>. La DLS, bien qu'étant une méthode rapide et peu coûteuse, a cependant été reconnue comme étant une technique à faible résolution qui doit donc être utilisée afin d'obtenir des résultats préliminaires. Cette méthode présente ainsi des limitations très importantes, notamment pour l'analyse d'échantillons polydispenses : l'intensité diffusée dépendant de la taille de l'objet à la puissance 6, un petit nombre de grosses particules (comme des poussières) peuvent ainsi masquer des objets majoritaires plus petits. Il est ainsi important, afin d'obtenir une caractérisation précise et réaliste des auto-assemblages, de multiplier et de combiner les méthodes de caractérisation<sup>5,7,13,14</sup>.

Il se pose également la question des interactions des nano-objets avec le milieu biologique : la taille limite de 100 nm définie par la Commission Européenne prend-elle en compte les interactions entre la surface des objets et les protéines présentes dans les milieux biologiques après administration ?

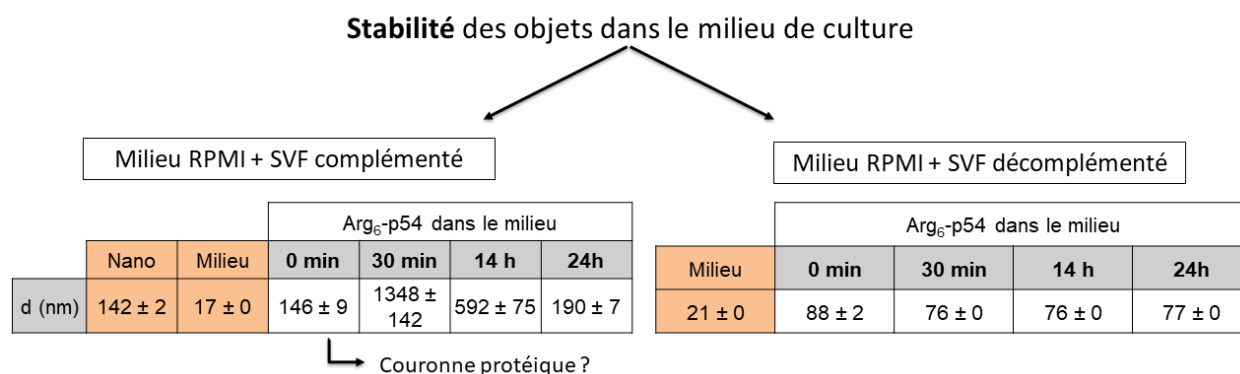


### 3. Interactions protéines-nanoparticule : la couronne protéique

La compréhension des interactions entre les nanoparticules et les molécules biologiques est une étape importante pour le développement des nanomédicaments. Le concept d'interaction de protéines à la surface des auto-assemblages, entraînant la formation d'une « hard protein-corona », a été de nombreuses fois discuté<sup>15-17</sup>. En effet, différentes études sur la composition de cette « hard protein-corona » montrent des résultats contradictoires. La complexité de la composition des milieux biologiques (avec plus de 3700 protéines présentes à différentes concentrations) et l'étude des interactions qui se créent entre la surface des objets et les protéines sont des paramètres clés qui rendent l'étude d'autant plus complexe<sup>18</sup>. Cette couronne joue pourtant un rôle important sur le devenir biologique de la nanoparticule : elle peut modifier notamment l'internalisation des nanoparticules dans les tissus et les cellules<sup>16</sup> et peut entraîner l'activation du système immunitaire<sup>19</sup>. La structure et la composition de la couronne varient en fonction de la nature de la nanoparticule. En effet, Orts-Gil *et al.* ont montré que la fonctionnalisation des nanoparticules avec du polyéthylène glycol entraînait une diminution de la quantité de protéines adsorbées ainsi qu'une modification de la composition protéique<sup>20,21</sup>. Il est ainsi admis que les caractéristiques (taille, forme, charge, composition de la surface) des nanoparticules étudiées modulent les propriétés de la couronne protéique<sup>22,23</sup>. L'adsorption des protéines sur les nanoparticules est décrite *via* l'effet Vroman : dans un mélange complexe de protéines, une série d'étapes d'adsorption et de désorption sont généralement impliquées, au cours desquelles les protéines ayant une mobilité plus élevée (protéines de faible poids moléculaire ou à forte concentration) sont tout d'abord adsorbées puis remplacées par les protéines moins mobiles ou ayant une grande affinité avec la surface<sup>24,25</sup>. Cet effet conduit à la formation de « hard corona »<sup>26</sup> ou « soft corona »<sup>27</sup>, en fonction des interactions entre les protéines et la surface des objets. Milani *et al.* ont ainsi démontré que la couronne pouvait être composée de différentes couches, la première couche étant liée de façon irréversible à la surface des nanoparticules (« hard corona ») tandis que les couches externes (« soft corona ») sont liées de manière réversible aux nanoparticules<sup>28</sup>. Dans ces couches externes, les protéines peuvent être échangées au cours du temps. Ainsi la couronne protéique est une couche dynamique dans laquelle l'arrangement et la quantité de protéines sont modifiables en fonction des conditions physico-chimiques et biologiques.

Il est ainsi important de considérer cette couronne protéique lors de l'étude de l'activité biologique des auto-assemblages. Ainsi, dans ce projet nous avons choisi de travailler *in vitro* avec des milieux contenant des sérums complétés et donc contenant toutes les protéines présentes dans les milieux biologiques. Lors d'études préliminaires, nous avons également pu constater une augmentation de la taille des nanoparticules au cours du temps dans le milieu contenant du sérum complété (analyse à différents temps : 0 min, 30 min, 14 h et 24 h). Cette évolution n'a pas été observée lors de l'étude de la stabilité dans un milieu contenant du sérum décomplété (figure 15). Nous avons ainsi supposé la formation d'une couronne protéique au

contact du complément présent dans le sérum. Des analyses supplémentaires pourraient être envisagées afin de confirmer cette hypothèse et ainsi d'approfondir l'étude sur la formation de la couronne protéique (épaisseur de la couche, composition et structure) à la surface de nos nano-assemblages. Cette étude peut être envisagée en isolant la couronne protéique (par centrifugation) puis grâce à différentes méthodes analytiques comme la microscopie électronique ou encore la spectrométrie de masse<sup>29,30</sup>.



**Figure 15** : Etude par DLS de la stabilité de la suspension Arg<sub>6</sub>-p54 dans le milieu RPMI contenant du sérum complémenté ou du sérum décomplémenté.

Nous devons ainsi être conscients que les auto-assemblages étudiés lors de cette thèse, après injection, ne seront pas uniquement formés de polyéthylène glycol, de peptide et de composé actif (ferrocifène) mais également de protéines adsorbées à la surface. Les nanoparticules et leur couronne protéique doivent ainsi être considérées comme le nanomédicament à caractériser<sup>31</sup>.

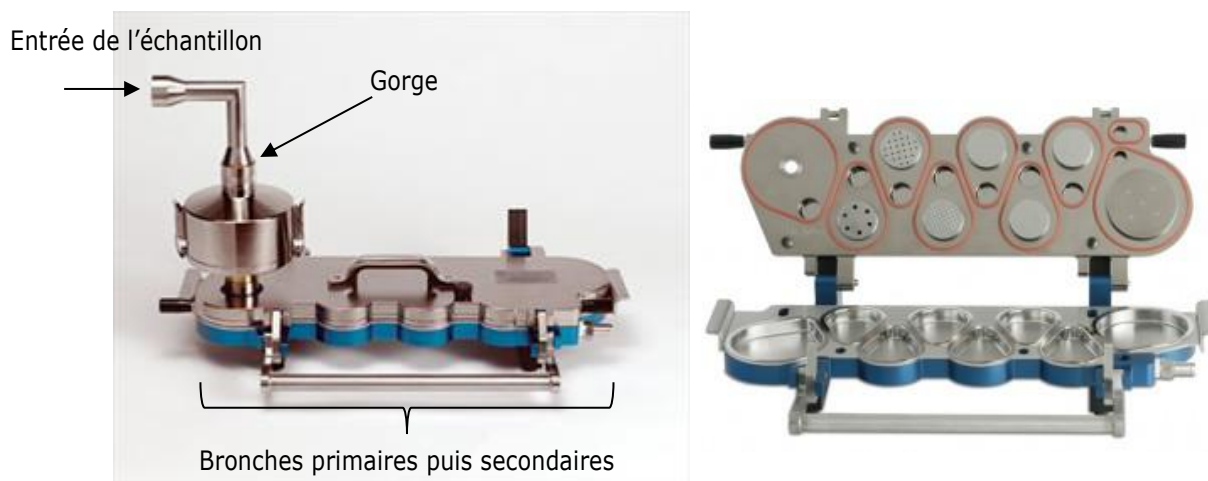
## 4. Expériences *in vivo*

Dans une perspective d'administration par voie pulmonaire, de nombreuses barrières biologiques sont à considérer. Dans la partie supérieure des poumons, particulièrement au niveau de la trachée et des bronches, les nanoparticules vont rencontrer les cellules ciliées, les macrophages, le mucus et *in fine* la membrane cellulaire de la cellule d'intérêt<sup>32-34</sup>. Pour cela, nous utilisons dans ce projet des peptides pénétrants qui sont capables de traverser les membranes et ainsi faciliter l'internalisation cellulaire du principe actif. De plus, des stratégies doivent être mises en place pour échapper au système d'élimination des particules : - au niveau des muqueuses de la trachée et des bronches, les cellules ciliées participent à l'élimination des nanoparticules *via* le mécanisme d'ascenseur mucociliaire, - au niveau alvéolaire, les macrophages prennent en charge les nanoparticules non solubilisées dans le poumon par un mécanisme de phagocytose<sup>35</sup>. Ainsi, la modification des propriétés de surface par l'incorporation de polyéthylène glycol permettrait de diminuer le processus d'élimination<sup>36</sup>.

Nous avons, au cours de ces travaux, démarré une étude préliminaire *in vivo* pour pouvoir évaluer l'efficacité et donc l'intérêt de la suspension qui était la plus prometteuse. Cette suspension, résultant de la co-nanoprécipitation de l'Arg<sub>9</sub>-p54 et du PEG-p54 (ratio molaire 10/1), a été étudiée sur des tumeurs

bronchiques NCI-H460 dans un modèle orthotopique murin. La suspension a été administrée en utilisant un appareillage spécifique Microsprayer® qui permet de délivrer un spray dans la trachée du rongeur.

Il est important de noter la différence entre l'appareillage mis en place chez la souris au cours de ce projet (formation d'un spray) et les différents types d'appareils couramment utilisés pour la nébulisation (formation d'un aérosol grâce à des nébuliseurs pneumatiques, ultrasoniques ou à tamis vibrant). En perspective de ce projet, il pourrait être intéressant de tester chacun d'entre eux afin de déterminer celui qui serait le plus adapté : seule l'expérimentation pourra permettre de sélectionner un nébuliseur. La biodistribution pulmonaire après administration par nébulisation ou spray pourra être analysée afin de déterminer la dose optimale à délivrer ainsi que le rythme d'administration permettant d'observer une efficacité thérapeutique, en l'absence de toxicité locale. Pour cela, nous pourrions utiliser un appareil permettant de reproduire le système respiratoire et ainsi de suivre le parcours des suspensions inhalées tout au long des voies respiratoires : le NGI (*Next Generation Impactor*). Ce système permet de mesurer, pour chaque dose inhalée, jusqu'où va la suspension et en quelle quantité elle se dépose dans les différentes parties du bloc respiratoire (figure 16). Les différentes suspensions pourront également être comparées en fonction de leur comportement au contact du mucus bronchique qui tapisse les alvéoles pulmonaires (importance de la présence du polyéthylène glycol). Ainsi, les suspensions pourront être analysées *in vitro* sur des modèles de culture de cellules primaires bronchiques en 3-D à l'interface air-liquide. Il est ainsi possible d'étudier le devenir des auto-assemblages au contact d'un épithélium reconstitué formé de cellules différenciées en cellules sécrétrices de mucus et cellules ciliées<sup>37</sup>.



**Figure 16** : Appareil NGI (*Next Generation Impactor*) permettant de reproduire le système respiratoire afin de suivre le parcours des suspensions

Le remplacement des modèles *vivo* par des modèles *vitro* (2D et 3D) a été discuté pour de nombreuses applications. En effet, le recours à des méthodes alternatives en expérimentation animale est aujourd'hui en pleine expansion. Cependant, il semble difficile d'obtenir des modèles *in vitro* pertinents car les cellules primaires une fois isolées et cultivées diffèrent de façon importante des cellules initiales présentes dans

l'organisme<sup>38,39</sup>. De plus, les interactions entre les organes et les différents types de cellules ne sont plus prises en compte, ce qui engendre un biais au niveau de la réponse thérapeutique.

## 5. Nébulisation *versus* inhalation de poudre sèche

Actuellement, différents types de dispositifs pour l'administration pulmonaire sont disponibles : les nébuliseurs, les inhalateurs pressurisés à valve doseuse, les inhalateurs « Soft Mist™ » et les inhalateurs à poudre sèche (dry powder inhalers, DPI). Tous ces dispositifs permettent de disperser un liquide, sauf le dernier qui consiste à disperser une poudre. Les nébuliseurs ont plusieurs avantages puisqu'ils permettent d'administrer des solutions ou des dispersions de façon relativement simple, à des doses élevées. Cependant il a été démontré que le dépôt de l'aérosol généré au niveau pulmonaire était relativement faible, avec une contamination importante de l'environnement et des temps d'administration longs. Les DPI se présentent sous forme de dispositifs unidose (comme l'Aerolizer®) ou multidose (comme le Turbuhaler®) (figure 17).



**Figure 17** : Exemples d'inhalateurs de poudre sèche (A) unidose à gélules (Aerolizer®), (B) multidose à réservoir (Turbuhaler®).

Les dispositifs unidose consistent à recharger l'appareil avant chaque inhalation avec des doses unitaires se présentant sous forme de gélules, dont le contenu est libéré par perçage. Les appareils multidose possèdent un réservoir de poudre ou un nombre défini de doses unitaires dans les capsules d'un blister<sup>40</sup>. Ces deux dispositifs ne contiennent pas de gaz propulseur et permettent ainsi une diminution de l'émission de CO<sub>2</sub> par rapport aux aérosols classiques. Les DPI présentent plusieurs avantages qui en font des appareils prometteurs pour l'administration de chimiothérapie inhalée. Ils permettent l'administration de doses élevées en un temps relativement court : environ 1 min est nécessaire pour administrer une dose contenant 20 à 30 mg de produit, en comparaison à la nébulisation qui nécessite 15 min pour administrer 5 mL de liposomes contenant 5 mg de cisplatine<sup>41</sup>. De plus, l'activation de l'aérosol pour les DPI ne se fait que sous l'inspiration du patient. La contamination de l'environnement extérieur est donc diminuée avec une perte dans l'environnement inférieure à 0,2 % pour l'air exhalé par rapport aux nébuliseurs classiques<sup>42</sup>. Différents paramètres déterminent la qualité du dépôt de la substance active dans les poumons : les propriétés de la poudre, les performances du dispositif d'inhalation et le flux inspiratoire qui dépend de l'état du patient. Cependant, il est nécessaire de développer des formulations ayant des caractéristiques spécifiques : libération contrôlée avec modification de la pharmacocinétique de la molécule active afin de diminuer la

toxicité locale, pénétration cellulaire et stabilité après lyophilisation. En effet un inconvénient majeur à l'utilisation de la voie pulmonaire est la faible dose en molécule active déposée dans les alvéoles pulmonaires : seulement 10 % de la dose initiale atteint les alvéoles<sup>43,44</sup>. Il est également important de contrôler la stabilité de la formulation après lyophilisation et d'analyser les caractéristiques physico-chimiques de la suspension une fois que celle-ci entre en contact avec les fluides pulmonaires<sup>45</sup>. Une fois encore se pose la question de la complexité de la caractérisation et les méthodes adéquates à utiliser pour caractériser de façon la plus réaliste possible le comportement des auto-assemblages dans des milieux complexes. Il est à noter que la plupart des nanoparticules décrites dans la littérature sont sous forme de suspension dans un liquide, c'est-à-dire adaptée à la nébulisation. Un exemple de nanovecteurs développés pour un dispositif DPI sont des nanoparticules de n-butylcyanoacrylate chargées en doxorubicine contenue dans une matrice sèche effervescente ou non. Les auteurs ont ainsi montré l'efficacité *in vivo* de la formulation et de la technique d'inhalation : une augmentation significative de l'efficacité antitumorale et de la survie a pu être observée. De plus, aucune toxicité cardiaque n'a été observée contrairement à l'inhalation d'une solution de doxorubicine<sup>46</sup>.

Il pourrait être intéressant dans ce projet d'évaluer la faisabilité de l'administration des auto-assemblages *via* un dispositif DPI en incorporant dans la suspension des excipients ou agents protecteurs (saccharose, lactose, poloxamère 188 ou tréhalose<sup>47</sup>) permettant de rendre les nanovecteurs stables après lyophilisation. Cependant une diminution de la charge en drogue sera à considérer. La comparaison des deux dispositifs (inhalation de poudre sèche versus nébulisation) pourra ainsi être étudiée. La mise à l'échelle de la synthèse des conjugués et de la formulation des nanoparticules sera également envisagée afin d'appréhender au mieux les différences de caractéristiques physico-chimiques et donc d'activité biologique des nanoparticules selon qu'elles soient obtenues à l'échelle industrielle ou en laboratoire<sup>9</sup>.

## Bibliographie

- (1) Jaouen, G.; Vessières, A.; Top, S. Ferrocifen Type Anti Cancer Drugs. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (24), 8802–8817. <https://doi.org/10.1039/c5cs00486a>.
- (2) Jaouen, G.; Top, S. The Ferrocifen Family as Potent and Selective Antitumor Compounds: Mechanisms of Action. In *Advances in Organometallic Chemistry and Catalysis*; Wiley-Blackwell, 2013; pp 563–580. <https://doi.org/10.1002/9781118742952.ch42>.
- (3) Vessières, A.; Corbet, C.; Heldt, J. M.; Lories, N.; Jouy, N.; Laïos, I.; Leclercq, G.; Jaouen, G.; Toillon, R.-A. A Ferrocenyl Derivative of Hydroxytamoxifen Elicits an Estrogen Receptor-Independent Mechanism of Action in Breast Cancer Cell Lines. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104* (5), 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.12.020>.
- (4) Top, S.; Vessières, A.; Leclercq, G.; Quivy, J.; Tang, J.; Vaissermann, J.; Huché, M.; Jaouen, G. Synthesis, Biochemical Properties and Molecular Modelling Studies of Organometallic Specific Estrogen Receptor Modulators (SERMs), the Ferrocifens and Hydroxyferrocifens: Evidence for an Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on Both Hormone-Dependent and Hormone-Independent Breast Cancer Cell Lines. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2003**, *9* (21), 5223–5236. <https://doi.org/10.1002/chem.200305024>.
- (5) Coty, J.-B.; Vauthier, C. Characterization of Nanomedicines: A Reflection on a Field under Construction Needed for Clinical Translation Success. *J. Controlled Release* **2018**, *275*, 254–268. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.013>.
- (6) D’Mello, S. R.; Cruz, C. N.; Chen, M.-L.; Kapoor, M.; Lee, S. L.; Tyner, K. M. The Evolving Landscape of Drug Products Containing Nanomaterials in the United States. *Nat. Nanotechnol.* **2017**, *12*, 523.
- (7) Gioria, S.; Caputo, F.; Urbán, P.; Maguire, C. M.; Bremer-Hoffmann, S.; Prina-Mello, A.; Calzolari, L.; Mehn, D. Are Existing Standard Methods Suitable for the Evaluation of Nanomedicines: Some Case Studies. *Nanomed.* **2018**, *13* (5), 539–554. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0338>.
- (8) Halamoda-Kenzaoui, B.; Holzwarth, U.; Roebben, G.; Bogni, A.; Bremer-Hoffmann, S. Mapping of the Available Standards against the Regulatory Needs for Nanomedicines. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2019**, *11* (1), e1531. <https://doi.org/10.1002/wnan.1531>.
- (9) Dormont, F.; Rouquette, M.; Mahatsekake, C.; Gobeaux, F.; Peramo, A.; Brusini, R.; Calet, S.; Testard, F.; Lepetre-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; et al. Translation of Nanomedicines from Lab to Industrial Scale Synthesis: The Case of Squalene-Adenosine Nanoparticles. *J. Controlled Release* **2019**, *307*, 302–314. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.040>.
- (10) Caputo, F.; Clogston, J.; Calzolari, L.; Rösslein, M.; Prina-Mello, A. Measuring Particle Size Distribution of Nanoparticle Enabled Medicinal Products, the Joint View of EUNCL and NCI-NCL. A Step by Step Approach Combining Orthogonal Measurements with Increasing Complexity. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2019**, *299*, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.030>.
- (11) Assay Cascade Protocols | Nanotechnology Characterization Lab (NCL) <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols> (accessed Aug 7, 2019).
- (12) Assay Cascade <http://www.euncl.eu/about-us/assay-cascade/> (accessed Aug 7, 2019).
- (13) Mehn, D.; Caputo, F.; Rösslein, M.; Calzolari, L.; Saint-Antonin, F.; Courant, T.; Wick, P.; Gilliland, D. Larger or More? Nanoparticle Characterisation Methods for Recognition of Dimers. *RSC Adv.* **2017**, *7* (44), 27747–27754. <https://doi.org/10.1039/C7RA02432K>.
- (14) Maguire, C. M.; Rösslein, M.; Wick, P.; Prina-Mello, A. Characterisation of Particles in Solution – a Perspective on Light Scattering and Comparative Technologies. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2018**, *19* (1), 732–745. <https://doi.org/10.1080/14686996.2018.1517587>.

- (15) Milani, S.; Baldelli Bombelli, F.; Pitek, A. S.; Dawson, K. A.; Rädler, J. Reversible versus Irreversible Binding of Transferrin to Polystyrene Nanoparticles: Soft and Hard Corona. *ACS Nano* **2012**, *6* (3), 2532–2541. <https://doi.org/10.1021/nn204951s>.
- (16) Monopoli, M. P.; Åberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K. A. Biomolecular Coronas Provide the Biological Identity of Nanosized Materials. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7* (12), 779–786. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207>.
- (17) Zanganeh, S.; Spitler, R.; Erfanzadeh, M.; Alkilany, A. M.; Mahmoudi, M. Protein Corona: Opportunities and Challenges. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *75*, 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.01.005>.
- (18) Kharazian, B.; Hadipour, N. L.; Ejtehadi, M. R. Understanding the Nanoparticle–Protein Corona Complexes Using Computational and Experimental Methods. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *75*, 162–174. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.02.008>.
- (19) Chen, F.; Wang, G.; Griffin, J. I.; Brenneman, B.; Banda, N. K.; Holers, V. M.; Backos, D. S.; Wu, L.; Moghimi, S. M.; Simberg, D. Complement Proteins Bind to Nanoparticle Protein Corona and Undergo Dynamic Exchange in Vivo. *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *12*, 387.
- (20) Orts-Gil, G.; Natte, K.; Thiermann, R.; Girod, M.; Rades, S.; Kalbe, H.; Thünemann, A. F.; Maskos, M.; Österle, W. On the Role of Surface Composition and Curvature on Biointerface Formation and Colloidal Stability of Nanoparticles in a Protein-Rich Model System. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *108*, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.02.027>.
- (21) Kurtz-Chalot, A.; Villiers, C.; Pourchez, J.; Boudard, D.; Martini, M.; Marche, P. N.; Cottier, M.; Forest, V. Impact of Silica Nanoparticle Surface Chemistry on Protein Corona Formation and Consequential Interactions with Biological Cells. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *75*, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.028>.
- (22) Capriotti, A. L.; Caracciolo, G.; Caruso, G.; Foglia, P.; Pozzi, D.; Samperi, R.; Laganà, A. Differential Analysis of “Protein Corona” Profile Adsorbed onto Different Nonviral Gene Delivery Systems. *Anal. Biochem.* **2011**, *419* (2), 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.08.003>.
- (23) Nguyen, V. H.; Lee, B.-J. Protein Corona: A New Approach for Nanomedicine Design. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 3137–3151. <https://doi.org/10.2147/IJN.S129300>.
- (24) Vroman, L.; Adams, A. L.; Fischer, G. C.; Munoz, P. C. Interaction of High Molecular Weight Kininogen, Factor XII, and Fibrinogen in Plasma at Interfaces. *Blood* **1980**, *55* (1), 156–159.
- (25) Scott, C. F. Mechanism of the Participation of the Contact System in the Vroman Effect. Review and Summary. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1991**, *2* (3), 173–181. <https://doi.org/10.1080/09205063.1991.9756658>.
- (26) Cedervall, T.; Lynch, I.; Foy, M.; Berggård, T.; Donnelly, S. C.; Cagney, G.; Linse, S.; Dawson, K. A. Detailed Identification of Plasma Proteins Adsorbed on Copolymer Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (30), 5754–5756. <https://doi.org/10.1002/anie.200700465>.
- (27) Lynch, I.; Cedervall, T.; Lundqvist, M.; Cabaleiro-Lago, C.; Linse, S.; Dawson, K. A. The Nanoparticle-Protein Complex as a Biological Entity; a Complex Fluids and Surface Science Challenge for the 21st Century. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2007**, *134–135*, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.04.021>.
- (28) Milani, S.; Baldelli Bombelli, F.; Pitek, A. S.; Dawson, K. A.; Rädler, J. Reversible versus Irreversible Binding of Transferrin to Polystyrene Nanoparticles: Soft and Hard Corona. *ACS Nano* **2012**, *6* (3), 2532–2541. <https://doi.org/10.1021/nn204951s>.
- (29) Pederzoli, F.; Tosi, G.; Vandelli, M. A.; Belletti, D.; Forni, F.; Ruozi, B. Protein Corona and Nanoparticles: How Can We Investigate On? *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9* (6), e1467. <https://doi.org/10.1002/wnan.1467>.

- (30) Monopoli, M. P.; Pitek, A. S.; Lynch, I.; Dawson, K. A. Formation and Characterization of the Nanoparticle-Protein Corona. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2013**, *1025*, 137–155. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-462-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-462-3_11).
- (31) Fadeel, B.; Feliu, N.; Vogt, C.; Abdelmonem, A. M.; Parak, W. J. Bridge over Troubled Waters: Understanding the Synthetic and Biological Identities of Engineered Nanomaterials. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2013**, *5* (2), 111–129. <https://doi.org/10.1002/wnan.1206>.
- (32) Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33* (9), 941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>.
- (33) de Souza Carvalho, C.; Daum, N.; Lehr, C.-M. Carrier Interactions with the Biological Barriers of the Lung: Advanced in Vitro Models and Challenges for Pulmonary Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *75*, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.05.014>.
- (34) Xu, Q.; Ensign, L. M.; Boylan, N. J.; Schön, A.; Gong, X.; Yang, J.-C.; Lamb, N. W.; Cai, S.; Yu, T.; Freire, E.; et al. Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus Ex Vivo and Distribution in Vivo. *ACS Nano* **2015**, *9* (9), 9217–9227. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b03876>.
- (35) Loira-Pastoriza, C.; Todoroff, J.; Vanbever, R. Delivery Strategies for Sustained Drug Release in the Lungs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *75*, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.05.017>.
- (36) Meenach, S.; Anderson, K.; Hilt, J.; McGarry, R.; Mansour, H. Characterization and Aerosol Dispersion Performance of Spray-Dried Chemotherapeutic PEGylated Phospholipid Particles for Dry Powder Inhalation Delivery in Lung Cancer. *Chem. Eng. Fac. Publ.* **2013**. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.05.012>.
- (37) Loret, T. Capacité de Modèles in Vitro de Complexité Différente à Prédire Les Réponses Toxiques Pulmonaires Observées in Vivo Après Exposition Aiguë à Des Nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de CeO<sub>2</sub>. thesis, Compiègne, 2017.
- (38) Ghallab, A. In Vitro Test Systems and Their Limitations. *EXCLI J.* **2013**, *12*, 1024–1026.
- (39) Lilienblum, W.; Dekant, W.; Foth, H.; Gebel, T.; Hengstler, J. G.; Kahl, R.; Kramer, P.-J.; Schweinfurth, H.; Wollin, K.-M. Alternative Methods to Safety Studies in Experimental Animals: Role in the Risk Assessment of Chemicals under the New European Chemicals Legislation (REACH). *Arch. Toxicol.* **2008**, *82* (4), 211–236. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0279-9>.
- (40) Devillier, P.; Salvator, H.; Roche, N. Le Choix Du Dispositif d'inhalation (Hors Nébulisation) : Un Acte Médical. *Rev. Mal. Respir.* **2015**, *32* (6), 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2014.10.729>.
- (41) Wittgen, B. P. H.; Kunst, P. W. A.; Born, K. van der; Wijk, A. W. van; Perkins, W.; Pilkiewicz, F. G.; Perez-Soler, R.; Nicholson, S.; Peters, G. J.; Postmus, P. E. Phase I Study of Aerosolized SLIT Cisplatin in the Treatment of Patients with Carcinoma of the Lung. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (8), 2414–2421. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1480>.
- (42) Newhouse, M. T.; Hirst, P. H.; Duddu, S. P.; Walter, Y. H.; Tarara, T. E.; Clark, A. R.; Weers, J. G. Inhalation of a Dry Powder Tobramycin PulmoSphere Formulation in Healthy Volunteers. *Chest* **2003**, *124* (1), 360–366. <https://doi.org/10.1378/chest.124.1.360>.
- (43) El-Gendy, N.; Gorman, E. M.; Munson, E. J.; Berkland, C. Budesonide Nanoparticle Agglomerates as Dry Powder Aerosols with Rapid Dissolution. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98* (8), 2731–2746. <https://doi.org/10.1002/jps.21630>.
- (44) Rasenack, N.; Steckel, H.; Müller, B. W. Micronization of Anti-Inflammatory Drugs for Pulmonary Delivery by a Controlled Crystallization Process. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92* (1), 35–44. <https://doi.org/10.1002/jps.10274>.



- (45) Rosière, R.; Hureauux, J.; Levet, V.; Amighi, K.; Wauthoz, N. La Chimiothérapie Inhalée – Partie 1 : Concept et Challenges Technologiques Actuels. *Rev. Mal. Respir.* 2018, 35 (4), 357–377. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.02.001>.
- (46) Roa, W. H.; Azarmi, S.; Al-Hallak, M. H. D. K.; Finlay, W. H.; Magliocco, A. M.; Löbenberg, R. Inhalable Nanoparticles, a Non-Invasive Approach to Treat Lung Cancer in a Mouse Model. *J. Controlled Release* 2011, 150 (1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.10.035>.
- (47) Hirsjärvi, S.; Peltonen, L.; Hirvonen, J. Effect of Sugars, Surfactant, and Tangential Flow Filtration on the Freeze-Drying of Poly(Lactic Acid) Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* 2009, 10 (2), 488–494. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9236-z>.

## Conclusion et perspectives

Au cours de ces travaux, une plateforme innovante a été mise en place pour la vectorisation d'une molécule anticancéreuse hydrophobe : la molécule de ferrocifène (p54) (figure 18). La conception de cette plateforme est basée sur la combinaison de trois stratégies de vectorisation : l'utilisation de peptide pénétrant, la formation d'une prodrogue amphiphile et l'auto-assemblage en nanoparticules. La synthèse des conjugués (CPP-p54) formés de deux types de peptides pénétrants Arg<sub>n</sub>-p54 (n=6 à 9) ou RLW-p54, leurs auto-assemblages dans l'eau ainsi que la caractérisation complète des objets formés ont été réalisés, tout en soulevant l'importance des méthodes de caractérisation employées pour caractériser l'objet réellement formé. En effet, la diffusion dynamique de la lumière, qui est une méthode couramment utilisée pour déterminer la taille des nanoparticules, n'a permis de caractériser qu'une infime population de la suspension représentant moins de 1 % de la matière. Ainsi nous avons démontré l'importance d'utiliser des méthodes complémentaires telles que la diffusion des rayons X aux petits angles, la quantification après filtration ou encore la diffusométrie RMN pour avoir une représentation fiable des objets formés.

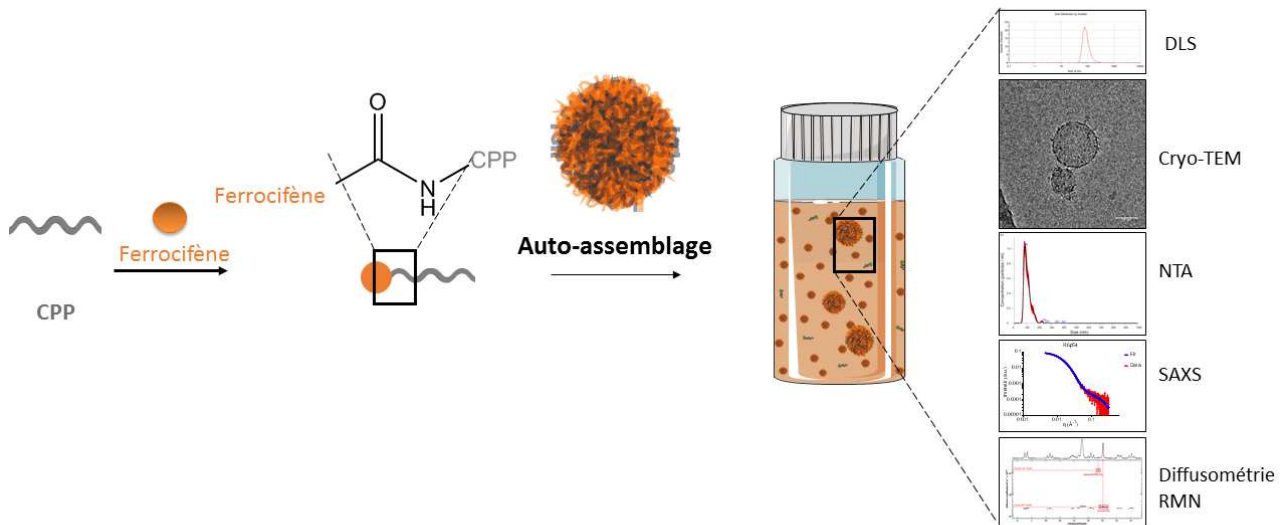
Nous avons démontré qu'il était possible d'améliorer l'activité biologique du ferrocifène (augmentation d'un facteur 9 avec la suspension Arg<sub>9</sub>-p54) en augmentant le pourcentage d'internalisation grâce aux peptides pénétrants et à l'auto-association. L'incorporation de polyéthylène glycol (PEG) a permis de protéger le peptide pénétrant et de cacher les charges positives entraînant ainsi une diminution de l'internalisation cellulaire. Nous avons pu observer la formation de deux métabolites différents à partir du CPP-p54 et du PEG-p54 : il serait intéressant d'analyser la structure chimique de ces métabolites. Enfin, l'étude préliminaire *in vivo* a révélé le potentiel thérapeutique de la suspension Arg<sub>9</sub>-p54/PEG-p54 (10/1) : la nébulisation intratrachéale de cette suspension n'a pas montré de toxicité sur les souris et a permis de réduire le volume tumoral d'un facteur 3.

Dans la continuité des travaux réalisés *in vivo*, la nébulisation de la suspension composée uniquement d'Arg<sub>9</sub>-p54 pourra être effectuée afin d'évaluer l'apport du PEG-p54. De la même façon, le contrôle p54 seul devra être effectué en prenant en compte le caractère hydrophobe de la molécule *via* l'utilisation de surfactants. De plus, différentes voies d'administration pourront être envisagées afin de prouver le bénéfice apporté par l'aérosolthérapie : comparaison entre nébulisation et administration par voie intraveineuse. La lyophilisation de la suspension pourra également être étudiée afin de comparer deux dispositifs d'administration pulmonaire différents : l'inhalation de poudre sèche et la nébulisation. Par la suite, la comparaison de cette nouvelle plateforme pourra être effectuée avec l'encapsulation des ferrocifènes au sein des LNC afin de prouver l'intérêt de l'utilisation d'un vecteur qui limite l'utilisation d'excipients.

La nano-plateforme mise en place dans ce projet pourra être modulée en jouant sur la séquence peptidique utilisée. En effet, la molécule de ferrocifène semble gouverner le processus d'auto-assemblage, les peptides pénétrants apportant de la stabilité aux structures formées.

## Chapitre 1

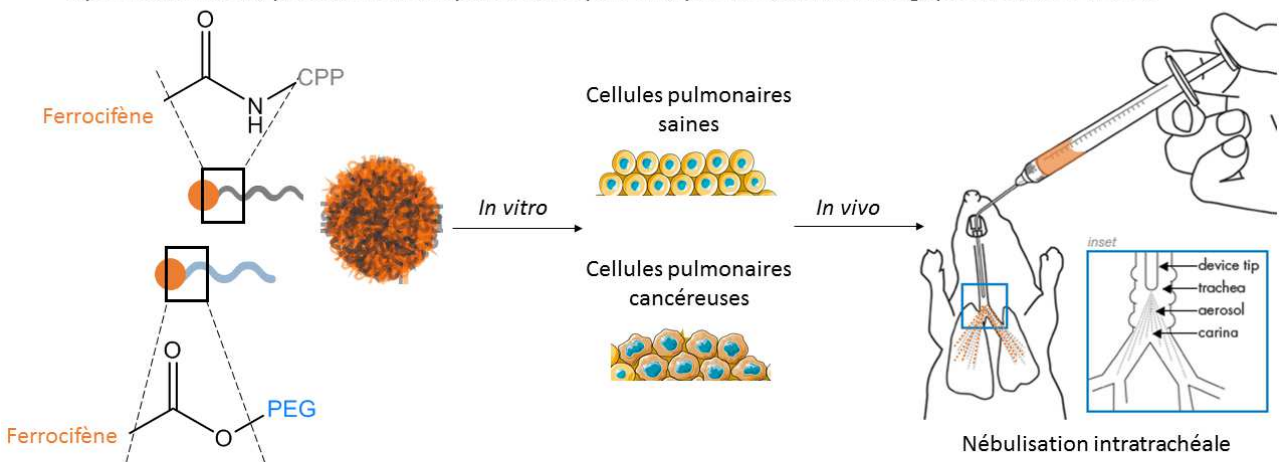
Conception de la plateforme nanoparticulaire : combinaison des trois stratégies de vectorisation



Importance et complémentarité des méthodes de caractérisation

## Chapitre 2

Optimisation de la plateforme nanoparticulaire puis analyse de l'activité biologique *in vitro* et *in vivo*



Augmentation de l'activité biologique du ferrocifène grâce aux CPP  
Diminution du volume tumoral

Figure 18 : Représentation schématique des travaux de l'ensemble de la thèse.

# Table des matières

TABLE DES ABRÉVIATIONS .....	1
INTRODUCTION .....	3
<b>1. Les nanomédecines : histoire et législation</b>	<b>3</b>
1.1. Plusieurs générations de nanomédicaments .....	4
1.2. Législation .....	5
1.3. Nanomédicaments sur le marché .....	5
1.4. Ce qu'il faut dépasser .....	6
<b>2. Stratégies pour le développement de nanoparticules innovantes</b>	<b>6</b>
2.1. Les peptides pénétrants .....	6
2.1.1. Propriétés structurales des CPP .....	8
2.1.2. Mécanismes d'internalisation des CPP .....	9
2.2. Les prodrogues .....	10
2.3. Les auto-assemblages de molécules amphiphiles .....	11
<b>3. Auto-assemblages constitués de peptides : synthèse et activité biologique</b>	<b>14</b>
<b>4. Application thérapeutique envisagée</b>	<b>37</b>
4.1. Les ferrocifènes .....	37
4.2. Le cancer du poumon .....	39
4.2.1. Épidémiologie du cancer du poumon et facteurs de risque .....	39
4.2.2. Les différents types de cancers du poumon .....	39
4.2.3. Les traitements .....	40
a) La chirurgie .....	41
b) Les traitements médicamenteux .....	42
c) La radiothérapie .....	43
4.3. L'aérosolthérapie .....	43
<b>5. Objectifs de la thèse</b>	<b>47</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>48</b>
<b>CHAPITRE 1 : « IMPORTANCE OF COMBINING ADVANCED PARTICLE SIZE ANALYSIS TECHNIQUES TO CHARACTERIZE CELL PENETRATING PEPTIDE-FERROCIFEN SELF-ASSEMBLIES » .....</b>	<b>58</b>
<b>1. Quelles méthodes utiliser pour caractériser les nanoparticules ?</b>	<b>59</b>
1.1. Diffusion de la lumière .....	60
1.1.1. La diffusion dynamique de la lumière (DLS) .....	61
1.1.2. La diffusion de la lumière sous multiples angles (MALS) .....	62
1.1.3. Analyse du suivi individuel de particules (NTA) .....	62
1.2. Microscopie électronique .....	62
1.3. Diffusion des rayons X aux petits angles .....	63
1.3.1. Interaction des rayons X avec la matière .....	63
1.3.2. Que mesure-t-on grâce à la diffusion des rayons X aux petits angles ? .....	64
1.3.3. Facteur de forme .....	64
1.3.4. Régime de Guinier .....	65
1.3.5. Facteur de structure et interactions entre les particules .....	65
<b>Abstract</b>	<b>66</b>
<b>Introduction</b>	<b>67</b>
<b>Results and discussion</b>	<b>68</b>
<b>Conclusion</b>	<b>76</b>
<b>Supporting information</b>	<b>82</b>
<b>CHAPITRE 2 : « SELF-ASSEMBLIES OF CELL-PENETRATING PEPTIDES AND FERROCIFENS: DESIGN AND EVALUATION OF AN INNOVATIVE PLATFORM FOR LUNG CANCER TREATMENT » .....</b>	<b>101</b>
<b>Abstract</b>	<b>102</b>
<b>Introduction</b>	<b>103</b>
<b>1. Results and discussion</b>	<b>105</b>
1.1. Synthesis and characterization of conjugates .....	105

1.2.	Stability study of CPP-p54 and PEG-p54 in biological medium .....	106
1.3.	Biological activity of CPP-p54 suspensions: viability assay and internalization quantification .....	108
1.3.1.	Cytotoxicity and internalization evaluation on healthy cell line .....	108
1.3.2.	Cell viability and internalization quantification on lung cancer cells .....	109
1.4.	Co-nanoprecipitation of CPP-p54/PEG-p54 .....	111
1.4.1.	Biological activity of Arg <sub>9</sub> -p54/PEG-p54 suspensions: viability assay and internalization quantification .....	111
1.4.2.	Internalization pathways .....	113
1.5.	Preliminary <i>in vivo</i> study .....	115
	<b>Conclusion</b>	<b>116</b>
<b>2.</b>	<b>Materials and methods</b>	<b>117</b>
2.1.	Materials.....	117
2.2.	Conjugate synthesis and characterization.....	117
2.2.1.	Synthesis and purification.....	117
2.2.2.	Characterization .....	118
2.3.	Self-assembly formulations and characterization.....	119
2.3.1.	Formulation protocol .....	119
2.3.2.	Self-assembly characterization.....	119
2.4.	Stability of conjugates in biological medium .....	120
2.5.	<i>In vitro</i> cell viability .....	120
2.6.	Internalization quantification.....	121
2.7.	Internalization pathways .....	122
2.8.	<i>In vivo</i> experiments .....	122
2.8.1.	Animals .....	122
2.8.2.	Preparation of the Matrigel solution .....	122
2.8.3.	Preparation of cell suspension for its injection.....	123
2.8.4.	Intratracheal administration.....	123
	<b>Supporting Information</b>	<b>125</b>
	<b>Diagramme de phase</b>	<b>128</b>
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE</b> .....		<b>135</b>
<b>1.</b>	<b>Résumé des travaux</b>	<b>135</b>
<b>2.</b>	<b>Caractérisation des auto-assemblages versus législation</b>	<b>136</b>
<b>3.</b>	<b>Interactions protéines-nanoparticule : la couronne protéique</b>	<b>138</b>
<b>4.</b>	<b>Expériences <i>in vivo</i></b>	<b>139</b>
<b>5.</b>	<b>Nébulisation versus inhalation de poudre sèche</b>	<b>141</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>143</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....		<b>147</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....		<b>149</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....		<b>151</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....		<b>152</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b> .....		<b>153</b>

# Table des illustrations

<b>Figure 1</b> : Exemples de nanoparticules utilisées en nanomédecine : Les nanoparticules organiques (liposome, nanocapsule lipidique, micelle, dendrimère, nanoparticule de polymères) et les nanoparticules inorganiques (nanoparticule magnétique, quantum dots, nanoparticule métallique et nanotube de carbone). .....	4
<b>Figure 2</b> : Mécanismes suggérés d'entrées des CPP par translocation. <b>(A)</b> Modèle de micelle inverse, <b>(B)</b> Modèle de pore transitoire et <b>(C)</b> Modèle de fusion membranaire (Bechara & Sagan, 2013 <sup>31</sup> ). .....	10
<b>Figure 3</b> : Différents domaines du diagramme de phase : domaine SFME et domaine Ouzo. Représentation de la fraction massique en acétone en fonction de la fraction massique en huile. Le diamètre des auto-assemblages évolue en fonction de la composition du système (concentration en acétone et en soluté) et du domaine (Ouzo ou SFME) (Yan <i>et al.</i> , 2017 <sup>98</sup> ). .....	12
<b>Figure 4</b> : Structure chimique des ferrocifènes résultant de la substitution d'un groupement phényle de l'hydroxytamoxifène par le ferrocène. ....	37
<b>Figure 5</b> : Mécanisme d'action supposé des ferrocifènes. ....	38
<b>Figure 6</b> : Les différents stades du cancer du poumon. ....	40
<b>Figure 7</b> : Exemples de générateurs d'aérosols : le nébuliseur pneumatique, le nébuliseur ultrasonique et le nébuliseur électronique à tamis vibrant. ....	44
<b>Figure 8</b> : Stratégies de vectorisation pour le développement d'une plateforme innovante permettant l'administration des ferrocifènes. ....	47
<b>Figure 9</b> : Structures chimiques des conjugués : <b>(A)</b> conjugué RLW-p54, <b>(B)</b> conjugué R <sub>n</sub> -p54. ....	59
<b>Figure 10</b> : Appareil de DLS utilisé couramment dans les laboratoires pour la caractérisation des nanoparticules. ....	61
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique d'une expérience de diffusion avec $q$ le vecteur de diffusion, $k$ le vecteur d'onde incident et $k'$ le vecteur d'onde diffusé. ....	63
<b>Figure 12</b> : Schéma d'un profil obtenu en SAXS. L'intensité diffusée est représentée en fonction du vecteur d'onde $q$ lié à l'angle de diffusion $2\theta$ par la relation $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$ , où $\lambda$ est la longueur d'onde des rayons X. ....	64
<b>Figure 13</b> : Diagramme de phase obtenu pour le PEG-p54. La droite bleue représente la binodale. Les domaines Ouzo et SFME sont représentés ainsi que l'évolution du diamètre des nanoparticules en fonction de la concentration massique finale en PEG-p54 et de la fraction massique en acétone. ....	129
<b>Figure 14</b> : Stratégie développée par le NCI-NCL et l'EUNCL afin de mesurer la distribution en taille des auto-assemblages : approche progressive en trois étapes en fonction de la complexité du système. Le but de chaque étape est décrit et des exemples de méthodes utilisées pour la caractérisation sont cités. ....	137
<b>Figure 15</b> : Etude par DLS de la stabilité de la suspension Arg <sub>6</sub> -p54 dans le milieu RPMI contenant du sérum complétement ou du sérum décomplémenté. ....	139
<b>Figure 16</b> : Appareil NGI ( <i>Next Generation Impactor</i> ) permettant de reproduire le système respiratoire afin de suivre le parcours des suspensions .....	140
<b>Figure 17</b> : Exemples d'inhalateurs de poudre sèche <b>(A)</b> unidose à gélules (Aerolizer®), <b>(B)</b> multidose à réservoir (Turbuhaler®). ....	141
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique des travaux de l'ensemble de la thèse. ....	148

## Table des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Exemples d'applications de CPP conjugués à des molécules actives en cours de développement clinique. NR : Non renseigné. (Adapté de Habault & Poyet, 2019 <sup>38</sup> ). .....	7
<b>Tableau 2</b> : Principales caractéristiques des suspensions obtenues dans le domaine SFME ou dans le domaine Ouzo : stabilité, aspect visuel, évolution de la taille des particules en fonction de la concentration en soluté et de la concentration en solvant. ....	13
<b>Tableau 3</b> : Traitements possibles en fonction de l'étendue du cancer du poumon. ....	41
<b>Tableau 4</b> : Etudes cliniques menées sur les chimiothérapies administrées par aérosol. NR : Non renseigné. (Adapté de Rosière <i>et al.</i> <sup>161</sup> ).....	45
<b>Tableau 5</b> : Méthodes de caractérisation développées dans cette partie. ....	60

# **Curriculum Vitae**





# Léna GUYON

## Ingénieure de recherche - chimie analytique

✉ lena.guyon@outlook.fr  
📍 22 rue Larrey , 49100 Angers  
📅 26 ans  
🇫🇷 Française  
🚗 Permis de conduire  
☎ 06 26 07 14 02

### Compétences

#### Chimie et analytique

- Synthèse de copolymères hybrides synthétiques recombinants, synthèse peptidique.
- Technique de purification par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) semi-préparative.
- Méthodes analytiques : HPLC, UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), spectrométrie de masse et spectroscopie RMN.

#### Formulation et caractérisation

- Encapsulation de molécules anti-cancéreuses : nanoprécipitation, microfluidique.
- Caractérisation physico-chimique des nanostructures : diffusion dynamique de la lumière (DLS), analyse du suivi individuel des nanoparticules (NTA), microscopie (Cryo-TEM) et diffusion des rayons-X aux petits angles (SAXS).

#### Etudes in vitro

- Culture cellulaire (lignées humaines cancéreuses et saines), test de viabilité (MTT)

### Expériences professionnelles

#### Doctorat en Sciences Pharmaceutiques / INSERM U1066 CNRS 6021 - Micro et Nanomédecines Translotionelles Angers, France

De juillet 2016 à novembre 2019

- Auto-assemblages constitués de peptides pénétrants et de ferrocifène : une plateforme innovante pour le traitement du cancer du poumon, sous la direction du Pr. Catherine PASSIRANI.

#### Stage de Fin d'Etudes en Recherche et Développement / LCPO - IECB Bordeaux, France

De mars 2015 à septembre 2015

- Synthèse et étude de l'auto-assemblage de copolymères hybrides synthétiques recombinants, sous la direction du Pr. Sébastien LECOMMANDOUX.

#### Stage de Recherche / CSIRO Melbourne, Australie

De juillet 2014 à novembre 2014

- Étude des systèmes constitués de protéines de soja et de petit-lait, sous la direction du Pr. Li DAY.

### Diplômes et Formations

#### Master Chimie Moléculaire et Macromoléculaire / Université Bordeaux 1 Bordeaux, France

De septembre 2014 à septembre 2015

#### Diplôme d'Ingénieur en Chimie Physique / Ecole nationale supérieure de chimie, de biologie et de physique Bordeaux, France

De septembre 2012 à septembre 2015

- Spécialité Ingénierie des Polymères et Formulation

### Articles scientifiques

Guyon L. *et al*, Importance of combining advanced particle size analysis techniques to characterize cell penetrating peptide-ferrocifen self-assemblies, *J. Phys. Chem. Lett.* 2019, 6613-6620.

Guyon L., Lepeltier E. & Passirani C., Self-assembly of peptide-based nanostructures: Synthesis and biological activity. *Nano Research*, 2018, 11, 2315-2335.

H.McCann T., Guyon L., Fischer P., DayLi, Rheological properties and microstructure of soy-whey protein, *Food Hydrocolloids*, 2018, 82, 434-441.

### Compétences générales

#### Gestion de projet

#### Capacité à travailler en équipe

#### Gestion des budgets et des commandes imputés aux projets

#### Rédaction de rapport

#### Encadrement de stagiaires

### Langues

#### Anglais

6 mois passés en Australie  
TOEIC : 810/990

#### Espagnol

Niveau scolaire

### Centres d'intérêt

#### Environnement & Climat

**Sports** Trail, randonnée, natation et danse

**in** @léna-guyon

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Guyon Léna  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **02 / 09 / 2019**



**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint  
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université  
40 rue de rennes - BP 73532  
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00





---

**Titre :** Auto-assemblages constitués de peptides pénétrants et de ferrocifène : une plateforme innovante pour le traitement du cancer du poumon

**Mots clés :** peptides pénétrants, ferrocifènes, auto-assemblages, cancer du poumon

**Résumé :** L'objectif de ces travaux était de développer un nouveau type de nanoparticule permettant le transport des ferrocifènes, en combinant trois stratégies de vectorisation : l'utilisation de peptides pénétrants, la formation d'une prodrogue amphiphile et leur auto-association potentielle. La synthèse des conjugués (CPP-p54) formés de deux types de peptides pénétrants différents Arg<sub>n</sub>-p54 (n = 6 à 9) et RLW-p54, leur auto-assemblage dans l'eau ainsi que la caractérisation complète des objets formés ont été réalisés, tout en soulevant l'importance des méthodes de caractérisation employées pour caractériser l'objet réellement formé. Des études *in vitro* ont également été menées sur des cellules cancéreuses et des cellules pulmonaires saines démontrant une amélioration de l'activité biologique d'un facteur 9.

---

**Title:** Self-assemblies of cell-penetrating peptides and ferrocifen: an innovative platform for lung cancer treatment

**Keywords:** cell-penetrating peptides, ferrocifens, self-assemblies, lung cancer

**Abstract:** The aim of this project was to develop a new type of nanoparticle in order to transport ferrocifen molecules, combining three different strategies: the use of cell-penetrating peptides (CPPs), prodrug and their potential self-association. The synthesis of conjugates (CPP-p54) consisting of two different types of cell-penetrating peptides Arg<sub>n</sub>-p54 (n=6 to 9) and RLW-p54, their self-assembly in water and the complete characterization of the self-assemblies were carried out, by highlighting the importance of the methods used to characterize the suspension. *In vitro* studies were also performed on healthy cell line and lung cancer cells showing an improvement in biological activity by a factor 9.