

## Projet doctoral 2024-2027

### Modalités d'encadrement, de suivi de la formation et d'avancement des recherches du doctorant

La partie chimie sera encadré par les Dr. Kessler et Tonali. La partie pharmacologie moléculaire par les Dr. Robin et Iturrioz. La partie in vivo par le Dr. Keck. Le Dr. Gilles sera l'encadrant principal, co-encadrera l'ensemble des domaines et gèrera la globalité du projet.

### Titre en français

Ingénierie de nano objets à vocations thérapeutiques à partir d'un candidat médicament peptidique

### Mots clés

Toxines animales, métabolisme rénal, thérapeutique, nano-médecine, pharmacologie

### English title

Engineering therapeutic nano-objects from a peptide drug candidate

### Keywords

Animal toxins, renal metabolism, therapeutics, nano-medicine, pharmacology

### Thématique

Médicament peptidique, nano médecine, pathologies rénales

### Domaine

Thérapie innovante et pharmacologie

### Résumé du projet de thèse

Les peptides sont une classe de médicament en pleine essor mais souffre d'un temps de demi-vie court dans l'organisme, principalement dû à une dégradation protéolytique et à un rapide métabolisme rénal<sup>1</sup>. Les peptides riches en ponts disulfure comme les toxines animales, sont très résistants à la protéolyse mais restent sensibles à la filtration glomérulaire.

Nous étudions la mambaquarétine issue du venin du mamba vert depuis plusieurs années. Cette toxine bloque sélectivement le récepteur de type 2 à la vasopressine (AVPR2)<sup>2</sup> qui est exprimé dans le rein et qui régule l'homéostasie aqueuse. Son blocage est une stratégie validée chez l'homme pour l'hyponatrémie<sup>3</sup> et les polykystoses rénales (PKDs)<sup>4</sup> pour lesquelles il y a un manque crucial de solutions thérapeutiques. La mambaquarétine a été validée pour ces deux pathologies<sup>5,6</sup>. La mambaquarétine est un peptide basique et de petite taille (6500 da avec une demi vie de 30 min chez la souris et 1.3 h chez le rat. L'endothélium des capillaires fenêtrés du glomérule laisse passer les molécules de moins de 8 nm et la charge négative de la membrane basale repousse les protéines acides. Ces deux paramètres favorisent le métabolisme rénal de la mambaquarétine, ce que nous avons pu validé en imagerie TEP<sup>6</sup>.

La stratégie classique pour augmenter le temps de circulation d'une molécule d'intérêt est le greffage d'un PEG ou d'un ligand spécifique de l'albumine, par exemple<sup>7</sup>. Dans notre cas, cette option n'est pas adaptée car elle induit une perte d'affinité. Notre stratégie consiste à générer des multimères de mambaquarétines non filtrable par le glomérule et avec une

grande avidité pour le AVPR2 rénal. Nous travaillons sur des plateformes moléculaires intelligentes multivalentes décorées de mambaquarétine afin de générer des molécules actives ayant des longues durées d'action in vivo. Cette stratégie est flexible et permet de mélanger des blocs de construction synthétiques et biologiques, de contrôler la multivalence du ligand, la charge globale du nano objet et sa taille. Une unité de fluorophore sera introduite pour une détection rapide. L'architecture contrôlée des plateformes permettra des interactions multivalentes optimales entre la mambaquarétine et plusieurs AVPR2. Le AVPR2 est surexprimé au niveau des cellules principales du tube collecteur où ils exercent leur fonction de régulation de la diurèse. L'ancrage des plateformes décorées de plusieurs mambaquarétine sera multivalente, augmentant considérablement son l'avidité pour le AVPR2. Différentes tailles de liens entre la plateforme et la mambaquarétines seront testés pour favoriser cette multivalence. Nous espérons générer des plateformes actives sur plusieurs dizaines heures.

Quatre plateformes sont explorées sur lesquelles seront greffées entre 3 et 10 mambaquarétines: les protéiques circulantes (comme l'albumine), des peptidiques de tailles croissantes conçus à façon au laboratoire, des structures de polyéthylène glycol très hydrosolubles, des polymères très acides qui pourront être complexés sur des nano particules ferriques (en collaboration). La chimie click sera privilégiée pour décorer ces nano-objets avec un nombre contrôlé de mambaquarétine. Chaque construction sera caractérisée en pharmacologie moléculaire (tests de liaisons, tests de fonctions, Kon, Koff, cytométrie en flux) et in vivo (pharmacodynamique et pharmacocinétique) par suivie de la diurèse. Les nano-objets ayant les propriétés souhaitées seront évalués en imagerie TEP pour appréhender leur biodistribution et leur métabolisation puis évalués en tant qu'agents thérapeutiques sur des modèles murins d'hyponatrémie et de PKDs.

Le ou la candidat.e pour cette thèse possédera un ensemble de compétences multidisciplinaires avec un intérêt fort pour la chimie des peptides.

### **Summary of thesis project**

Peptides are a rapidly growing class of drugs but suffer from a short half-life in the body, primarily due to proteolytic degradation and rapid renal metabolism<sup>1</sup>. Peptides rich in disulfide bonds, like animal toxins, are highly resistant to proteolysis but remain sensitive to glomerular filtration.

We have been studying mambaquaretin derived from the venom of the green mamba for several years. This toxin selectively blocks the type 2 vasopressin receptor (AVPR2)<sup>2</sup> expressed in the kidney, regulating aqueous homeostasis. Its blockade is a validated strategy in humans for hyponatremia<sup>3</sup> and renal polycystic kidney diseases (PKDs)<sup>4</sup>, for which there is a crucial lack of therapeutic solutions. Mambaquaretin has been validated for these two pathologies<sup>5,6</sup>. Mambaquaretin is a basic and small peptide (6500 Da) with a half-life of 30 minutes in mice and 1.3 hours in rats. The fenestrated capillary endothelium of the glomerulus allows molecules smaller than 8 nm to pass through, and the negative charge of the basement membrane repels acidic proteins. These parameters favor the renal metabolism of mambaquaretin, as validated by PET imaging<sup>6</sup>.

The classical strategy to increase the circulation time of a molecule of interest is grafting a PEG or a specific albumin ligand, for example<sup>7</sup>. In our case, this option is not suitable as it induces a loss of affinity. Our strategy consists of generating non-glomerular filterable mambaquaretin multimers with high avidity for renal AVPR2. We are working on intelligent

multivalent molecular platforms decorated with mambaquaretin to generate active molecules with long in vivo durations of action. This strategy is flexible and allows mixing synthetic and biological building blocks, controlling ligand multivalency, overall charge of the nano object, and its size. A fluorophore unit will be introduced for rapid detection. The controlled architecture of the platforms will allow optimal multivalent interactions between mambaquaretin and several AVPR2. AVPR2 is overexpressed in the principal cells of the collecting duct where they regulate diuresis. The anchoring of platforms decorated with multiple mambaquaretin will be multivalent, significantly increasing its avidity for AVPR2. Different sizes of links between the platform and mambaquaretin will be tested to favor this multivalency. We hope to generate active platforms for several tens of hours.

Four different types of platforms are explored, on which between 3 and 10 mambaquaretin will be grafted: circulating proteins (like albumin), peptidic structures of increasing sizes designed in the laboratory, highly water-soluble polyethylene glycol structures, highly acidic polymers that can be complexed onto iron nanoparticles (in collaboration). Click chemistry will be favored to decorate these nano-objects with a controlled number of mambaquaretin. Each construction will be characterized in molecular pharmacology (binding tests, functional tests, Kon, Koff, flow cytometry) and in vivo (pharmacodynamics and pharmacokinetics) by monitoring diuresis. Nano-objects exhibiting the desired properties will be evaluated in PET imaging to understand their biodistribution and metabolism and then evaluated as therapeutic agents in murine models of hyponatremia and PKDs.

The candidate for this thesis will possess a set of multidisciplinary skills with a strong focus for peptide chemistry.

### **Objectifs**

Le projet de cette thèse vise à mieux comprendre les paramètres qui régissent la filtration glomérulaire de nos objets et d'obtenir un nouveau candidat médicament adapté aux pathologies rénales chroniques. Les connaissances générées pourront être appliquées aux autres toxines que nous étudions au laboratoire.

### **Contexte**

Le laboratoire « toxine récepteurs et canaux » explore et exploite les toxines animales comme une source de candidats thérapeutiques. Lorsque qu'une toxine possède des qualités pharmacologiques extraordinaires, comme la mambaquarétine, elles sont évaluées sur des modèles pathologiques. Ces toxines sont toutes de petites tailles (3 à 10 Kda) et basiques. Leur faible demi-vie et leur mode d'administration par injection limitent donc leur exploitation en tant que médicaments. Nous adressons cette limitation par la construction d'objet de grandes tailles et de grande avidité pour leur cible.

Nous maîtrisons la synthèse de la mambaquarétine par la synthèse peptidique sur phase solide. Nous savons où introduire un groupement azido afin de n'introduire que des modifications mineures sur l'affinité de la mambaquarétine. La chimie click est aussi maîtrisée tout comme toutes les étapes de caractérisation biologique.

L'ensemble des connaissances générées au cours de cette thèse nous permettrons de maîtriser les paramètres influençant sur la filtration glomérulaire et pourront être utilisées pour d'autres toxines.

### **Méthodes**

La mambaquarétine sera synthétisée sur surface solide par la chimie Fmoc par des robots de synthèse (prélude et Symphony by Giros protein technologies). Une fonction azido sera introduite régio-sélectivement. Chaque composé sera purifié en phase inverse (HPLC Waters) et caractérisé pharmacologiquement (plateforme du laboratoire). Les couplages sur les plateformes

seront réalisés par chimie click. Pour cela ces plateformes seront synthétisées avec plusieurs fonctions alcynes. Les nano objets ainsi générés seront caractérisés par analyse de masse, mesures physiques de tailles et dispersion (en collaboration) et in vivo.

### Résultats attendus

Génération de nano-mambaquarétine de tailles et de Point Isoélectrique maîtrisés.  
Caractéristiques in vitro (affinité, fonction, stabilité, solubilité) et in vivo (pharmacodynamique, pharmacocinétique).  
Compréhension et maîtrise des paramètres qui régulent la filtration glomérulaire.  
Application de cette compréhension pour générer une mambaquarétine ayant une longue durée d'action in vivo.  
Démonstration sur modèles pathologiques.

### Références bibliographiques

1. Muttenthaler M, King GF, Adams DJ, Alewood PF: Trends in peptide drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* [Internet] 1–17, 2021 Available from: <http://www.nature.com/articles/s41573-020-00135-8>
2. Gilles N: Natural Peptide Toxins as an Option for Renewed Treatment of Type 2 Vasopressin Receptor-Related Diseases. *Biology (Basel)* [Internet] 12: 544, 2023 Available from: <https://www.mdpi.com/2079-7737/12/4/544>
3. Adrogué HJ, Tucker BM, Madias NE: Diagnosis and Management of Hyponatremia: A Review. *JAMA* [Internet] 328: 280–291, 2022 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35852524>
4. Bergmann C, Guay-Woodford LM, Harris PC, Horie S, Peters DJM, Torres VE: Polycystic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers* [Internet] 4: 50, 2018 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30523303>
5. Ciolek J, Reinfrank H, Quinton L, Viengchareun S, Stura EA, Vera L, et al.: Green mamba peptide targets type-2 vasopressin receptor against polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet] 114: 7154–7159, 2017 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28630289>
6. Droctové L, Lancien M, Tran VL, Susset M, Jegou B, Theodoro F, et al.: A snake toxin as a theranostic agent for the type 2 vasopressin receptor. *Theranostics* [Internet] 10: 11580–11594, 2020 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33052234>
7. Jiang EY, Desroches ST, Mikos AG: Particle carriers for controlled release of peptides. *Journal of Controlled Release* 360: 953–968, 2023

### Conditions scientifiques matérielles (conditions de sécurité spécifiques) et financières du projet de recherche

La thèse sera menée au sein du service d'ingénierie des molécules au sein du département médecines et technologies pour la santé (CEA/DRF/JOLIOT). Notre équipe Toxines Récepteurs et Canaux ioniques maîtrise l'ensemble des technologies requises pour ce projet de thèse. Le service a mis en place un protocole de formation et de suivi de sécurité aussi bien pour les risques chimiques, radiologiques et biologiques. Plusieurs formations sécurités sont prévus au début de la thèse. Un ensemble de ressources financières multiples et variées permettrons un travail serein et la participation à des congrès internationaux.

### Pays partenaire, établissement partenaire étranger

Belgique : Le Prof Loïc Quinton, responsable du laboratoire d'analyse par masse à l'université de Liège. Caractérisation précise des masses des nanoobjets générés.  
Australie : Dr Céline Valéry, NanoBioPharm Laboratory Head, Melbourne est spécialiste de la galénique des peptides thérapeutiques. Caractérisation biophysique des plateformes.

**Collaborations envisagées**

Dr. Gref (ISMO UMR 8214 CNRS, Paris-Saclay university)

Dr. Favier (CNRS, Lyon 1)

Dr. Truillet (SHFJ, CEA)

Dr. Bienaimé (hôpital Universitaire *Necker*)

**Objectifs de valorisation des travaux de recherche du doctorant : diffusion, publication et confidentialité, droit à la propriété intellectuelle,...**

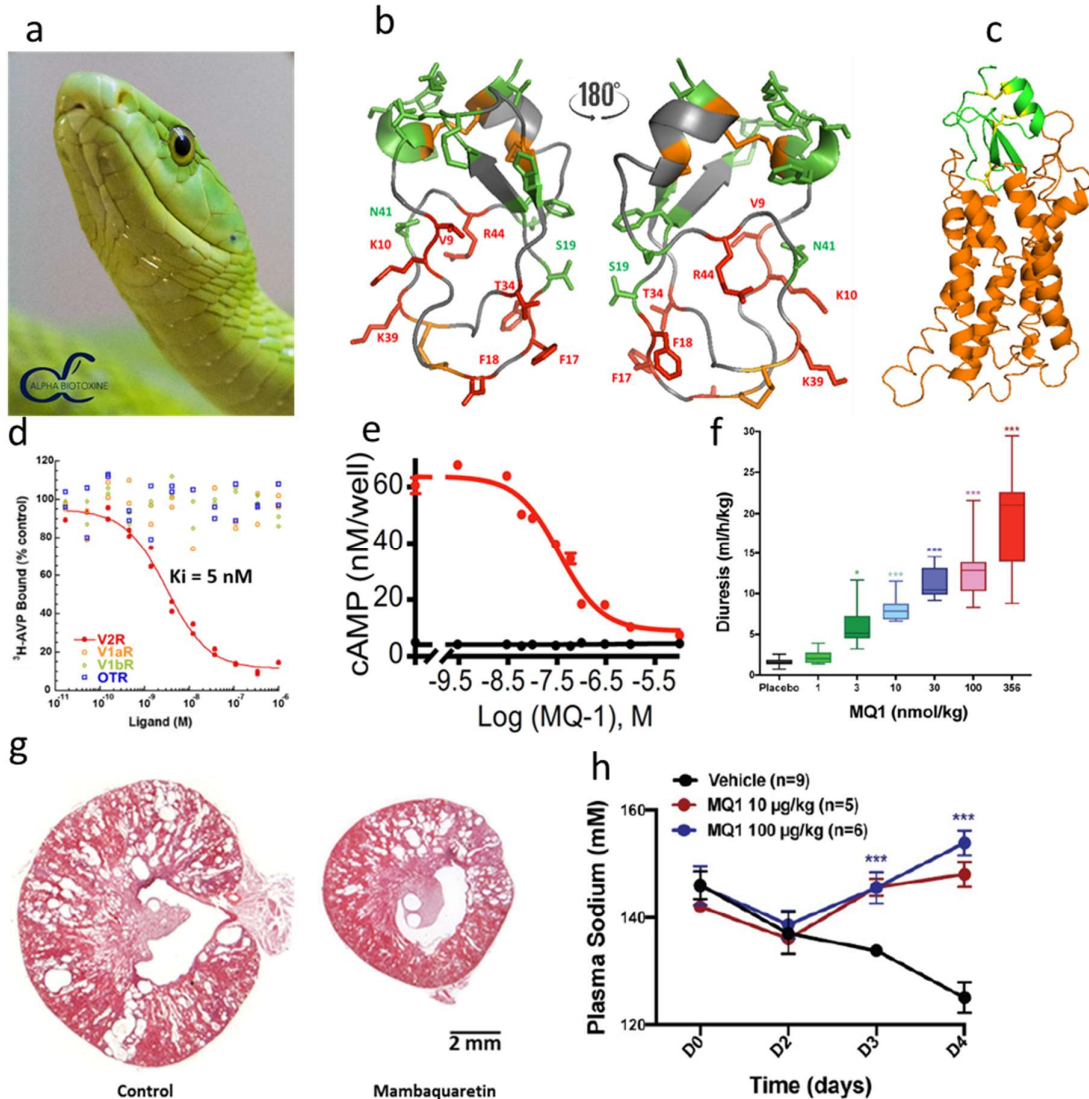
Notre ambition étant de proposer une nouvelle solution thérapeutique, le brevet sera la première des protections avant toute publication. Cette gestion brevet/publication est couramment gérée par le Dr. Gilles. Il est attendu plusieurs publications à comité de lecture.

**Profil et compétences recherchées**

Le ou la candidat.e pour cette thèse sera polyvalent.e, ouvert.e d'esprit avec une forte compétence organisationnelle. La capacité d'apprentissage est la plus importante des qualités. Une base en chimie et pharmacologie sont les bienvenues.

**Profile and skills required**

The candidate for this this thesis will be versatile and open-minded, with strong organizational skills. The ability to learn is the most important quality. A background in chemistry and pharmacology are welcome.



**Description de la mambaquarétine.** a : Le serpent mamba vert *Dendroaspis angusticeps*. b : La mambaquarétine composée de 57 acides aminés et réticulée par 3 ponts disulfure. En rouge les résidus impliqués dans l'interaction avec le AVPR2, en vert les résidus non impliqués. c : modèle d'interaction mambaquarétine/AVPR2. Les deux extrémités de la mambaquarétine sont à l'opposées du AVPR2. d : Affinités de la mambaquarétine pour les 4 récepteurs sensibles à la vasopressine. La mambaquarétine a une affinité supérieure à 10  $\mu$ M pour les V1aR, V1bR et OTR et une affinité de 5 nM pour le AVPR2. e : Inhibition par des doses croissantes de mambaquarétine de la production d'AMPC de cellules de reins stimulée par la vasopressine, démontrant le caractère antagoniste de la mambaquarétine. f : Augmentation de la diurèse chez le rat après une injection de doses croissantes de mambaquarétine. g : Modèle de souris de la polykystose rénale. Le groupe de souris traité par la mambaquarétine développe moins de kystes. h : Modèle rat d'hyponatrémie, l'administration de la mambaquarétine restore une natrémie normale.