



HAL
open science

Synthèse de nouveaux vecteurs peptidiques pour la thérapie anticancéreuse et l'imagerie tumorale

Stephanie Foillard

► **To cite this version:**

Stephanie Foillard. Synthèse de nouveaux vecteurs peptidiques pour la thérapie anticancéreuse et l'imagerie tumorale. Chimie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00275297

HAL Id: tel-00275297

<https://theses.hal.science/tel-00275297>

Submitted on 23 Apr 2008

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.

Université Joseph Fourier
Grenoble I – Sciences, Technologie, Santé

THESE

Présentée par

Stéphanie FOILLARD

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
Spécialité : Chimie-Biologie

Synthèse de Nouveaux Vecteurs Peptidiques pour la Thérapie Anti-Cancéreuse et l'Imagerie Tumorale

Soutenue publiquement le 10 Mars 2008, devant le jury composé de :

Pr. Patrick COUVREUR, CNRS UMR 8612, Université Paris Sud
Dr. Florine CAVELIER, CNRS UMR 5247, Montpellier
Dr. Gille DIVITA, CNRS UMR 5237, Montpellier
Dr. Alain COMMERCON, Sanofi-Aventis, Vitry-sur-Seine
Pr. Pascal DUMY, UJF UMR5250, Grenoble
Dr. Didier BOTURYN, CNRS UMR5250, Grenoble

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Université Joseph Fourier
Grenoble I – Sciences, Technologie, Santé

THESE

Présentée par

Stéphanie FOILLARD

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
Spécialité : Chimie-Biologie

Synthèse de Nouveaux Vecteurs Peptidiques pour la Thérapie Anti-Cancéreuse et l'Imagerie Tumorale

Soutenue publiquement le 10 Mars 2008, devant le jury composé de :

Pr. Patrick COUVREUR, CNRS UMR 8612, Université Paris Sud
Dr. Florine CAVELIER, CNRS UMR 5247, Montpellier
Dr. Gille DIVITA, CNRS UMR 5237, Montpellier
Dr. Alain COMMERCON, Sanofi-Aventis, Vitry-sur-Seine
Pr. Pascal DUMY, UJF UMR5250, Grenoble
Dr. Didier BOTURYN, CNRS UMR5250, Grenoble

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

REMERCIEMENTS

Au terme de ma thèse, je tiens à adresser mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie,

*Le Professeur **Pascal Dumy**, directeur du Département de Chimie Moléculaire, responsable de l'équipe « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires », directeur de cette thèse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et avoir dirigé ces travaux,*

***Didier Boturyn**, co-directeur de cette thèse, pour m'avoir encadrée, conseillée au quotidien avec une grande disponibilité ainsi que pour sa confiance tout au long de mes travaux. Un grand merci pour les critiques et corrections de ce manuscrit.*

***Gille Divita** et **Florine Cavelier** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux, ainsi que **Patrick Couvreur** et **Alain Commerçon** pour avoir participé à mon jury. Leurs remarques, critiques et jugements ont été pour moi d'un grand intérêt.*

***Elizabeth Garanger** pour ses travaux de thèse antérieurs d'une grande qualité. Merci également à **Amandine**, **Jésus**, **Martin**, qui ont été des collègues chimistes formidables.*

***Jean-Luc Coll** pour sa collaboration dans l'évaluation biologique des composés. Merci aux membres de son équipe pour leur participation fructueuse à ce projet et avec qui, il m'a été particulièrement agréable de travailler : **Lucie**, **Mélanie**, **Véronique**, **Sandrine**, **Dominique**, **Vit Hui**, **Zhaohui**.*

*La **Région Rhône-Alpes**, pour avoir financé mes travaux de recherche durant trois ans.*

J'adresse mes remerciements également aux personnes que j'ai rencontrées au cours de ma thèse et qui l'ont rendue de par leurs présences, discussions et sourires, très plaisante.

*Tous les **membres de l'équipe « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires »** pour leur serviabilité, leur bonne humeur et tout spécialement aux étudiants qui ont participé de manière très active à rendre tous les jours agréables. Merci à **Myriam**, collègue et amie, **Mathilde**, **Walid**, **Vincent**, **Nabil**, **Sumana**, **Corinne**, **Jo**, **Sophie**, **Ludvine**, **Pierre**, **Mathieu**, **Julien**...*

Un dernier grand merci aux personnes qui m'ont encouragée et soutenue dans mon parcours de chercheur.

***Mes parents** pour leur soutien dans mon orientation professionnelle. **Denis** pour m'avoir encouragée et laissée poursuivre ma formation loin de lui.*

***Aux chercheurs** dont j'ai eu la chance de croiser le chemin et qui m'ont permis de découvrir et de me passionner pour la recherche en cancérologie, avec une pensée particulière pour **Alain Duffos**.*

Encore merci à tous...

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé sous la direction du Dr. Didier Boturyn et du Pr. Pascal Dumy au sein du laboratoire « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires », CNRS UMR5250, Département de Chimie Moléculaire, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Les études biologiques ont été réalisées en collaboration avec l'équipe « Cibles Diagnostiques ou Thérapeutiques et Vectorisation des Drogues dans le Cancer du Poumon » du Département Oncogénèse et Biotechnologie, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble.

Ce travail a donné lieu aux publications suivantes :

Articles dans des revues internationales à comités de lecture

Jin, Z. H.; Josserand, V.; Foillard, S.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Favrot, M. C.; Coll, J. L. In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol Cancer* **2007**, *6*, 41.

Foillard, S.; Ohsten Rasmussen, M.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P. 1-Ethoxyethylidene, a New Compatible Protecting Group for the Stepwise SPPS of Aminooxy Peptides. *J Org Chem* **2008**, *73*, 983-991.

Résumés de congrès soumis à comité de lecture

Foillard, S.; Boturyn, D.; Dumy, P. Synthèse de vecteurs peptidiques pour la thérapie anticancéreuse et l'imagerie tumorale. *Bulletin du cancer* **2007**, *94*, 43-44.

Boturyn, D.; Razkin, J.; Foillard, S.; Jin, Z.-H.; Coll, J.-L.; Josserand, V.; Texier, I.; Favrot, M.-C.; Dumy, P. Sondes fluorescentes activables pour l'imagerie tumorale. *Bulletin du cancer* **2007**, *94*, 32.

Articles dans des bases de données soumis à comité de lecture

Cheng, K. T.; Garanger, E.; Josserand, V.; Jin, Z.; Foillard, S.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Coll, J.-L. Cy5-Regioselectively addressable functionalized template-[cyclo-(RGD-d-Phe-Lys)]₄ peptide Cy5-RAFT-c(-RGDfK-)₄. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database* ed. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), **2007**.

Cheng, K. T.; Razkin, J.; Josserand, V.; Jin, Z.; Foillard, S.; Boturyn, D.; Favrot M.-C.; Dumy, P.; Coll, J.-L. Self-quenched-regioselectively addressable functionalized template-[cyclo-(RGD-d-Phe-Lys)]₄ peptide-Cy5-fluorescence quencher QSY21RAFT-c(-RGDfK-)₄-Cy5-SS-Q. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database* ed. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), **2008**.

Communications orales à des congrès

Foillard, S.; Razkin, J.; Ohsten Rasmussen, M.; Boturyn, D.; Dumy, P. Synthèse totale de clusters de RGD et évaluation de leur affinité cellulaire sur résine. *15ème Réunion du Groupe Français des Peptides et Protéines 20-25th May 2007*, Dinard.

Foillard, S.; Boturyn, D.; Dumy, P. Synthesis of new peptidic vectors for cancer therapy and tumour imaging. *2nd Intracellular Delivery of Therapeutic Molecules 19-20th September 2007*, Grenoble.

Communications par posters à des congrès

Foillard, S.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Ohsten Rasmussen, M.; Razkin, J.; Favrot, M.-C.; Dumy, P. All-On-Resin Synthesis and Biological Assay of RGD-containing Peptide. *GTRV Summer School 7-9th September 2005*, Martigny (Switzerland).

Foillard, S.; Razkin, J.; Ohsten Rasmussen, M.; Boturyn, D.; Dumy, P. Synthèse de vecteurs peptidiques pour la thérapie anticancéreuse et l'imagerie tumorale. *21th Annual Meeting of the G.T.R.V. 13-15th December 2006*, Paris.

Foillard, S.; Boturyn, D.; Dumy, P. Synthèse de vecteurs peptidiques pour la thérapie anticancéreuse et l'imagerie tumorale. *2e Journées Scientifiques du CLARA 19-20 March 2007*, Grenoble.

TABLE DES MATIERES

Abréviations	IX
Liste des acides aminés naturels	XI
INTRODUCTION	3
Préambule	3
I. Vectorisation en Cancérologie	5
I.1. Cancer : Situation Actuelle	5
I.1.1. Pathologie Complexe dont la Fréquence Augmente	5
I.1.2. Méthodes Traditionnelles de Détection et de Traitement des Cancers	7
I.2. Nouvelles Stratégies Ciblées en Cancérologie	10
I.2.1. Grandes Stratégies Ciblées	10
I.2.2. Grandes Familles d'Agents de Ciblage des Cancers	12
I.2.3. Grandes Familles de Vecteurs Cellulaires	15
I.3. Outils pour la Conception de Vecteurs Multivalents	18
I.3.1. Supports Multivalents pour le Ciblage et la Vectorisation	18
I.3.2. Méthodes de Conjugaison pour l'Assemblage de Macromolécules	21
II. Définition du Projet de Recherche	24
II.1. Stratégie de Ciblage de l'Intégrine $\alpha_v\beta_3$ au cours de la Néo-angiogenèse Tumorale	24
II.1.1. Néo-Angiogenèse Tumorale	24
II.1.2. Intégrine $\alpha_v\beta_3$	27
II.1.3. Pentapeptides Cycliques -RGD- : Ligands Spécifiques de l'Intégrine $\alpha_v\beta_3$	31
II.2. Gabarit RAFT : Nouvel Outil Multivalent de Ciblage et de Vectorisation	34
II.2.1. Origine des Gabarits RAFT	34
II.2.2. Structure des RAFT	35
II.2.3. Conception du Vecteur RAFT pour la Cancérologie	37
II.3. Démarche Expérimentale	38
II.3.1. Résultats Antérieurs : RAFT(c[-RGDfK-] ₄) Nouvel Outil de Ciblage des Tumeurs	38
II.3.2. Conception d'une Nouvelle Génération de Molécules pour la Cancérologie	41
RESULTATS ET DISCUSSIONS	43
A. Synthèse des Vecteurs Multivalents RAFT(c[-RGDfK-] ₄)	45
A.1. Conception, Stratégies de Synthèse et Optimisation	45
A.2. Synthèse Peptidique sur Support Solide	48
A.3. Synthèse et Incorporation de Nouveaux Acides Aminés Modifiés en SPPS	51
A.4. Synthèse des Différents Précurseurs Peptidiques RAFT et c[-RGXfK-]	58
A.4.1. Synthèse du RAFT	58
A.4.2. Synthèse des Cyclopentapeptides Présentant le Motif -RGD- et son Analogue -RβAD-	60
A.5. Synthèse des Vecteurs Multivalents RAFT(c[-RXDfK-] ₄)	61
A.6. RESUME	65
B. Synthèse et Caractérisation des Conjugés pour l'Imagerie Tumorale	67
B.1. Conception des Conjugés pour l'Imagerie	67
B.1.1. Objectif des Travaux	67
B.1.2. Choix des Molécules de Détection	70
B.2. Synthèse des Conjugés (Marqueur)RAFT(c[-RGDfK-] ₄)	72
B.2.1. Synthèse des Conjugés aux Fluorophores	72
B.2.2. Synthèse des Conjugés à la Biotine	74
B.3. Etudes Biologiques	76
B.3.1. Etude des caractéristiques du Ligand Multivalent RAFT(c[-RGDfK-] ₄)	76
B.3.2. Localisation des Tumeurs <i>in vivo</i> chez le Petit Animal	80
B.4. RESUME	81
C. Synthèse et Caractérisation des Conjugés pour la Thérapie Anti-cancéreuse	83
C.1. Conception des Conjugés pour la Thérapie Anti-Cancéreuse	83
C.1.1. Objectif des Travaux	83
C.1.2. Choix de Molécules Thérapeutiques à Vectoriser	85
C.2. Synthèse des Conjugés (Drogue)RAFT(c[-RGDfK-] ₄)	89
C.2.1. Synthèse du Conjugé à la Doxorubicine	89
C.2.2. Synthèse des Conjugés aux Peptides (KLAKLAK) ₂ , au PNA et aux SiRNA	90

C.3.	Synthèse d'un Composé pour l'Etude du Devenir Cellulaire du Peptide (KLAKLAK) ₂	93
C.3.1.	Objectifs des Travaux et Stratégie de Synthèse	93
C.3.2.	Synthèse du Conjugué (Smart Probe (KLAKLAK) ₂ -NH ₂)RAFT (c[-RGDfK-] ₄)	95
C.4.	Etudes Biologiques	97
C.4.1.	Evaluation de la Toxicité du Conjugué (KLAKLAK) ₂ RAFT (c[-RGDfK-] ₄)	98
C.4.2.	Etude du Devenir Cellulaire du Composé (KLAKLAK) ₂	100
C.4.3.	Evaluation de l'Efficacité de Transfection du Conjugué (SiRNA)RAFT(c[-RGDfK-] ₄)	102
C.5.	RESUME	103
D.	Synthèse Totale de Clusters de Ligands -RGD- et Adhésion Cellulaire sur Résine	105
D.1.	RAFT Supportés : Outils pour l'Evaluation Biologique de Nouveaux Ligands Multivalents	105
D.2.	Synthèse du Vecteur Multivalent RAFT(c[-RGDfK-] ₄) sur Support Solide	106
D.2.1.	Stratégie de Synthèse	107
D.2.2.	Synthèse des RAFT(c[-RXDfK-] ₄) et RAFT(c[-RGDfK-] ₁) sur support solide	108
D.3.	Evaluation de l'Adhésion Cellulaire sur les Résines Présentant les Peptides	111
D.3.1.	Mise au Point du Test d'Adhésion Cellulaire	111
D.3.2.	Effet de Multivalence	113
D.3.3.	Tests de Screening Cellulaire	114
D.4.	RESUME	115
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		117
PARTIE EXPERIMENTALE		121
<i>Protocoles de Synthèse</i>		123
Materials and Equipments		123
General Procedures for Syntheses of Peptides		124
Syntheses of New Modified Amino Acid for SPPS		127
Syntheses of Cyclodecapeptidic Scaffolds		130
Classical Synthesis of Cyclodecapeptidic Scaffolds		130
Optimized Synthesis of Cyclodecapeptidic Scaffolds		132
Syntheses of Cyclopentapeptidic Ligands		133
Classical Synthesis of Cyclopentapeptidic Ligands		133
Optimized Synthesis of Cyclopentapeptidic Ligands		137
Syntheses of Multivalent RAFT(c[-RXDfK-] ₄) Vectors		137
Multivalent RAFT(c[-RXDfK-] ₄) Vectors for Reporter Group Conjugation		137
Multivalent RAFT(c[-RGDfK-] ₄) Vectors for Drug Conjugation		138
Syntheses of Reporter Group-Conjugated Compounds		143
Syntheses of Drug-Conjugated Compounds		150
Syntheses of Drug(Reporter Group)-Conjugated Compounds		155
Syntheses of RAFT(c[-RXDfK-] _n) on Resin		156
<i>Protocoles des Tests Biologiques</i>		161
Materials and Equipments		161
<i>In vitro</i> Assays		161
<i>In vivo</i> Assays		164
ANNEXES		165
Références Bibliographiques		167

Abréviations

Ac	Acétyl
AcOH	Acide acétique
AcONa	Acétate de sodium
AcONH₄	Acétate d'ammonium
ADN	Acide Désoxyribonucléique
OAl	Allyl ester
Alloc	Allyloxycarbonyl
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Boc	<i>Tertio</i> -butyloxycarbonyl
BSA	Bovine Serum Albumine
CDR	Complementary Determining Region
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
EDT	Éthanedithiol
EGF	Endothelial Growth Factor
eq.	Équivalent molaire
ESI	Electrospray Ionisation
EtOAc	Ethyl acetate
Et₂O	Éther diéthylique
EtOH	Éthanol
FBS	Fœtal Bovine Serum
FCS	Fluorescence Correlation Microscopy
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
Fmoc	9-Fluorénylméthoxyloxycarbonyl
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GMP	Good Manufacturing Practices
HEK(293)	Lignée de cellules épithéliales de rein embryonnaire humain
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
IC₅₀	Concentration inhibant de 50% un paramètre
ID	Indice de Captation
IGROV-1	Lignée cellulaire de carcinome ovarien humain
i.p.	Intrapéritonéale
IR	Infrarouge
i.v.	Intraveineuse
K_d	Constante de dissociation
MeOH	Méthanol
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NMP	1-méthyl-2-pyrrolidone
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Npys	2-Nitrophénylsulfényl
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PET	Positron Emission Tomography
PNA	Peptide Nucleic Acid
PyAOP	(7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

PyBOP[®]	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Template
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RP-HPLC	Reverse Phase - High-Performance Liquid Chromatography
r.t.	Room temperature
RT	Retention Time
SASRIN	Super Acid Sensitive Resin
s.c.	Sous-cutanée
siRNA	Small interfering RNA
SM	Spectrométrie de masse
SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
Succ	Succinimide
t.a.	Température ambiante
TASP	Template Assembled Synthetic Protein
<i>t</i>Bu	<i>Tertio</i> -butyl
TFA	Acide trifluoroacétique
TIS	Triisopropylsilane
TNBS	Acide trinitrobenzènesulfonique
TNFα	Tumour Necrosis Factor α
t_r	Temps de rétention
Trt	Triphénylméthyl (ou trityl)
TS/Apc	Lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire murin
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
3-LL	Lignée cellulaire de carcinome pulmonaire murin

Liste des acides aminés naturels

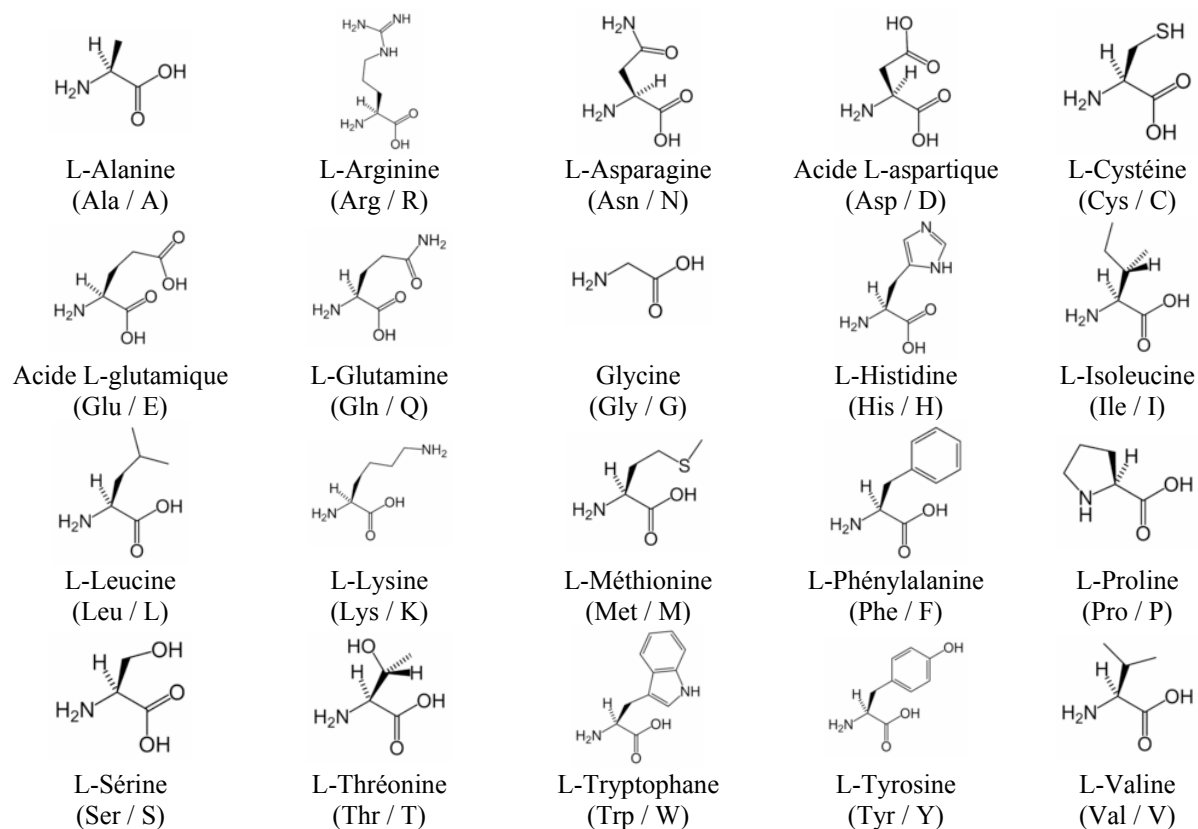


Figure I : Structures des 20 acides aminés naturels (codes à trois et une lettres).¹

Le code à une lettre utilise une lettre majuscule pour les acides aminés de la série naturelle de configuration L et une lettre minuscule pour les acides aminés non naturels de configuration D.

¹ Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E. Acides aminés, peptides, protéines et acides nucléiques. *Traité de Chimie Organique* ed. De Boeck & Larcier, Paris. **1999**, 1158-1159.

INTRODUCTION

Préambule

Le cancer est un problème majeur de santé publique dans le monde. La lutte contre le cancer est une priorité du secteur santé et fait l'objet de nombreux projets que se soit au niveau français avec le Plan Cancer 2003-2007 ou au niveau mondial notamment avec l'approbation des « Resolutions on Cancers Control » (OMS).

Les moyens de diagnostic disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas souvent le dépistage précoce des tumeurs. Sur le plan thérapeutique, les traitements conventionnels cytostatiques et cytotoxiques n'ont qu'une sélectivité imparfaite vis-à-vis des cellules tumorales. Ils entraînent des effets secondaires, parfois sévères, qui limitent les doses auxquelles ils peuvent être administrés. La cancérologie clinique réclame donc le développement conjoint de nouvelles méthodes diagnostiques plus sensibles et plus performantes, ainsi que de nouvelles thérapeutiques plus efficaces mais aussi mieux tolérées. Pour répondre à ces besoins, la recherche sur le cancer se tourne vers le développement de « stratégies ciblées ». Celles-ci correspondent à l'utilisation de nouvelles molécules directement issues des connaissances de la biologie du cancer et visant à agir spécifiquement sur la cellule cancéreuse.

Parmi les phénomènes physiopathologiques spécifiques des cellules cancéreuses, le ciblage de la néo-angiogenèse tumorale constitue une stratégie prometteuse pour circonscrire les foyers tumoraux, limiter l'extension de la tumeur et prévenir la formation de métastases à distance du foyer primitif. Les néo-vaisseaux tumoraux se distinguent structurellement et fonctionnellement de la vascularisation quiescente par la sur-expression de récepteurs membranaires et d'éléments de reconnaissance spécifiques à la surface des cellules endothéliales. Ces derniers constituent une voie potentielle pour cibler et détecter spécifiquement les zones de néo-angiogenèse. Par ailleurs, ces récepteurs sont également surexprimés par certaines lignées de cellules tumorales, permettant ainsi un ciblage direct de celles-ci. Afin d'atteindre efficacement ces récepteurs, des ligands synthétiques de très bonne spécificité et sélectivité sont développés.

Dans ce contexte, nos travaux sont consacrés à la conception de vecteurs synthétiques ciblant un récepteur cellulaire surexprimé par les tumeurs. Ce ciblage permet de concentrer les drogues ou les éléments de détection au niveau tumoral. L'outil synthétique utilisé pour la construction chimique de nos vecteurs est un châssis décapeptidique cyclique présentant deux domaines indépendants permettant de séparer les deux fonctions du vecteur. Sur un domaine, la fonction de ciblage est assurée par la présentation multivalente de ligands spécifiques du récepteur. L'autre domaine du vecteur supporte les molécules d'intérêt à vectoriser : agents thérapeutiques pour limiter la prolifération du foyer malin ou agents de détection pour l'imagerie médicale. Les travaux antérieurs ont montré l'efficacité de ce système de vectorisation pour le ciblage des tumeurs. Aujourd'hui, nos travaux concernent la conception et la synthèse d'une nouvelle génération de molécules vectrices et l'étude des propriétés biologiques de certaines de ces nouvelles molécules.

I. Vectorisation en Cancérologie

I.1. Cancer : Situation Actuelle

Le cancer regroupe un ensemble de maladies caractérisées par une prolifération illimitée de cellules capables d'échapper à une mort cellulaire programmée (appelée apoptose), ce qui entraîne la formation d'une population de cellules anormales pouvant se disperser dans l'ensemble de l'organisme.² Ces maladies apparaissent dans les différentes parties du corps humain : tissus, organes ou cellules associées à ces tissus. Il existe donc différents types de cancers ayant des évolutions distinctes et diverses.

I.1.1. Pathologie Complexe dont la Fréquence Augmente

Lors du développement d'un cancer, il existe trois étapes essentielles indépendantes : l'initiation, la promotion et la progression tumorale. La cancérogenèse s'accompagne de la mise en place d'autres processus biologiques tels que l'angiogenèse, l'échappement tumoral et la diffusion de cellules malignes expliquant que la genèse d'un cancer est un processus complexe souvent long.

L'initiation est l'étape au cours de laquelle une cellule donnée acquiert une anomalie génétique définitive. Parmi les agents initiateurs, on peut citer les virus, les substances chimiques et les rayonnements. Une cellule « initiée » n'a pas acquis d'autonomie de croissance mais transmet à sa descendance la mutation génétique irréversible résultant de l'initiation. Les dommages créés au sein d'une cellule initiée peuvent passer inaperçus si d'autres événements géniques n'ont pas lieu pour stimuler la progression tumorale. A ce stade les cellules en prolifération gardent les caractères de spécificité des tissus dont elles sont originaires.

L'étape suivante est la promotion tumorale. Elle correspond à la prolifération clonale des cellules « initiées » aboutissant à des amas cellulaires ou tumeurs bénignes, suite à la stimulation par des promoteurs tumoraux n'ayant en général pas d'action directe sur l'ADN (hormones, inflammation chronique, facteurs de croissance...). Ces cellules prolifèrent activement dans le tissu d'origine mais elles ont perdu leurs caractéristiques de cellules différenciées.

La dernière étape est la progression tumorale résultant d'une ou plusieurs mutations supplémentaires qui convertit les tumeurs bénignes en tumeurs malignes. Les cellules tumorales deviennent alors capables d'envahir les tissus environnants et d'établir des métastases dans les organes éloignés de la tumeur primaire. Ce dernier stade d'évolution est dit stade de « cancer invasif ».

La cellule cancéreuse met en œuvre des mécanismes qui s'organisent de manière apparemment séquentielle et précise pour pouvoir réussir son implantation, son développement et sa progression. Pour que se développe un cancer, il est désormais admis qu'il faut que des modifications surviennent au niveau de l'ADN d'une seule et même cellule que ce soit par mutations ou par réarrangements chromosomiques inadéquats. Ces

² Lacave, R.; Larsen, C.-J.; Robert, J. *Cancérologie fondamentale*. ed. J. Libbey-Eurotext, Montrouge, **2005**, XIV-437 p.

modifications génétiques peuvent être soit spontanées, soit induites par des déclencheurs d'origine externe. Les altérations géniques responsables du développement d'un cancer affectent principalement les gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, dans les phénomènes d'adhérence cellulaire, ainsi que dans les processus de réparation des lésions de l'ADN. La cellule cancéreuse acquiert alors certaines propriétés lui conférant sa malignité (Figure 1).

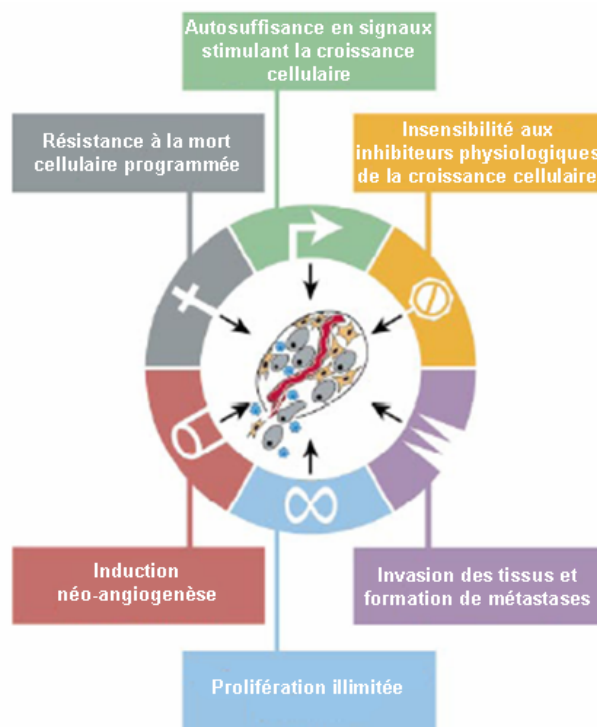


Figure 1 : Propriétés responsables du caractère malin des cellules cancéreuses.³

Ni détectées, ni réparées par les systèmes de surveillance et de réparation de l'organisme, les altérations génétiques sont directement responsables de la prolifération anarchique des cellules cancéreuses, que ce soit dans le cas des tumeurs solides ou dans celui des tumeurs « monoclonales » des cellules circulantes. Ce dérèglement de quelques unes des milliards de cellules qui constituent les êtres pluricellulaires est une pathologie fréquente quel que soit le continent, l'origine ethnique ou la culture.

Aujourd'hui, le cancer est devenu un problème de santé publique dans les pays industrialisés mais également dans les pays en développement. En 2000, plus de 4,4 millions de cas ont été diagnostiqués en Asie, 2,8 millions en Europe, 1,4 millions en Amérique du Nord et 627 000 en Afrique. Le cancer représentait 12 % des décès dans le monde.⁴

Avec un nombre croissant de nouveaux cas diagnostiqués en Europe estimé à 3,2 millions en 2006,⁵ l'incidence des cancers semble malheureusement en progression. Ceci s'explique par l'augmentation de l'espérance de vie et par la multiplication des comportements à risques (exposition intensive aux rayons U.V., alimentation, tabac, alcool). Cependant, cette augmentation ne concerne pas tous les types de cancers. En effet, dans les pays industrialisés, certains cancers ont nettement régressé notamment grâce à l'amélioration

³ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.

⁴ Ferlay, J.; Bray, F.; Pisani, P.; Parkin, D. M. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, IARC CancerBase No 5, version 2.0. *IARC Press Lyon* **2004**.

⁵ Ferlay, J.; Autier, P.; Boniol, M.; Heanue, M.; Colombet, M.; Boyle, P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology* **2007**, *18*, 581-592.

des conditions d'hygiène (cas des cancers de l'estomac) et aux dépistages précoces (cas des cancers du col de l'utérus et du colon) (Figure 2).

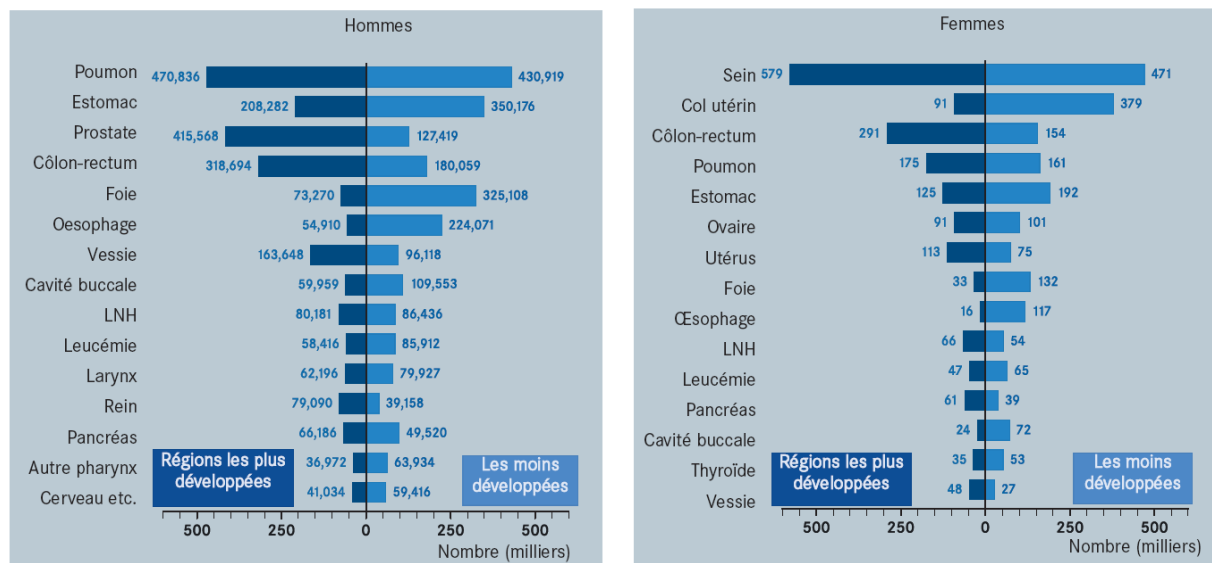


Figure 2 : Comparaison des cancers les plus répandus dans les pays les plus développés et les moins développés en 2000. LNH = Lymphome non hodgkinien.⁶

Néanmoins avec plus de 26 millions de personnes actuellement atteintes d'un cancer dans le monde,⁷ le développement de nouveaux traitements et de nouvelles méthodes diagnostiques est au centre des recherches des industries pharmaceutiques et de la recherche publique.

1.1.2. Méthodes Traditionnelles de Détection et de Traitement des Cancers

★ Détection des Cancers

La détection précoce des cancers est primordiale pour permettre une thérapie efficace. Le nombre de cellules tumorales à détruire est plus faible et les cellules ne possèdent pas encore toutes les anomalies génétiques leur permettant de résister ou de s'adapter aux traitements thérapeutiques. A l'inverse, les succès de guérison pour les tumeurs bien établies sont très réduits. Un certain nombre de techniques sont aujourd'hui disponibles pour la détection des cancers.

Classiquement la détection des tumeurs se fait par observation et palpation. Cette technique ne permet pas une détection précoce. En effet, les tumeurs détectées sont de l'ordre du centimètre et correspondent à un stade avancé du cancer. Les prélèvements de cellules ou biopsies sont utilisés pour confirmer le caractère malin d'une tumeur, pour en déterminer le stade tumoral et pour réaliser un dépistage précoce de certains cancers (détection de lésions précancéreuses dans le cancer du col de l'utérus). Les méthodes d'imagerie classiquement utilisées, la radiographie (rayons X), l'échographie (ultrasons), l'IRM (résonance magnétique), les techniques nucléaires (radioactivités) et l'endoscopie sont des techniques performantes permettant de détecter des tumeurs de quelques millimètres. Elles sont particulièrement utiles pour les préventions du cancer du sein, du poumon et du colon. D'autres techniques de détection ont été développées comme la recherche de marqueurs

⁶ Stewart, B. W.; Kleihues, P. Le cancer, un fardeau mondial. *Le cancer dans le monde* ed. IARC Press, Lyon. 2005, 13-19.

⁷ World Health Organisation, <http://www.who.int/features/qa/15/fr/index.html>.

génétiques analysant les gènes défectueux ou manquants (cancers « héréditaires »). La recherche de marqueurs sériques, substances produites par les tumeurs et libérées dans le sang (hormones, enzymes, antigènes) permet de détecter la présence de cellules cancéreuses et de surveiller leur évolution mais ne concerne qu'un petit nombre de cancers.

Parmi ces différentes méthodes de détections, les techniques d'imagerie médicale ont fait d'énormes progrès ces trente dernières années. Le CT-Scan (ou tomodensitométrie) utilisant les rayons X, permet de réaliser des coupes transversales du corps humain et d'obtenir des images précises d'un organe. Le PET Scan (*Positron Emission Tomography*) basé sur la détection de radioéléments émetteurs de positrons permet de localiser avec une très grande précision les tumeurs (forme et contours exacts). Le traceur radioactif le plus souvent utilisé est le ^{18}F -fluoro-desoxy-glucose (^{18}F -FDG), un sucre radioactif analogue du glucose. Celui-ci s'accumule spécifiquement au niveau des zones à forte activité métabolique : tumeurs, métastases, cerveau. Cette imagerie fonctionnelle permet de déceler des micro-métastases invisibles sur les clichés radiographiques ou encore de suivre l'évolution et la réponse à un traitement anti-tumoral. Ce type d'imagerie est utilisé par exemple pour suivre la réponse de tumeurs gastro-intestinales au traitement par le Glivec[®] (Figure 3).⁸ Avant traitement, l'examen PET Scan permet de visualiser un intense marquage au ^{18}F -FDG au niveau du foie (flèche simple), dans l'estomac (flèche double) et une excrétion urinaire normale du composé. Le CT Scan confirme la présence de ces lésions. Un an après le début de la thérapie, les clichés montrent que les masses tumorales ont régressé et ne sont plus marquées au ^{18}F -FDG indiquant une absence d'activité tumorale et une réponse à la thérapie.

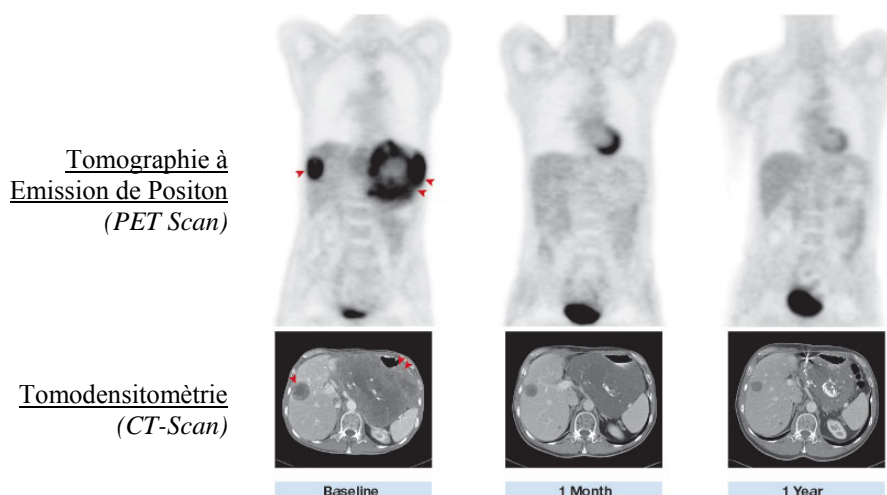


Figure 3 : Imagerie PET Scan au ^{18}F -FDG et CT-Scan de la réponse de tumeurs gastro-intestinales au traitement par le Glivec[®].⁸

Malheureusement, ce type d'imagerie présente certaines contraintes. La demi-vie du ^{18}F est courte (110 min) et implique une utilisation extrêmement rapide du ^{18}F -FDG. L'acheminement entre des sites éloignés de production et d'utilisation reste un problème majeur de ce type de marqueur. D'autre part, le PET Scan n'est pas utilisable pour visualiser des tumeurs dans les organes à fort métabolisme comme le cerveau ou dans les organes impliqués dans l'élimination du marqueur. Cependant ces techniques d'imagerie médicale représentent une avancée considérable pour l'oncologie dans la détection précoce des tumeurs mais restent des technologies très coûteuses et présentes seulement dans des centres spécialisés.

⁸ Sullivan, D. C.; Kelloff, G. Seeing into cells. The promise of *in vivo* molecular imaging in oncology. *EMBO Rep* **2005**, *6*, 292-296.

★ Traitements des Cancers

Une fois le cancer diagnostiqué, différentes méthodes sont à la disposition des praticiens pour traiter la maladie. La chirurgie est classiquement utilisée pour enlever la tumeur primaire et permet la guérison d'un grand nombre de cancers précoces. Elle est aujourd'hui la méthode la plus efficace pour les petits foyers tumoraux sans métastase, mais reste problématique. L'élimination de l'intégralité des cellules cancéreuses et la prévention de leur dissémination lors de l'opération chirurgicale peuvent être difficiles. Toujours pour les traitements locaux, la radiothérapie, basée sur l'action de rayonnements « ionisants » (X, alpha, bêta ou gamma) est utilisée pour traiter les tumeurs mais pose le problème de la toxicité des rayonnements « ionisants » sur les tissus sains environnants. Un peu à part, l'hormonothérapie est prescrite pour réduire le taux d'hormones dans le sang dans le cas de cancers hormonosensibles. Enfin la chimiothérapie correspond à l'utilisation de composés naturels ou de synthèse bloquant la prolifération cellulaire (traitements cytostatiques) ou tuant les cellules (traitements cytotoxiques).

La chimiothérapie classique utilise divers produits regroupés en plusieurs familles dont les plus utilisées sont décrites ci-après. Les agents alkylants représentent la plus ancienne classe d'anti-cancéreux avec les dérivés des gaz moutarde (Cyclophosphamide). Ils agissent directement au niveau de l'ADN en établissant des pontages intra- ou inter-brins, bloquant ainsi le cycle cellulaire. Les sels de platines (Cisplatine[®]) font aussi partie de cette classe. Les anti-métabolites, tel que le 5-fluorouracile, représentent une deuxième famille d'anti-cancéreux inhibant les enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN ou s'incorporant à l'ADN. On peut ensuite citer la famille des inhibiteurs de topoisomérases (I et II) qui empêchent la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire. La doxorubicine (anthracycline) toujours très utilisée en chimiothérapie fait partie de cette classe d'anticancéreux. Une dernière grande classe d'anticancéreux est celle des « poisons » du fuseau, rassemblant les molécules pouvant agir sur la polymérisation ou la dépolymérisation des protéines constitutives des microtubules du fuseau mitotique, empêchant ainsi la continuité du cycle cellulaire. Cette famille regroupe les dérivés des alcaloïdes de la pervenche (Vinorelbine) et des taxanes (Docétaxel).⁹ Par ailleurs, dans le traitement de certains cancers, des synergies médicamenteuses ont été montrées en associant des molécules appartenant à différentes familles (polychimiothérapie).

Cependant, ces chimiothérapies sont des traitements agissant spécifiquement sur toutes les cellules qui prolifèrent. Elles peuvent donc détruire des cellules saines et tout particulièrement les cellules à fort taux de renouvellement comme les cellules sanguines. Ainsi les agents de chimiothérapie peuvent entraîner une toxicité hématologique (perte globale des cellules sanguines, perte de fer, ou perte des plaquettes sanguines), l'alopecie (perte de cheveux), une toxicité gonadique et toxicité cardiaque (caractéristique des anthracyclines) auxquelles peuvent s'ajouter le développement de cancers secondaires. Aux vues des nombreuses toxicités liées à la chimiothérapie, des traitements palliatifs sont administrés en parallèle de manière à permettre la survie même du patient (traitements stimulant la production de cellules hématopoïétiques) ou pour limiter les effets secondaires (douleurs, fatigue, vomissements).

La chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie peuvent être associées et utilisées de manière simultanée. Ces méthodes combinées donnent souvent de bons résultats de rémission de cancers sans rechute. Néanmoins, quel que soit le traitement (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie) celui-ci est souvent lourd et traumatisant pour le patient cancéreux.

⁹ Robert, J. Pharmacologie des médicaments anticancéreux. *Cancérologie Fondamentale* ed. J. Libbey-Eurotext, Montrouge. **2005**, 403-413.

★ Orientations en Détection et Traitements des Cancers

Aujourd'hui encore, la majorité des tumeurs sont diagnostiquées à des stades avancés de la maladie et sont incurables, d'où la nécessité de développer des techniques de plus en plus fines et précises pour détecter au plus tôt un grand nombre de cancers. La recherche de moyens diagnostiques plus performants se tourne vers le développement de sondes capables de détecter les stades précoces de la progression tumorale et de visualiser des métastases de taille inférieure au millimètre. On s'oriente donc vers une imagerie moléculaire qui consiste à utiliser des sondes reconnaissant des phénomènes biologiques spécifiques des cancers et permettant de les imager au moyen de techniques d'imagerie médicale de plus en plus performantes.

Les traitements contre le cancer permettent de réduire le volume tumoral et d'améliorer la survie du patient (guérison des cancers détectés précocement). La chimiothérapie, malgré sa toxicité, apparaît comme la seule thérapie pour traiter les tumeurs métastatiques. Malheureusement, sur les cancers de stade avancé, elle ne guérit que rarement. Là également, on s'oriente vers le développement de nouvelles molécules ciblant les anomalies spécifiques des cellules cancéreuses pour limiter leur croissance ou pour les détruire et diminuer la toxicité des traitements.

Il y a donc en oncologie une forte demande de méthodes de détection plus précoces et de traitements thérapeutiques moins toxiques et plus efficaces. Afin de répondre à cette demande, la recherche s'oriente de plus en plus vers des stratégies ciblées que ce soit pour le diagnostic ou pour la thérapie.

I.2. Nouvelles Stratégies Ciblées en Cancérologie

De nombreux progrès réalisés au cours des vingt dernières années dans les domaines de la biologie moléculaire, cellulaire et de la génomique ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le phénomène tumoral. Cela a permis le développement de nouvelles molécules ciblant des anomalies spécifiques des cellules cancéreuses.

I.2.1. *Grandes Stratégies Ciblées*

A l'heure actuelle, plusieurs grandes approches ciblées ont été développées pour essayer de bloquer les mécanismes impliqués dans le développement et la progression tumorale. Les cibles peuvent être intracellulaires (kinases, transférases, gènes) et extracellulaires (récepteurs aux facteurs de croissance, antigènes cellulaires localisés à la surface des cellules cancéreuses ou facteurs de croissance du milieu extracellulaire tumoral).

Les plus grands succès de ces stratégies ciblées en thérapie ont été obtenus avec la commercialisation d'anticorps monoclonaux agissant sur les mécanismes moléculaires propres au phénomène tumoral (Tableau 1). Par exemple, le Bevacizumab inactive un facteur de croissance, le VEGF qui stimule la formation des vaisseaux sanguins. Les anticorps peuvent également inhiber des récepteurs. Parmi ceux-ci, le Panitumumab, le Cetuximab et le Trastuzumab sont des anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs aux facteurs de croissance EGF et HER2/neu. Les autres anticorps validés en oncologie, Rituxumab et Alemtuzumab, sont dirigés respectivement contre les antigènes CD20 et CD52 présentés

spécifiquement par certaines cellules cancéreuses.¹⁰ Le développement de fragments d'anticorps dirigés contre les mêmes cibles semble également prometteur (Lucentis en phase clinique I).¹¹

Nom commercial	Nom de l'anticorps	Origine	Cible	Approuvé en / Type de cancer	Société
Vectibix™	Panitumumab	Humain	EGFR	2006 Cancer du colon	Amgen, CA
Avastin™	Bevacizumab	Humanisé	VEGF	2004 Cancer du colon	Genentech, EU
Erbix™	Cetuximab	Chimérique	EGFR	2004 Cancer du colon	ImClone Systems, EU
Bexxar™	Tositumomab	¹³¹ I Souris	CD20	2003 Lymphome	GlaxoSmithKline, EU
Zevalin™	Ibritumomab	⁹⁰ Y Souris	CD20	2002 Lymphome	Biogen Idec, EU
CamPath™	Alemtuzumab	Humanisé	CD52	2001 Leucémie	Ilex Genzyme, EU
Mylotarg™	Gemtuzumab-Ozogamicin	Humanisé	CD33	2000 Leucémie	Wyeth, EU
Herceptin™	Trastuzumab	Humanisé	Her2/neu	1998 Cancer du sein	Genentech, EU
Rituxan™	Rituximab	Chimérique	CD20	1997 Lymphome	Genentech, EU

Tableau 1 : Anticorps monoclonaux actuellement utilisés en oncologie.^{12,13}

D'autres composés capables d'inhiber la néo-angiogenèse tumorale sont en cours d'études cliniques, tels que des petites molécules de synthèse (Sorafenib, Sunitinib, Vatalanib et Thalidomide), un peptide (Cilengitide), des protéines recombinantes (Endostatin, Angiostatin) et un ribosyme (Angiozyme).¹⁴ Par ailleurs, plusieurs petites molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase surexprimée dans certains cancers ont été validées (l'Imatinib, le Gefitinib, l'Erlotinib). D'autres molécules inhibitrices de l'activité kinase ou transférase spécifiquement impliquée dans le cycle cellulaire et la transduction du signal des cellules cancéreuses sont également en cours d'investigation clinique.¹⁵ En ce qui concerne la stratégie ciblant les anomalies géniques des cellules cancéreuses, elle fait l'objet de nombreuses recherches, mais pose le problème de l'absence de vecteurs permettant une transfection efficace.¹⁶ Malgré les efforts de recherche, les molécules actuellement validées en cancérologie sont majoritairement des composés agissant sur des cibles extracellulaires ou des petites molécules organiques diffusant à travers la membrane cellulaire pour agir sur des cibles intracellulaires.

Ces molécules ont une action directe sur les anomalies des cellules cancéreuses en induisant leur mort cellulaire ou en limitant leur croissance. Une autre voie possible dans le

¹⁰ Schrama, D.; Reisfeld, R. A.; Becker, J. C. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 147-159.

¹¹ Clinicaltrials.gov *Ranibizumab Injections to Treat Retinal Tumors in Patients With Von Hippel-Lindau Syndrome*, <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00089765>.

¹² Chua, Y. J.; Cunningham, D. Panitumumab. *Drugs Today* **2006**, *42*, 711-719.

¹³ Adams, G. P.; Weiner, L. M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 1147-1157.

¹⁴ Lippert, J. W. Vascular disrupting agents. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15*, 605-615.

¹⁵ Hinnen, P.; Eskens, F. A. Vascular disrupting agents in clinical development. *Br J Cancer* **2007**, *96*, 1159-1165.

¹⁶ Edelstein, M. L.; Abedi, M. R.; Wixon, J.; Edelstein, R. M. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med* **2004**, *6*, 597-602.

développement de stratégies ciblées est la conception de macromolécules évoluées dont les propriétés proviennent de l'assemblage de différents éléments que sont les agents de ciblage, les éléments effecteurs, les supports moléculaires, et les éléments de vectorisation.

1.2.2. Grandes Familles d'Agents de Ciblage des Cancers

Récemment, de nouvelles voies de recherche s'orientent vers le développement de systèmes multifonctionnels combinant propriétés de ciblage tumoral et propriétés effectrices (thérapie/diagnostic).¹⁷ Le ciblage peut être assuré par des molécules reconnaissant des anomalies spécifiques de la membrane extracellulaire des cellules cancéreuses (antigènes cellulaires, récepteurs membranaires) ou bien des anomalies spécifiques du tissu tumoral (néo-vascularisations tumorales). Les propriétés effectrices résultent du couplage d'éléments thérapeutiques ou de détection à l'agent de ciblage. Ces ligands sont utilisés afin d'améliorer les propriétés de pharmacoguidage des systèmes de vectorisation assurant le transport ciblé d'éléments effecteurs.

★ Anticorps Monoclonaux et Fragments d'Anticorps

De manière générale, les anticorps monoclonaux et fragments d'anticorps possèdent une très haute affinité spécifique pour certains éléments présentés à la surface des cellules. Dans le cas de reconnaissance d'éléments présentés par les cellules cancéreuses, ils deviennent des agents de ciblage de choix pour atteindre les zones tumorales.¹⁸ Classiquement, une fois liés aux cellules cancéreuses, ces anticorps peuvent induire une réponse immunitaire (stimulation du système immunitaire) ou une autre réponse cellulaire (endocytose, proliférations). Afin d'apporter ou d'augmenter l'efficacité thérapeutique des anticorps, des techniques d'ingénierie des protéines ou des modifications chimiques ont permis d'armer ces anticorps avec des toxines, des isotopes radioactifs, des molécules utilisées en chimiothérapie traditionnelles ou des cytokines.¹⁹ Ces agents de ciblage permettent de concentrer spécifiquement les agents thérapeutiques au niveau tumoral diminuant ainsi leur toxicité. La conjugaison entre anticorps et molécules de chimiothérapie conventionnelle a été largement décrite dans la littérature.²⁰ Parmi la dizaine d'anticorps monoclonaux utilisés en thérapie contre le cancer (Tableau 1), trois ont été conjugués : le Tositumomab, l'Ibritumomab et le Gemtuzumab-Ozogamicin.²¹

Dans le cas du Gemtuzumab-Ozogamicin (composé cytotoxique couplé à un anticorps humanisé), il résulte de la reconnaissance anticorps/récepteur une endocytose du complexe anticorps-drogue et un relargage de la drogue active dans les cellules cancéreuses (Figure 4). Ce système est très efficace dans certaines leucémies avec une toxicité acceptable.

¹⁷ Eckhardt, S. Molecular targeted therapy: a strategy of disillusion or optimism? *J Lab Clin Med* **2006**, *147*, 108-113.

¹⁸ Chari, R. V. Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs. *Acc Chem Res* **2008**, *41*, 98-107.

¹⁹ Payne, G. Progress in immunoconjugate cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 207-212.

²⁰ Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* **2001**, *1*, 118-129.

²¹ Wu, A. M.; Senter, P. D. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 1137-1146.

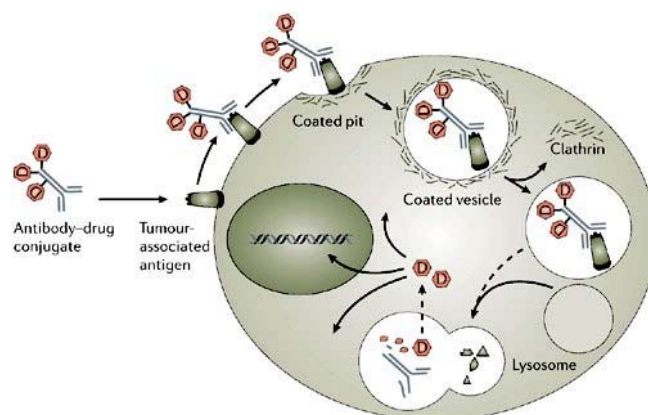


Figure 4 : Principe d'action des anticorps conjugués pour la thérapie.¹⁰

Le couplage d'un élément radioactif à un anticorps permet une irradiation ciblée de plusieurs couches de cellules au niveau tumoral. Les isotopes utilisés sont en général des émetteurs β avec un rayon d'action allant de 1 à 7 mm. L'anticorps radio-marqué peut ainsi irradier les cellules que le complexe anticorps/radioélément n'a pas pu atteindre ou les cellules qui n'expriment pas l'antigène.²² L'efficacité de la radio-immunothérapie (BexxarTM et ZevalinTM) a été démontrée dans les lymphomes récidivants et résistants à la chimiothérapie.²³ Les résultats thérapeutiques obtenus avec ces anticorps couplés à des radioéléments se sont révélés meilleurs que l'anticorps nu mais ces conjugués présentent une toxicité hématologique.

Parallèlement, pour des expériences de diagnostic, les anticorps ont été associés à des radiotraceurs.²⁴ Ils ont également été couplés à des chromophores et ont permis d'obtenir des images très nettes des zones tumorales de petites tailles (inférieur à 1 mm de diamètre) pouvant être utilisées en situations peropératoires.²⁵

Bien que les anticorps aient une grande efficacité en tant qu'agents de ciblage, ils présentent certains désavantages. Leur grande taille entraîne une faible pénétration intracellulaire et diffusion intra-tumorale. Ils présentent également un fort caractère immunogène s'ils ne sont pas humains. Afin de contourner ces inconvénients, l'ingénierie des anticorps a permis le développement, d'une part de fragments d'anticorps de petite taille et d'autre part d'anticorps modifiés humanisés.^{26,27,28} Leur conjugaison à des éléments de détection ou cytotoxiques permet de concevoir des macromolécules efficaces pour le diagnostic et le traitement de certains cancers.

²² Azria, D.; Spano, J.-P. *Thérapies ciblées en cancérologie*. ed. J. Libbey-Eurotext, Montrouge, **2006**, VI-127 p.

²³ Sharkey, R. M.; Goldenberg, D. M. Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med* **2005**, *46*, 115-127.

²⁴ Xu, H.; Baidoo, K.; Gunn, A. J.; Boswell, C. A.; Milenic, D. E.; Choyke, P. L.; Brechbiel, M. W. Design, synthesis, and characterization of a dual modality positron emission tomography and fluorescence imaging agent for monoclonal antibody tumor-targeted imaging. *J Med Chem* **2007**, *50*, 4759-4765.

²⁵ Gutowski, M.; Carcenac, M.; Pourquier, D.; Larroque, C.; Saint-Aubert, B.; Rouanet, P.; Pelegrin, A. Intraoperative immunophotodetection for radical resection of cancers: evaluation in an experimental model. *Clin Cancer Res* **2001**, *7*, 1142-1148.

²⁶ Holliger, P.; Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 1126-1136.

²⁷ Carter, P. J. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* **2006**, *6*, 343-357.

²⁸ Sidhu, S. S.; Fellouse, F. A. Synthetic therapeutic antibodies. *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 682-688.

★ Ligands des récepteurs membranaires tumoraux

Un grand nombre de récepteurs membranaires sont surexprimés à la surface des cellules cancéreuses. Les ligands naturels de ces récepteurs s'y lient avec une très bonne affinité et sélectivité. Ils sont donc apparus comme des agents de ciblage potentiels.²⁹ La nature de ces ligands est variée : protéique (transferrine)³⁰, saccharidique (acide hyaluronique)³¹ ou organique (l'acide folique)³². Par ailleurs, les méthodes de « phage display »³³ et de screening de bibliothèques peptidiques « One Bead One Compound »,³⁴ ont permis de sélectionner de nouveaux ligands peptidiques. Des modifications structurales et chimiques de divers ligands ont permis d'en optimiser les propriétés (affinité, spécificité) afin d'obtenir de très bons agents de ciblage des tumeurs. Des études de modélisation basées sur les interactions ligand-récepteurs sont réalisées pour développer et concevoir des ligands synthétiques de haute affinité. Aujourd'hui, il y a donc un panel de ligands naturels et synthétiques susceptibles d'être utilisés pour diriger les éléments thérapeutiques et de détection au niveau des tumeurs. Ainsi, le couplage du ligand folate à des radiomarqueurs tels que ¹¹¹In, ^{99m}Tc et ^{65/68}Ga a permis une accumulation importante *in vivo* des conjugués au niveau des tumeurs, des reins et relativement faible au niveau des autres tissus.³²

★ Multivalence des agents de ciblage

Les systèmes biologiques mettent souvent en jeu des interactions à contacts multiples : c'est le cas notamment lors de la prise en charge d'un pathogène par les macrophages au cours de la réaction immunitaire ou encore, lors de l'adhésion plaquettaire sur des sites d'inflammation dans le phénomène de coagulation. Ces interactions multiples sont responsables de réponses biologiques spécifiques, différentes des réponses induites par un contact unique. Dans le cas du ciblage d'un récepteur, les systèmes de présentation multivalente de ligands permettent d'augmenter l'efficacité du ciblage.^{35,36} Par ailleurs, il a également été observé une modulation de la réponse physiologique induite au niveau d'un récepteur en fonction de la multivalence du ligand (intensité et nature de la réponse). Par exemple, une présentation multivalente de ligands peut induire un phénomène d'endocytose du complexe ligand/récepteur non observé dans le cas du ligand monovalent.³⁷ Il existe plusieurs mécanismes possibles pouvant rendre compte de l'apport de la multivalence dans un phénomène de reconnaissance ligand-récepteur (Figure 5).

²⁹ Vyas, S. P.; Sihorkar, V. Endogenous carriers and ligands in non-immunogenic site-specific drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2000**, *43*, 101-164.

³⁰ Daniels, T. R.; Delgado, T.; Helguera, G.; Penichet, M. L. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clin Immunol* **2006**, *121*, 159-176.

³¹ Jaracz, S.; Chen, J.; Kuznetsova, L. V.; Ojima, I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorg Med Chem* **2005**, *13*, 5043-5054.

³² Low, P. S.; Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D. Discovery and Development of Folic-Acid-Based Receptor Targeting for Imaging and Therapy of Cancer and Inflammatory Diseases. *Acc Chem Res* **2008**, *41*, 120-129.

³³ Ruoslahti, E. Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Semin Cancer Biol* **2000**, *10*, 435-442.

³⁴ Aina, O. H.; Sroka, T. C.; Chen, M. L.; Lam, K. S. Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers* **2002**, *66*, 184-199.

³⁵ Mammen, M.; Chio, S.-K.; Whitesides, G. M. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* **1998**, *37*, 2755-2794.

³⁶ Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 14922-14933.

³⁷ Schraa, A. J.; Kok, R. J.; Berendsen, A. D.; Moorlag, H. E.; Bos, E. J.; Meijer, D. K.; de Leij, L. F.; Molema, G. Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting. *J Control Release* **2002**, *83*, 241-251.

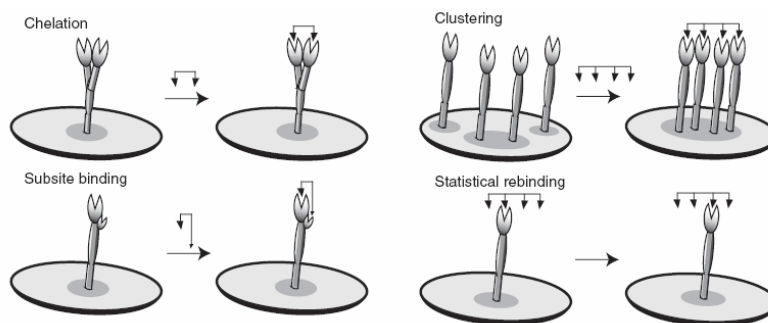


Figure 5 : Mécanismes impliqués dans la reconnaissance d'un ligand multivalent par sa cible.³⁸

L'effet de chélation et l'effet de « *subsite binding* » résultent de contacts multiples entre le ligand multivalent et un récepteur présentant plusieurs sites de liaison. L'effet de « *statistical rebinding* » correspond à la facilité d'un ligand multivalent à se lier à nouveau au même récepteur grâce à la concentration locale élevée en ligand à proximité du récepteur. Ces trois effets permettent une diminution de la dissociation du système ligand/récepteur et augmentent l'affinité apparente du ligand multivalent pour son récepteur. De manière indirecte, l'augmentation de l'affinité du ligand pour son récepteur peut être à l'origine d'une endocytose du complexe récepteur/ligand. L'effet de « *clustering* » correspond à une modification de la proximité et de l'orientation de plusieurs récepteurs provoquée par leur liaison au ligand multivalent. Ce phénomène peut affecter les fonctions de signalisation des récepteurs et induire des phénomènes cellulaires tels que, là encore, l'endocytose du système récepteur/ligand (Figure 5).³⁸

Certains systèmes multivalents peuvent montrer un gain important en terme d'affinité et de spécificité pour le ciblage mais également un gain en terme de modulation de la réponse biologique, avec notamment induction de l'endocytose.³⁹ Cette dernière propriété d'internalisation cellulaire des systèmes multivalents est un cas particulier. Classiquement les agents de ciblage concentrent les éléments effecteurs à proximité des cellules cancéreuses, mais peu d'entre eux possèdent des propriétés de vectorisation. Dans le cas où la cible de l'élément effecteur est intracellulaire, il faut lui d'associer un agent de vectorisation.

1.2.3. Grandes Familles de Vecteurs Cellulaires

Il existe majoritairement trois grandes familles de vecteurs cellulaires : les vecteurs viraux, les système lipidiques et les peptides ou protéines de translocation. A l'origine, ces systèmes ont été particulièrement développés pour les applications de thérapie génique. Aujourd'hui, leur utilisation se généralise à toutes les stratégies nécessitant une entrée cellulaire.⁴⁰

³⁸ Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction. *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 2348-2368.

³⁹ Carlson, C. B.; Mowery, P.; Owen, R. M.; Dykhuizen, E. C.; Kiessling, L. L. Selective tumor cell targeting using low-affinity, multivalent interactions. *ACS Chem Biol* **2007**, *2*, 119-127.

⁴⁰ Rawat, A.; Vaidya, B.; Khatri, K.; Goyal, A. K.; Gupta, P. N.; Mahor, S.; Paliwal, R.; Rai, S.; Vyas, S. P. Targeted intracellular delivery of therapeutics: an overview. *Pharmazie* **2007**, *62*, 643-658.

★ Vecteurs Viraux

Les virus sont des vecteurs naturels, hautement évolués et d'une efficacité redoutable pour pénétrer dans les cellules hôtes, transférer leur matériel génétique et exploiter la machinerie cellulaire pour leur réplication. Pour les utiliser en thérapie, des systèmes non pathogènes ont été développés.⁴¹ Afin de contourner le manque de sélectivité de ces vecteurs pour les tumeurs, plusieurs stratégies ont été développées. Des agents de ciblage ont été couplés à leur surface, notamment des anticorps bi-fonctionnels reconnaissant d'un part une protéine de l'enveloppe du virus et d'autre part un récepteur des cellules cibles (Figure 6).⁴² Cette technique a permis d'introduire un « gène médicament » dans une cellule cancéreuse *via* un virus inactivé.

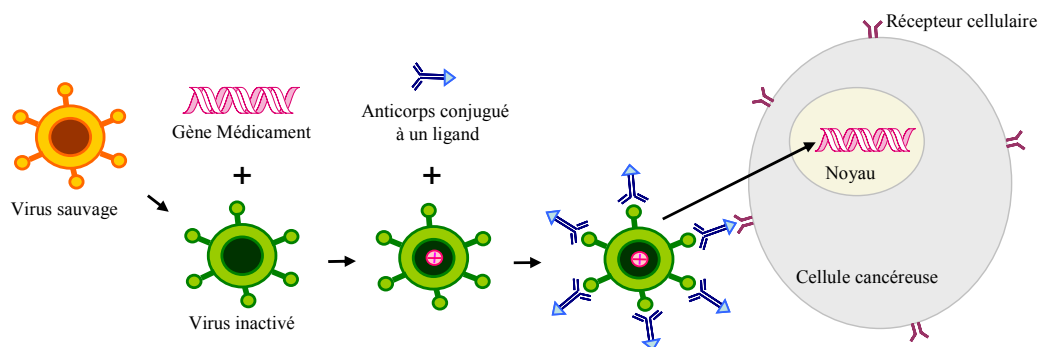


Figure 6 : Principe d'utilisation des vecteurs viraux ciblés pour la thérapie génique.

Des éléments de ciblage ont également été introduits par génie génétique en modifiant les fibres virales. Cette dernière stratégie a été employée pour faire présenter par un virus des peptides ciblant des récepteurs à la surface des cellules cancéreuses.⁴³ Malgré un matériel viral non pathogène, l'insertion d'un gène dans le génome d'une cellule hôte reste délicate et ne doit pas avoir d'influence sur l'expression des autres gènes (insertions génotoxiques susceptibles d'induire des effets secondaires sévères).

★ Systèmes Lipidiques, Nanoparticules

Grâce au développement des nanotechnologies, la recherche galénique est à l'origine de nouveaux systèmes d'administration permettant l'entrée dans la cellule de molécules actives.⁴⁴ Ces systèmes permettent également de protéger les molécules actives de la dégradation et de contrôler leur libération. Ces nanoparticules sont principalement des systèmes lipidiques. Les vecteurs lipidiques de première génération sont des vésicules formées d'une ou plusieurs couches de phospholipides. De manière à limiter leur dégradation par le système immunitaire (opsonisation), ceux-ci ont été recouverts de polymères hydrophiles (vecteurs de deuxième génération). Afin de diriger ces vecteurs, ils ont été décorés de ligands (anticorps, peptides, sucres, acide folique).^{45,46} Ils sont alors capables de

⁴¹ Liu, T. C.; Galanis, E.; Kirn, D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol* **2007**, *4*, 101-117.

⁴² Owen, R. M.; Carlson, C. B.; Xu, J.; Mowery, P.; Fasella, E.; Kiessling, L. L. Bifunctional ligands that target cells displaying the alpha v beta3 integrin. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 68-82.

⁴³ Wu, H.; Seki, T.; Dmitriev, I.; Uil, T.; Kashentseva, E.; Han, T.; Curiel, D. T. Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum Gene Ther* **2002**, *13*, 1647-1653.

⁴⁴ Couvreur, P.; Vauthier, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res* **2006**, *23*, 1417-1450.

⁴⁵ Cheong, I.; Huang, X.; Thornton, K.; Diaz, L. A., Jr.; Zhou, S. Targeting cancer with bugs and liposomes: ready, aim, fire. *Cancer Res* **2007**, *67*, 9605-9608.

reconnaître de manière sélective des antigènes ou des récepteurs cellulaires. Ces vecteurs se sont révélés être des outils polyvalents car capables de vectoriser un large éventail d'éléments effecteurs ayant des propriétés physicochimiques différentes (hydrophile, hydrophobe) (Figure 7).⁴⁷ Ainsi, ils ont été utilisés pour délivrer divers éléments à l'intérieur des cellules cancéreuses tels des siRNA⁴⁸ ou encore des agents cytotoxiques.⁴⁹ De nombreux vecteurs lipidiques ciblés montrent des résultats précliniques très satisfaisants.⁵⁰ En 2007, un complexe lipidique présentant des fragments d'anticorps dirigés contre le récepteur de la transferrine et vectorisant un « gène médicament » est entré en phase clinique I.⁵¹

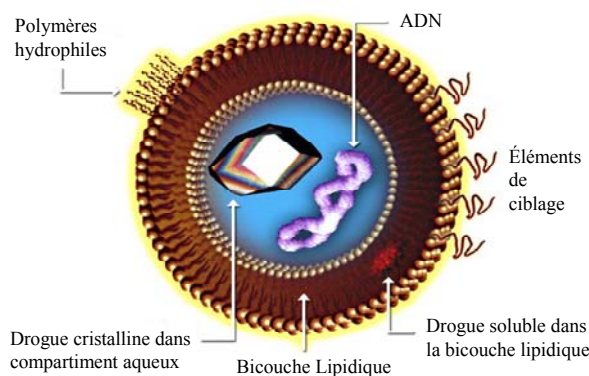


Figure 7 : Schéma des liposomes ciblés pour la vectorisation vers la cellules cancéreuse.⁵²

Récemment, des nanoparticules polymériques ont été également utilisées pour la thérapie génique mais n'ont montré qu'une efficacité de transfection faible.⁵³

★ Peptides et Protéines de Translocation

Durant les dix dernières années, un certain nombre de peptides (CPP, *Cell Penetrating Peptide*) ou petites protéines (PTD, *Protein Transduction Domain*), ayant la propriété de traverser la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes ont été utilisés pour vectoriser des macromolécules.^{54,55} Certaines de ces séquences dérivent de protéines naturelles telles que des protéines de surface de virus et bactéries (Tableau 2).

⁴⁶ Russ, V.; Wagner, E. Cell and tissue targeting of nucleic acids for cancer gene therapy. *Pharm Res* **2007**, *24*, 1047-1057.

⁴⁷ Samad, A.; Sultana, Y.; Aqil, M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Delivery* **2007**, *4*, 297-305.

⁴⁸ Schiffelers, R. M.; Ansari, A.; Xu, J.; Zhou, Q.; Tang, Q.; Storm, G.; Molema, G.; Lu, P. Y.; Scaria, P. V.; Woodle, M. C. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, 149.

⁴⁹ Park, J. W.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Colbern, G.; Shalaby, R.; Baselga, J.; Shao, Y.; Nielsen, U. B.; Marks, J. D.; Moore, D.; Papahadjopoulos, D.; Benz, C. C. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res* **2002**, *8*, 1172-1181.

⁵⁰ Torchilin, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *Aaps J* **2007**, *9*, 128-147.

⁵¹ ClinicalTrials.gov *Safety Study of Infusion of SGT-53 to Treat Solid Tumors*, <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00470613>.

⁵² Torchilin, V. P. Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev* **2006**, *58*, 1532-1555.

⁵³ Vasir, J. K.; Labhasetwar, V. Polymeric nanoparticles for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **2006**, *3*, 325-344.

⁵⁴ Tamsamani, J.; Vidal, P. The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Drug Discov Today* **2004**, *9*, 1012-1019.

⁵⁵ Gupta, B.; Levchenko, T. S.; Torchilin, V. P. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev* **2005**, *57*, 637-651.

Agents de translocation	Séquence d'acides aminés	Origines
Pénétratine	RQIKIWFQNRRMKWKK	Antennapedia
Tat (48-60)	GRKKRRQRRPPQC	HIV-1
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Galanine et Mastoparan
Peptide amphiphile	KALKLALKALKAALKLA	Synthèse
Arg ₉	RRRRRRRRR	Synthèse

Tableau 2 : Exemples d'agents de translocation.⁵⁴

Ces agents de translocation ont été conjugués à une grande variété de composés. Ainsi, ils ont permis la vectorisation cellulaire de petites molécules, de peptides, de protéines, d'acides nucléiques et de nanoparticules.^{56,57,58} Ces systèmes montrent une grande efficacité de vectorisation *in vitro* et *in vivo* chez le petit animal mais leurs mécanismes d'internalisation ne sont pas toujours clairement établis.⁵⁶

Les vecteurs cellulaires ainsi que certaines molécules de ciblage multivalentes sont des systèmes efficaces pour introduire divers éléments à l'intérieur des cellules. La bifonctionnalité des vecteurs « agents de ciblage multivalents » les rend particulièrement intéressants, ce qui a amené de nombreuses équipes de recherche à concevoir des molécules de ce type.

I.3. Outils pour la Conception de Vecteurs Multivalents

Depuis une vingtaine d'années, la conception de macromolécules polyfonctionnelles destinées à présenter des ligands de manière multivalente et à vectoriser des molécules d'intérêts a entraîné le développement de supports multivalents et de méthodes de conjugaison adéquate.

I.3.1. Supports Multivalents pour le Ciblage et la Vectorisation

Les supports utilisés pour le ciblage et la vectorisation, naturels ou synthétiques, sont appelés gabarits, châssis moléculaires ou encore « templates ». Ce sont principalement des protéines, des systèmes polymériques, des nanoparticules, des virus ou des petites molécules. Développés ou modifiés par les chimistes, ces objets sont utilisés pour présenter de manière multivalente des ligands (reconnaissance des cellules cancéreuses) et vectoriser des éléments thérapeutiques ou/et diagnostiques.

* Protéines

Certaines protéines globulaires (Immunoglobuline, Albumine, Avidine) ont été utilisées comme supports pour la présentation de plusieurs copies d'un ligand. Les ligands sont typiquement introduits sur les fonctions nucléophiles de la protéine (résidus lysine, histidine, cystéine ou extrémités *N*-terminales) par l'intermédiaire de bras espaceurs fonctionnels. Cette

⁵⁶ Patel, L. N.; Zaro, J. L.; Shen, W. C. Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharm Res* **2007**, *24*, 1977-1992.

⁵⁷ Deshayes, S.; Morris, M.; Heitz, F.; Divita, G. Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**, *60*, 537-547.

⁵⁸ Maurel, F.; Debart, F.; Cavelier, F.; Thierry, A. R.; Lebleu, B.; Vasseur, J. J.; Vives, E. Toward high yield synthesis of peptide-oligonucleotide chimera through a disulfide bridge: a simplified method for oligonucleotide activation. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 5084-5087.

approche conduit à une structure de composition chimique non définie avec un indice de valence imprécis, sans contrôle de la distance entre les ligands ou de leur orientation. Par ailleurs, les ligands peuvent également être introduits en utilisant les propriétés intrinsèques de certaines protéines. L'avidine peut être utilisée pour la présentation multimérique de ligands grâce à l'association de quatre ligands biotinylés.⁵⁹ Cette stratégie permet d'accéder à une structure chimique dont les paramètres de valence sont mieux contrôlés.

* Systèmes lipidiques, Nanoparticules, Virus

De par leur taille et la possibilité de leur associer différents éléments en périphérie, les virus,⁶⁰ les systèmes lipidiques⁶¹ et les nanoparticules⁶² sont, une fois décorés de ligands, des systèmes de présentation multimérique.

Les nanoparticules regroupent communément, les objets d'une taille comprise entre 1 et 100 nm. Ces systèmes peuvent avoir différentes compositions (or, cristaux de quartz, silice) présentant des propriétés intrinsèques spécifiques (fluorescence, magnétisme, opacité aux rayons X) et peuvent être fonctionnalisés avec plusieurs copies d'un ligand.⁶³ Par exemple, des nanocristaux fluorescents inorganiques « *quantum dot* » présentant de façon multimérique un peptide d'adressage tumoral (dirigé contre une protéine de surface, la nucléoline) ont permis de vectoriser des éléments thérapeutiques, tels que des siRNA (Figure 8).⁶⁴ Ces systèmes constituent une approche « *See and Treat* » particulièrement intéressante dans l'étude de nouveaux conjugués multivalents. Ils permettent l'évaluation de leur efficacité de vectorisation cellulaire, de leur mode d'action, de leur pharmacocinétique et de leur biodisponibilité. L'inconvénient de ces systèmes est un contrôle imprécis du nombre de ligands présentés.

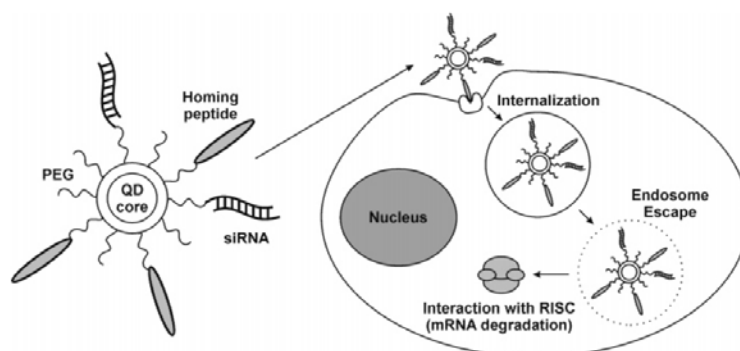


Figure 8 : Schéma de nanoparticules de quantum dot ciblés pour la vectorisation de siRNA.⁶⁴

⁵⁹ Dirksen, A.; Langereis, S.; de Waal, B. F.; van Genderen, M. H.; Hackeng, T. M.; Meijer, E. W. A supramolecular approach to multivalent target-specific MRI contrast agents for angiogenesis. *Chem Commun* **2005**, 2811-2813.

⁶⁰ Liu, Y.; Deisseroth, A. Tumor vascular targeting therapy with viral vectors. *Blood* **2007**, *107*, 3027-3033.

⁶¹ Dass, C. R.; Choong, P. F. Targeting of small molecule anticancer drugs to the tumour and its vasculature using cationic liposomes: lessons from gene therapy. *Cancer Cell Int* **2006**, *6*, 17.

⁶² Sonvico, F.; Mornet, S.; Vasseur, S.; Dubernet, C.; Jaillard, D.; Degrouard, J.; Hoebeke, J.; Duguet, E.; Colombo, P.; Couvreur, P. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjug Chem* **2005**, *16*, 1181-1188.

⁶³ Liu, Y.; Miyoshi, H.; Nakamura, M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *Int J Cancer* **2007**, *120*, 2527-2537.

⁶⁴ Derfus, A. M.; Chen, A. A.; Min, D. H.; Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N. Targeted quantum dot conjugates for siRNA delivery. *Bioconjug Chem* **2007**, *18*, 1391-1396.

★ Systèmes Polymériques

Les techniques de polymérisation classiques conduisent à des ligands multivalents de grandes tailles, dans lesquels les ligands sont distribués le long d'un polymère.⁶⁵ Les réactions de polymérisation étant difficiles à contrôler, la taille de la macromolécule obtenue est imprécise et son indice de valence indéterminée.

D'autres systèmes de polymérisation contrôlés permettent la synthèse de structures de taille définie. Ces systèmes polymériques (dendrimères,^{66,67} calixarènes,⁶⁸ cyclodextrines⁶⁹) sont utilisés comme supports moléculaires pour la présentation multimérique de ligands.^{70,71} Par exemple, les systèmes MAP (*Multiple Antigen Peptides*), originellement développés pour présenter plusieurs copies d'un motif antigénique⁷² sont facilement adaptables à la présentation de divers ligands. Ces structures sont basées sur un squelette polylysine branché dont les fonctions amines des résidus lysines (αNH_2 et ϵNH_2) constituent des points d'accroche permettant d'accéder à des systèmes multivalents comportant différents indices de valence (2, 4, 8, 16...) (Figure 9).

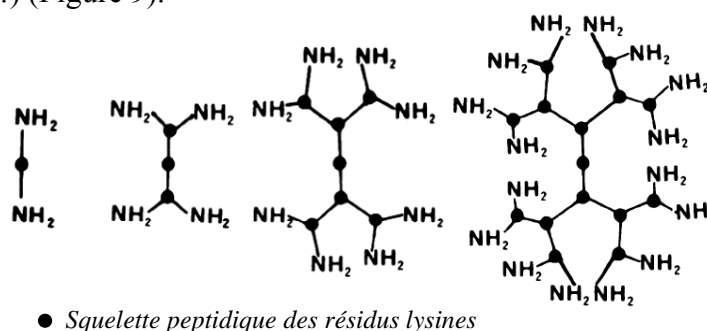


Figure 9 : Schéma des Multiple Antigen Peptides.⁷²

La possibilité d'utiliser des groupements protecteurs orthogonaux pour les fonctions amine rend ces systèmes particulièrement versatiles. En effet, la conjugaison de différents types de molécules permet l'introduction de plusieurs fonctionnalités.⁷³ Ces architectures multivalentes permettent un contrôle de la densité en ligands mais pas de la conformation de la macromolécule (orientation des ligands et distance entre les ligands variables).

⁶⁵ Maynard, H. D.; Okada, S. Y.; Grubbs, R. H. Inhibition of cell adhesion to fibronectin by oligopeptide-substituted polynorbornenes. *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 1275-1279.

⁶⁶ Cheng, Y.; Gao, Y.; Rao, T.; Li, Y.; Xu, T. Dendrimer-based prodrugs: design, synthesis, screening and biological evaluation. *Comb Chem High Throughput Screen* **2007**, *10*, 336-349.

⁶⁷ Darbre, T.; Reymond, J. L. Peptide dendrimers as artificial enzymes, receptors, and drug-delivery agents. *Acc Chem Res* **2006**, *39*, 925-934.

⁶⁸ Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. Calixarene-based multivalent ligands. *Chem Soc Rev* **2007**, *36*, 254-266.

⁶⁹ Jensen, K. J.; Brask, J. Carbohydrates in peptide and protein design. *Biopolymers* **2005**, *80*, 747-761.

⁷⁰ Tong, R.; Cheng, J. Anticancer Polymeric Nanomedicines. *Polymer Reviews* **2007**, *47*, 345 - 381.

⁷¹ Fichter, K. M.; Zhang, L.; Kiick, K. L.; Reineke, T. M. Peptide-Functionalized Poly(ethylene glycol) Star Polymers: DNA Delivery Vehicles with Multivalent Molecular Architecture. *Bioconjug Chem* **2008**, *19*, 76-88.

⁷² Tam, J. P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85*, 5409-5413.

⁷³ Thumshirn, G.; Hersel, U.; Goodman, S. L.; Kessler, H. Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chemistry - A European Journal* **2003**, *9*, 2717-2725.

★ Molécules de Faibles Masses Moléculaires

Certaines molécules de faibles masses moléculaires ont également été utilisées comme châssis moléculaires. La nature de ces petits composés est très variée (monosaccharides,⁷⁴ stéroïdes⁷⁵ ou autres petites molécules organiques⁷⁶) et ils présentent tous plusieurs fonctions chimiques permettant le couplage de ligands. Ces molécules regroupent des objets pouvant présenter de 2 à 10 copies du ligand et dont la taille ne dépasse pas les 1000 Da.³⁸ Ils permettent donc un contrôle des paramètres de valence. De plus, les propriétés structurales de certains châssis permettent également un contrôle de l'orientation des ligands.

Les chimistes ont donc à leur disposition une large gamme de supports multivalents pour construire de nouveaux vecteurs pour la cancérologie. Le support est choisi selon les effets biologiques recherchés : reconnaissance cellulaire, induction d'une voie de signalisation, induction d'une endocytose.

I.3.2. Méthodes de Conjugaison pour l'Assemblage de Macromolécules

Il existe un grand nombre de méthodes chimiques possibles pour assembler différents éléments au support multivalent : les ligations chimiques traditionnelles et chimiosélectives.

★ Liaisons Chimiques Traditionnelles

Les liaisons chimiques traditionnelles permettent d'assembler deux fragments protégés : seules les fonctions chimiques mises en jeu pour la conjugaison doivent être réactives. Cela implique donc la protection de l'ensemble des autres groupes fonctionnels, contrainte souvent limitante en ingénierie des biomolécules. Parmi ces liaisons, le lien amide est classiquement utilisé pour l'assemblage de fragments peptidiques protégés (Figure 10), mais il s'avère inadapté pour la conjugaison de fragments protégés d'origines différentes (peptides, oligonucléotides, sucres).

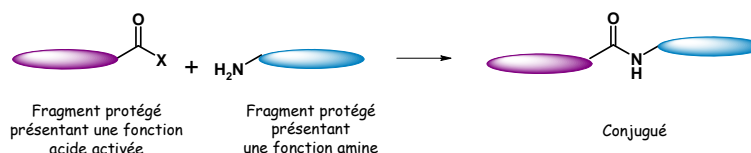


Figure 10 : Schéma de principe du couplage de deux éléments par lien peptidique.

En effet, la chimie standard des différentes biomolécules n'est pas entièrement compatible et ne permet pas l'utilisation de ce type de liaison. Par exemple, dans le cas d'un couplage peptide-oligonucléotide, les fragments peptidiques se déprotègent par un traitement en milieu acide, condition dans laquelle les oligonucléotides sont instables.

★ Liaisons Chimiosélectives

A l'opposé, les méthodes chimiosélectives offrent une alternative particulièrement intéressante aux synthèses traditionnelles pour la conjugaison de biomolécules de différentes familles et la construction de conjugués complexes de hauts poids moléculaires. Elles

⁷⁴ Ni, J.; Powell, R.; Baskakov, I. V.; DeVico, A.; Lewis, G. K.; Wang, L. X. Synthesis, conformation, and immunogenicity of monosaccharide-centered multivalent HIV-1 gp41 peptides containing the sequence of DP178. *Bioorg Med Chem* **2004**, *12*, 3141-3148.

⁷⁵ Li, H.; Wang, L. X. Cholic acid as template for multivalent peptide assembly. *Org Biomol Chem* **2003**, *1*, 3507-3513.

⁷⁶ Guarise, C.; Prins, L. J.; Scrimin, P. Fully symmetrical functionalization of multivalent scaffold molecules on solid support. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11670-11674.

reposent sur l'assemblage convergent de fragments polyfonctionnels déprotégés de différentes natures (peptides, protéines, saccharides, acides nucléiques) portant l'un et l'autre des fonctions chimiques présentant une réactivité réciproque et spécifique (fonctions électrophile et nucléophile « complémentaires »). La formation de la liaison chimiosélective s'opère principalement en milieu aqueux sans réactif de couplage. La ligation de deux synthons déprotégés permet de contourner les problèmes rencontrés lors des synthèses classiques (faible solubilité et purifications difficiles des fragments protégés) et de simplifier considérablement les stratégies de synthèse.⁷⁷

Il existe différentes méthodes chimiosélectives impliquant des fonctions chimiques diverses : les cycloadditions (cycloadditions 1,3-dipolaires et réactions de Diels-Alder), les réactions impliquant l'électrophilie de la fonction carbonyle (formation des liaisons oxime, hydrazones et thiosemicarbazones), les réactions impliquant la fonction thiol (formation des liaisons thioethers et disulfures), les réactions impliquant des fonctions acide thiocarboxyliques ou thioesters (formation des liaisons thioesters et amides) et la réaction impliquant des fonctions phosphine et azide (ligation de Staudinger) (Figure 11).^{77,78}

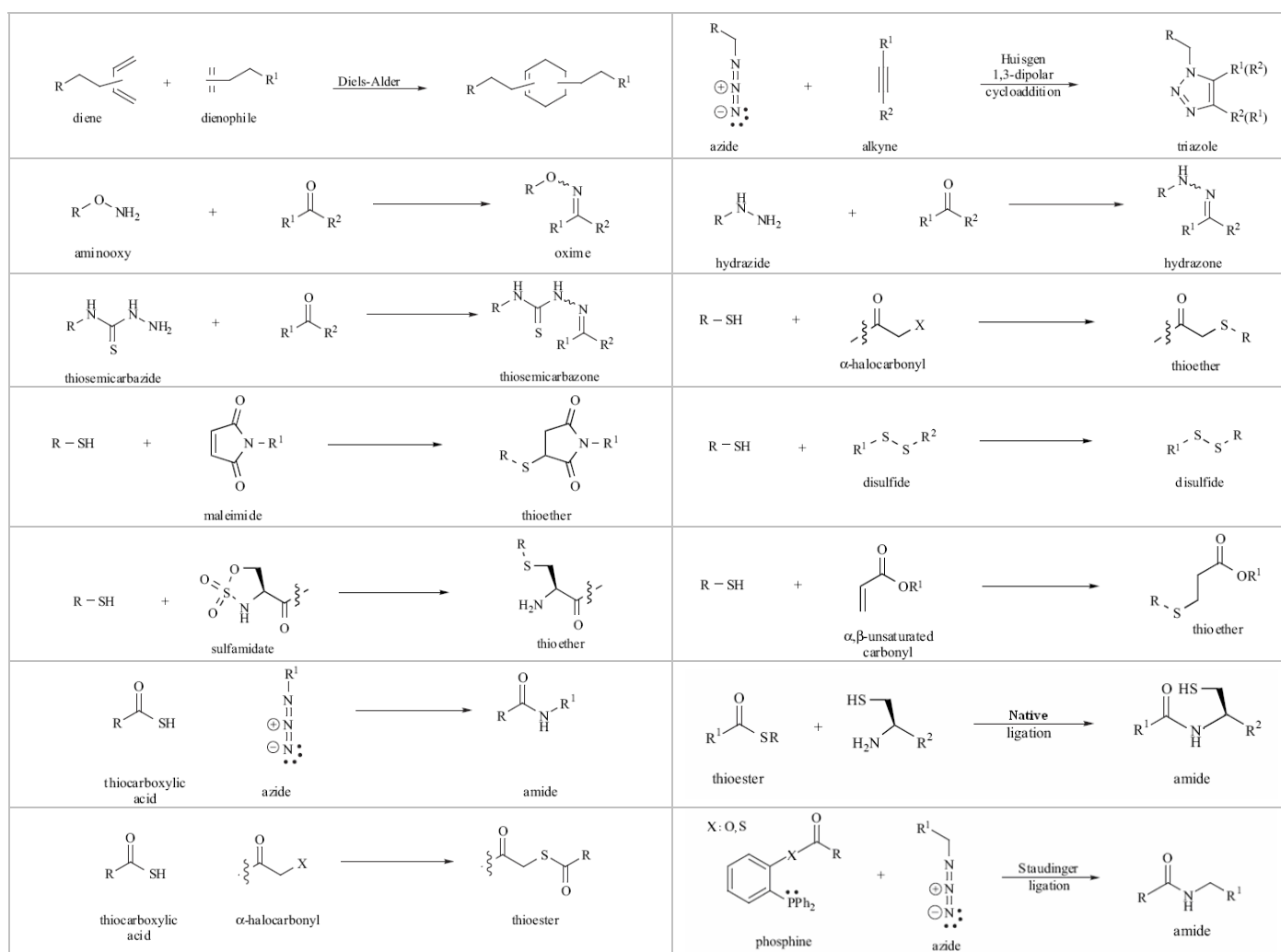


Figure 11 : Schéma des différentes réactions chimiosélectives.⁷⁷

⁷⁷ Langenhan, J. M.; Thorson, J. S. Recent Carbohydrate-Based Chemoselective Ligation Applications. *Curr Org Synth* **2005**, 2, 59-81.

⁷⁸ Kent, S. Total chemical synthesis of enzymes. *J Pept Sci* **2003**, 9, 574-593.

La plupart des liaisons obtenues sont stables en conditions physiologiques et seules certaines présentent des propriétés de stabilité dépendantes des conditions environnantes (pH, enzymes). Par exemple en conditions intracellulaires, la liaison disulfure peut être réduite et coupée. Cette rupture peut être avantageusement utilisée dans des stratégies « pro-drogues » avec relargage intracellulaire des l'éléments thérapeutiques.^{79,80} Ces stratégies sont actuellement utilisées pour un certain nombre de médicaments anticancéreux,⁸¹ comme par exemple le conjugué EC 145 (pro-drogue folate/vinblastine utilisant un pont disulfure) qui a passé avec succès les études de phase clinique I.⁸²

⁷⁹ Papot, S.; Tranoy, I.; Tillequin, F.; Florent, J. C.; Gesson, J. P. Design of selectively activated anticancer prodrugs: elimination and cyclization strategies. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2002**, *2*, 155-185.

⁸⁰ Kratz, F.; Muller, I. A.; Ryppa, C.; Warnecke, A. Prodrug Strategies in Anticancer Chemotherapy. *ChemMedChem* **2007**, *11*, 20-53.

⁸¹ Kratz, F.; Abu Ajaj, K.; Warnecke, A. Anticancer carrier-linked prodrugs in clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* **2007**, *16*, 1037-1058.

⁸² Sausville, E.; LoRusso, P.; Quinn, M.; Forman, K.; Leamon, C.; Morganstern, D.; Bever, S.; Messmann, R. A phase I study of EC145 administered weeks 1 and 3 of a 4-week cycle in patients with refractory solid tumors. *Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings* **2007**, *25*, 2577.

II. Définition du Projet de Recherche

La conception de molécules capables de reconnaître et de se concentrer spécifiquement dans les foyers tumoraux primitifs et métastatiques est primordiale pour le développement de méthodes diagnostiques plus performantes et d'agents anti-tumoraux plus efficaces et mieux tolérés. Bien que complétant l'arsenal thérapeutique contre le cancer, les nouvelles stratégies ciblées présentent certaines limites. Le problème majeur de ces stratégies est leur efficacité d'action limitée à quelques types cellulaires tumoraux. En effet, ciblant une anomalie particulière, ces traitements sont efficaces sur les cancers présentant cette anomalie. D'où la nécessité d'une étude approfondie des caractéristiques de la tumeur avant de prescrire un traitement au patient.⁸³ La stratégie correspondant à cibler la néo-angiogenèse tumorale paraît beaucoup plus généralisable puisque applicable à toutes les tumeurs vascularisées. Ainsi, il nous est apparu très intéressant d'explorer cette voie.

A ces fins, nos travaux ont été consacrés à la conception de vecteurs synthétiques basés sur un châssis moléculaire original permettant une présentation multimérique de ligands d'un récepteur surexprimé au niveau des tumeurs pour des applications diagnostiques et thérapeutiques contre le cancer.

II.1. Stratégie de Ciblage de l'Intégrine $\alpha_v\beta_3$ au cours de la Néo-angiogenèse Tumorale

Comme détaillé précédemment (Section I.1.1), au cours de son développement une tumeur solide acquiert certaines propriétés responsables de son caractère malin dont la capacité à induire la néo-angiogenèse.

II.1.1. Néo-Angiogenèse Tumorale

La formation de vaisseaux sanguins est un processus physiologique important durant l'embryogenèse et le développement. Chez l'adulte, l'angiogenèse n'a lieu que dans de rares situations physiologiques normales (cycle menstruel, développement embryonnaire, cicatrisation) et dans certaines pathologies (polyarthrite rhumatoïde, rétinopathie, psoriasis, artériosclérose, cancer).⁸⁴

Bien qu'observée depuis la première moitié du 20^{ème} siècle,^{85,86} la néo-angiogenèse tumorale n'est reconnue comme étape critique indispensable au développement des tumeurs qu'au début des années 1970.⁸⁷

⁸³ Herbst, R. S. Role of novel targeted therapies in the clinic. *Br J Cancer* **2005**, 92, S21-27.

⁸⁴ Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **2003**, 9, 653-660.

⁸⁵ Goldman, E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* **1907**, 2, 1236-1240.

⁸⁶ Algire, G. H.; Chalkley, H. W. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. *J Natl Cancer Inst* **1945**, 41, 111-124.

⁸⁷ Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **1971**, 285, 1182-1186.

★ Mécanisme de Formation des Vaisseaux Sanguins Tumoraux

La néo-angiogenèse tumorale correspond à la formation de nouveaux vaisseaux destinés à la vascularisation de la tumeur à partir de vaisseaux préexistants (Figure 12). Ces nouveaux vaisseaux vont permettre l'apport nécessaire en nutriments et en oxygène pour le développement de la tumeur mais également le passage de cellules malignes dans la circulation sanguine (métastases).⁸⁸ L'angiogenèse est un processus clef de la croissance, de la survie et de la dissémination tumorale.

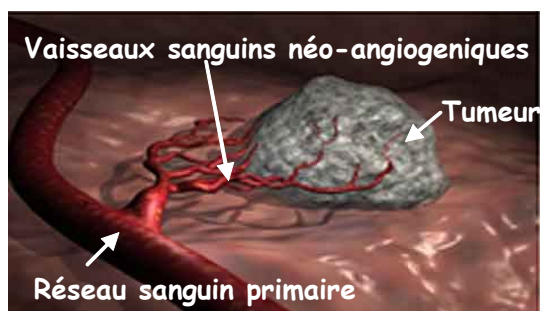


Figure 12 : Schéma de la mise en place d'une néo-vascularisation tumorale à partir du réseau vasculaire primaire.

Les mécanismes moléculaires de la néo-vascularisation tumorale sont multiples et complexes. Ils font intervenir différents acteurs et différentes voies de régulation. Ces mécanismes ne sont pas tous clairement identifiés et certains sont controversés.⁸⁹ Le mécanisme classiquement communément accepté de la néo-angiogenèse tumorale peut être décrit de manière simplifiée comme une succession d'étapes.⁹⁰

L'initiation de ce processus résulte de la dérégulation de l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques (signaux respectivement inducteurs ou inhibiteurs de l'angiogenèse). Cette dérégulation, appelée « switch angiogénique », résulte principalement d'un stress métabolique (hypoxie, hypoglycémie), d'un stress mécanique (pression exercée par la prolifération des cellules tumorales), d'un phénomène inflammatoire ou encore de la dérégulation des gènes de contrôle des facteurs régulateurs de l'angiogenèse.⁹¹

Dans des conditions physiologiques, les facteurs anti-angiogéniques inhibiteurs (thrombospondine-1, l'angiostatine, l'endostatine, le facteur plaquettaire-4, les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases de la matrice extracellulaire et l'interféron IFN α) sont plus importants que les facteurs activateurs. Lors du « switch angiogénique » les molécules pro-angiogéniques activateuses deviennent prédominantes et les inhibiteurs sont réprimés.⁹¹ Les molécules pro-angiogéniques sont principalement les facteurs de croissance : VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), EGF (Endothelial Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) ou le facteur nécrosant des tumeurs : TNF α (Tumour Necrosis Factor α). Ils sont sécrétés par les cellules tumorales, mais également par le stroma tumoral (fibroblastes, myofibroblastes), les cellules inflammatoires ou la matrice extracellulaire.

⁸⁸ Zetter, B. R. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* **1998**, *49*, 407-424.

⁸⁹ Auguste, P.; Lemiere, S.; Larrieu-Lahargue, F.; Bikfalvi, A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol* **2005**, *54*, 53-61.

⁹⁰ Bamias, A.; Dimopoulos, M. A. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. *Eur J Intern Med* **2003**, *14*, 459-469.

⁹¹ Hanahan, D.; Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **1996**, *86*, 353-364.

Le « switch angiogénique » entraîne une activation des cellules endothéliales à proximité de la tumeur. Cette activation correspond principalement à la surexpression de récepteurs protéiques de surface (VEGFR, FGFR, l'EGFR, PDGFR) et de molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire (E-selectine, endogline, intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$) (Figure 13-A).⁸⁹

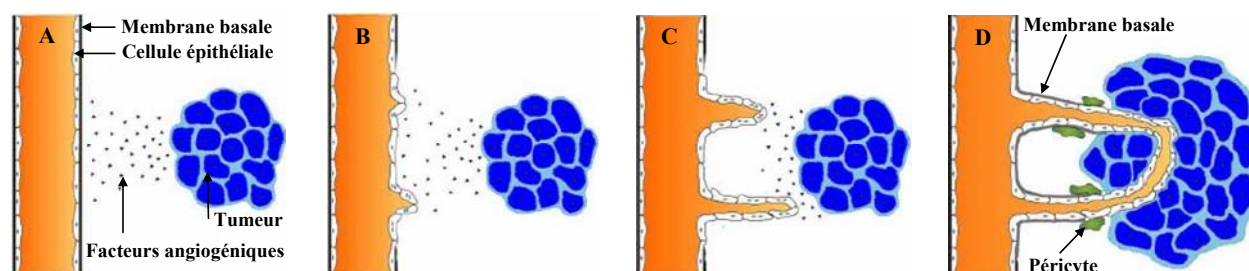


Figure 13 : Schéma illustrant : A/ Emission des facteurs pro-angiogéniques et l'activation des cellules endothéliales ; B/ Dégradation de la membrane basale ; C/ Migration et prolifération des cellules endothéliales ; D/ Consolidation et stabilisation des micro-vaisseaux.

Parallèlement, les facteurs de croissance stimulent la sécrétion d'enzymes protéolytiques dégradant les protéines de la matrice extracellulaire et de la membrane basale soutenant l'endothélium. Il en résulte un bourgeonnement du vaisseau devant le foyer tumoral (Figure 13-B). Les cellules endothéliales migrent alors vers la source du stimulus angiogénique conduisant à la création de ramifications vasculaires (Figure 13-C). Cette étape fait intervenir des molécules d'adhésion spécialisées comme les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$. La formation des micro-vaisseaux se poursuit par la prolifération rapide des cellules endothéliales, puis la régénération de la lame basale et le recrutement des péricytes consolidant et stabilisant le vaisseau (Figure 13-D). La néo-angiogenèse tumorale conduit à une architecture vasculaire désorganisée et défectueuse au voisinage de la tumeur.⁹²

La compréhension de certains mécanismes moléculaires et cellulaires de la néo-angiogenèse tumorale a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de mettre au point de nouvelles stratégies et molécules pour atteindre les tumeurs.⁹³

* Stratégies Anti-Tumorales Anti-Angiogéniques

Les stratégies anti-tumorales anti-angiogéniques peuvent impliquer les différents acteurs de la néo-angiogenèse (les cellules néoplasiques, les cellules du stroma tumoral, les cellules hématopoïétiques et les cellules endothéliales néoformées) en agissant sur le processus de formation des vaisseaux sanguins tumoraux.⁹⁴ Ainsi ont été développées des molécules inhibitrices :

- de la prolifération des cellules endothéliales,
- des activateurs de l'angiogenèse,
- de la dégradation de la matrice extracellulaire,
- des interactions entre les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire.

Les stratégies d'inhibition de l'angiogenèse peuvent être, de manière simplifiée, regroupées en deux catégories : l'« anti-angiogenèse » et le « ciblage de la vascularisation tumorale ».⁹⁵ L'« anti-angiogenèse » correspond au blocage des fonctions des régulateurs endogènes de l'angiogenèse. Il en résulte une inhibition de la prolifération, de la migration et de la survie des cellules endothéliales vasculaires. Le ciblage de la vascularisation tumorale correspond à l'utilisation d'agents de ciblage de la néo-vascularisation pour délivrer à

⁹² Carmeliet, P.; Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **2000**, *407*, 249-257.

⁹³ Ferrara, N.; Kerbel, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **2005**, *438*, 967-974.

⁹⁴ Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **2005**, *438*, 932-936.

⁹⁵ Bikfalvi, A. Tumor angiogenesis. *Bull Cancer* **2003**, *90*, 449-458.

proximité ou à l'intérieur des cellules endothéliales une molécule thérapeutique.⁹⁶ Cela entraîne la mort des cellules endothéliales vasculaires. Les molécules anti-angiogéniques testées en phase clinique montrent souvent des résultats modestes en monothérapie, mais présentent des résultats encourageants en association avec une chimiothérapie classique ou une radiothérapie. Il semblerait que ces molécules puissent « normaliser » la vascularisation tumorale, améliorant ainsi l'action de la chimiothérapie ou de la radiothérapie.⁹⁷

Parmi les différentes stratégies de ciblage possibles, le « ciblage de la vascularisation tumorale » *via* l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ surexprimées par les cellules endothéliales néo-formées, mais également par certaines cellules néoplasiques de statut $\alpha_v\beta_3$ positif, nous est apparu particulièrement pertinent.

II.1.2. Intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un acteur de la migration et de l'adhésion des cellules endothéliales sur la matrice extracellulaire pour la formation de la néo-vascularisation tumorale. Surexprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux néo-angiogéniques et par de nombreuses lignées tumorales humaines, elle est une cible très attrayante pour le développement d'agents anti-cancéreux.

* Caractéristiques et Rôles de l'Intégrine $\alpha_v\beta_3$

Les intégrines sont une famille importante de récepteurs cellulaires responsables des interactions cellule-cellule, cellule-matrice extracellulaire et cellule-pathogène.⁹⁸ Elles jouent un rôle important dans le rattachement des cellules à leur environnement et en particulier au réseau de protéines de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibronectine, vitronectine). Les intégrines sont également impliquées dans le transfert de signaux à travers la membrane plasmique et régulent de nombreuses fonctions dont la différenciation cellulaire, la migration cellulaire ou la cicatrisation.

Comme les autres membres de cette famille de récepteur, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est constituée de deux sous-unités glycoprotéiques transmembranaires α et β , associées de façon non-covalente. La sous-unité α est caractérisée par la présence, dans le domaine extracellulaire de régions capables de s'associer à des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Le domaine extracellulaire de la sous-unité β présente une région riche en cystéine et une partie *N*-terminale repliée formant une large boucle. Ces sous-unités se lient aux ligands extracellulaires *via* les domaines *N*-terminaux (Figure 14-A/B).

⁹⁶ Alessi, P.; Ebbinghaus, C.; Neri, D. Molecular targeting of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1654*, 39-49.

⁹⁷ Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **2005**, *307*, 58-62.

⁹⁸ Luo, B. H.; Springer, T. A. Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol* **2006**, *18*, 579-586.

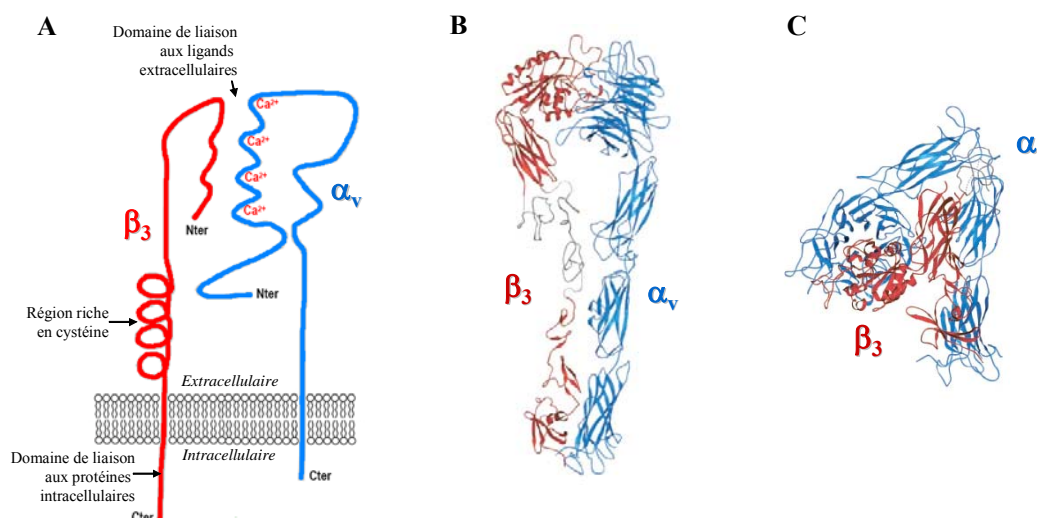


Figure 14 : Représentation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$: A/ Schéma simplifié de l'intégrine ; B/ Représentation en ruban du domaine extracellulaire de l'intégrine déployé ; C/ Représentation en ruban du domaine extracellulaire de l'intégrine.⁹⁹

Les deux chaînes α et β présentent de petites parties transmembranaires constituées essentiellement de résidus hydrophobes. Les courtes régions intracellulaires contiennent les extrémités C-terminales des deux chaînes et sont, contrairement aux récepteurs des facteurs de croissance, dépourvues d'activité enzymatique intrinsèque (Figure 14-A). La queue cytoplasmique de la sous-unité β peut s'associer aux filaments d'actine reliant alors le récepteur au cytosquelette. Elle peut également former des complexes focaux avec des protéines adaptatrices intracellulaires (taline, vinculine, α -actinine) et établir une connexion avec les kinases cytoplasmiques ou avec les récepteurs aux facteurs de croissance. La structure de la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été résolue aux rayons X (3,1 Å) (Figure 14-C) Elle révèle une structure compacte en forme de V où chaque sous-unité est repliée (Figure 15-Closed headpiece bent).⁹⁹ Récemment, des études ont montré que cette conformation correspond à un état physiologique de faible affinité, alors que la liaison à un ligand induit un changement de conformation dans lequel l'intégrine se déploie et présente un état physiologique de haute affinité.^{100,101} Le déploiement de l'intégrine augmente son état d'affinité pour les ligands (Figure 15-Closed headpiece extended). La liaison du ligand à l'intégrine ou la liaison de protéines effectrices (taline) aux domaines cytoplasmique et transmembranaire permettent une propagation de signaux conformationnels se traduisant par un mouvement concerté avec éloignement des domaines cytoplasmiques de l'intégrine (Figure 15-Open headpiece extended). Cette dernière conformation active le récepteur.⁹⁸

⁹⁹ Xiong, J. P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R.; Scott, D. L.; Joachimiak, A.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* **2001**, *294*, 339-345.

¹⁰⁰ Takagi, J.; Petre, B. M.; Walz, T.; Springer, T. A. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **2002**, *110*, 599-511.

¹⁰¹ Kim, M.; Carman, C. V.; Springer, T. A. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **2003**, *301*, 1720-1725.

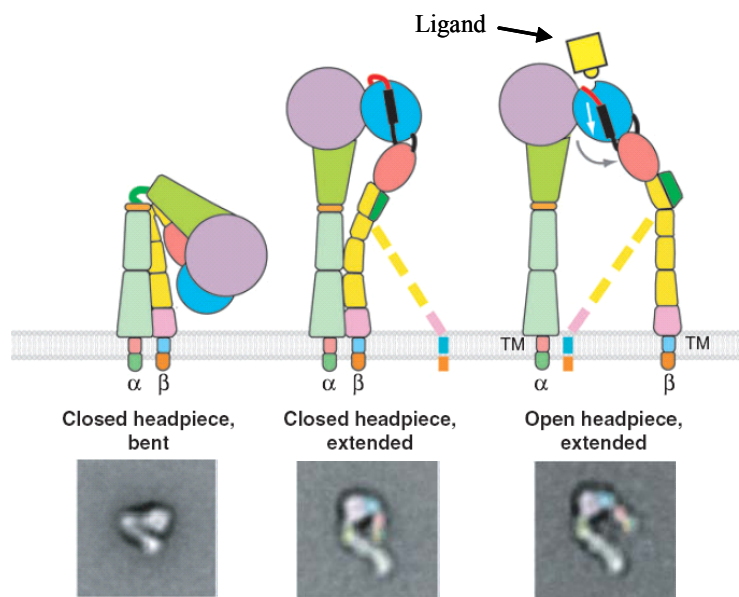


Figure 15 : Schémas et clichés de microscopie électronique des changements de conformation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ associés à la régulation de son affinité.¹⁰²

Les signaux intracellulaires et la liaison du ligand modifient la conformation de l'intégrine entraînant une signalisation bidirectionnelle. Par ailleurs, la distribution membranaire de l'intégrine et la formation de « cluster » de récepteurs semblent dépendantes de la présence de substrats présentant les ligands de manière multivalente.¹⁰³ Malgré une meilleure compréhension des mécanismes conformationnels régulant l'affinité de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et sa signalisation, son rôle n'est pas complètement élucidé et semble complexe. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pourrait réguler tantôt des activités pro-angiogéniques, tantôt des activités anti-angiogéniques.¹⁰⁴

Des niveaux d'expression élevés de ce récepteur ont été mis en évidence spécifiquement sur l'endothélium des vaisseaux en formation dans différents modèles d'angiogenèse.¹⁰⁵ Des analyses immuno-histochimiques montrent que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est hautement surexprimée par la néo-vascularisation et certaines lignées tumorales par rapport aux tissus normaux (respectivement plus de 100000 contre moins de 10000 intégrines par cellules).^{39,106} Cette différence d'expression fait de ce récepteur une cible particulièrement intéressante dans la recherche anti-angiogénique. Il a également été montré que des niveaux thérapeutiques d'antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ perturbent les vaisseaux nouvellement formés sans affecter la vascularisation quiescente. Ces antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ se sont révélés capables d'inhiber l'angiogenèse tumorale et de perturber les métastases.¹⁰⁷ L'affinité de ces

¹⁰² Luo, B. H.; Carman, C. V.; Springer, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **2007**, *25*, 619-647.

¹⁰³ Buensuceso, C.; de Virgilio, M.; Shattil, S. J. Detection of integrin alpha IIb beta 3 clustering in living cells. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 15217-15224.

¹⁰⁴ Hynes, R. O. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* **2002**, *8*, 918-921.

¹⁰⁵ Reynolds, L. E.; Wyder, L.; Lively, J. C.; Taverna, D.; Robinson, S. D.; Huang, X.; Sheppard, D.; Hynes, R. O.; Hodivala-Dilke, K. M. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* **2002**, *8*, 27-34.

¹⁰⁶ Max, R.; Gerritsen, R. R.; Nooijen, P. T.; Goodman, S. L.; Sutter, A.; Keilholz, U.; Ruiters, D. J.; De Waal, R. M. Immunohistochemical analysis of integrin alphav beta3 expression on tumor-associated vessels of human carcinomas. *Int J Cancer* **1997**, *71*, 320-324.

¹⁰⁷ Brooks, P. C.; Montgomery, A. M.; Rosenfeld, M.; Reisfeld, R. A.; Hu, T.; Klier, G.; Chersesh, D. A. Integrin alphav beta3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **1994**, *79*, 1157-1164.

antagonistes pour le récepteur a entraîné l'utilisation de ces molécules comme ligands spécifiques de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour son ciblage.

★ Ligands Spécifiques de l'Intégrine $\alpha_v\beta_3$

Le ligand endogène privilégié de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est la vitronectine, mais elle se lie également à de nombreuses autres protéines d'adhésion telles que la fibronectine, le facteur de von Willebrand (vWF), le fibrinogène ou la thrombospondine. La liaison de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à ces protéines se fait par l'intermédiaire de la séquence consensus d'acides aminés « arginine-glycine-acide aspartique » (-RGD-). Cette observation a stimulé le développement de peptides présentant cette séquence -RGD- et la conception de peptidomimétiques mimant ce tripeptide. Les ligands moléculaires de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sont majoritairement des peptides, des petites molécules peptidomimétiques et des anticorps.¹⁰⁸

Parmi les anticorps développés dans les stratégies anti-angiogéniques, le plus étudié est le Vitaxin[®] (MedImmune). Cet anticorps monoclonal humanisé dérive de l'anticorps murin LM 609 dirigé contre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. En 2001, le Vitaxin[®] est entré dans des études de phase clinique I sur des patients présentant des tumeurs solides résistantes. Ces études ont montré une bonne tolérance du Vitaxin et une stabilisation de la progression tumorale.¹⁰⁹ Des études cliniques de phase I et II sont en cours d'investigation sur une seconde génération d'anticorps Vitaxin[®], sur des patients présentant des tumeurs solides résistantes, des lymphomes, des cancers colorectaux avancés, des mélanomes de stade avancé, ainsi que des cancers avancés résistants de la prostate.¹¹⁰

Récemment, plusieurs classes de peptidomimétiques de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont été développées.¹¹¹ Ces peptidomimétiques consistent en un châssis central rigide présentant une partie basique et une partie acide mimant respectivement la guanidine et l'acide carboxylique de la séquence -RGD-. Les peptidomimétiques qui présentent un groupement 2-aminoimidazole (mime de la guanidine) et un groupement 2,3-di-aminopropionate benzènesulfonamide (mime du carboxylate) se sont révélés de très bons ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.¹¹² Ces ligands se concentrent rapidement au niveau de la tumeur et présentent une élimination principalement rénale.

En ce qui concerne les peptides, de nombreux systèmes présentant la séquence -RGD- ont été développés, dont des peptides linéaires. Malgré des études *in vitro* encourageantes montrant leur efficacité à bloquer l'adhésion cellulaire à de faible concentration (20 μM), les études cliniques ont montré une forte accumulation dans le foie sans accumulation spécifique au niveau de la tumeur.¹¹³ Ces résultats décevants résultent de la nature même du composé :

¹⁰⁸ Lim, E. H.; Danthi, N.; Bednarski, M.; Li, K. C. A review: Integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted molecular imaging and therapy in angiogenesis. *Nanomedicine* **2005**, *1*, 110-114.

¹⁰⁹ Posey, J. A.; Khazaeli, M. B.; DelGrosso, A.; Saleh, M. N.; Lin, C. Y.; Huse, W.; LoBuglio, A. F. A pilot trial of Vitaxin, a humanized anti-vitronectin receptor (anti $\alpha_v\beta_3$) antibody in patients with metastatic cancer. *Cancer Biother Radiopharm* **2001**, *16*, 125-132.

¹¹⁰ Clinicaltrials.gov Vitaxin, <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=vitaxin>.

¹¹¹ Hsu, A. R.; Veeravagu, A.; Cai, W.; Hou, L. C.; Tse, V.; Chen, X. Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonists for Anti-Angiogenic Cancer Treatment. *Recent Pat on Anti-Cancer Drug Discovery* **2007**, *2*, 143-158.

¹¹² Harris, T. D.; Kalogeropoulos, S.; Nguyen, T.; Liu, S.; Bartis, J.; Ellars, C.; Edwards, S.; Onthank, D.; Silva, P.; Yalamanchili, P.; Robinson, S.; Lazewatsky, J.; Barrett, J.; Bozarth, J. Design, synthesis, and evaluation of radiolabeled integrin $\alpha_v\beta_3$ receptor antagonists for tumor imaging and radiotherapy. *Cancer Biother Radiopharm* **2003**, *18*, 627-641.

¹¹³ Sutcliffe-Goulden, J. L.; O'Doherty, M. J.; Marsden, P. K.; Hart, I. R.; Marshall, J. F.; Bansal, S. S. Rapid solid phase synthesis and biodistribution of ¹⁸F-labelled linear peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2002**, *29*, 754-759.

linéaire, ces peptides peuvent adopter de nombreuses conformations diminuant l'affinité de liaison avec l'intégrine et ils sont de plus particulièrement sensibles aux dégradations protéolytiques. Afin de limiter ces inconvénients, des petits peptides cycliques de conformation contrainte capables d'induire une activité ont été développés.

II.1.3. Pentapeptides Cycliques -RGD- : Ligands Spécifiques de l'Intégrine $\alpha_V\beta_3$

★ Optimisation Structurale des Peptides -RGD- via la Cyclisation

Afin de concevoir des ligands présentant une haute affinité et une bonne spécificité pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, le motif -RGD- a été incorporé au sein de séquences contraintes de penta- et d'hexapeptides cycliques.¹¹⁴ Ces peptides ont été évalués par des tests d'affinité pour différentes intégrines purifiées dans lesquels ils sont en compétition avec des protéines d'adhésions. L'affinité d'un peptide pour une intégrine est quantifiée par l'intermédiaire d'un IC_{50} correspondant à la concentration en peptides nécessaire pour avoir 50 % d'inhibition de la liaison de l'intégrine à une protéine d'adhésion. Cette quantification est classiquement réalisée par détection directe ou indirecte du ligand naturel. Ces tests d'affinité ont permis la sélection d'un cyclopentapeptide, le c[-RGDfV-]. Ce dernier possède une très bonne affinité pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ purifiée (IC_{50} 50 nM en compétition avec la vitronectine), comparable à l'affinité de la vitronectine pour l'intégrine (IC_{50} 25 nM en compétition avec la vitronectine).¹¹⁵ Le c[-RGDfV-] présente également une très bonne spécificité pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ avec des affinités beaucoup plus faibles pour les autres intégrines (IC_{50} 29 μ M pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ en compétition avec le fibrinogène ; IC_{50} 6,4 μ M pour l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ en compétition avec la fibronectine). Afin d'augmenter encore l'affinité de ce ligand pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ et d'améliorer ces propriétés pharmacologiques (stabilité), une étude systématique des dérivés *N* α -méthylés du cyclopentapeptide a été réalisée.¹¹⁶ Ces dérivés ont été évalués et le composé méthylé sur le résidu valine s'est avéré le plus actif (IC_{50} 0,58 nM en compétition avec la vitronectine) et le plus spécifique de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (IC_{50} 860 nM pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ en compétition avec le fibrinogène ; IC_{50} 37 nM pour l'intégrine $\alpha_V\beta_5$ en compétition avec la vitronectine).¹¹⁷ L'augmentation de l'activité du composé méthylé résulte de la contrainte conformationnelle apportée par le groupement méthyle, induisant une meilleure interaction avec l'intégrine. Ce cyclopentapeptide c[-RGDf(N-Me)V-] est aujourd'hui engagé, sous le nom de Cilengitide (Merck KGaA), dans des études cliniques de phases I et II pour le traitement de glioblastomes multiformes, de mélanomes de stades avancés et de cancers de la prostate métastasés (Figure 16).¹¹⁸

¹¹⁴ Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Aumailley, M.; Timpl, R. Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. *Eur J Biochem* **1992**, *210*, 911-921.

¹¹⁵ Pfaff, M.; Tangemann, K.; Muller, B.; Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Timpl, R.; Engel, J. Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_V\beta_3$, and $\alpha_5\beta_1$ integrins. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 20233-20238.

¹¹⁶ Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Matha, B.; Lohof, E.; Holzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha_V\beta_3$ integrin antagonists. *J Med Chem* **1999**, *42*, 3033-3040.

¹¹⁷ Goodman, S. L.; Holzemann, G.; Sulyok, G. A.; Kessler, H. Nanomolar small molecule inhibitors for $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_V\beta_5$, and $\alpha_V\beta_3$ integrins. *J Med Chem* **2002**, *45*, 1045-1051.

¹¹⁸ Clinicaltrials.gov *Cilengitide*, <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=cilengitide>.

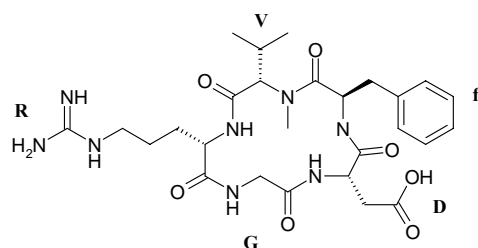


Figure 16 : Structure du Cilengitide c[-RGDf(N-Me)V-].

D'autres ligands présentant la séquence -RGD- ont été cyclisés par ponts disulfures ou liens thioethers.¹¹⁹ Certains ligands cyclisés par ponts disulfures ont été développés par la méthode de « *phage display* » et montrent une haute affinité et spécificité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.^{120,121} Néanmoins, ceux-là s'avèrent moins stables que le Cilengitide (instabilité *in vivo* du pont disulfure et conformations multiples), ce qui rend ces structures globalement moins intéressantes pour le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.¹²²

★ Etude Structurale de l'Interaction Cyclopentapeptide/Intégrine

En 2002, la structure cristalline du domaine extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ associée au ligand c[-RGDf(N-Me)V-] en présence d'ions divalents de manganèse a été résolue (Figure 17).¹²³ Elle a permis de caractériser l'interaction du motif -RGD- avec l'intégrine et d'étudier les changements conformationnels provoqués par la liaison du ligand.

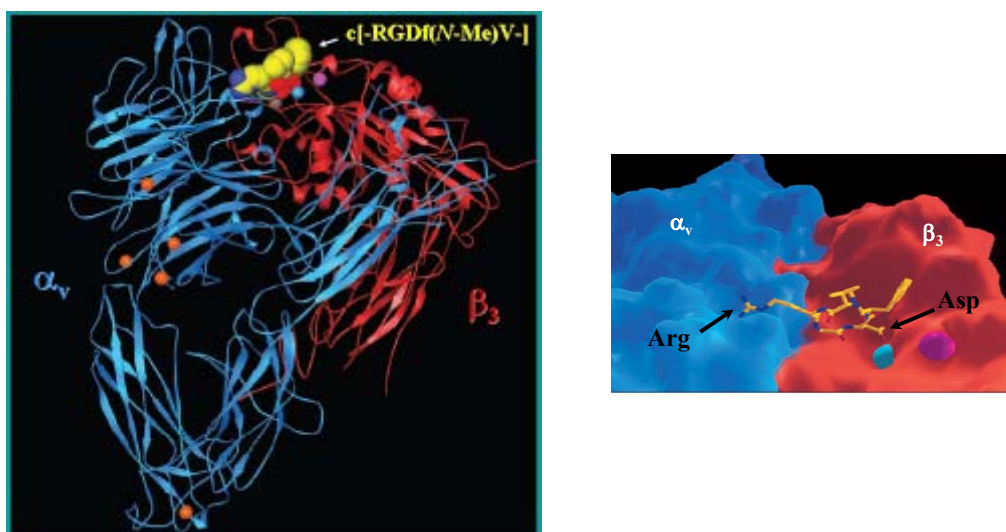


Figure 17 : Représentation de la structure du domaine extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ associée au ligand c[-RGDf(N-Me)V-] en présence de Mn^{2+} .

¹¹⁹ Kelleman, A.; Mattern, R. H.; Pierschbacher, M. D.; Goodman, M. Incorporation of thioether building blocks into an $\alpha_v\beta_3$ -specific RGD peptide: synthesis and biological activity. *Biopolymers* **2003**, *71*, 686-695.

¹²⁰ Koivunen, E.; Wang, B.; Ruoslahti, E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *Biotechnology* **1995**, *13*, 265-270.

¹²¹ Holig, P.; Bach, M.; Volkel, T.; Nahde, T.; Hoffmann, S.; Müller, R.; Kontermann, R. E. Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells. *Protein Eng Des Sel* **2004**, *17*, 433-441.

¹²² Temming, K.; Schiffelers, R. M.; Molema, G.; Kok, R. J. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug Resist Updat* **2005**, *8*, 381-402.

¹²³ Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaut, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **2002**, *296*, 151-155.

L'interaction entre le ligand c[-RGDf(N-Me)V-] et l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ requiert le recrutement de 2 cations divalents. Le motif -RGD- du ligand s'associe au récepteur dans un sillon à l'interface des 2 chaînes α_V et β_3 et établit des contacts de part et d'autre des 2 sous-unités (Figure 17). Le résidu arginine est orienté vers la chaîne α_V et établit des ponts salins avec deux résidus acides aspartiques de l'intégrine. Le résidu acide aspartique du ligand s'expose vers la chaîne β_3 et est impliqué dans des interactions polaires (coordination d'un cation bivalent et liaisons hydrogènes avec l'intégrine). Le résidu glycine intermédiaire, à l'interface entre les deux sous-unités, établit essentiellement des contacts hydrophobes avec la sous-unité β_3 . Les deux résidus complétant la structure du ligand, -f(N-Me)V-, sont eux exposés vers l'extérieur du complexe et n'établissent aucun contact avec le récepteur.

★ Propriétés des Pentapeptides Cycliques -RGD-

Sur différents modèles animaux, une administration répétée de Cilengitide montre un effet anti-angiogénique et anti-tumoral dont résulte une inhibition de la croissance tumorale sans affecter la vascularisation quiescente.¹²⁴ Le Cilengitide a également été évalué en combinaison avec la radio-immunothérapie sur des modèles précliniques et a montré une synergie entre les deux traitements, sans majoration de la toxicité.¹²⁵ Le Cilengitide a été impliqué dans des études cliniques pour diverses indications (tumeurs solides, gliomes ou sarcomes). Ces études ont montré des stabilisations de la maladie et une réduction de la propagation des métastases chez certains patients. Elles ont également permis de déterminer une élimination principalement rénale du produit, une absence de toxicité hématologique, des effets secondaires tolérables (nausées, fatigue, vomissements, éruptions cutanées), une demi-vie plasmatique de 3 à 5 h et la dose optimale pour inhiber la croissance tumorale (200 mg/m²). Les études cliniques se poursuivent avec de nombreuses études de phase clinique II en cours pour évaluer le Cilengitide dans divers indications (cancers de la prostate, du pancréas et du poumon, mélanomes avancés, leucémie myéloïde aigue, gliomes). Jusqu'à maintenant, le Cilengitide n'a pas montré d'efficacité thérapeutique contre les tumeurs solides dont les stades sont peut être trop avancés pour que le traitement ait un effet significatif en termes de réduction tumorale ou de durée de survie.

Les propriétés des cyclopentapeptides -RGD- ont été largement étudiées grâce à des analogues du Cilengitide radio-marqués. Parmi ceux-ci, le c[-RGDyV-] radio-marqué à ¹²⁵I a montré une accumulation rapide et importante du composé au niveau de la tumeur (2-4 % ID/g en 10 min) mais montre une élimination hépatique.¹²⁶ Pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques de ce type de composé, une partie saccharidique a été ajoutée au peptide.¹²⁷ La valine méthylée du Cilengitide est remplacée par une lysine portant un sucre radio-marqué au ¹⁸F. Les essais *in vitro* ont montré que les changements apportés au cyclopentapeptide -RGD- ne modifient que faiblement ces propriétés d'affinité et de sélectivité pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (IC₅₀ pour $\alpha_V\beta_3$ de 5 nM en compétition avec la vitronectine ; IC₅₀ 6 μ M pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ en compétition avec le fibrinogène ; IC₅₀ 1 μ M pour

¹²⁴ Mitjans, F.; Meyer, T.; Fittschen, C.; Goodman, S.; Jonczyk, A.; Marshall, J. F.; Reyes, G.; Piulats, J. In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alphav integrins. *Int J Cancer* **2000**, *87*, 716-723.

¹²⁵ Burke, P. A.; DeNardo, S. J.; Miers, L. A.; Lamborn, K. R.; Matzku, S.; DeNardo, G. L. Cilengitide targeting of alphav beta3 integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res* **2002**, *62*, 4263-4272.

¹²⁶ Haubner, R.; Wester, H. J.; Reuning, U.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Diefenbach, B.; Kessler, H.; Stocklin, G.; Schwaiger, M. Radiolabeled alphav beta3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J Nucl Med* **1999**, *40*, 1061-1071.

¹²⁷ Haubner, R.; Wester, H. J.; Burkhart, F.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Weber, W.; Goodman, S. L.; Kessler, H.; Schwaiger, M. Glycosylated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics. *J Nucl Med* **2001**, *42*, 326-336.

l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en compétition avec la vitronectine). La biodistribution montre une élimination majoritairement rénale et une accumulation rapide et importante au niveau des tumeurs (3-4 % ID/g en 10 min).¹²⁸ Par ailleurs, d'autres études ont montré que des dimères de cyclopeptides -RGD- supportés par un acide aspartique et marqués au ^{18}F augmentent l'accumulation ainsi que la rétention tumorale par rapport aux composés monovalents. De plus, la version dimérique présente l'avantage d'entraîner une élimination principalement rénale alors que le monomère est majoritairement éliminé par voie hépatique.¹²⁹ Il est également possible de diminuer l'élimination hépatique par ajout d'un polymère hydrophile au cyclopentapeptide -RGD-.¹³⁰ L'ajout d'un co-ligand a montré une amélioration des propriétés pharmacologiques des peptides -RGD- (augmentation de l'accumulation tumorale et de la stabilité métabolique).¹³¹

Enfin, les cyclopentapeptides -RGD- ont été très largement utilisés pour la vectorisation d'éléments thérapeutiques et de détection.¹³² L'observation de l'amélioration des propriétés de ciblage des ligands multiples a également stimulé le développement de composés multivalents présentant ces cyclopentapeptides pour le ciblage des tumeurs.¹³³

II.2. Gabarit RAFT : Nouvel Outil Multivalent de Ciblage et de Vectorisation

Notre laboratoire utilise un châssis moléculaire original, le RAFT, pour concevoir de nouveaux vecteurs pour le diagnostic et la thérapie contre le cancer.

II.2.1. Origine des Gabarits RAFT

Les gabarits RAFT (*Regioselectively Addressable Functionalized Template*)¹³⁴ ont été développés à la fin des années 1980 sous le nom de TASP (*Template-Assembled Synthetic Protein*) par Pr. le Manfred Mutter.¹³⁵ Ils sont destinés à la construction de petits systèmes moléculaires capables de mimer les propriétés fonctionnelles des protéines (Figure 18). Dans cette approche, les motifs structuraux d'intérêts sont adéquatement organisés dans l'espace sur le « template » afin de mimer une partie de la protéine.

¹²⁸ Haubner, R.; Wester, H. J.; Weber, W. A.; Mang, C.; Ziegler, S. I.; Goodman, S. L.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Kessler, H.; Schwaiger, M. Noninvasive imaging of alphav beta3 integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res* **2001**, *61*, 1781-1785.

¹²⁹ Chen, X.; Tohme, M.; Park, R.; Hou, Y.; Bading, J. R.; Conti, P. S. Micro-PET imaging of alphav beta3-integrin expression with 18F-labeled dimeric RGD peptide. *Mol Imaging* **2004**, *3*, 96-104.

¹³⁰ Chen, X.; Hou, Y.; Tohme, M.; Park, R.; Khankaldyyan, V.; Gonzales-Gomez, I.; Bading, J. R.; Laug, W. E.; Conti, P. S. Pegylated Arg-Gly-Asp peptide: 64Cu labeling and PET imaging of brain tumor alphav beta3-integrin expression. *J Nucl Med* **2004**, *45*, 1776-1783.

¹³¹ Jia, B.; Shi, J.; Yang, Z.; Xu, B.; Liu, Z.; Zhao, H.; Liu, S.; Wang, F. 99mTc-labeled cyclic RGDfK dimer: initial evaluation for SPECT imaging of glioma integrin alphav beta3 expression. *Bioconjug Chem* **2006**, *17*, 1069-1076.

¹³² Garanger, E.; Boturyn, D.; Dumy, P. Tumor targeting with RGD peptide ligands-design of new molecular conjugates for imaging and therapy of cancers. *Anticancer Agents Med Chem* **2007**, *7*, 552-558.

¹³³ Liu, S. Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin alphav beta3 targeted radiotracers for tumor imaging. *Mol Pharm* **2006**, *3*, 472-487.

¹³⁴ Dumy, P.; Favrot, M.-C.; Boturyn, D.; Coll, J.-L. Synthesis and characterization of novel systems for guidance and vectorization of compounds having a therapeutic activity. Brevet PCT/FR2003/002773 WO 2004/02894, 19 Septembre 2003.

¹³⁵ Mutter, M.; Altmann, K.-H.; Tuchscherer, G.; Vuilleumier, S. Strategies for the de novo design of proteins. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 771-785.

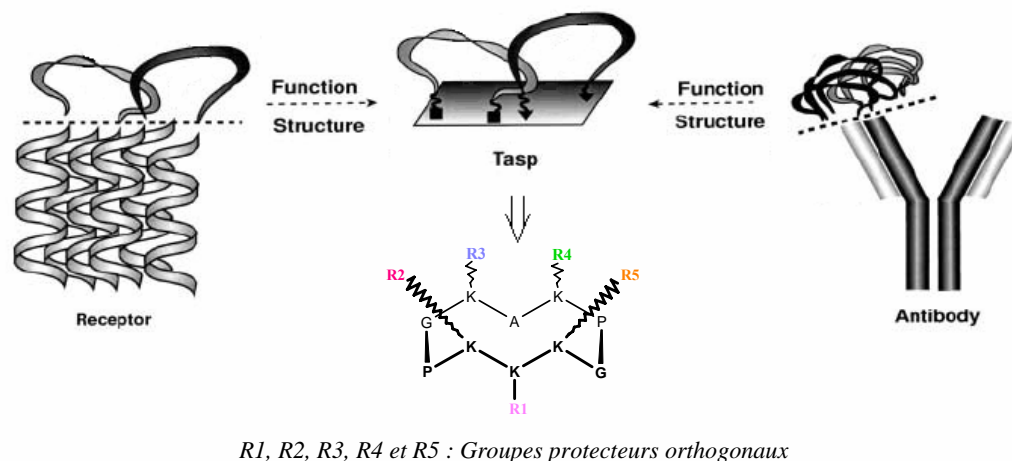


Figure 18 : Schéma de principe de construction de mimes de protéine et structure du châssis peptidique cyclique TASP.¹³⁶

Dans les années 1990, ces châssis peptidiques fonctionnalisables régiosélectivement grâce aux résidus lysines (K) chimiquement adressables, sont également appelés RAFT.¹³⁷ Depuis une trentaine d'années, ces châssis moléculaires sont utilisés pour la construction d'architectures multivalentes¹³⁸ pour diverses applications^{139,140} telles que des structures modèles mimant des protéines d'intérêts comme les canaux ioniques¹⁴¹, le CMH de Classe I,¹⁴² des fibres amyloïdes¹⁴³ ou encore des vaccins synthétiques anti-tumoraux.¹⁴⁴

II.2.2. Structure des RAFT

Le squelette des RAFT est un décapeptide cyclique de séquence c[-Pro-Gly-Lys-Lys-Lys-]₂.¹³⁷ Cette structure est inspirée de celle de la Gramicidine S, un antibiotique de structure cyclodécapeptidique symétrique : c[-DPhe-Pro-Val-Orn-Leu-]₂.

¹³⁶ Mutter, M.; Tuchscherer, G. Non-native architectures in protein design and mimicry. *Cell Mol Life Sci* **1997**, *53*, 851-863.

¹³⁷ Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron Lett* **1995**, *36*, 1255-1258.

¹³⁸ Garanger, E.; Boturyn, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Chemoselectively addressable template: a valuable tool for the engineering of molecular conjugates. *J Org Chem* **2006**, *71*, 2402-2410.

¹³⁹ Singh, Y.; Dolphin, G. T.; Razkin, J.; Dumy, P. Synthetic Peptide templates for molecular recognition: recent advances and applications. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1298-1314.

¹⁴⁰ Boturyn, D.; Defrancq, E.; Dolphin, G. T.; Garcia, J.; Labbe, P.; Renaudet, O.; Dumy, P. RAFT Nano-constructs: surfing to biological applications. *J Pept Sci* **2008**, *14*, 224-240.

¹⁴¹ Futaki, S. Peptide ion channels: design and creation of function. *Biopolymers* **1998**, *47*, 75-81.

¹⁴² Tuchscherer, G.; Servis, C.; Corradin, G.; Blum, U.; Rivier, J.; Mutter, M. Total chemical synthesis, characterization, and immunological properties of an MHC class I model using the TASP concept for protein de novo design. *Protein Sci* **1992**, *1*, 1377-1386.

¹⁴³ Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J. Control of amyloid beta-peptide protofibril formation by a designed template assembly. *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 2699-2702.

¹⁴⁴ Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Deriaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. Chemoselective assembly and immunological evaluation of multiepitopic glycoconjugates bearing clustered Tn antigen as synthetic anticancer vaccines. *Bioconjug Chem* **2005**, *16*, 1149-1159.

Des études RMN^{145,146} complétées par une structure cristalline¹⁴⁷ ont montré que le RAFT est composé d'un feuillet β antiparallèles reliés par deux coudes -Pro-Gly- (coudes β de type II) stabilisant la conformation du cyclodécapeptide en solution (Figure 19). La structure cyclique du châssis est aussi un avantage dans le cadre d'une utilisation *in vivo*. En effet, les peptides cycliques sont décrits pour conférer une plus grande résistance aux enzymes protéolytiques.¹⁴⁸

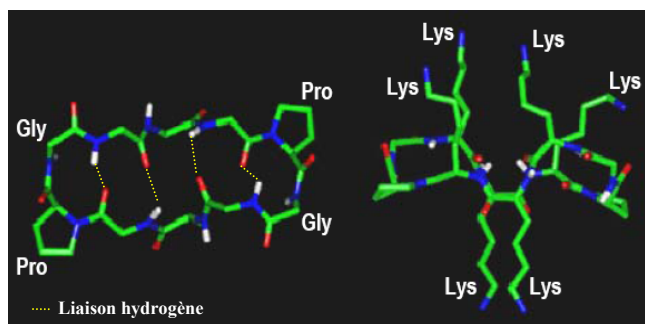


Figure 19 : Modélisation moléculaire du RAFT.

Dans cette structure à mobilité conformationnelle réduite, les chaînes latérales des six résidus lysines de la partie centrale se trouvent orientées de part et d'autre du plan moyen du cycle. Les quatre résidus lysines au voisinage des deux coudes -Pro-Gly- ont leurs chaînes latérales qui s'orientent du même côté du plan moyen du cycle (par convention appelé face supérieure du RAFT), tandis que les deux résidus lysines centraux ont leurs chaînes latérales qui s'orientent vers le côté opposé (face inférieure) (Figure 19).

Les études de diffraction aux rayons X, réalisées sur un châssis RAFT du type $c[-p-G-F(p-NO_2)-A-F(p-NO_2)-]_2$, ont permis d'accéder aux paramètres de taille du gabarit ($L \sim 10 \text{ \AA}$ et $l \sim 5-6 \text{ \AA}$) et aux distances qui séparent les atomes des chaînes latérales des résidus centraux (Figure 20).¹⁴⁷ Malgré une flexibilité conformationnelle réduite des *para*-nitro phénylalanines par rapport aux lysines, ces distances donnent un ordre de grandeur du degré de liberté réduit des chaînes latérales des lysines sur le gabarit RAFT.

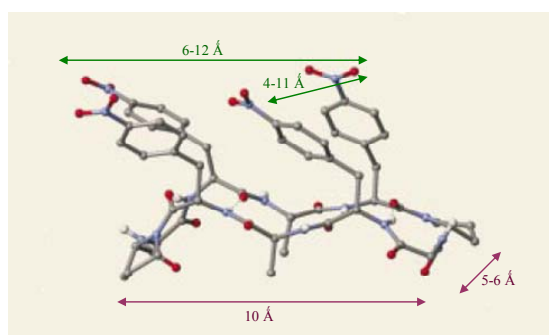


Figure 20 : Structure aux Rayons X du RAFT $c[-p-G-F(p-NO_2)-A-F(p-NO_2)-]_2$.¹⁴⁷

¹⁴⁵ Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M. Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates: an NMR and restrained molecular dynamics investigation. *Biopolymers* **1996**, *39*, 297-308.

¹⁴⁶ Peng, Z. H. Solid phase synthesis and NMR conformational studies on cyclic decapeptide template molecule. *Biopolymers* **1999**, *49*, 565-574.

¹⁴⁷ Peluso, S.; Ruckle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M. Crystal structure of a synthetic cyclodecapeptide for template-assembled synthetic protein design. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 432-437.

¹⁴⁸ Katsara, M.; Tselios, T.; Deraos, S.; Deraos, G.; Matsoukas, M. T.; Lazoura, E.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Round and round we go: cyclic peptides in disease. *Curr Med Chem* **2006**, *13*, 2221-2232.

II.2.3. Conception du Vecteur RAFT pour la Cancérologie

L'originalité du RAFT réside dans la présentation de deux faces fonctionnalisables de manière indépendante avec jusqu'à six sites d'ancrage de motifs structuraux (ϵNH_2 des chaînes latérales des six résidus lysine). Ces sites sont adressables chimiquement au moyen de groupes protecteurs orthogonaux, permettant l'accrochage de différents motifs sur les deux faces du gabarit. Il est également possible de moduler le nombre de sites d'ancrage sur chacune des deux faces en remplaçant les résidus lysine par des résidus alanine. Les propriétés du RAFT en font un outil particulièrement versatile dans la construction d'architectures multivalentes.

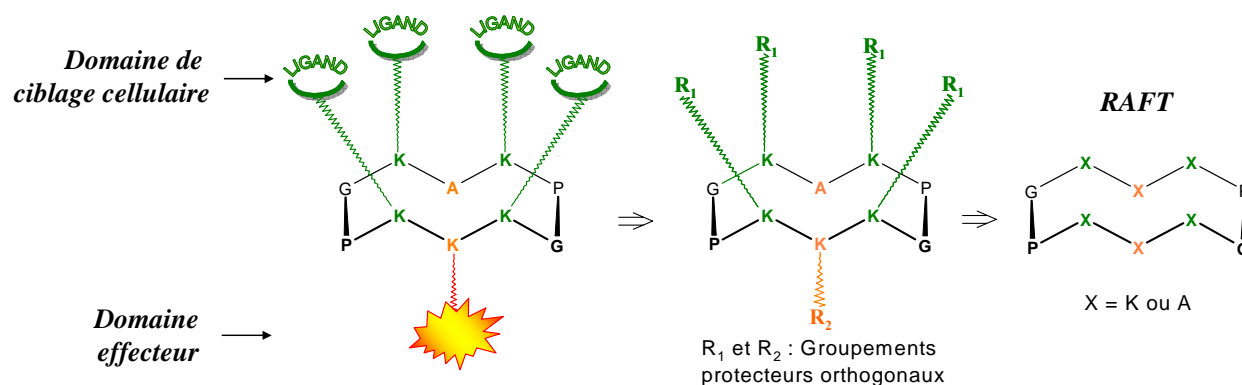


Figure 21 : Schéma du RAFT utilisé pour la vectorisation en cancérologie.

Dans nos travaux, nous utilisons le châssis moléculaire RAFT présentant quatre sites d'ancrage sur la face supérieure pour construire une architecture multivalente de ligands ciblant les tumeurs et un seul site d'ancrage sur la face inférieure pour l'accrochage d'un élément effecteur (Figure 21). Il est également envisageable d'utiliser ce châssis présentant deux sites d'ancrage sur la face inférieure pour la vectorisation de deux éléments effecteurs. Ce système RAFT permet une séparation spatiale des modules de ciblage et effecteur, évitant leur interférence. Par ailleurs, il n'est pas immunogène¹⁴⁴ et sa métabolisation cellulaire ne génère pas de produits de dégradation toxiques.

II.3. Démarche Expérimentale

II.3.1. Résultats Antérieurs : RAFT(c[-RGDfK-]₄) Nouvel Outil de Ciblage des Tumeurs

Notre laboratoire a récemment développé une structure tétramérique RAFT(c[-RGDfK-]₄) dont les propriétés biologiques ont été évaluées par le Groupe de Recherche sur le Cancer du Poumon (INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Pr. M.-C. Favrot).

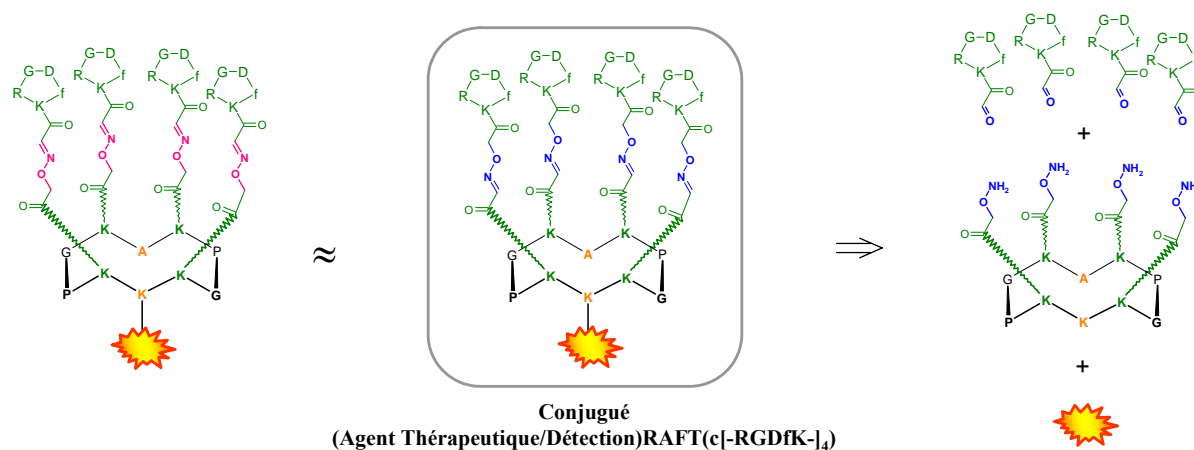


Figure 22 : Schéma de la construction des conjugués RAFT(c[-RGDfK-]₄).

* Propriétés du RAFT(c[-RGDfK-]₄)

Ce composé multimérique est construit à partir d'un châssis moléculaire RAFT auquel est couplé par liens oxime chimiosélectifs quatre motifs c[-RGDfK-] (Figure 22). Les synthèses du gabarit RAFT et du ligand -RGD- fonctionnalisés par des fonctions oxyamine et aldéhyde ont été décrites^{149,150} et le couplage de ces peptides par lien éther d'oxime a été largement étudié.¹³⁸ Au sein de notre molécule multivalente, le lien éther d'oxime s'est avéré stable (pas réactions de trans-oximation correspondant à un échange au niveau de la liaison oxime entre les éléments présentant des fonctions aldéhyde ou oxyamine) et de configuration *E* ($\leq 95\%$).¹⁵¹ Cette configuration a été déterminée par des études RMN de type NOESY du RAFT(c[-RGDfK-]₄).^{*} La liaison oxime permet une conjugaison avec une grande efficacité entre les deux partenaires peptidiques. Par ailleurs, il a été montré que l'orientation de la liaison oxime dans cette macromolécule n'a pas d'influence en terme de rendement ou d'efficacité de ciblage *in vitro* (Figure 22).¹⁵²

¹⁴⁹ Boturyn, D.; Dumy, P. A convenient access to α V β 3/ α V β 5 integrin ligand conjugates: regioselective solid-phase functionalisation of an RGD based peptide. *Tetrahedron Lett* **2001**, 42, 2787-2790.

¹⁵⁰ Boturyn, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 5730-5739.

¹⁵¹ Garanger, E. Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie. 280 p. Thèse: *Chimie-Biologie* Université Joseph Fourier, **2005**.

* Jourdan, M.; Boturyn, D.; Dumy, P. Résultats non publiés.

¹⁵² Garanger, E.; Boturyn, D.; Coll, J. L.; Favrot, M. C.; Dumy, P. Multivalent RGD synthetic peptides as potent α v β 3 integrin ligands. *Org Biomol Chem* **2006**, 4, 1958-1965.

L'étude de l'effet de multivalence de différents gabarits RAFT(c[-RGDfK-]_n) a montré que les meilleures structures en terme de liaison et d'interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sont des gabarits présentant trois ou quatre motifs -RGD-.¹⁵² Le composé tétravalent est 10 fois plus affiné pour l'intégrine que le composé monovalent (Figure 23-A). Compte tenu des propriétés structurales du RAFT(c[-RGDfK-]₄), cette augmentation d'affinité est très certainement liée à un effet de concentration locale en ligands -RGD- à proximité de l'intégrine lorsqu'un ligand multivalent y est associé, plutôt qu'à un effet de *clustering*. Lors de tests *in vitro* et *in vivo*, le RAFT(c[-RGDfK-]₄) est un inhibiteur efficace de l'adhésion cellulaire *via* les intégrines $\alpha_v\beta_3$. Chez la souris Nude, des injections intra-tumorales répétées de faibles doses de RAFT(c[-RGDfK-]₄) ont montré une réduction de la croissance tumorale et confère à ce composé une activité anti-angiogénique et anti-tumorale (Figure 23-B).¹⁵³

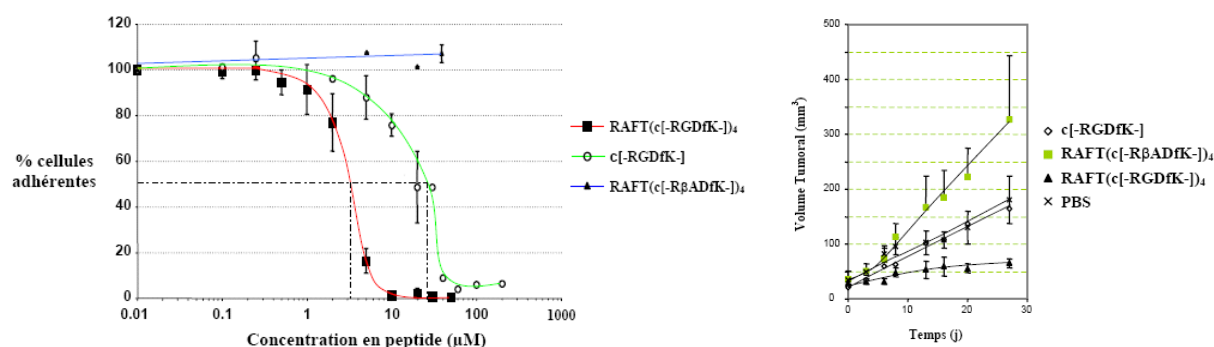


Figure 23 : A/ Courbes d'inhibition des ligands monovalent ($IC_{50} = 30 \mu M$) et tétravalent ($IC_{50} = 3 \mu M$) ; B/ Courbe de l'activité anti-proliférative *in vivo* des peptides -RGD- administrés en intra-tumoral à des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées du modèle A549.^{152,153}

Par ailleurs, d'autres études *in vitro* ont montré que le RAFT(c[-RGDfK-]₄) présente des propriétés d'internalisation dans les cellules de statut $\alpha_v\beta_3$ positif (Figure 24).¹⁵⁰ L'entrée cellulaire de ce composé multivalent se fait par une endocytose récepteur-dépendante,¹⁵³ contrairement au cyclopentapeptide -RGD- qui semble être internalisé par une endocytose en phase fluide.³⁷ Par ailleurs, le RAFT(c[-RGDfK-]₄) biotynilé au niveau de sa face inférieure s'est avéré capable d'internaliser une protéine de taille importante, la streptavidine (60 kDa).¹⁵⁰ La très bonne affinité et spécificité du RAFT(c[-RGDfK-]₄) pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et ses propriétés d'internalisation récepteur-dépendante ont permis d'envisager l'utilisation de ce système pour la vectorisation de molécules effectrices (diagnostiques et thérapeutiques).

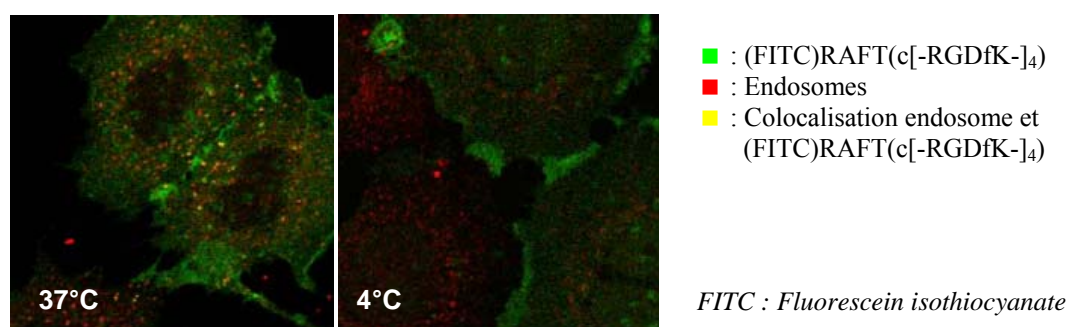


Figure 24 : Clichés d'imagerie de fluorescence de l'étude du mode d'internalisation du ligand RAFT(c[-RGDfK-]₄) sur la lignée cellulaire KEK293(β3).¹⁵³

¹⁵³ Garanger, E.; Boturyn, D.; Jin, Z.; Dumy, P.; Favrot, M. C.; Coll, J. L. New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol Ther* **2005**, *12*, 1168-1175.

★ Ciblage et Détection de Tumeurs

Pour des applications d'imagerie non invasive de tumeurs chez le petit animal, la Cyanine 5, chromophore émettant dans le proche infrarouge et divers radiotraceurs (^{125}I -Tyr, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{157}Gd , ^{18}F -FDG) ont été couplés au RAFT(c[-RGDfK-] $_4$).^{150,153,154} Les résultats préliminaires obtenus en imagerie optique avec le conjugué à la Cyanine 5 sur des modèles murins montrent que le RAFT(c[-RGDfK-] $_4$) cible efficacement la nouvelle vascularisation tumorale ainsi que les métastases de statut $\alpha_v\beta_3$ positif (Figure 25).

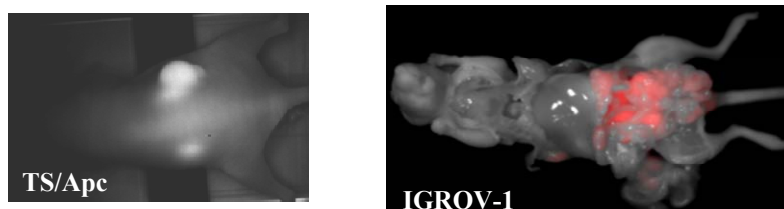


Figure 25 : Clichés d'imagerie non invasive de tumeurs (statut TS/Apc) et de métastases (statut IGROV-1) chez la souris (injections i.v. 10 nmol de conjugués/souris).¹⁵³

Afin d'améliorer la détection des tumeurs et des métastases par imagerie optique, notre laboratoire a également développé de nouvelles sondes fluorescentes activables en conditions intracellulaires.¹⁵⁵ Ces molécules sont composées de notre vecteur multivalent cyanilé auquel est conjugué par pont disulfure un quencher (QSY21) capable d'absorber l'émission de fluorescence de la Cyanine 5. Ces composés ne sont pas fluorescents, ils le deviennent après réduction du pont disulfure à l'intérieur des cellules cancéreuses.¹⁵⁶ Ce système permet d'augmenter le contraste lumineux améliorant ainsi la détection tumorale (Figure 26).¹⁵⁷

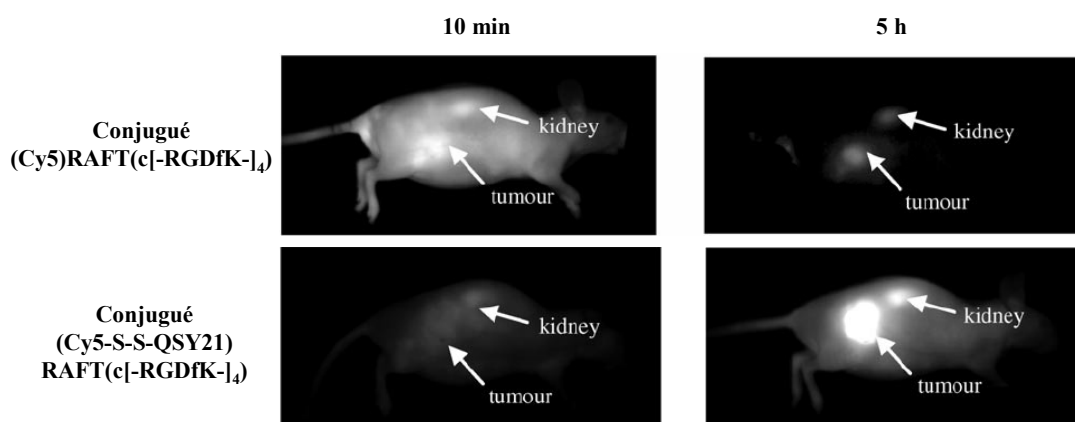


Figure 26 : Clichés d'imagerie de fluorescence de tumeurs sous cutanées (IGROV-1) chez la souris (injections i.v. 10 nmol de conjugués/souris).¹⁵⁶

¹⁵⁴ Sancey, L.; Ardisson, V.; Riou, L. M.; Ahmadi, M.; Marti-Batlle, D.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Fagret, D.; Ghezzi, C.; Vuillez, J. P. In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the $\alpha_v\beta_3$ integrin-targeted tracer ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2007**, *34*, 2037-2047.

¹⁵⁵ Texier, I.; Coll, J.-L.; Dumy, P.; Boturyn, D.; Favrot, M.-C. Target vector with activable imaging function. Brevet PCT/FR2006/001749 WO 2007/010128, 25 janvier 2007.

¹⁵⁶ Razkin, J.; Josserand, V.; Boturyn, D.; Jin, Z. H.; Dumy, P.; Favrot, M.; Coll, J. L.; Texier, I. Activatable fluorescent probes for tumour-targeting imaging in live mice. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069-1072.

¹⁵⁷ Jin, Z. H.; Razkin, J.; Josserand, V.; Boturyn, D.; Grichine, A.; Texier, I.; Favrot, M. C.; Dumy, P.; Coll, J. L. In Vivo Noninvasive Optical Imaging of Receptor-Mediated RGD Internalization Using Self-Quenched Cy5-Labeled RAFT-c(-RGDfK-)(4). *Mol Imaging* **2007**, *6*, 43-55.

II.3.2. Conception d'une Nouvelle Génération de Molécules pour la Cancérologie

Les résultats préliminaires obtenus avec le RAFT(c[-RGDfK-]₄) ont montré que ce système multivalent représente un outil particulièrement efficace de ciblage de la néo-angiogenèse tumorale et des tumeurs de statut $\alpha_v\beta_3$ positif. Cela nous a amené à concevoir une nouvelle génération de molécules pour la cancérologie (Figure 27).

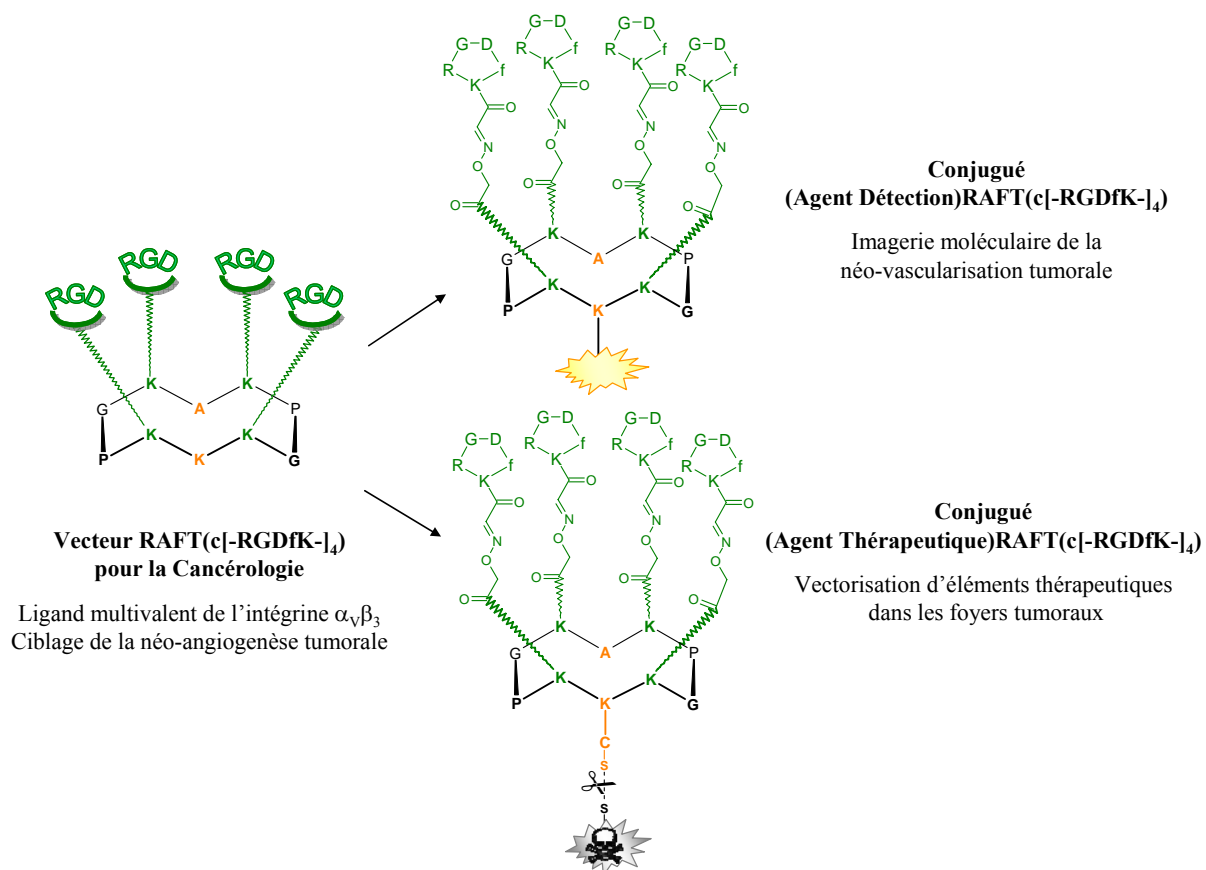


Figure 27 : Schémas des nouveaux conjugués pour la cancérologie.

Mes travaux de thèse ont consisté dans un premier temps à optimiser la synthèse de nos ligands multivalents RAFT(c[-RGDfK-]₄) pour la cancérologie. Nous avons développé de nouvelles voies de synthèse notamment grâce à la conception de nouveaux acides aminés modifiés utilisés pour la construction de nos précurseurs peptidiques linéaires (**PARTIE A**). Nous avons ensuite optimisé les vecteurs multivalents pour la détection tumorale en les conjuguant à des chromophores d'imagerie optique particulièrement performants (**PARTIE B**). En ce qui concerne la thérapie anti-tumorale, nous avons préparé des vecteurs multivalents conjugués à la doxorubicine dans l'optique de concentrer la drogue au sein des tissus tumoraux pour réduire sa toxicité sur les organes sains. Nous avons également choisi de vectoriser un peptide apoptotique dont l'action intracellulaire en fait une drogue intéressante. Par ailleurs, nous avons conçu des conjugués SiRNA et PNA afin de valider le potentiel de notre vecteur pour la thérapie génique (**PARTIE C**). Au cours de ces recherches, nous avons également développé une méthode innovante de synthèse totale du RAFT(c[-RGDfK-]₄) sur support solide permettant son évaluation biologique grâce à un test d'adhésion cellulaire directement sur la résine (**PARTIE D**).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

A. Synthèse des Vecteurs Multivalents RAFT(c[-RGDfK-]₄)

A.1. Conception, Stratégies de Synthèse et Optimisation

Les nouveaux vecteurs développés au laboratoire sont construits à partir du châssis moléculaire RAFT auquel on associe quatre motifs -RGD- sur la face supérieure et un élément effecteur sur la face inférieure (agent détection ou de thérapie). L'élément effecteur, souvent onéreux est introduit en fin de synthèse. Le RAFT et les ligands c[-RGDfK-] sont préparés en synthèse mixte sur support solide et en solution. Les peptides linéaires sont assemblés en utilisant la Synthèse Peptidique sur Phase Solide (SPPS) en stratégie Fmoc/*t*Bu. Ils sont ensuite cyclisés en solution et fonctionnalisés afin de permettre leur assemblage par des liens éther d'oxime (Figure 28).¹⁵⁰

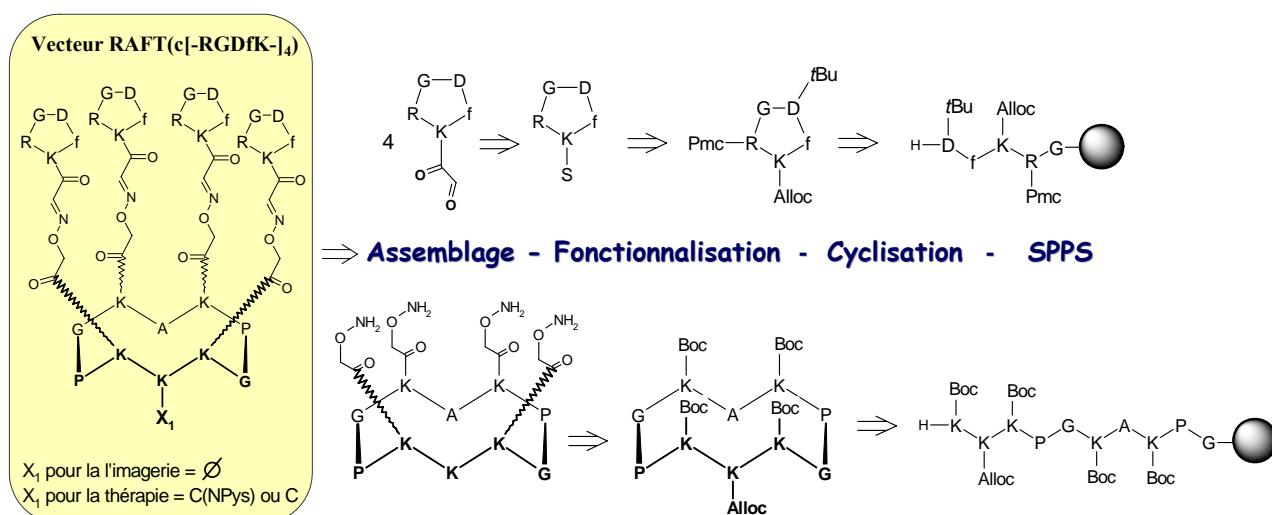


Figure 28 : Schéma rétro-synthétique des vecteurs RAFT(c[-RGDfK-]₄) pour la cancérologie.

La liaison éther d'oxime appartient à la catégorie des liaisons chimiosélectives. Elle permet l'assemblage convergent de molécules polyfonctionnelles déprotégées de différentes familles et la construction de conjugués complexes de hauts poids moléculaires. Parmi les méthodes de liaisons chimiosélectives, le lien oxime s'est avéré particulièrement approprié pour l'assemblage de modules peptidiques. En effet, il fait intervenir des fonctions (aldéhyde et oxyamine) pouvant facilement être introduites par modifications des chaînes latérales de certains acides aminés. Par ailleurs, ce lien offre une bonne chimiosélectivité, une flexibilité intéressante et une très bonne stabilité *in vitro* comme *in vivo*.¹⁵⁰ Ainsi la conjugaison par lien oxime a permis la synthèse d'une large gamme de constructions moléculaires telles que des bibliothèques de petites molécules,¹⁵⁸ des peptides cycliques,¹⁵⁹ des oligonucléotides cycliques,¹⁶⁰ des glycopeptides,¹⁶¹ des

¹⁵⁸ Su, S.; Acquilano, D. E.; Arumugasamy, J.; Beeler, A. B.; Eastwood, E. L.; Giguere, J. R.; Lan, P.; Lei, X.; Min, G. K.; Yeager, A. R.; Zhou, Y.; Panek, J. S.; Snyder, J. K.; Schaus, S. E.; Porco, J. A., Jr. Convergent synthesis of a complex oxime library using chemical domain shuffling. *Org Lett* **2005**, *7*, 2751-2754.

¹⁵⁹ Roberts, K. D.; Lambert, J. N.; Ede, N. J.; Bray, A. M. Preparation of cyclic peptide libraries using intramolecular oxime formation. *J Pept Sci* **2004**, *10*, 659-665.

conjugués peptide-oligonucléotides,¹⁶² des mîmes de surface cellulaire,¹⁶³ des protéines,¹⁶⁴ et récemment des conjugués glycopeptide-oligonucléotides.¹⁶⁵ En ce qui concerne la synthèse de nos macromolécules peptidiques, les résultats antérieurs ont montré que le lien oxime permet une conjugaison particulièrement efficace des quatre ligands c[-RGDfK-] au gabarit RAFT et ont confirmé sa stabilité en conditions physiologiques *in vivo*.¹⁵¹

Pour mettre en place le lien éther d'oxime, le RAFT est fonctionnalisé de manière contrôlée avec quatre groupes oxyamine sur sa face supérieure. Les cyclopentapeptides c[-RGDfK-] sont fonctionnalisés avec une fonction aldéhyde masquée introduite grâce à un résidu sérine protégé.¹⁶⁶ En effet, la coupure oxydante de la fonction 1,2-aminoéthanol de la sérine (S) par le périodate de sodium produit un aldéhyde glyoxylique ou α -oxo aldéhyde. L'aldéhyde ainsi formé permet la formation d'une liaison éther d'oxime particulièrement stable. L'assemblage des quatre ligands c[-RXDfK-] sur le RAFT permet d'accéder à l'intermédiaire clef de synthèse de nos conjugués, le RAFT(c[-RGDfK-]₄). Dans le cas des conjugués pour l'imagerie, la stratégie de vectorisation ne nécessite pas de relargage de l'agent de détection, nous avons donc choisi de le coupler au RAFT par un lien stable. Le châssis moléculaire RAFT(c[-RGDfK-]₄) est directement utilisable pour le couplage d'éléments d'imagerie par un lien de type amide au niveau de sa face inférieure. Dans le cas des conjugués pour la thérapie, nous avons choisi une stratégie de relargage de la drogue en condition intracellulaire grâce à un pont disulfure labile. Cela nécessite donc une fonctionnalisation de la face inférieure du RAFT par un résidu présentant une fonction thiol pouvant établir une liaison disulfure avec des éléments thérapeutiques également porteurs de fonctions thiol. La fonction thiol est facilement introduite sur le RAFT par l'intermédiaire d'un résidu cystéine (Figure 28).

Au cours de ces travaux de synthèse et dans l'optique de la préparation de quantités importantes de conjugués (supérieure au gramme), nous nous sommes attaché à optimiser les voies de préparation des vecteurs multivalents en augmentant les rendements de synthèse et en diminuant le nombre d'étapes. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux étapes de fonctionnalisation de nos peptides. Classiquement, les fonctions oxyamine et aldéhyde sont introduites après synthèse peptidique sur support solide sur les peptides cycliques en solution. Cette stratégie nécessite l'élimination de groupes protecteurs orthogonaux et la condensation sur le RAFT de l'ester activé portant la fonction aminooxy ou le couplage peptidique d'un résidu sérine sur le ligand -RGD- (Figure 29). Afin de s'affranchir de ces étapes de fonctionnalisation de nos peptides, nous avons cherché à incorporer lors de la SPPS des acides aminés modifiés présentant les fonctions impliquées dans la liaison éther d'oxime. Pour cela, nous avons développé des

¹⁶⁰ Edupuganti, O. P.; Defrancq, E.; Dumy, P. Head-to-tail oxime cyclization of oligodeoxynucleotides for the efficient synthesis of circular DNA analogues. *J Org Chem* **2003**, *68*, 8708-8710.

¹⁶¹ Hang, H. C.; Bertozzi, C. R. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Acc Chem Res* **2001**, *34*, 727-736.

¹⁶² Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates: chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Chemistry - A European Journal* **2001**, *7*, 3976-3984.

¹⁶³ Chen, X.; Lee, G. S.; Zettl, A.; Bertozzi, C. R. Biomimetic engineering of carbon nanotubes by using cell surface mucin mimics. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 6111-6116.

¹⁶⁴ Kochendoerfer, G. G.; Kent, S. B. Chemical protein synthesis. *Curr Opin Chem Biol* **1999**, *3*, 665-671.

¹⁶⁵ Singh, Y.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Preparation of a multitopic glycopeptide-oligonucleotide conjugate. *Org Lett* **2005**, *7*, 1359-1362.

¹⁶⁶ Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G. Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjug Chem* **1992**, *3*, 138-146.

acides aminés modifiés présentant les fonctions aldéhyde masquée et oxyamine protégée. L'utilisation de ces nouveaux acides aminés semble particulièrement intéressante pour la construction de macromolécules car elle diminue le nombre d'étapes de synthèse et les procédures en solution, permettant ainsi un gain en terme de rendement et de temps de synthèse (Figure 29).

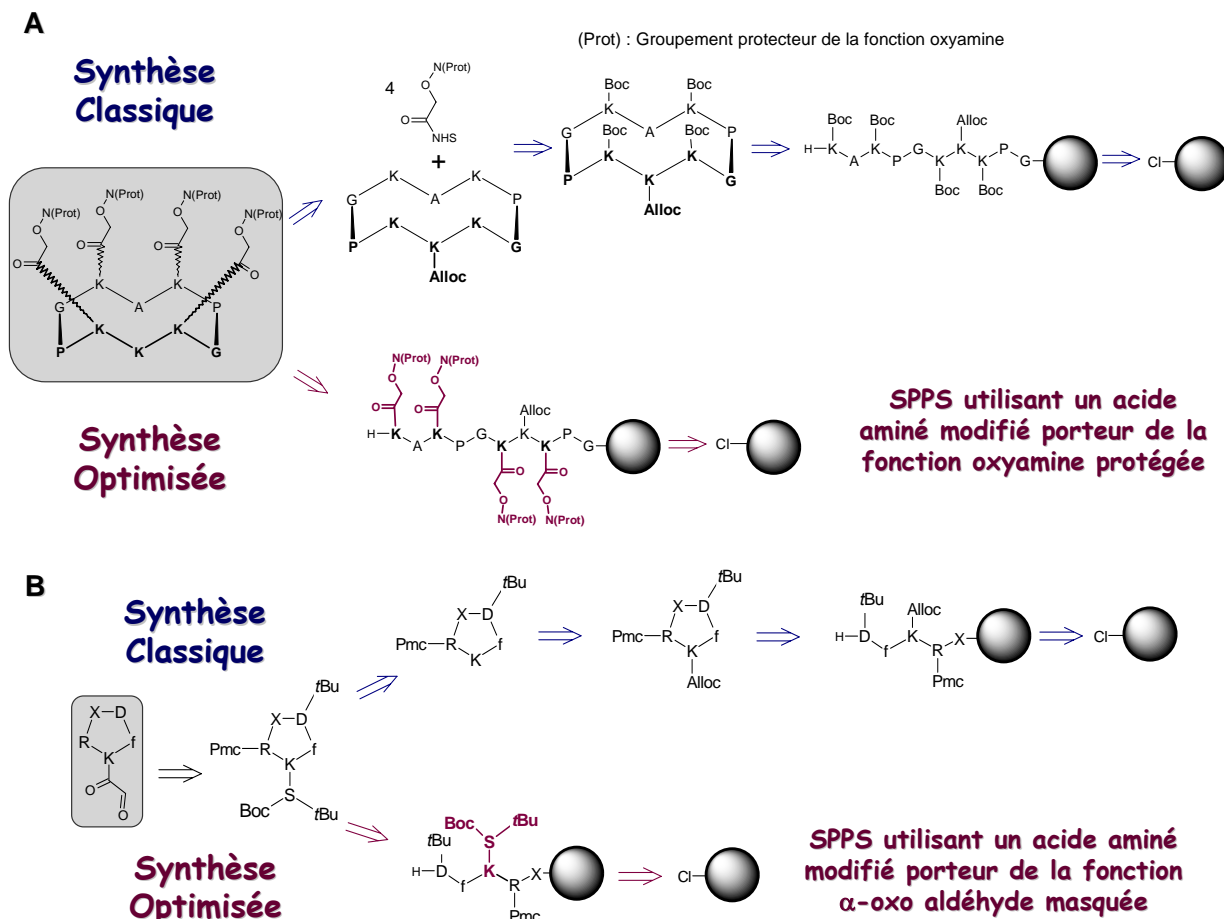


Figure 29 : Schémas rétro-synthétiques des deux voies de synthèse : A/ des RAFT fonctionnalisés par des oxyamines ; B/ des c[-RGDfK-] fonctionnalisés par un aldéhyde.¹⁴⁹

Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à améliorer l'étape d'assemblage chimiosélectif des c[-RGDfK(CO-CHO)-] au RAFT par liens éther d'oxime. En effet la très forte réactivité des fonctions oxyamine pour les composés carbonyles volatils (acétone, formaldéhyde...) peut être à l'origine de réactions secondaires parasites. En plus des précautions à prendre lors de la manipulation de fonctions oxyamine déprotégées, nous avons cherché à minimiser le nombre et le temps de réaction des étapes sensibles (déprotection des fonctions oxyamine, purification des composés présentant des fonctions oxyamine non protégées et couplage chimiosélectif avec les composés aldéhyde). Pour cela, il nous est apparu intéressant de réaliser les réactions de déprotection des fonctions oxyamine et de couplage des ligands -RGD- au RAFT en une étape de synthèse « One Pot » (Figure 30).

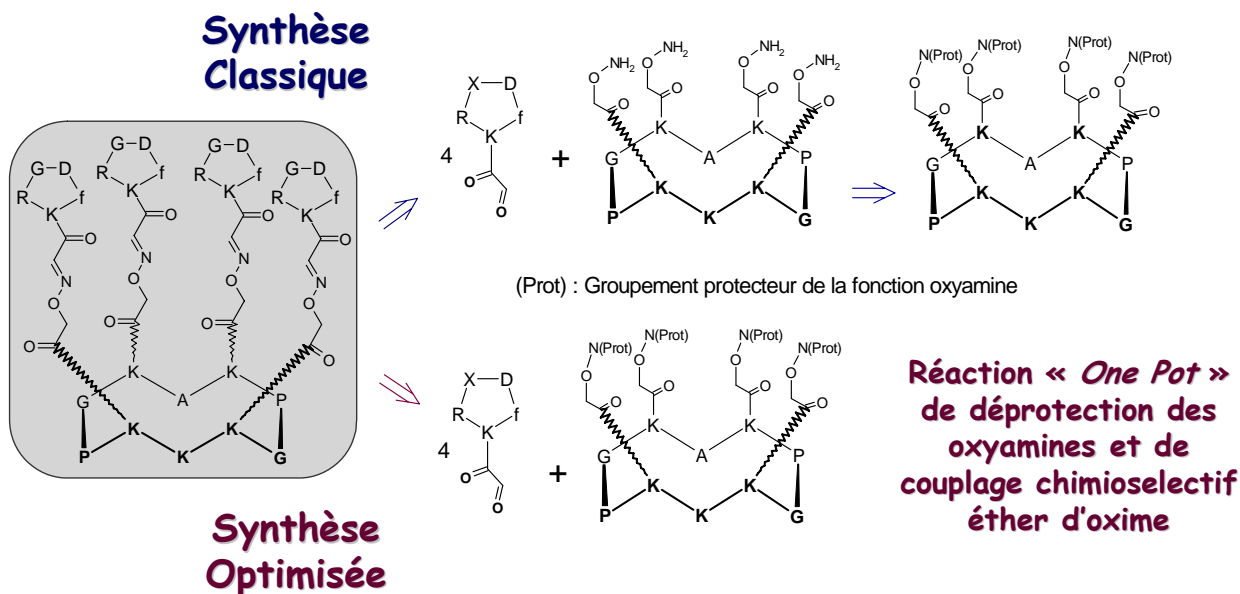


Figure 30 : Schéma rétro-synthétique de la synthèse du RAFT([-RGDfK-]₄).

A.2. Synthèse Peptidique sur Support Solide

Pour préparer les différents peptides linéaires impliqués dans la synthèse de nos vecteurs multivalents, nous avons utilisé la technique de Synthèse Peptidique sur Support Solide (SPPS). Cette méthode, développée dans les années 1960,¹⁶⁷ consiste en l'addition successive d'acides aminés protégés sur un support insoluble à partir de l'extrémité C-terminale. Les supports solides sont typiquement des billes de polymères synthétiques présentant des bras espaceurs fonctionnalisés pour la liaison du premier acide aminé et éventuellement des extensions conférant différentes propriétés de solubilité. Ces supports sont chimiquement inertes et non solubles à tous les réactifs utilisés durant la synthèse, mais présentent une bonne solvation des extensions fonctionnelles dans les solvants employés au cours de l'élongation du peptide. Il existe aujourd'hui un très large panel de résines commerciales possédant différentes propriétés de solvation (solvants aqueux/organiques) et diverses fonctions chimiques. Le choix de la résine permet la synthèse de peptides protégés ou non après décrochage de la résine et conditionne la nature de l'extrémité C-terminale (acide, amide, hydrazide, ester méthylique, aldéhyde).

En SPPS, l'addition de chaque acide aminé correspond à un cycle de deux étapes : le couplage d'un acide aminé protégé et l'élimination du groupe protecteur $N\alpha$ -terminal.¹⁶⁸ Cette méthode présente les avantages de la synthèse sur support adaptée à la construction de peptides. Ces avantages sont la facilité et la rapidité de la synthèse grâce aux étapes de lavage du peptide sur le support. Néanmoins, la SPPS nécessite une succession de réactions rapides et quantitatives afin de limiter au maximum les peptides « tronqués ». Afin de tendre vers des réactions complètes, on travaille généralement en larges excès molaires d'acides aminés et d'activateurs dans des conditions concentrées. La construction de la chaîne peptidique sur support rend possible l'utilisation d'excès de réactifs,

¹⁶⁷ Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **1963**, 85, 2149-2154.

¹⁶⁸ Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*. ed. C. W. Rees, CRC Press, New York, **1997**, 278 p.

facilement éliminés par simple filtration. En comparaison, la synthèse des peptides en phase liquide implique des traitements longs et contraignants.

Depuis cinquante ans, la SPPS s'est largement imposée et de nombreuses améliorations techniques (composants et bras espaceurs fonctionnalisés des supports de synthèse, groupements protecteurs orthogonaux) l'ont rendue de plus en plus performante (Tableau 3). Malgré cela, la synthèse peptidique reste délicate avec notamment de nombreuses réactions secondaires qui peuvent avoir lieu (épimérisations, cyclisations, alkylations).

Année	Améliorations
1963	Développement de la SPPS : support en polystyrène et groupe protecteur $N\alpha$ -terminal Boc ¹⁶⁷
1967	Décrochement des peptides du support par traitement au HF ¹⁶⁹
1970	Introduction de la résine BHA ¹⁷⁰ et MBHA ¹⁷¹ pour la synthèse de peptides amides
1970	Introduction du groupe protecteur $N\alpha$ -terminal Fmoc sensible aux traitements basiques
1973	Développement de la résine Wang acide labile (TFA) avec le groupe protecteur $N\alpha$ -terminal Bpoc ¹⁷²
1975	Introduction de la résine polyacrylamide (solvation en milieux polaire et aprotique) ¹⁷³
1976	Utilisation de la CLHP en phase inverse pour la purification de peptides préparés en SPPS ¹⁷⁴
1977	Concept de protections orthogonales ¹⁷⁵
1978	Stratégie Fmoc/ <i>t</i> Bu sur résine Wang avec des groupements orthogonaux acides labiles et décrochement du peptide de la résine par traitement au TFA ¹⁷⁶
1985	Synthèse peptidique en parallèle ¹⁷⁷ et application à la synthèse de bibliothèques peptidiques ¹⁷⁸
1985	Introduction de la résine polystyrène-polyéthylène glycol ¹⁷⁹ (solvation en milieux aqueux et organique)
1987	Développement de nombreux <i>linker</i> sensibles au TFA pour la SPPS de peptides amide en stratégie Fmoc/ <i>t</i> Bu ^{180,181,182}

¹⁶⁹ Sakakibara, S.; Shimonishi, Y.; Kishida, Y.; Okada, M.; Sugihara, H. Use of anhydrous hydrogen fluoride in peptide synthesis. I. Behavior of various protective groups in anhydrous hydrogen fluoride. *Bull Chem Soc Jpn* **1967**, *40*, 2164-2167.

¹⁷⁰ Pietta, P. G.; Marshall, G. R. Amide protection and amide supports in solid-phase peptide synthesis. *Journal of the Chemical Society* **1970**, *11*, 650-651.

¹⁷¹ Matsueda, G. R.; Stewart, J. M. A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid phase synthesis of peptide amides. *Peptides* **1981**, *2*, 45-50.

¹⁷² Wang, S. S. p-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J Am Chem Soc* **1973**, *95*, 1328-1333.

¹⁷³ Atherton, E.; Clive, D. L.; Sheppard, R. C. Letter: Polyamide supports for polypeptide synthesis. *J Am Chem Soc* **1975**, *97*, 6584-6585.

¹⁷⁴ Rivier, J.; Wolbers, R.; Burgus, R. *Application of high pressure liquid chromatography to peptides*. Pept., Proc. Am. Pept. Symp., 5th, **1977**, ed. Wiley, New York, 52-55.

¹⁷⁵ Barany, G.; Merrifield, R. B. A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function. *J Am Chem Soc* **1977**, *99*, 7363-7365.

¹⁷⁶ Chang, C. D.; Meienhofer, J. Solid-phase peptide synthesis using mild base cleavage of N alpha-fluorenylmethoxycarbonylamino acids, exemplified by a synthesis of dihydrosomatostatin. *Int J Pept Protein Res* **1978**, *11*, 246-249.

¹⁷⁷ Geysen, H. M.; Meloan, R. H.; Barteling, S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**, *81*, 3998-4002.

¹⁷⁸ Houghten, R. A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1985**, *82*, 5131-5135.

¹⁷⁹ Sucholeiki, I. New developments in solid phase synthesis supports. *Annual Reports in Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity* **1999**, *2*, 9-14.

¹⁸⁰ Albericio, F.; Barany, G. An acid-labile anchoring linkage for solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions. *Int J Pept Protein Res* **1987**, *30*, 206-216.

¹⁸¹ Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methyl ester resin. *Tetrahedron Lett* **1987**, *28*, 3787-3790.

1987	Développement du <i>linker</i> « Xanthenyl » pour la SPPS en stratégie Fmoc/ <i>t</i> Bu de peptides amides complètement protégés ¹⁸³ (décrochement de la résine 1 % TFA/CH ₂ Cl ₂)
1987	Développement de la résine SASRIN TM pour la SPPS en stratégie Fmoc/ <i>t</i> Bu de peptides complètement protégés ¹⁸⁴ (décrochement de la résine 1 % TFA/CH ₂ Cl ₂)
1988	Développement de la résine 2-chlorotriylchloride [®] pour la SPPS en stratégie Fmoc/ <i>t</i> Bu de peptides complètement protégés ¹⁸⁵ (décrochement de la résine AcOH/TFE/CH ₂ Cl ₂ ou HFIP/CH ₂ Cl ₂)
1993	Chimie combinatoire pour la synthèse rapide de bibliothèques de petites molécules ¹⁸⁶
2002	Synthèse peptidique accélérée sous micro-ondes ¹⁸⁷
2003	Synthèse peptidique SPPS (Fmoc) de longs peptides (100 AA) ¹⁸⁸

Tableau 3 : Améliorations importantes apportées à la SPPS.

En SPPS, il existe principalement deux grandes stratégies pour réaliser une synthèse : les stratégies Boc/Bzl et Fmoc/*t*Bu. Celles-ci diffèrent par le choix du groupe protecteur *N*α-terminal (Boc ou Fmoc) et les groupements protecteurs orthogonaux pouvant être utilisés pour protéger les chaînes latérales des acides aminés (respectivement Bzl ou *t*Bu). Le groupement tertiobutyloxycarbonyl (Boc) est labile en milieu acide fort trifluoroacétique (TFA). Les traitements répétés au TFA présentent l'avantage de limiter les agrégats peptidiques mais peuvent entraîner des réactions secondaires (carbocation intermédiaire très réactif). Les protections latérales orthogonales utilisées dans cette stratégie doivent résister au TFA et doivent être labiles dans d'autres conditions, comme le groupe Bzl qui s'élimine en présence d'acide fluorhydrique ou de dihydrogène. En ce qui concerne la stratégie Fmoc/*t*Bu, le fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc) s'élimine dans des conditions basiques en présence de pipéridine. Les protections latérales doivent être stables en milieu basique et se déprotègent classiquement en conditions acides, comme le *t*Bu éliminé par un traitement au TFA. Les Fmoc-AA-OH sont plus onéreux que les Boc-AA-OH mais la stratégie Fmoc/*t*Bu s'avère plus versatile, notamment grâce au développement de nombreux groupements protecteurs orthogonaux au Fmoc permettant des synthèses de molécules plus complexes. Nous avons donc choisi cette dernière stratégie pour la construction de nos vecteurs peptidiques. Par ailleurs, la modularité de la SPPS nous permet l'incorporation d'acides aminés modifiés tels que des dipeptides ou « *Building Block* ».

¹⁸² Stuber, W.; Knolle, J.; Breipohl, G. Synthesis of peptide amides by Fmoc-solid-phase peptide synthesis and acid labile anchor groups. *Int J Pept Protein Res* **1989**, *34*, 215-221.

¹⁸³ Sieber, P. An improved method for anchoring of 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids to 4-alkoxybenzyl alcohol resins. *Tetrahedron Lett* **1987**, *28*, 6147-6150.

¹⁸⁴ Mergler, M.; Tanner, R.; Gosteli, J.; Grogg, P. Peptide synthesis by a combination of solid-phase and solution methods. I. A new very acid-labile anchor group for the solid phase synthesis of fully protected fragments. *Tetrahedron Lett* **1988**, *29*, 4005-4008.

¹⁸⁵ Barlos, K.; Gatos, D.; Kaposos, S.; Papaphotiu, G.; Schaefer, W.; Yao, W. Esterification of partially protected peptide fragments with resins. Synthesis of Leu15-gastrin I using 2-chlorotriyl chloride resin. *Tetrahedron Lett* **1989**, *30*, 3947-3950.

¹⁸⁶ Jung, G. *Combinatorial chemistry : synthesis, chemistry, screening*. ed. Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, 634 p.

¹⁸⁷ Erdelyi, M.; Gogoll, A. Rapid microwave-assisted solid phase peptide synthesis. *Synthesis* **2002**, *11*, 1592-1596.

¹⁸⁸ White, P.; Keyte, J. W.; Bailey, K.; Bloomberg, G. Expediting the Fmoc solid phase synthesis of long peptides through the application of dimethylloxazolidine dipeptides. *J Pept Sci* **2004**, *10*, 18-26.

A.3. Synthèse et Incorporation de Nouveaux Acides Aminés Modifiés en SPPS

★ Synthèse de Nouveaux Acides Aminés Modifiés

Nous avons développé de nouveaux acides aminés modifiés afin d'optimiser les synthèses de nos conjugués. Les acides aminés **2** et **5** sont préparés à partir de lysines présentant, au niveau de leur chaîne latérale, les fonctions impliquées pour la mise en place du lien éther d'oxime : une fonction aldéhyde masquée (serine) ou une fonction oxyamine protégée (Figure 31).

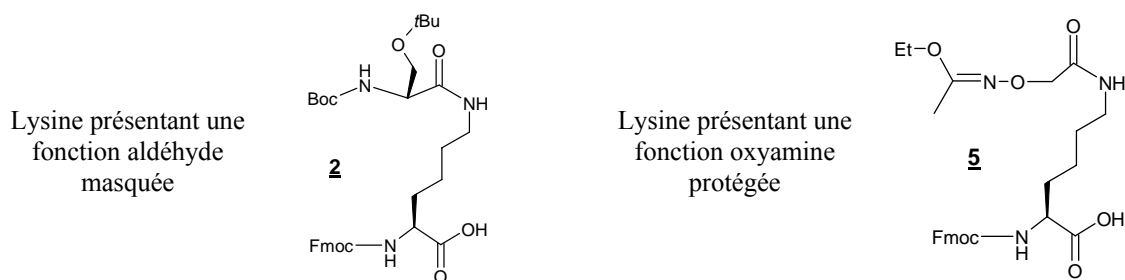
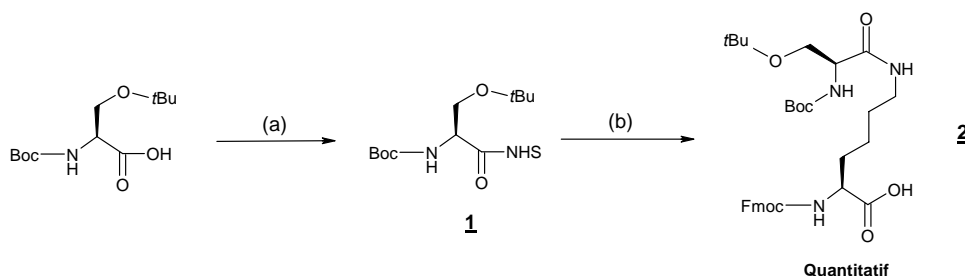


Figure 31 : Schéma des deux nouveaux acides aminés modifiés.

Ces dernières années, quelques méthodes de synthèse d'acides aminés modifiés présentant la fonction aldéhyde ont été développées.^{189,190,191,192} Dans notre cas, nous avons choisi de conserver l'introduction de la fonction aldéhyde masquée grâce au résidu sérine en l'incorporant sur la chaîne latérale d'un résidu lysine (Figure 32).¹⁹³ Le dipeptide **2** est synthétisé à partir d'un résidu lysine et d'un résidu sérine protégé. Il est obtenu en utilisant une méthode classique de formation du lien amide.



Réactifs : (a) DCC, NHS, Acétate d'éthyle/dioxane ; (b) Fmoc-K-OH, DIPEA, CH₂Cl₂.

Figure 32 : Schéma de synthèse du nouvel acide aminé modifié présentant la fonction aldéhyde.¹⁹³

Dans un premier temps, nous préparons l'ester activé **1** en utilisant le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et le *N*-hydroxysuccinimide (NHS). Il en résulte l'ester

¹⁸⁹ Melnyk, O.; Fruchart, J. S.; Grandjean, C.; Gras-Masse, H. Tartric acid-based linker for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide alpha-oxo aldehydes. *J Org Chem* **2001**, *66*, 4153-4160.

¹⁹⁰ Spetzler, J. C.; Hoeg-Jensen, T. Masked side-chain aldehyde amino acids for solid-phase synthesis and ligation. *Tetrahedron Lett* **2002**, *43*, 2303-2306.

¹⁹¹ Shin, H.; Cama, E.; Christianson, D. W. Design of amino acid aldehydes as transition-state analogue inhibitors of arginase. *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 10278-10284.

¹⁹² Garcia, J. M.; Far, S.; Diesis, E.; Melnyk, O. Determination of glyoxylyl-peptide concentration using oxime chemistry and RP-HPLC analysis. *J Pept Sci* **2006**, *12*, 734-738.

¹⁹³ Gaertner, H. F.; Rose, K.; Cotton, R.; Timms, D.; Camble, R.; Offord, R. E. Construction of protein analogues by site-specific condensation of unprotected fragments. *Bioconjug Chem* **1992**, *3*, 262-268.

activé de la serine. Dans un deuxième temps, l'attaque nucléophile de la fonction amine d'une lysine permet d'obtenir le produit désiré **2** avec une excellente pureté et un rendement global quantitatif (Figure 33). Le dipeptide **2** a été caractérisé par RMN du proton. En plus des signaux de la Fmoc-Lysine, le spectre de RMN du proton montre des signaux blindés correspondant aux groupements Boc et *t*Bu de la partie serine de la molécule, entre 1 et 1,5 ppm.

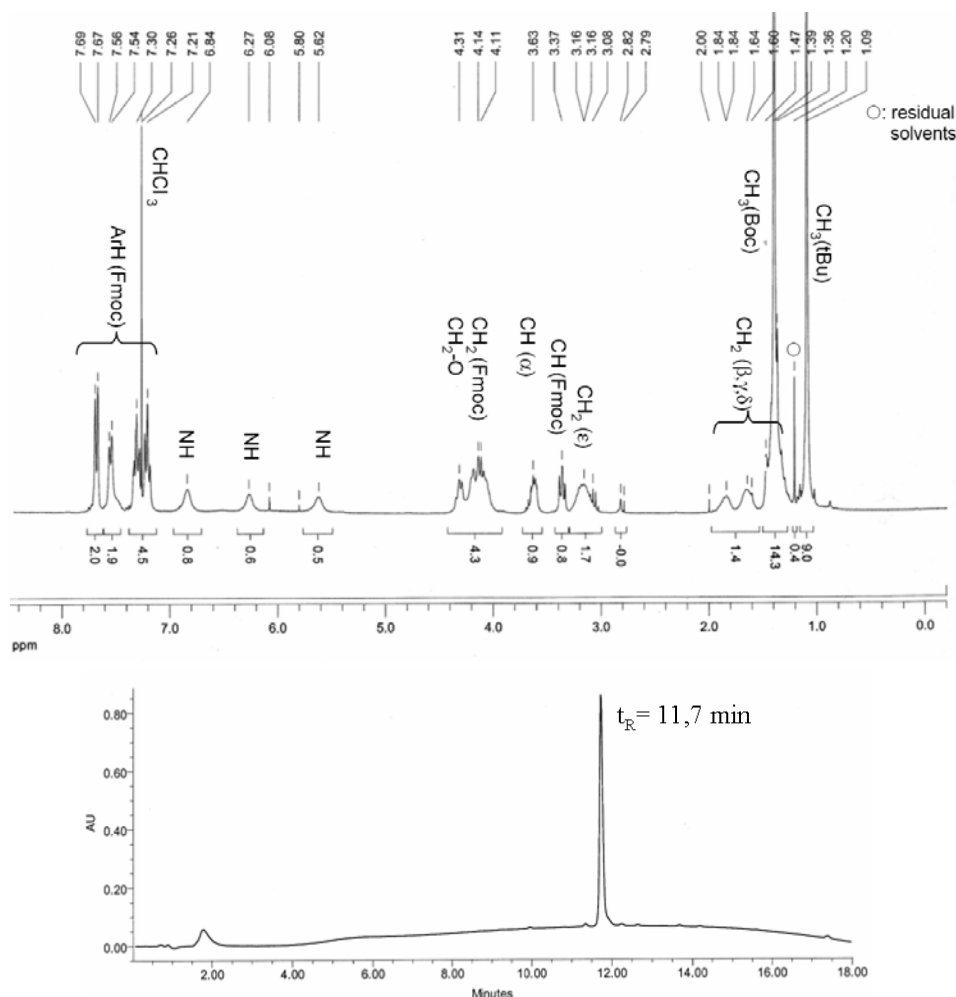


Figure 33 : Spectre RMN et chromatogramme CLHP du composé **2**.

Des méthodes de synthèse d'acides aminés modifiés présentant la fonction oxyamine ont aussi été décrites dans la littérature.^{194,195} La fonction oxyamine est le plus souvent introduite par l'intermédiaire de l'acide 2-aminoxyacétique (Aoa-OH) protégé par un groupement Boc. Cependant, l'azote de la fonction aminoxy malgré sa protection reste réactif lors des réactions de couplage. Cela entraîne une réaction secondaire significative : la *N*-acylation de l'acide aminé engagé dans le couplage au niveau de l'azote de la fonction aminoxy. Afin de contourner ce problème, nous avons utilisé un nouveau groupe protecteur de la fonction oxyamine, stable durant la synthèse peptidique et s'éliminant dans

¹⁹⁴ Lang, I.; Donze, N.; Garrouste, P.; Dumy, P.; Mutter, M. Chemoselectively addressable HCan building blocks in peptide synthesis: L-homocanaline derivatives. *J Pept Sci* **1998**, *4*, 72-80.

¹⁹⁵ Spetzler, J. C.; Hoeg-Jensen, T. Preparation and application of O-amino-serine, Ams, a new building block in chemoselective ligation chemistry. *J Pept Sci* **1999**, *5*, 582-592.

des conditions acides douces : le groupement 1-éthoxyéthylidène (Eei).¹⁹⁶ Nous avons donc préparé l'acide 2-(1-éthoxyéthylidèneaminoxy)acétique, afin de l'introduire sur la chaîne latérale d'un résidu lysine (Figure 34).

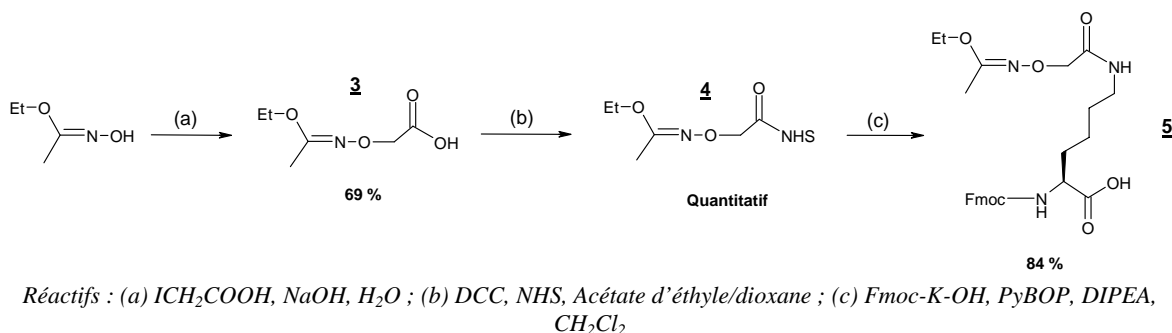
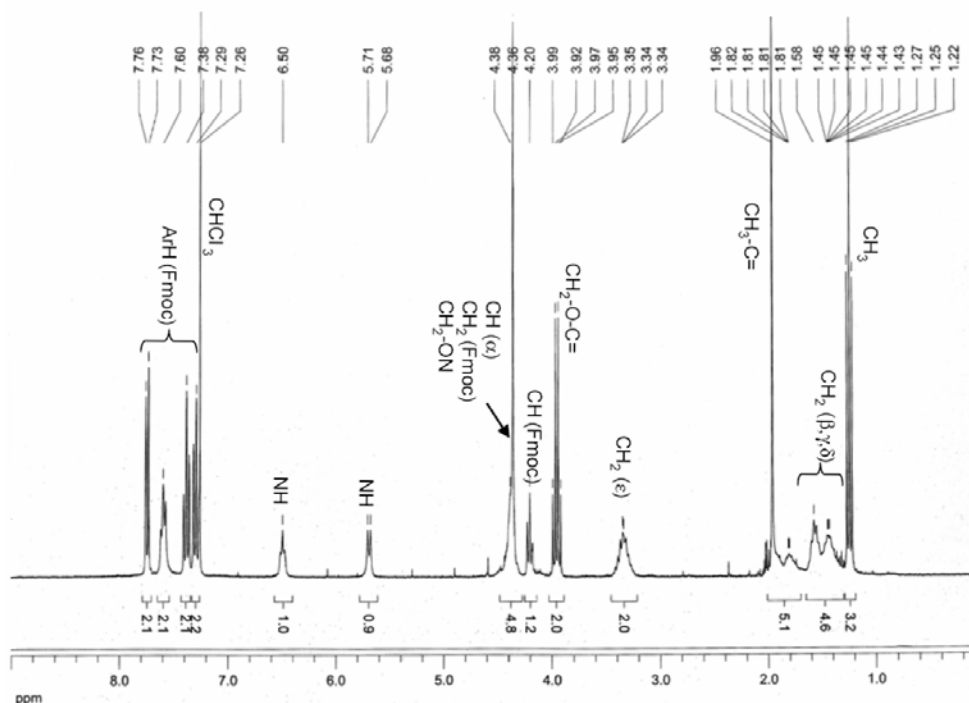


Figure 34 : Schéma de synthèse de l'acide aminé modifié présentant la fonction oxyamine protégée par un groupement 1-éthoxyéthylidène.

Le peptide modifié **5** est synthétisé en trois étapes à partir de la Fmoc-Lys-OH et d'un synthon présentant l'oxyamine protégée. La première étape consiste en la préparation de l'acide 2-(1-éthoxyéthylidèneaminoxy)acétique à partir de l'éthyle *N*-hydroxyacétimide et de l'acide iodoacétique en conditions basiques. Dans un deuxième temps, la fonction acide du composé **3** est activée sous forme d'ester *N*-hydroxysuccinimide dans les mêmes conditions que celles utilisées pour obtenir le composé **1**. On obtient finalement, après l'acylation de la lysine, l'acide aminé modifié **5** avec une pureté supérieure à 98 % et un rendement global d'environ 60 % (Figure 35). Ce composé a été caractérisé par RMN du proton dont le spectre montre les signaux de la Fmoc-Lysine ainsi que des signaux blindés correspondant aux protons du groupement Eei à 1,96 ppm.



¹⁹⁶ Khomutov, A. R.; Vepsalainen, J.; Shvetsov, A. S.; Hyvonen, T.; Keinanen, T.; Pustobaev, V. N.; Eloranta, T. O.; Khomutov, R. M. Synthesis of Hydroxylamine Analogues of Polyamines. *Tetrahedron Lett* **1996**, *52*, 13751-13766.

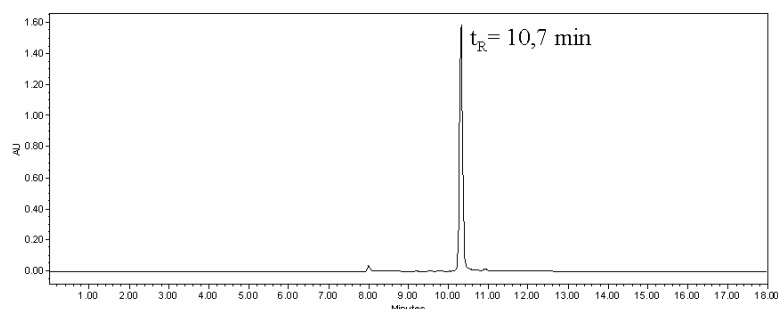


Figure 35 : Spectre RMN et chromatogramme CLHP du composé **5**.

Les conditions de stabilité du groupement protecteur 1-éthoxyéthylidène ont été ensuite étudiées. Celui-ci s'est avéré stable durant plus de vingt quatre heures dans les différentes conditions utilisées en SPPS :

- couplage d'acides aminés en condition basique,
- élimination du groupement Fmoc en présence de pipéridine,
- décrochement du peptide de la résine en condition acide douce (AcOH/TFE/CH₂Cl₂ (1/1/8)).

Les conditions d'élimination du groupe protecteur ont été analysées en utilisant le composé **5** (2 mM) dans différentes solutions aqueuses contenant de 0,1 à 10 % de TFA (Figure 36). La déprotection du groupe Eei a été suivie par CLHP à 299 nm. Celui-ci est totalement éliminé au bout d'une demi-heure en utilisant une solution de 3 % de TFA.

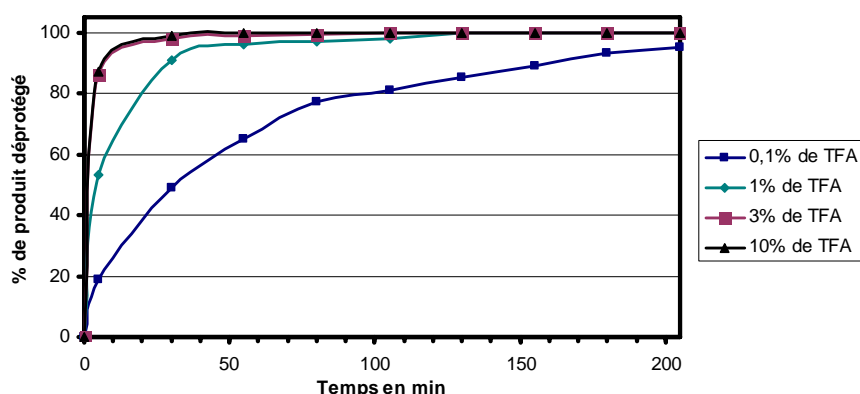


Figure 36 : Cinétique de déprotection du composé **5**.

★ Etude de l'Incorporation des Nouveaux Acides Aminés modifiés en SPPS

Afin de vérifier la compatibilité des composés **2** et **5** avec la SPPS, nous avons réalisé la synthèse de différents peptides et vérifié leur pureté. Nous avons également étudié les bénéfices apportés par la protection de la fonction oxyamine avec le groupement 1-éthoxyéthylidène. Pour cela, nous avons comparé l'utilisation du composé **5** à celle d'autres acides aminés modifiés comportant la fonction oxyamine classiquement protégée par des groupements Boc notamment (Figure 37) :

- le composé **6**, lysine présentant une oxyamine protégée par un groupement Boc,
- le composé **7**, lysine présentant une oxyamine protégée par deux groupements Boc.

Ce dernier a été développé afin d'éviter la réaction de *N*-acylation indésirable qui se produit dans le cas d'une protection avec un seul groupe Boc.^{194,197}

¹⁹⁷ Brask, J.; Jensen, K. J. Carbopeptides: chemoselective ligation of peptide aldehydes to an aminoxy-functionalized D-galactose template. *J Pept Sci* **2000**, *6*, 290-299.

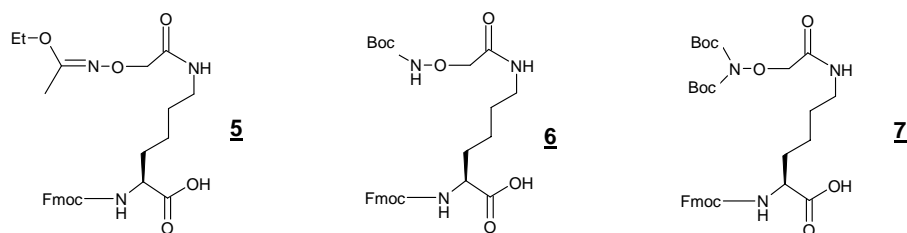
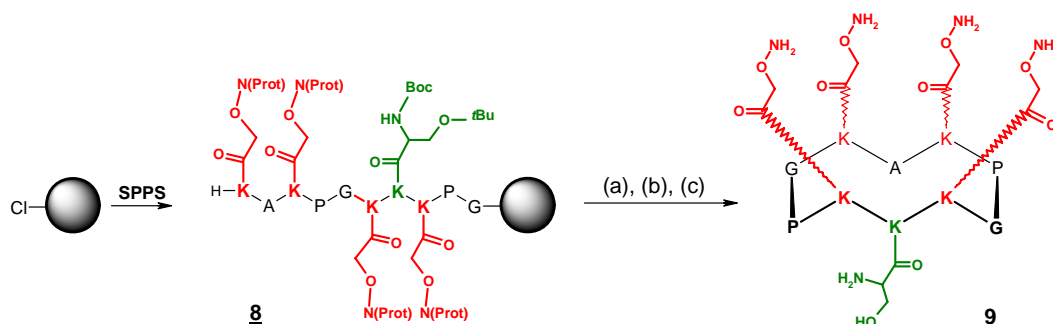


Figure 37 : Fmoc aminoacides comportant une fonction oxyamine protégée.

Dans notre étude, nous avons choisi de synthétiser le peptide **9** (Figure 38) en utilisant chacun des acides aminés modifiés. Les composés **2**, **5**, **6** et **7** ont été incorporés lors de la SPPS en stratégie Fmoc/*t*Bu en utilisant les mêmes conditions de couplage et de déprotection que celles utilisées pour les acides aminés classiques sur une résine 2-chlorotrityle[®]. Cette résine présente l'avantage de permettre le décrochement des peptides de la résine dans des conditions très douces (acide acétique en présence de TFE dans le CH₂Cl₂). La synthèse est initiée par une substitution nucléophile d'un atome de chlore par le premier acide aminé en condition basique. Les cycles de déprotection du groupement Fmoc des acides aminés sont effectués avec une solution de pipéridine à 20 % dans le DMF. Le dosage de l'adduit dibenzofulvène/pipéridine formé permet de contrôler le taux de substitution de la résine au cours de l'élongation du peptide. Les couplages peptidiques sont réalisés au moyen de l'agent de couplage PyBOP^{®198} en présence d'un excès de réactifs (2 eq. d'acides aminés et d'agent de couplage). Chaque couplage est contrôlé par des tests colorimétriques (Kaiser¹⁹⁹ et TNBS²⁰⁰) réalisés sur un échantillon de résine. Après l'élimination du dernier groupe Fmoc, le peptide **8** est décroché de la résine. Celui-ci est ensuite cyclisé dans des conditions de hautes dilutions (5.10⁻⁴ M) dans le DMF en présence de PyBOP[®]. Les conditions de hautes dilutions permettent de limiter les phénomènes de dimérisation ou d'oligomérisation et donc de favoriser la réaction de cyclisation intramoléculaire. Ce peptide est en suite déprotégé en conditions acides.



Prot : Groupement protecteur de l'oxyamine

Réactifs : (a) TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (1/1/8) ; (b) PyBOP, DIPEA, DMF ; (c) 50 % TFA/CH₂Cl₂.

Figure 38 : Schéma de synthèse du RAFT présentant quatre fonctions oxyamine et une fonction aldéhyde masquée.

¹⁹⁸ Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP: a new peptide coupling reagent devoid of toxic byproduct. *Tetrahedron Lett* **1990**, *31*, 205-208.

¹⁹⁹ Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* **1970**, *34*, 595-598.

²⁰⁰ Hancock, W. S.; Battersby, J. E. A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid. *Anal Biochem* **1976**, *71*, 260-264.

Au cours de la synthèse du peptide **9**, l'utilisation des « *building block* » **6** et **7** entraîne des réactions secondaires donnant lieu à de nombreux intermédiaires indésirables en fin de synthèse (Figure 39-A).

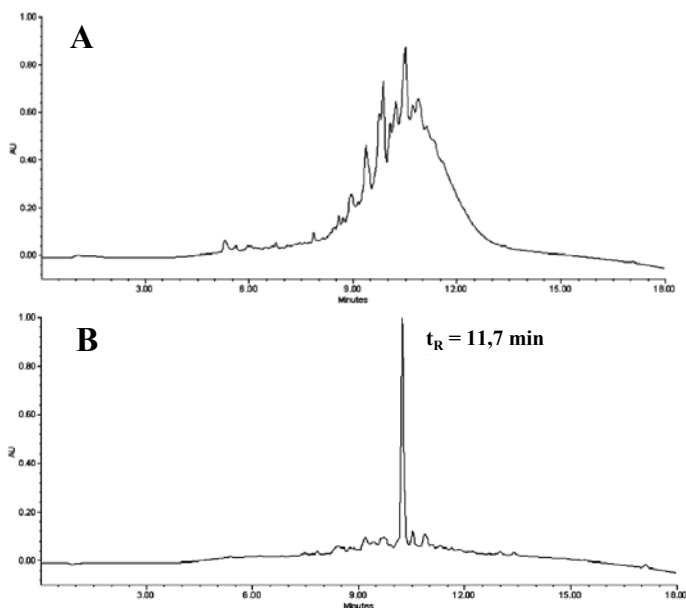


Figure 39 : Chromatogrammes CLHP des peptides **8** synthétisés en utilisant : A/ le composé **6** ; B/ le composé **5**.

Les profils CLHP des premières étapes de synthèse de **9** lors de l'incorporation de **6** et **7** ont montré la présence de plusieurs produits. Les analyses de ces différents composés par CLHP et spectrométrie de masse ESI, nous ont permis de déterminer les réactions secondaires intervenant (Figure 40).²⁰¹ On observe, dans le cas de la synthèse **B** réalisée avec l'acide aminé **6**, une acylation partielle (10 %) sur l'azote de la fonction oxyamine protégée produisant le composé indésirable **15**. Dans le cas de l'utilisation de l'acide aminé modifié **7** au cours de la synthèse **A**, une élimination d'un des deux groupements protecteurs Boc protégeant la fonction oxyamine a lieu lors du traitement à la pipéridine pour la déprotection Fmoc. Cette élimination a déjà été observée sur des dérivés hydrazino tri-protégés par le groupement Boc.²⁰² Cette déprotection entraîne par la suite une *N*-acylation partielle (13 %) au niveau de l'azote de l'oxyamine lors du couplage de l'acide aminé suivant avec la formation du composé **13**. Seule l'utilisation de l'acide aminé modifié **5** a permis d'obtenir le peptide **8** avec une pureté satisfaisante comme le montre le profil CLHP (Figure 39-B).²⁰¹

²⁰¹ Foillard, S.; Ohsten Rasmussen, M.; Razkin, J.; Boturn, D.; Dumy, P. 1-Ethoxyethylidene, a New Compatible Protecting Group for the Stepwise SPPS of Aminoxy Peptides. *J Org Chem* **2008**, *73*, 983-991.

²⁰² Bonnet, D.; Grandjean, C.; Rousselot-Pailley, P.; Joly, P.; Bourel-Bonnet, L.; Santraine, V.; Gras-Masse, H.; Melnyk, O. Solid-phase functionalization of peptides by an alpha-hydrazinoacetyl group. *J Org Chem* **2003**, *68*, 7033-7040.

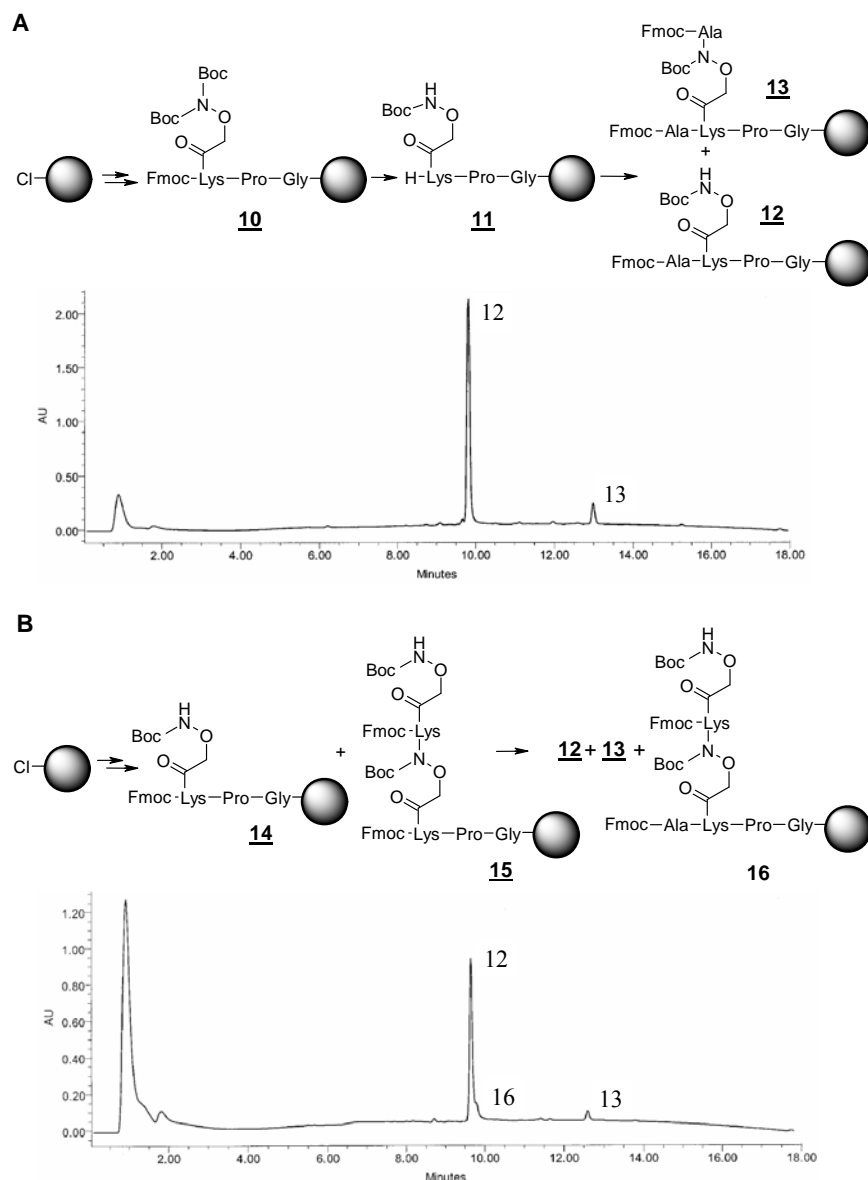


Figure 40 : Analyse des réactions secondaires lors des essais de synthèse du peptide **9** en utilisant : A/ le composé **6** ; B/ le composé **7**.

Les acides aminés modifiés **2** et **5** ont également été utilisés pour préparer d'autres peptides, généralisant ainsi leur utilisation en SPPS.²⁰¹ L'ensemble de nos travaux montrent que les acides aminés modifiés **2** et **5** sont parfaitement compatibles avec la SPPS. L'acide aminé modifié **5** dont l'oxyamine est protégée par le groupement 1-éthoxyéthylidène permet d'éviter les réactions secondaires se produisant avec les acides aminés modifiés **6** et **7** lors de la SPPS. D'autre part, notre méthode de synthèse à partir des « *building block* » permet de réduire considérablement les étapes de synthèse et évite certaines purifications intermédiaires lors la construction de peptides adressables chimioselectivement. La fonctionnalisation des peptides *via* l'utilisation de nos nouveaux « *building block* » **2** et **5** s'avère être une méthode originale particulièrement attractive pour la préparation de conjugués et adaptable à une large gamme d'applications.

Dans la stratégie de synthèse de nos vecteurs multivalents, nous avons choisi d'introduire une fonction électrophile aldéhyde glyoxylique sur le ligand -RGD- et les fonctions oxyamine nucléophiles sur le gabarit RAFT. Le dipeptide **2** contenant la fonction aldéhyde masquée est utilisé pour la synthèse sur support solide du ligand

c[-RGDfK(CO-CHO)-]. L'acide aminé **5** présentant la fonction oxyamine protégée est utilisé dans la synthèse du châssis RAFT. Par la suite, les acides aminés modifiés **2** et **5** ont également été utiles pour développer une synthèse de nos composés réalisée entièrement sur résine.

A.4. Synthèse des Différents Précurseurs Peptidiques RAFT et c[-RGXfK-]

La synthèse des précurseurs peptidiques RAFT et c[-RGDfK-] requiert une méthode mixte de synthèse en phase solide et en solution. Les séquences peptidiques linéaires sont synthétisées en stratégie Fmoc/*t*Bu, sur une résine acide-labile compatible avec l'utilisation des groupes protecteurs orthogonaux des résidus impliqués dans la synthèse.

A.4.1. Synthèse du RAFT

Le RAFT a été synthétisé de deux façons : classiquement en utilisant des Fmoc-AA-OH conventionnels ou de manière optimisée en incorporant l'acide aminé modifié **5**.

Dans la méthode de synthèse classique le précurseur linéaire du RAFT est réalisé sur résine 2-chlorotriptyle[®] dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour préparer le composé **9**. Tous les couplages sont réalisés en utilisant l'agent activateur PyBOP[®]. L'avancement des réactions est contrôlé par des tests colorimétriques classiques (Kaiser ou TNBS). Les cycles de déprotection du groupement Fmoc sont effectués avec une solution de 20 % de pipéridine dans le DMF libérant l'extrémité *N*-terminale du peptide supporté afin de réaliser le couplage de l'acide aminé suivant. Les solutions récupérées lors des déprotections contenant l'adduit de la pipéridine sur le dibenzofulvène permettent également de quantifier de façon indirecte le taux de greffage de l'acide aminé par spectrométrie UV. La synthèse du peptide est stratégiquement initiée à partir d'un résidu glycine achiral de façon à s'affranchir des phénomènes d'épimérisation qui peuvent survenir lors de l'étape ultérieure de cyclisation. Après le couplage des différents acides aminés et l'élimination du dernier groupement Fmoc, la séparation du peptide linéaire **17** (*cf* Partie Expérimentale) du support solide s'effectue en conditions acides douces (1 % TFA dans le CH₂Cl₂ ou AcOH/TFE/CH₂Cl₂ (1/1/8)) permettant de garder les groupements protecteurs Boc et Alloc (Figure 41).

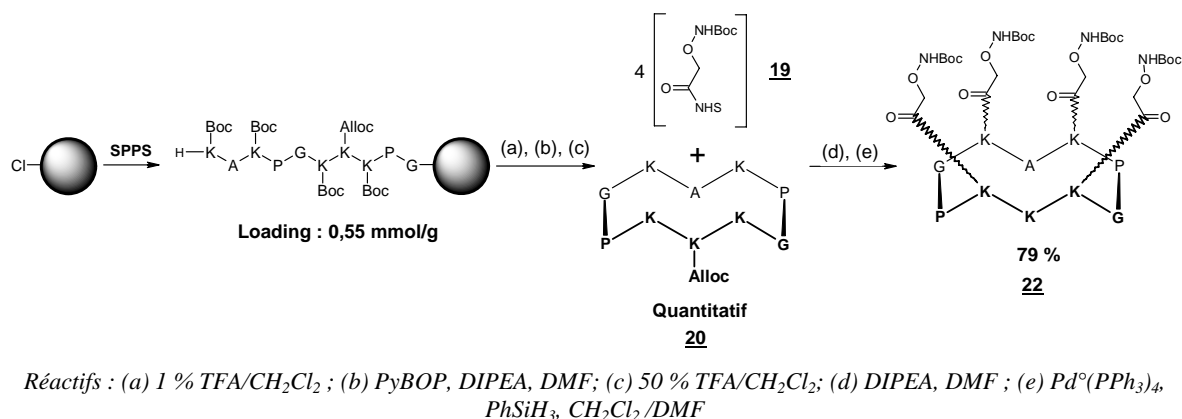


Figure 41 : Schéma de la voie de synthèse classique du RAFT fonctionnalisé avec quatre fonctions oxyamine.

La cyclisation intramoléculaire est réalisée entre les extrémités acide et amine du peptide **17** en présence de PyBOP[®] et de DIPEA, dans des conditions de haute dilution. Après l'étape de cyclisation, l'élimination simultanée des quatre groupes Boc présents sur les chaînes latérales des lysines du cyclodécapeptide **18** (cf Partie Expérimentale) est réalisée au moyen d'une solution de TFA à 50 %. Ceci permet d'obtenir le composé **20** avec un rendement quantitatif. Ce dernier peptide peut alors être fonctionnalisé sur sa face supérieure avec quatre oxyamines protégées. Cette fonctionnalisation est réalisée grâce à une réaction d'acylation des fonctions ϵNH_2 des lysines par l'ester activé **19** (Figure 41). Le groupement Alloc de la chaîne latérale du résidu lysine dirigé vers la face inférieure du RAFT est ensuite éliminé par une catalyse au palladium (0) en présence d'un large excès de phénylsilane (PhSiH_3) dans du CH_2Cl_2 anhydre.²⁰³ Le phénylsilane, donneur d'hydrures, est employé pour piéger l'adduit intermédiaire π -allyl-palladium. Cette réaction se déroule en une demi-heure sous atmosphère d'argon. Le peptide brut **22** est récupéré après une précipitation à l'éther éthylique sous la forme de sel de TFA avec un rendement global de l'ordre de 80 % et une pureté suffisante pour son utilisation ultérieure (Figure 42).

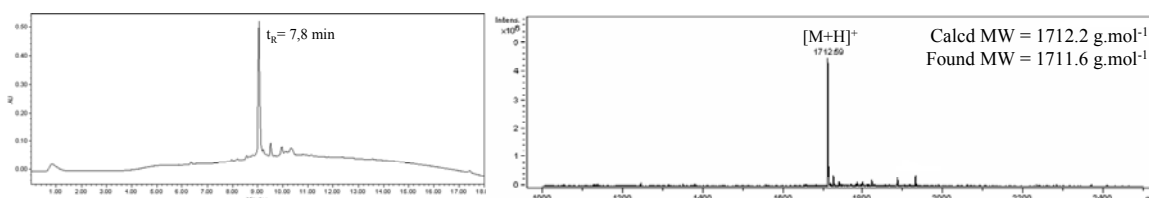
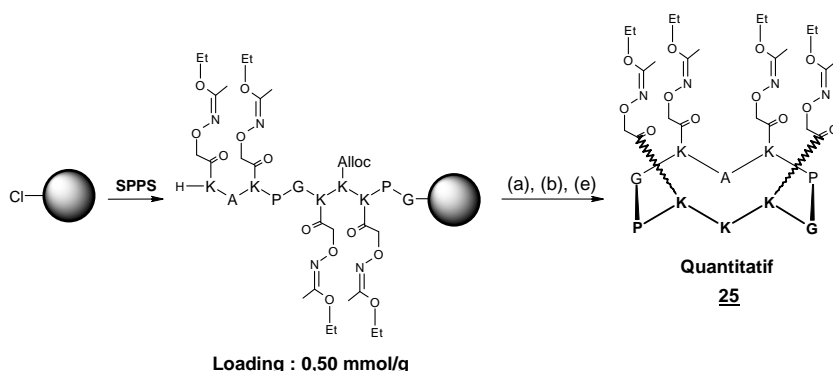


Figure 42 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé **22**.

Cette synthèse peut être optimisée en utilisant l'acide aminé modifié **5** (Figure 37) lors de la construction peptidique du RAFT linéaire sur support solide. Ceci nous permet le gain de deux étapes de synthèse (déprotection régiosélective et introduction des fonctions oxyamine). Afin de conserver les groupements 1-éthoxyéthylidène sur les fonctions oxyamine, le peptide est décroché de la résine dans des conditions douces $\text{AcOH}/\text{TFE}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1/1/8) (Figure 43). Les réactions de cyclisation et d'élimination du groupe Alloc sont rigoureusement réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour la synthèse classique. Cette dernière voie de synthèse permet de synthétiser le RAFT **25** présentant quatre fonctions oxyamine protégées en augmentant le rendement global de synthèse (rendement supérieur à 95 % contre 80 % pour la synthèse classique).



Réactifs : (a) $\text{TFE}/\text{AcOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1/1/8) ; (b) PyBOP, DIPEA, DMF ; (e) $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_4$, PhSiH_3 , CH_2Cl_2 /DMF

Figure 43 : Schéma de la voie de synthèse optimisée du RAFT comportant quatre fonctions oxyamine.

²⁰³ Thieret, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibe, F.; Albericio, F. Use of Alloc-amino acids in solid-phase peptide synthesis. Tandem deprotection-coupling reactions using neutral conditions. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38*, 7275-7278.

A.4.2. Synthèse des Cyclopentapeptides Présentant le Motif -RGD- et son Analogue -RβAD-

La préparation de c[-RGDfK-] fonctionnalisé sur le résidu lysine par un aldéhyde glyoxylique a été décrite récemment.¹⁴⁹ Par ailleurs, la mutation du résidu glycine du cyclopentapeptide par un résidu β-alanine permet d'obtenir un peptide ne possédant plus d'affinité pour l'intégrine α_vβ₃. Ce peptide c[-RβADfK-] est nécessaire pour contrôler la spécificité de nos macromolécules lors des expériences biologiques.²⁰⁴ Les cyclopentapeptides contenant les motifs -RGD- et -RβAD- sont préparés selon des stratégies tout à fait identiques. Ils ont été synthétisés de deux façons : classiquement en utilisant des Fmoc-AA-OH ou de manière optimisée en incorporant l'acide aminé modifié **2**.

Dans la voie de synthèse classique du ligand c[-RGDfK-], le peptide linéaire est synthétisé sur une résine 2-chlorotrytyle[®] compatible avec l'utilisation des groupements protecteurs Pmc, *t*Bu, Alloc, (Figure 44). L'élongation des séquences est, là encore, initiée à partir des résidus achiraux (glycine ou β-alanine) pour contourner les problèmes d'épimérisation lors de la cyclisation ultérieure. Les peptides protégés sont décrochés de la résine dans une solution diluée de TFA (1 %) et ensuite cyclisés dans des conditions de haute dilution.

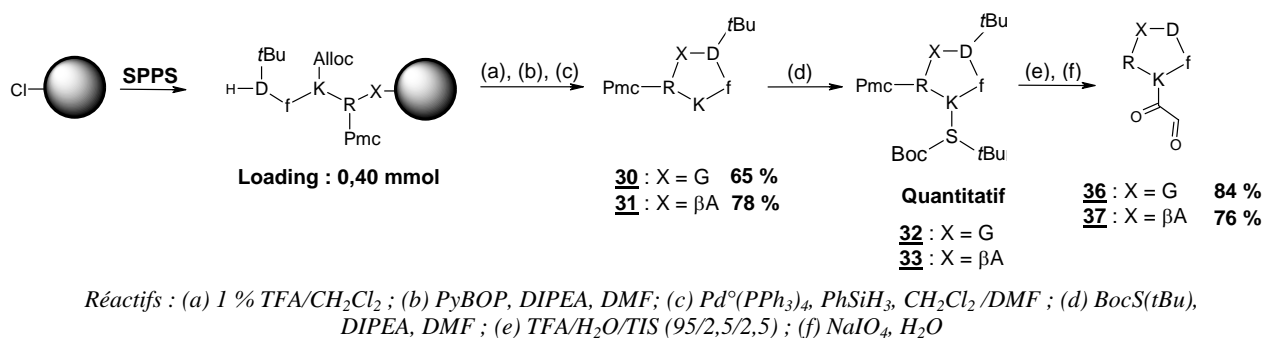


Figure 44 : Schéma de la voie de synthèse classique de c[-RXDfK-] fonctionnalisé par un aldéhyde.

Après l'étape de cyclisation, la fonctionnalisation sur le résidu lysine requiert la déprotection sélective de sa chaîne latérale (Figure 44). Le groupement Alloc est éliminé par une catalyse au palladium (0). Cette réaction se déroule dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Après évaporation des solvants, les peptides **30** et **31** sont récupérés par une simple précipitation à l'éther. Ils sont alors fonctionnalisés grâce à l'introduction de la BocSer(*t*Bu). La formation de la liaison peptidique est réalisée en présence d'un léger excès d'acide aminé et d'agent de couplage PyBOP (1,1-1,2 eq.). Les peptides **32** et **33** ainsi obtenus sont alors déprotégés en milieu acide au moyen d'une solution concentrée de TFA (95%) en présence d'agents nucléophiles (H₂O/TIS) piégeant les carbocations tertiobutyles libérés. L'oxydation de la fonction 1,2-aminoalcool du résidu sérine est enfin réalisée dans l'eau en présence d'un excès de périodate de sodium (10 eq.). La réaction est complète au bout de vingt minutes. Le composé est ensuite purifié par CLHP afin d'éliminer les sels présents (NaIO₄ et NaIO₃) ainsi que le formaldéhyde libéré lors de la coupure oxydante. Les composés **36** et **37** sont obtenus avec des rendements

²⁰⁴ Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H. Stereoisomeric Peptide Libraries and Peptidomimetics for Designing Selective Inhibitors of the α_vβ₃ Integrin for a New Cancer Therapy. *Angew Chem Int Ed Engl* **1997**, *36*, 1374-1389.

Classiquement, les fonctions oxyamine des RAFT **22** et **25** sont déprotégées en conditions acides en présence d'agents nucléophiles (TIS/H₂O) piègeurs de carbocations (Figure 48). Le peptide **40** est obtenu après purification CLHP avec un rendement faible. Celui-ci peut être expliqué par la grande réactivité des oxyamines responsables de réactions secondaires non désirées.

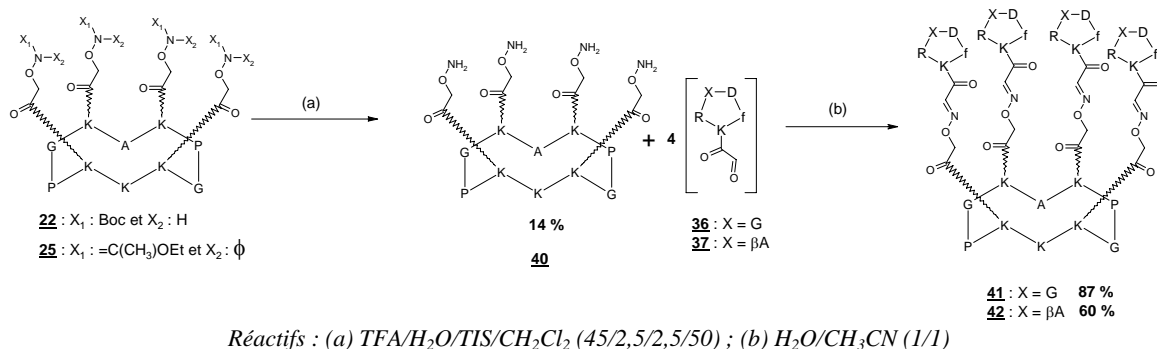


Figure 48 : Schéma de la voie classique de déprotection des fonctions oxyamine du RAFT et de couplage des c[-RGDfK(CO-CHO)-].

Les précurseurs peptidiques **40**, **36** et **37** étant sous forme de sels de TFA, la réaction de formation des liens éther d'oxime est réalisée dans une solution H₂O/CH₃CN sans ajout supplémentaire d'acide au milieu réactionnel. La réaction est réalisée en utilisant un excès de **36** ou de **37** (2 eq./site oxyamine). La réaction est complète au bout d'une heure et les composés sont ensuite purifiés par CLPH afin de séparer les excès de dérivés aldéhyde. Cet excès peut être récupéré pour une utilisation ultérieure. Les conjugués **41** et **42** sont obtenus avec une excellente pureté et des rendements inférieurs à 15 %. Ils ont été caractérisés par spectrométrie de masse électrospray en mode positif (Figure 49).

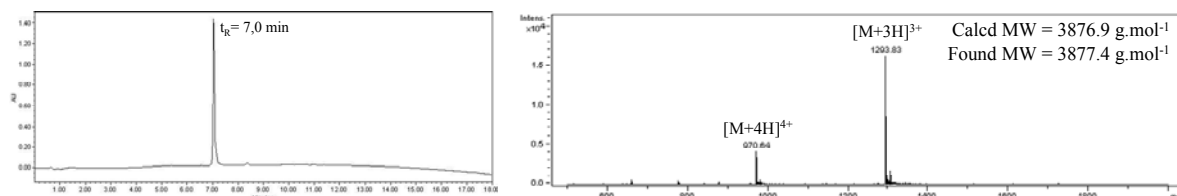


Figure 49: Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé **41**.

Les étapes clés de la synthèse de nos conjugués, la déprotection des fonctions oxyamine du RAFT et le couplage de celles-ci avec les ligands c[-RXDfK(CO-CHO)-] ont également été optimisées. Les fonctions oxyamine sont extrêmement réactives : par exemple, elles sont utilisées pour doser de faibles quantités de composés carbonyles.^{206,207} Il est donc nécessaire de prendre de nombreuses précautions dès que l'on génère une fonction oxyamine libre ou bien lors de sa mise en solution dans les étapes de ligation chimiosélective. Ces manipulations doivent être réalisées dans des milieux exempts de composés présentant des fonctions carbonyles réactives, tels que l'acétone ou le formaldéhyde. Par ailleurs, il faut s'assurer que les réactifs utilisés sont eux aussi exempts de tout additif susceptible de réagir avec les fonctions oxyamine. La grande réactivité des oxyamines nous a également amenés à minimiser les temps de réaction des étapes mettant en jeu les fonctions oxyamine libres. Pour cela, nous avons étudié la faisabilité de réaliser

²⁰⁶ Nishikawa, H.; Sakai, T. Derivatization and chromatographic determination of aldehydes in gaseous and air samples. *J Chromatogr, A* **1995**, *710*, 159-165.

²⁰⁷ Houdier, S.; Legrand, M.; Boturny, D.; Croze, S.; Defrancq, E.; Lhomme, J. A new fluorescent probe for sensitive detection of carbonyl compounds. *Analytica Chimica Acta* **1999**, *382*, 253-263.

les réactions de déprotection des fonctions oxyamine et de couplage avec les composés aldéhyde en une seule étape (Figure 50).

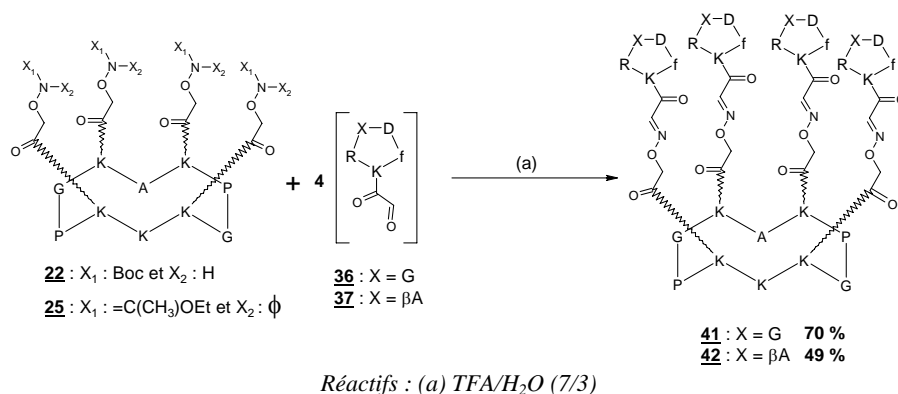
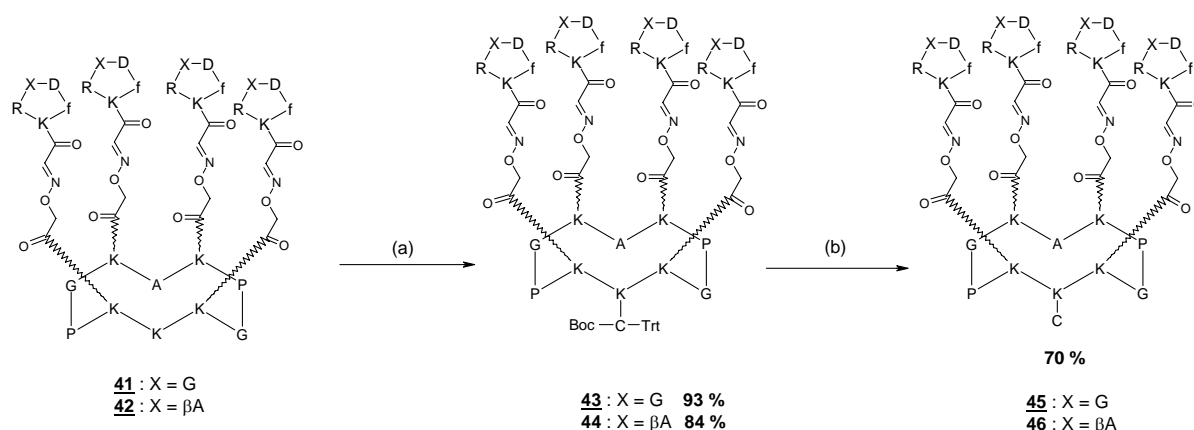


Figure 50 : Schéma de la réaction « *One Pot* » de déprotection des fonctions oxyamine du RAFT et de couplage des c[-RXDfK(CO-CHO)-].

Les précurseurs peptidiques protégés **22** ou **25** sont couplés avec les aldéhydes **36** ou **37** par liens éther d'oxime dans une solution de TFA concentrée (70%) en présence d'eau, nécessaire à la déprotection des fonctions oxyamine. La réaction est réalisée en utilisant un excès de composés **36** ou **37** (2 eq./site oxyamine). La réaction est complète au bout de vingt minutes et les produits sont ensuite purifiés par CLPH afin de séparer les excès de dérivés aldéhyde. Les conjugués **41** et **42** sont obtenus avec des rendements de l'ordre de 50-70 % et ont été caractérisés par spectrométrie de masse électrospray en mode positif. La réaction conduisant au composé **42** n'a été réalisée qu'une seule fois sur une petite quantité expliquant la différence de rendement avec le composé **41** dont la synthèse et le traitement ont été optimisés.

La nouvelle voie de synthèse « *One-Pot* » présente de nombreux avantages sur la voie de synthèse classique. D'une part, elle permet de réaliser deux réactions en une seule étape et d'éliminer une purification intermédiaire, d'autre part, elle diminue les temps de réaction au cours desquels les fonctions oxyamine sont libres. Cette voie de synthèse limite ainsi les réactions secondaires sur les fonctions oxyamine. La réaction « *One Pot* » permet donc la synthèse des intermédiaires clés de la synthèse de nos conjugués pour la cancérologie **41** et **42** avec un bon rendement allant jusqu'à 70 % (contre environ 10-15 % pour la synthèse classique).

L'intermédiaire **41**, RAFT(c[-RGDfK-]₄), sera utilisé directement pour le couplage des agents de détection par un lien stable amide. Contrairement, les agents thérapeutiques ne sont pas couplés directement à **41** et **42** car nous avons choisi une conjugaison *via* un pont disulfure labile en conditions intracellulaires réductrices permettant le relargage de l'élément effecteur. La mise en place du lien disulfure entre le vecteur multivalent RAFT(c[-RGDfK-]₄) et les différents éléments thérapeutiques implique la fonctionnalisation de la face inférieure du RAFT avec une fonction thiol. Cette fonction thiol est introduite par l'intermédiaire du couplage peptidique de résidus cystéines protégés : BocCys(Trt) (composés **44** et **43** - Figure 51) ou BocCys(Npys) (composés **47** et **48** - Figure 53). Ces fonctions thiol peuvent jouer un rôle de nucléophile lorsqu'elles sont libres (**45** et **46**) ou d'électrophile lorsqu'elles sont activées par le groupement NPys (**49** et **50**).



Réactifs : (a) BocC(Trt), PyBOP, DIPEA, DMF; (b) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5)

Figure 51 : Schéma de synthèse des composés multivalents **45** et **46**.

Les composés **45** et **46** sont obtenus en deux étapes (couplage peptidique de BocC(Trt) puis déprotection) à partir des intermédiaires **41** et **42**. Ils sont obtenus après purification avec des rendements globaux de l'ordre de 60 % et ont été caractérisés par spectrométrie de masse électrospray en mode positif (Figure 52).

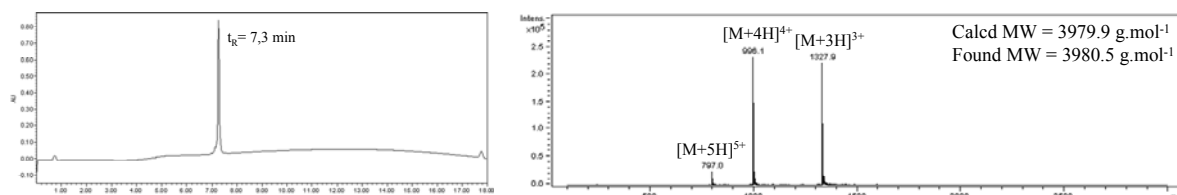
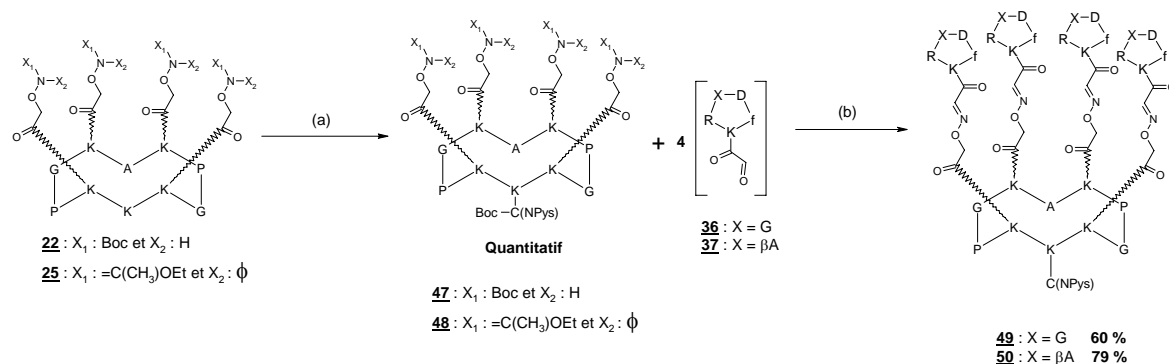


Figure 52: Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé **45**.

La synthèse des composés **49** et **50** nous a permis de valider une autre stratégie de synthèse dans laquelle le couplage peptidique de la BocC(NPys) est réalisé avant le couplage chimiosélectif des ligands -RGD- au châssis RAFT (Figure 53).



Réactifs : (a) BocC(NPys), PyBOP, DIPEA, DMF; (b) TFA/H₂O (7/3)

Figure 53 : Schéma de synthèse des composés multivalents **49** et **50**.

Les composés **49** et **50** sont obtenus en deux étapes (couplage peptidique de BocC(NPys) puis réaction « One-Pot ») après purification à partir des intermédiaires **22** et **25**. Ils sont obtenus avec des rendements de 60 à 80 % et ont été caractérisés par spectrométrie de masse électrospray en mode positif (Figure 54).

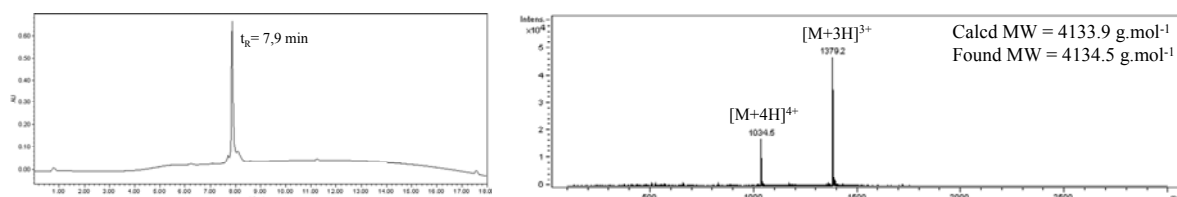
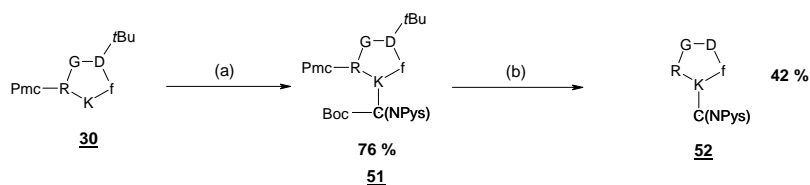


Figure 54: Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé **49**.

Cette méthode, nous permettant d'accéder aux composés **49** et **50** avec d'excellents rendements globaux, s'est avérée particulièrement intéressante d'un point de vue synthétique et a été utilisée pour la synthèse de grosses quantités de nos conjugués pour des études pré-cliniques.

Nous avons également synthétisé l'intermédiaire clef monovalent **52** pour la construction des molécules contrôles nécessaires aux expériences biologiques (Figure 55). Celui-ci est obtenu en deux étapes à partir du cyclopentapeptide partiellement protégé **30**. La fonction thiol est introduite par l'intermédiaire du couplage peptidique d'un résidu BocCys(Npys). Le composé **51** obtenu est ensuite déprotégé en milieu acide permettant d'accéder au cyclopentapeptide fonctionnalisé **52**.



Réactifs : (a) BocC(NPys), PyBOP, DIPEA, DMF; (b) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5)

Figure 55 : Schéma de synthèse du cyclopentapeptide c[-RXDfK(C(Npys))-] pour la thérapie.

Le composé **52** est obtenu avec un rendements de l'ordre de 30 %. La réaction conduisant à ce composé n'ayant été réalisée qu'une seule fois, la synthèse et le traitement du composé restent à optimiser. Le composé **52** a été caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif avec la présence de l'ion moléculaire [M+H]⁺ à 861,4 g.mol⁻¹ (M_{calc} = 860,3 g.mol⁻¹)(Figure 56).

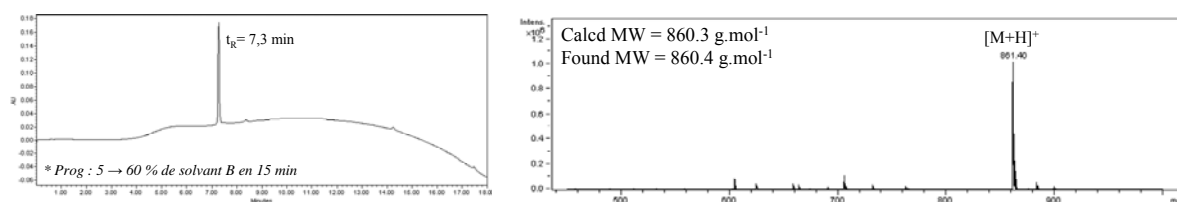


Figure 56: Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé **52**.

A.6. RESUME

La synthèse de nos vecteurs multivalents RAFT(c[-RGDfK-]₄) résulte d'une synthèse mixte sur support et en solution. Nous avons optimisé les voies de synthèse classique de nos vecteurs multivalents notamment grâce à une réaction « One Pot » et à l'utilisation lors de la SPPS de nouveaux acides aminés modifiés que nous avons récemment développés (Figure 57). Toutes ces améliorations nous permettent aujourd'hui la synthèse de nos vecteurs à grande échelle.

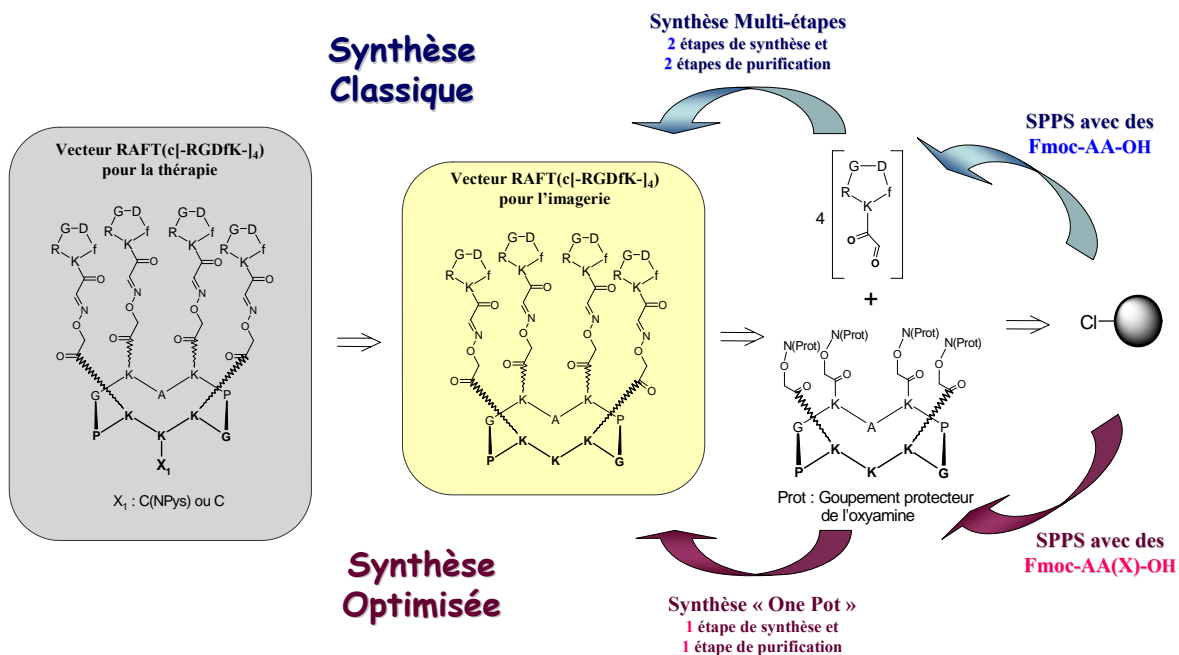


Figure 57 : Schéma rétro-synthétique des différentes voies de synthèse RAFT(c[-RXDfK-]₄) pour la cancérologie.

Par ailleurs, les analyses des produits de réaction ont permis de vérifier la compatibilité des nouveaux acides aminés avec la SPPS et de montrer le bénéfice de l'utilisation du groupement 1-éthoxyéthylidène par rapport à d'autres groupements protecteurs conventionnels de la fonction oxyamine décrits dans la littérature. Le ligand tétravalent ainsi synthétisé RAFT(c[-RGDfK-]₄) **41** peut être utilisé directement pour sa conjugaison à des agents de détection et d'imagerie. La fonctionnalisation de ce dernier par une cystéine permet d'obtenir les conjugués **45** et **49** destinés à la vectorisation suivie du relargage cellulaire de l'élément thérapeutique.

B. Synthèse et Caractérisation des Conjugués pour l'Imagerie Tumorale

B.1. Conception des Conjugués pour l'Imagerie

La seconde partie des travaux de synthèse est consacrée à la conjugaison du vecteur multivalent avec divers agents de détection. Ces conjugués sont destinés à des applications d'imagerie non-invasive chez le petit animal et à des études biologiques caractérisant les propriétés de notre vecteur multivalent. Les agents de détection sont associés au RAFT(c[-RGDfK-]₄) sur sa face inférieure par un lien amide stable en conditions physiologiques.

B.1.1. Objectif des Travaux

★ Synthèse de conjugués pour l'imagerie non invasive du petit animal

Les résultats antérieurs obtenus en imagerie optique sur des modèles murins avec le RAFT(c[-RGDfK-]₄) conjugué à la Cyanine 5 montrent son efficacité pour le ciblage de la nouvelle vascularisation tumorale ainsi que des métastases de statut $\alpha_v\beta_3$ positif.¹⁵³ Ces résultats nous ont amenés à synthétiser d'autres conjugués analogues présentant des éléments d'imagerie plus performants. Ces conjugués résultent du couplage des chromophores au niveau de la face inférieure de l'intermédiaire clef de synthèse RAFT(c[-RGDfK-]₄) **41** (Figure 58).

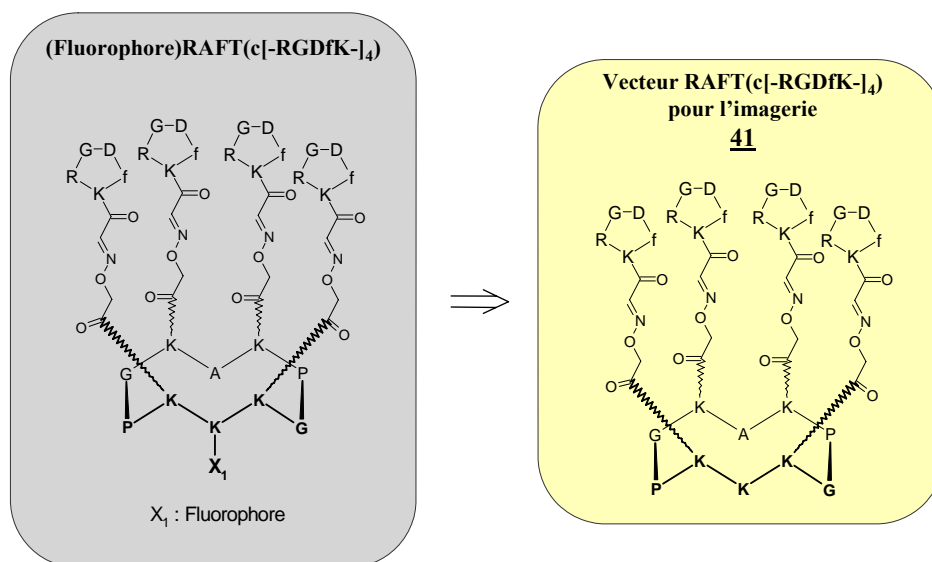


Figure 58 : Schéma rétro-synthétique du conjugué (Fluorophore)RAFT(c[-RGDfK-]₄).

La détection particulièrement sensible de ces chromophores par les appareillages sophistiqués de tomographie 3D de fluorescence proche infrarouge permet leur localisation très précise (Figure 59).

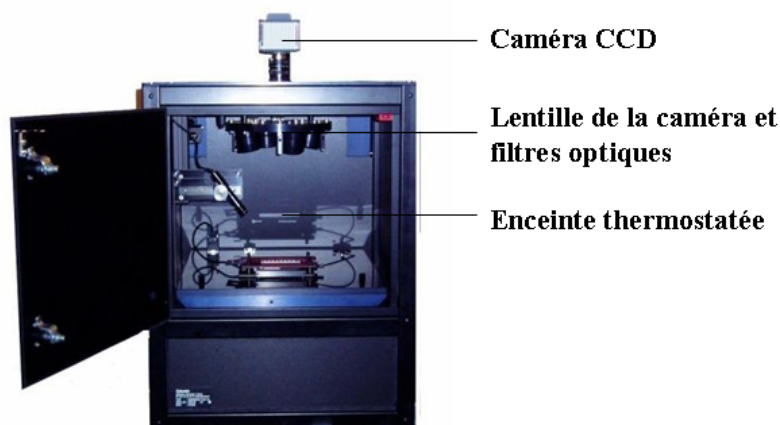


Figure 59 : Photo de l'instrumentation de tomographie de fluorescence proche infrarouge 3D du petit animal.

★ Synthèse de conjugués pour l'étude des propriétés biologiques du RAFT(c[-RGDfK-]₄)

Les résultats obtenus précédemment ont montré l'efficacité de ciblage des cellules de statut $\alpha_v\beta_3$ positif par le conjugué (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-]₄) et l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans l'internalisation de nos composés multivalents. Cela nous a permis d'envisager l'utilisation de ce composé fluorescent pour :

- déterminer la voie d'entrée cellulaire de notre vecteur parmi les différents mécanismes d'endocytose possibles,
- étudier son trafic cellulaire.

Différentes voies d'endocytose peuvent être à l'origine de l'entrée cellulaire de notre vecteur multivalent : la pinocytose et les endocytoses médiées par des récepteurs, impliquant l'intervention de protéines structurales telles que les clathrines ou les cavéoles (Figure 60).

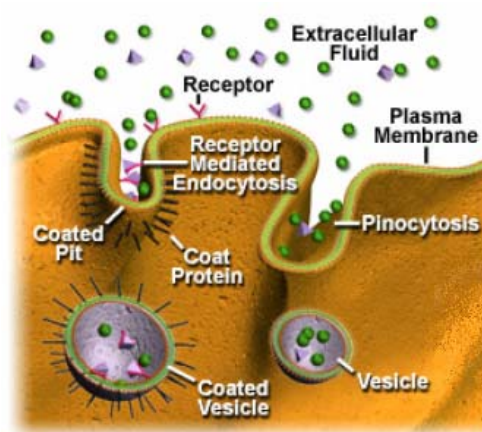


Figure 60 : Schéma des mécanismes de la pinocytose et des endocytoses médiés par les récepteurs.²⁰⁸

Pour étudier la voie d'internalisation de notre vecteur, nous avons synthétisé le conjugué (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-]₄). Il est préparé à partir de la Cyanine 5 et de l'intermédiaire clef de synthèse **41**, le RAFT(c[-RGDfK-]₄) (Figure 58).

²⁰⁸ Molecular Expression *Endosomes and Endocytosis*,
<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/endosomes/endosomes.html>.

Par ailleurs, nous avons également préparé des molécules biotinylées afin de quantifier l'entrée cellulaire de nos vecteurs multivalents. F. Burlina et coll. ont récemment appliqué la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) à la mesure de l'entrée cellulaire de CPP biotinylés.^{209,210} Cette méthode repose sur l'utilisation d'éléments biotinylés qu'il est possible de récupérer après internalisation. Par l'ajout d'une quantité connue d'un étalon interne, un isotope stable deutéré de l'élément à doser, il est possible de quantifier par spectrométrie de masse MALDI-TOF l'élément biotinylé internalisé. En effet, ayant des structures chimiques identiques, les deux peptides deutérés ou non ont les mêmes propriétés de desorption/ionisation et de détection mais se distinguent par leur différence de masse moléculaire. Ainsi l'intensité relative des signaux $[M+H]^+$ des éléments biotinylés correspond à leur proportion relative dans le mélange.

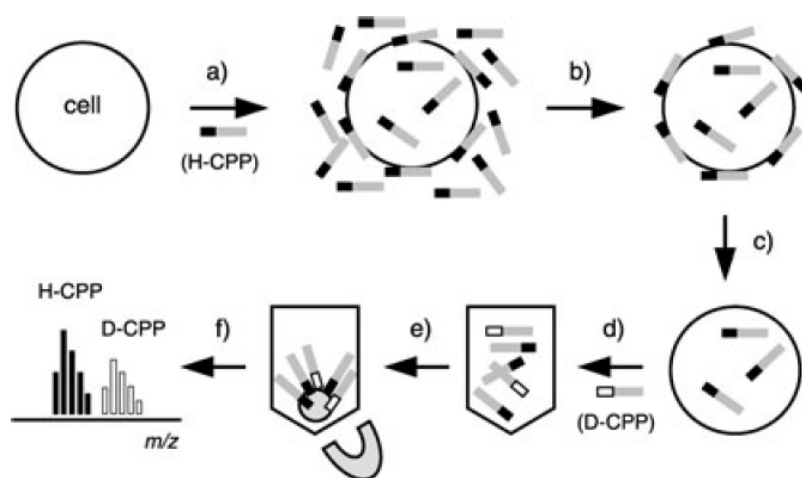


Figure 61 : Schéma de principe de la quantification par MALDI-TOF de l'entrée cellulaire de CPP.²¹⁰

Dans cette méthode de quantification par spectrométrie de masse, des cellules sont incubées avec l'élément non deutéré (H-CCP) dont on veut doser l'entrée cellulaire (a).²¹¹ Les cellules sont ensuite lavées (b), puis un traitement à la trypsine permet la digestion des H-CCP associés à la membrane (c). Une quantité appropriée d'étalon standard interne (D-CCP) est ajoutée et les cellules sont ensuite lysées grâce à un traitement chimique et thermique (d). Les peptides biotinylés sont alors capturés à l'aide de billes magnétiques recouvertes de streptavidine (e). Les billes sont ensuite lavées et les éléments biotinylés sont analysés par MALDI-TOF (f).²¹¹ Le ratio entre les aires des signaux $[M+H]^+$ des peptides des éléments biotinylés deutérés ou non est proportionnel à la quantité absolue d'éléments D-CCP et H-CCP. Il est alors possible connaissant la quantité d'étalon interne ajoutée, de déduire la quantité de l'élément internalisé. Il est également intéressant de noter que l'élimination de l'étape de traitement à la trypsine de ce protocole permet de déterminer la quantité globale de peptides associés à la membrane et internalisés afin d'évaluer la proportion de molécules associée à la membrane cellulaire.

Afin de réaliser cette étude de quantification de l'entrée cellulaire de notre vecteur multivalent dans des cellules de statut $\alpha_v\beta_3$, nous avons synthétisé différentes molécules

²⁰⁹ Aussedat, B.; Sagan, S.; Chassaing, G.; Bolbach, G.; Burlina, F. Quantification of the efficiency of cargo delivery by peptidic and pseudo-peptidic Trojan carriers using MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758*, 375-383.

²¹⁰ Burlina, F.; Sagan, S.; Bolbach, G.; Chassaing, G. Quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides by MALDI-TOF mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 4244-4247.

²¹¹ Girault, S.; Chassaing, G.; Blais, J. C.; Brunot, A.; Bolbach, G. Coupling of MALDI-TOF mass analysis to the separation of biotinylated peptides by magnetic streptavidin beads. *Anal Chem* **1996**, *68*, 2122-2126.

biotinylées possédant une étiquette isotopique composée de quatre glycines non deutérées ou deutérées pour le standart interne. Nous avons donc mis en place une stratégie de synthèse des vecteurs multivalents (Biotine)RAFT(c[-RGDfK-]₄), des molécules contrôles c[-RGDfK(Biotine)-] et (Biotine)RAFT(c[-RGDfK-]₁) présentant un bras espaceur classique H-(G)₄ ou deutéré D-(G)₄ (Figure 62).

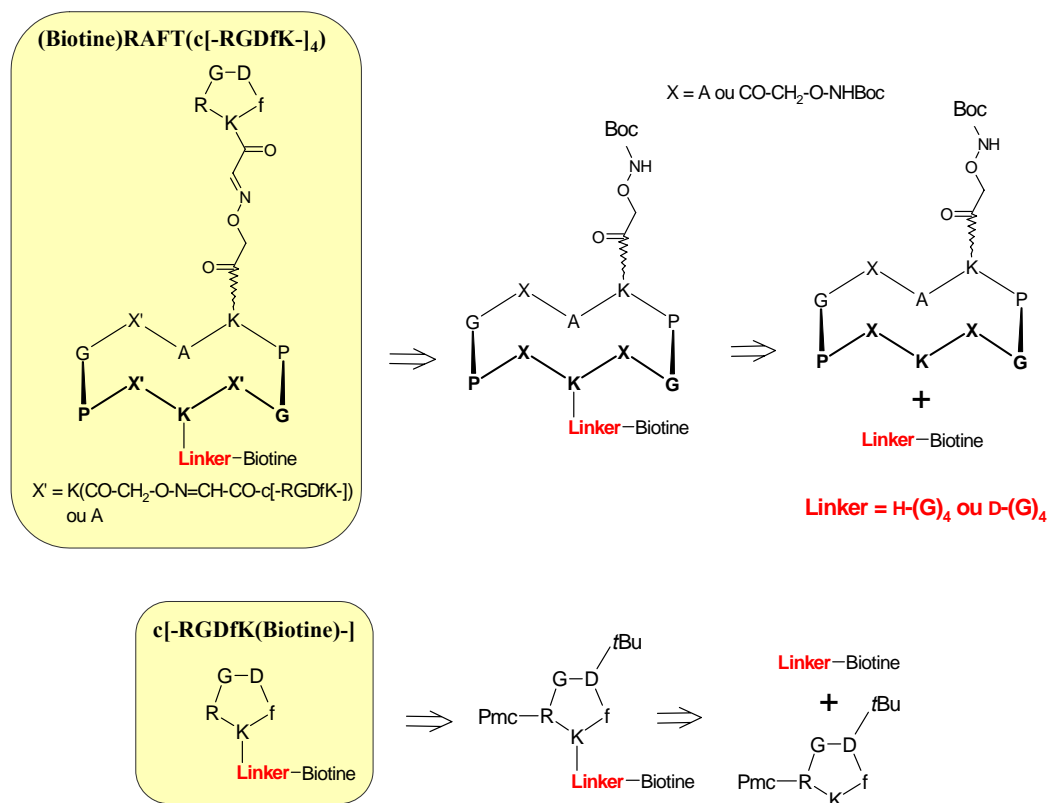


Figure 62 : Schémas rétro-synthétiques des molécules biotinylées.

En ce qui concerne la synthèse des composés (Biotine)RAFT(c[-RGDfK-]_n) (n= 4 ou 1), l'introduction du « linker » biotinylé sur la face inférieure du RAFT est réalisée avant le couplage chimiosélectif des ligands c[-RGDfK-] (Figure 62). Cette stratégie de synthèse non conventionnelle, ne faisant pas intervenir l'intermédiaire clef de synthèse RAFT(c[-RXDfK-]_n) pour l'imagerie, est liée à la nature même de la biotine et aux problèmes de solubilité qu'elle entraîne. Dans le cas de la synthèse de la molécule contrôle c[-RGDfK(biotine)-], le « linker » biotinylé est introduit sur le cyclopentapeptide partiellement protégé (Figure 62).

B.1.2. Choix des Molécules de Détection

★ Cyanine 5

Les sondes cyanylées appartiennent à une famille de chromophores présentant un groupe polyméthine et sont solubles dans les milieux aqueux. La Cyanine 5 est une sonde possédant des propriétés de fluorescence dans l'IR (proche IR ou IR lointain). Ce type de fluorophore a largement contribué au développement des techniques d'imagerie optique *in vivo* comme l'imagerie et la tomographie de fluorescence. En effet, leur émission de fluorescence dans le domaine spectral compris entre 650 et 800 nm présente de nombreux avantages. Les rayonnements IR sont faiblement absorbés par les tissus et les liquides biologiques par rapport aux rayonnements émis dans le visible. Ils permettent alors de

détecter des couches plus profondes de l'organisme. Par ailleurs, les interférences avec la lumière incidente d'excitation dissipée sont faibles et les photons des gammes de longueurs d'onde employées sont non-ionisants. Commercialement vendue sous forme d'ester activé, la Cyanine 5 (Cy5, $\lambda_{\text{abs}} = 649 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$) est facilement conjuguée au niveau d'une fonction amine libre (Figure 63). Le principal inconvénient de ce fluorochrome est son coût extrêmement élevé mais également un risque potentiel de formation d'agrégats non fluorescents ainsi qu'une stabilité chimique modérée (sensibilité à la lumière).²¹²

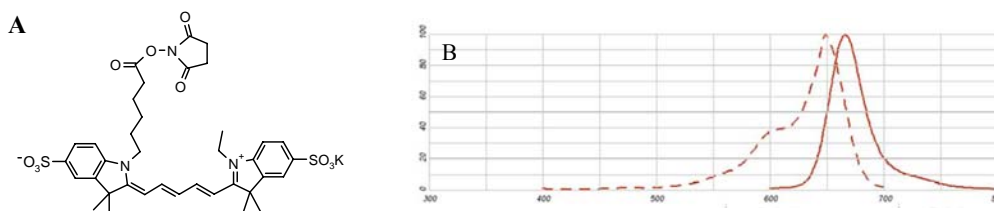


Figure 63 : A/ Schéma de Cy5-NHS ; B/ Spectres d'absorption (pointillé) et d'émission (plein) de Cy5-NHS.²¹³

★ Alexa Fluor[®] 700 et 750

Les fluorophores Alexa Fluor[®] proviennent de la sulfonation de chromophores tels que la coumarine, la rhodamine ou encore le xanthène. Ils font partie des chromophores les plus performants actuellement commercialisés.²¹⁴ D'une brillance plus intense que les autres chromophores, ils sont plus photostables et résistants à la précipitation. Ils présentent également une excellente solubilité aqueuse et une stabilité sur une large gamme de pH. Les sondes Alexa Fluor[®] 700 et 750 ont des propriétés de fluorescence dans l'infrarouge présentant les avantages décrits précédemment pour la Cyanine 5. Commercialement vendue sous la forme d'ester activé, les sondes Alexa Fluor[®] 700 (Alexa 700 excitation avec un laser à diode IR, $\lambda_{\text{abs}} = 696 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 719 \text{ nm}$) et Alexa Fluor[®] 750 (Alexa 750, excitation avec une lampe xénon, $\lambda_{\text{abs}} = 752 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 779 \text{ nm}$) peuvent être conjuguées *via* une fonction amine libre (Figure 64). Les inconvénients de ces fluorochromes sont leurs coûts extrêmement élevés ainsi que leurs structures protégées et non communiquées.

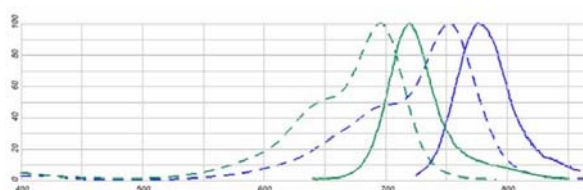


Figure 64 : Spectres d'absorption (pointillé) et d'émission (plein) d'Alexa Fluor[®] 700-NHS (vert) et d'Alexa Fluor[®] 750-NHS (bleu).²¹³

²¹² Flanagan, J. H., Jr.; Khan, S. H.; Menchen, S.; Soper, S. A.; Hammer, R. P. Functionalized tricyanocyanine dyes as near-infrared fluorescent probes for biomolecules. *Bioconjug Chem* **1997**, *8*, 751-756.

²¹³ Invitrogen *Fluorescence Spectra Viewer*, <http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/>.

²¹⁴ Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P.; Bishop-Stewart, J.; Bhalgat, M., K.; Millard, P. J.; Mao, F.; Leung, W.-Y.; Haugland, R. P. Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *J Histochem Cytochem* **1999**, *47*, 1179-1188.

★ Biotine

La biotine est fréquemment utilisée comme étiquette pour la détection de molécules d'intérêt. Possédant une très forte affinité pour l'avidine ($K_d = 10^{-15}$ M) et la streptavidine ($K_d = 10^{-13}$ M), l'interaction non covalente extrêmement forte entre la biotine et ses chélateurs naturels est souvent employée dans des protocoles de fonctionnalisation de surfaces, de purification (chromatographie d'affinité) ou d'échafaudages moléculaires (immunomarquages indirects). Dans nos travaux, nous exploitons la très forte affinité de la biotine pour la streptavidine pour séparer nos molécules biotinylés d'un mélange complexe de lysas cellulaire au moyen de billes recouvertes de streptavidine. D'un point de vue synthétique, la biotine possède une fonction acide carboxylique qui permet son incorporation sur une fonction amine libre. La fonction acide n'étant pas activée, la réaction d'acylation doit alors être réalisée en présence d'un agent de couplage.

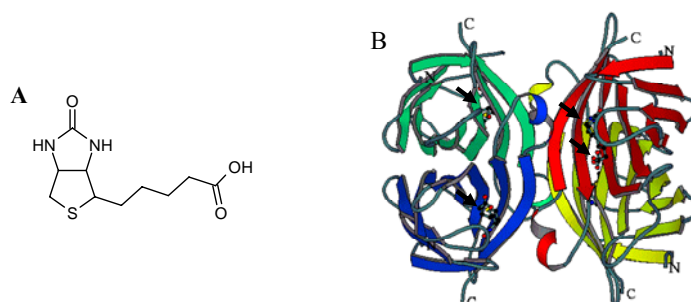


Figure 65 : A/ Structure de la biotine ; B/ Schéma de la streptavidine associée à quatre molécules de biotine (flèches noires).²¹⁵

B.2. Synthèse des Conjugués (Marqueur)RAFT(c[-RGDfK-]₄)

B.2.1. Synthèse des Conjugués aux Fluorophores

★ Alexa Fluor® 700 et 750

Les composés RAFT(c[-RGDfK-]₄) conjugués aux chromophores Alexa Fluor® 700 et 750 sont obtenus en une étape de synthèse à partir de l'intermédiaire **41**, RAFT(c[-RGDfK-]₄) (Figure 66). Le couplage de ces chromophores par un lien stable amide est rendu possible par l'utilisation d'une forme chimiquement active des agents fluorescents (les esters activés Alexa 700-NHS et Alexa 750-NHS). Dans des conditions légèrement basiques, l'amine libre de l'intermédiaire **41** est acylée à partir de l'acide carboxylique activé des composés Alexa. La réaction est réalisée dans du DMF anhydre en utilisant les réactifs en quantités stoechiométriques ou en utilisant un léger excès du composé **41** (1,1 eq.).

²¹⁵ Freitag, S.; Le Trong, I.; Klumb, L.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. Structural studies of the streptavidin binding loop. *Protein Sci* **1997**, *6*, 1157-1166.

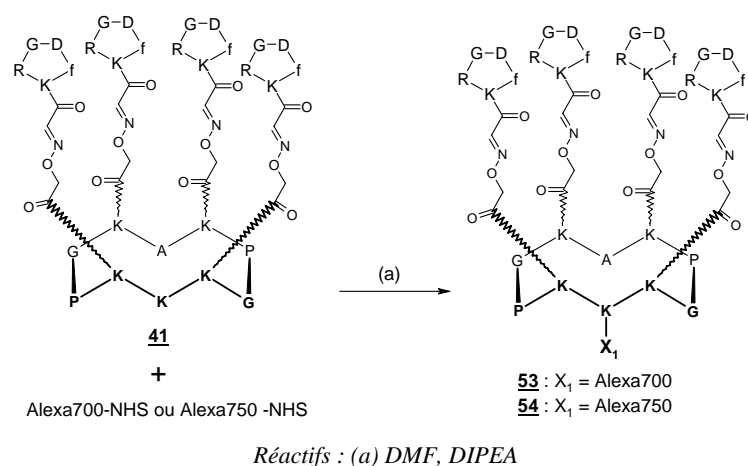


Figure 66 : Schéma de synthèse des ligands multivalents (Alexa)RAFT(c[-RGDfK-]₄).

Les réactions sont complètes au bout de 3 à 8 heures et les produits sont ensuite purifiés par CLPH. Malgré des avancements de réaction très corrects, les conjugués **53** et **54** sont obtenus avec des rendements moyens de l'ordre de 20-60 %. Cela est probablement dû à la formation d'agrégats en cours de réaction entraînant des difficultés de purification. Ces composés purifiés ont été obtenus avec une excellente pureté (Figure 67). Ils ont été caractérisés par spectrométrie de masse électrospray en mode positif par la présence des ions multichargés. Après déconvolution, la masse obtenue ($M = 4848,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) est en accord avec la masse théorique ($M = 4847,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

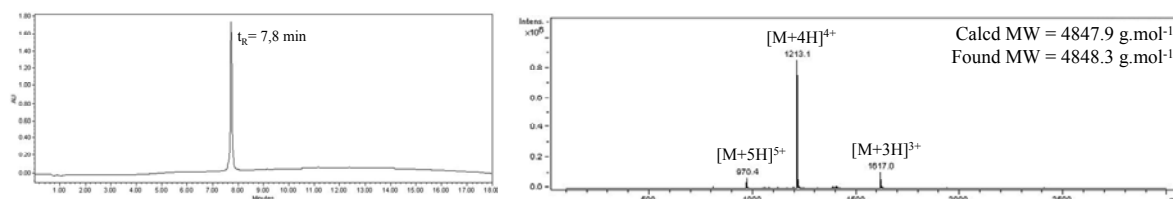


Figure 67 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé **53**.

★ Cyanine 5

Le composé RAFT(c[-RGDfK-]₄) conjugué à la Cyanine 5 est également obtenu en une étape de synthèse à partir de l'intermédiaire **41** (Figure 68). Le couplage de ce chromophore par un lien amide est rendu possible par l'utilisation de la Cy5-NHS. Dans des conditions légèrement basiques, l'amine libre de l'intermédiaire **41** est acylée à partir de l'acide carboxylique activé du composé cyanilé. La réaction est réalisée dans du DMF anhydre en utilisant un léger excès du composé **41** (1,2 eq.).

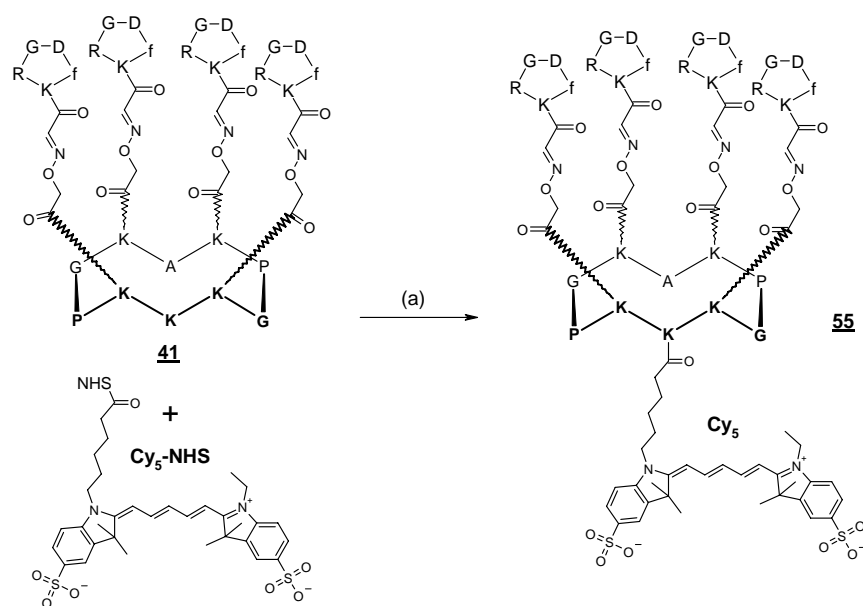


Figure 68 : Schéma de synthèse du ligand multivalent (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-]₄).

La réaction est complète au bout de 3 heures. Le produit **55** est ensuite purifié par CLPH et est obtenu avec un rendement de 67 % avec là aussi une excellente pureté. Il a été caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif (Figure 69).

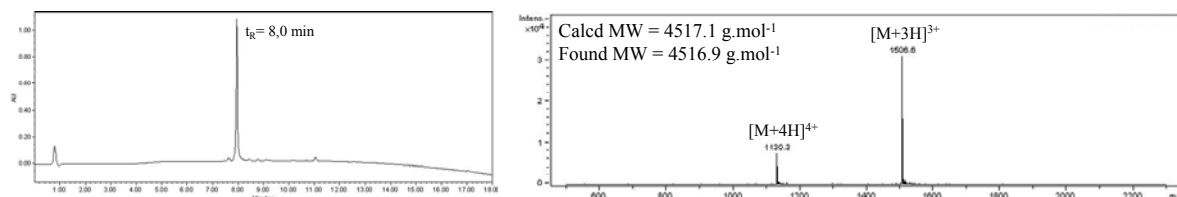


Figure 69 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé **55**.

B.2.2. Synthèse des Conjugués à la Biotine

La synthèse des composés (Biotine)RAFT(c[-RGDfK-]_n) fait intervenir dans un premier temps l'introduction des bras espaceurs biotinylés deutérés **56** ou non **57** sur la face inférieure des RAFT **22** ou **62** (Figure 71). Les bras espaceurs sont composés de quatre glycines permettant d'obtenir une différence de masse suffisante pour les expériences d'analyse de spectrométrie de masse ($\Delta = +8 \text{ g.mol}^{-1}$ entre les composés deutérés ou non). Le composé **62** est l'analogue monovalent du RAFT **22** et a été synthétisé en suivant les mêmes protocoles. Le couplage des bras espaceurs biotinylés est réalisé en une demi-heure en conditions basiques avec un léger excès de PyBOB (1,2 eq.).

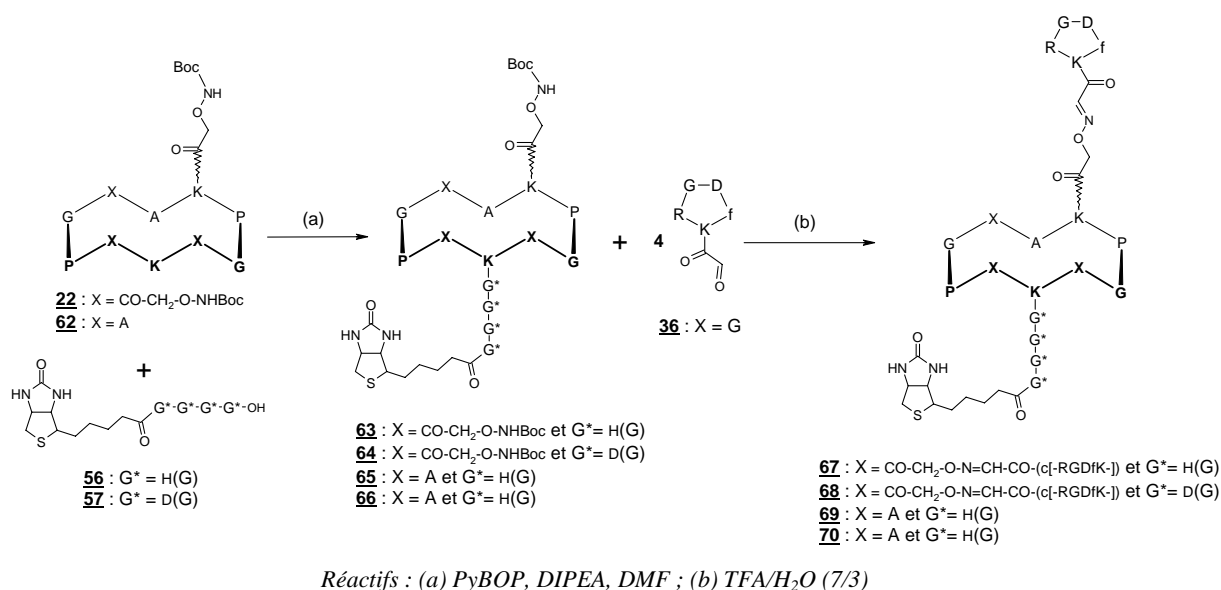


Figure 70 : Schéma de synthèse des composés (Biotine-linker)RAFT(c[-RXDfK-]₄).

Les peptides **63**, **64**, **65** et **66**, obtenus après évaporation du DMF sous pression réduite et précipitation à l'éther, sont directement utilisés pour le couplage « One-Pot » du ligand **36**. Cette dernière réaction est réalisée en présence d'un excès de ligands (2eq./par site oxyamine) dans une solution de TFA/H₂O (7/3). Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes et les produits sont purifiés par CLHP. Les conjugués **67**, **68**, **69** et **70** sont obtenus avec des rendements globaux de l'ordre de 35-50 %. Ces rendements moyens sont le résultat d'une perte de peptides lors de l'étape de purification. Celle-ci peut être liée à une mauvaise solubilisation des peptides biotinylés et à des problèmes d'agrégation de ces peptides sur la colonne de purification. Ces composés ont été caractérisés par spectrométrie de masse électrospray en mode positif (Figure 71).

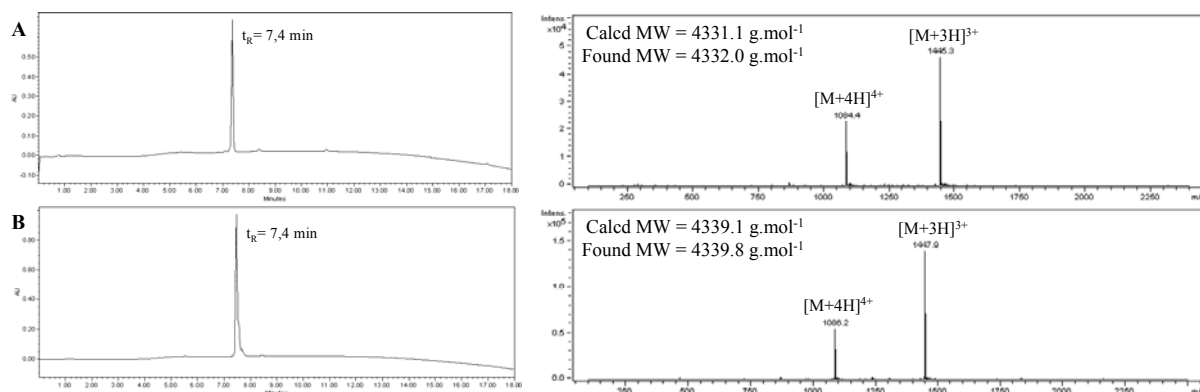


Figure 71 : Chromatogrammes CLHP et spectres de masse ESI : A/ du composé **67** ; B/ du composé **68**.

La synthèse de la molécule contrôle c[-RGDfK(biotine)-] est réalisée en deux étapes. Dans un premier temps les « linker » biotinylés **56** ou **57** sont introduits sur le cyclopentapeptide partiellement protégé **30** dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le RAFT **67** (Figure 72).

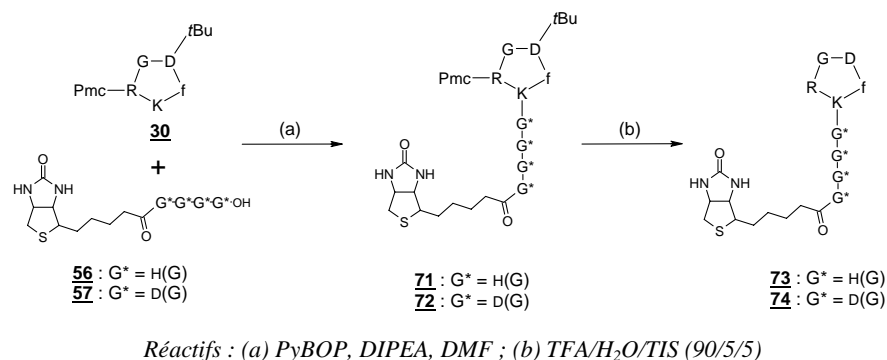


Figure 72 : Schéma de synthèse des ligands -RGD- biotinylés 73 et 74.

Les peptides 71 et 72 sont ensuite déprotégés dans une solution de TFA/TIS/H₂O (90/5/5) pendant deux heures. Les peptides déprotégés 73 et 74 sont alors purifiés par CLHP. Ces conjugués sont obtenus avec des rendements globaux inférieurs à 15 %. Ces peptides, très peu solubles dans des solutions H₂O/CH₃CN, doivent très probablement s'agréger sur la colonne de purification en phase inverse. En effet, par rapport à l'intensité d'absorbance lors des injections analytiques, les intensités d'absorbance obtenues lors de la purification sont très inférieures aux intensités attendues. Afin d'optimiser cette étape de purification, il sera envisageable d'utiliser une phase normale. Ces composés ont été caractérisés par spectrométrie de masse électrospray en mode positif (Figure 73).

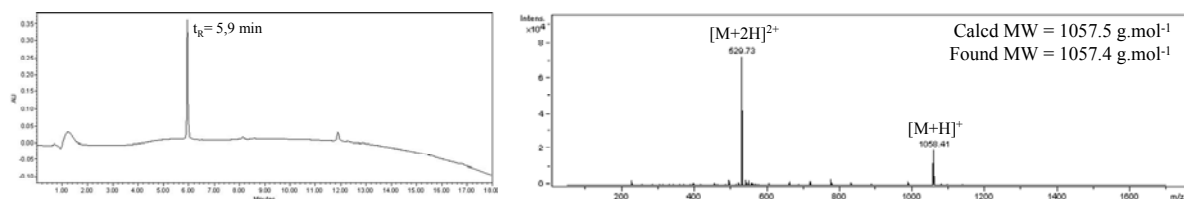


Figure 73 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé 73.

B.3. Etudes Biologiques

L'évaluation des conjugués pour l'imagerie tumorale a été réalisée par le Dr. V. Jossierand et l'étude de l'internalisation de notre vecteur par le Dr. L. Sancey (INSERM U823, Institut Albert Bonniot). La quantification de l'entrée cellulaire du RAFT(c[-RGDfK-]₄) sur différentes lignées dont HEK293(β3) est en cours et est réalisée en collaboration avec le Dr. F. Burlina (UMR CNRS 7613, Université Pierre et Marie Curie).

B.3.1. Etude des caractéristiques du Ligand Multivalent RAFT(c[-RGDfK-]₄)

★ Evaluation de l'affinité et de la spécificité de RAFT(c[-RGDfK-]₄)

La spectroscopie à corrélation de fluorescence a été utilisée pour évaluer l'affinité et la spécificité de notre vecteur pour l'intégrine α_vβ₃. Cette technique d'imagerie, basée sur la mesure de l'intensité de fluorescence et l'analyse de ses fluctuations, permet une évaluation du temps de diffusion des conjugués (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-]₄) 55 et c[-RGDfK(Cy5)-]¹⁵³ en présence de l'intégrine α_vβ₃ soluble et en compétition avec les peptides non marqués. Cette méthode a permis de confirmer que le vecteur multimérique a une affinité 10 fois plus importante pour l'intégrine α_vβ₃ que le cyclopentapeptide

(constante de dissociation K_D respectivement de 3,9 nM contre 41,4 nM). L'affinité de notre vecteur multivalent a également été testée pour une autre intégrine, $\alpha_V\beta_1$, et a permis de déterminer un K_D de 1147 nM : notre vecteur est 300 fois moins affiné pour l'intégrine $\alpha_V\beta_1$ que pour $\alpha_V\beta_3$. Cette étude confirme la très bonne affinité et la grande spécificité de notre vecteur pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.

★ Etude de l'internalisation et trafic cellulaire de RAFT(c[-RGDfK-]₄)

Les mécanismes d'internalisation du conjugué cyanilé **55** ainsi que son trafic intracellulaire ont été étudiés en imagerie confocale sur des cellules vivantes HEK293(β_3) (Figure 74). Ces cellules de statut $\alpha_V\beta_3$ positif proviennent d'épithélium de rein embryonnaire humain. Les études montrent l'internalisation du composé **55** dans des petites vésicules et sa présence au niveau des jonctions cellulaires ainsi qu'à l'intérieur du cytoplasme. En présence d'amantadine (inhibiteur de la voie d'endocytose dépendant des clathrines), l'internalisation du composé multivalent **55** est inhibée, alors qu'en présence de nystatine (inhibiteur de la voie des cavéoles), celle-ci a lieu malgré la rétractation des cellules (Figure 74).

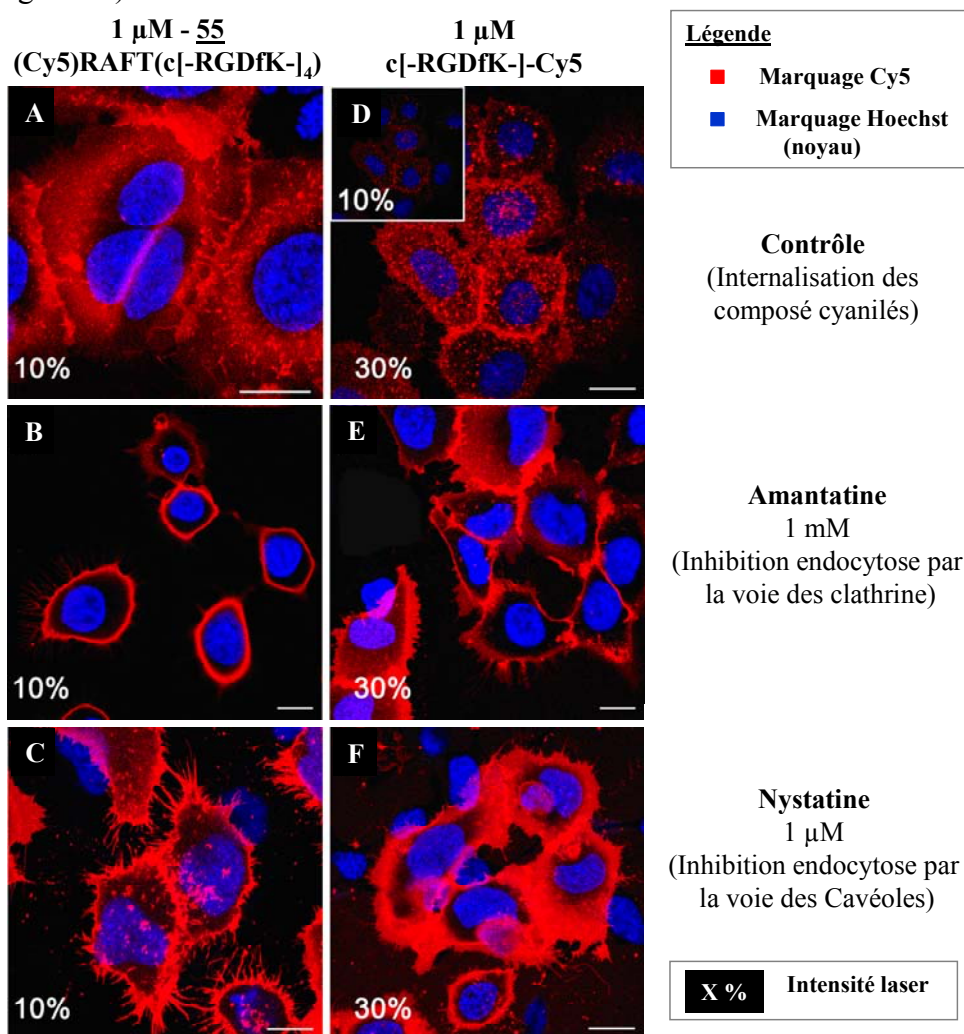


Figure 74 : Photos d'imagerie confocale de **55** (A-C) et de c[-RGDfK-] (D-F) chez Hek293(β_3) après 10 min d'incubation (Echelle 10 μ m).

En ce qui concerne l'internalisation de c[-RGDfK-] cyanilé, quelques soient les conditions testées, elle est toujours plus faible (nécessité d'augmenter l'intensité du laser) que celle du vecteur multivalent **55**. Le c[-RGDfK-] cyanilés est internalisé essentiellement

dans de petites vésicules et se localise également au niveau des jonctions cellulaires. Contrairement au composé **55**, l'internalisation de c[-RGDfK-] cyanilé n'est pas perturbée par la présence des inhibiteurs d'endocytose des voies des clathrines ou des cavéoles.

Afin de conforter ces premiers résultats, des expériences complémentaires d'imagerie confocale sur cellules vivantes ont été réalisées, en présence de transferrine (TrF), de Toxine B du choléra (CTB) ou de Dextran (Dex) respectivement marqueurs de la voie des clathrines, des cavéoles ou de la macropinocytose (Figure 75).

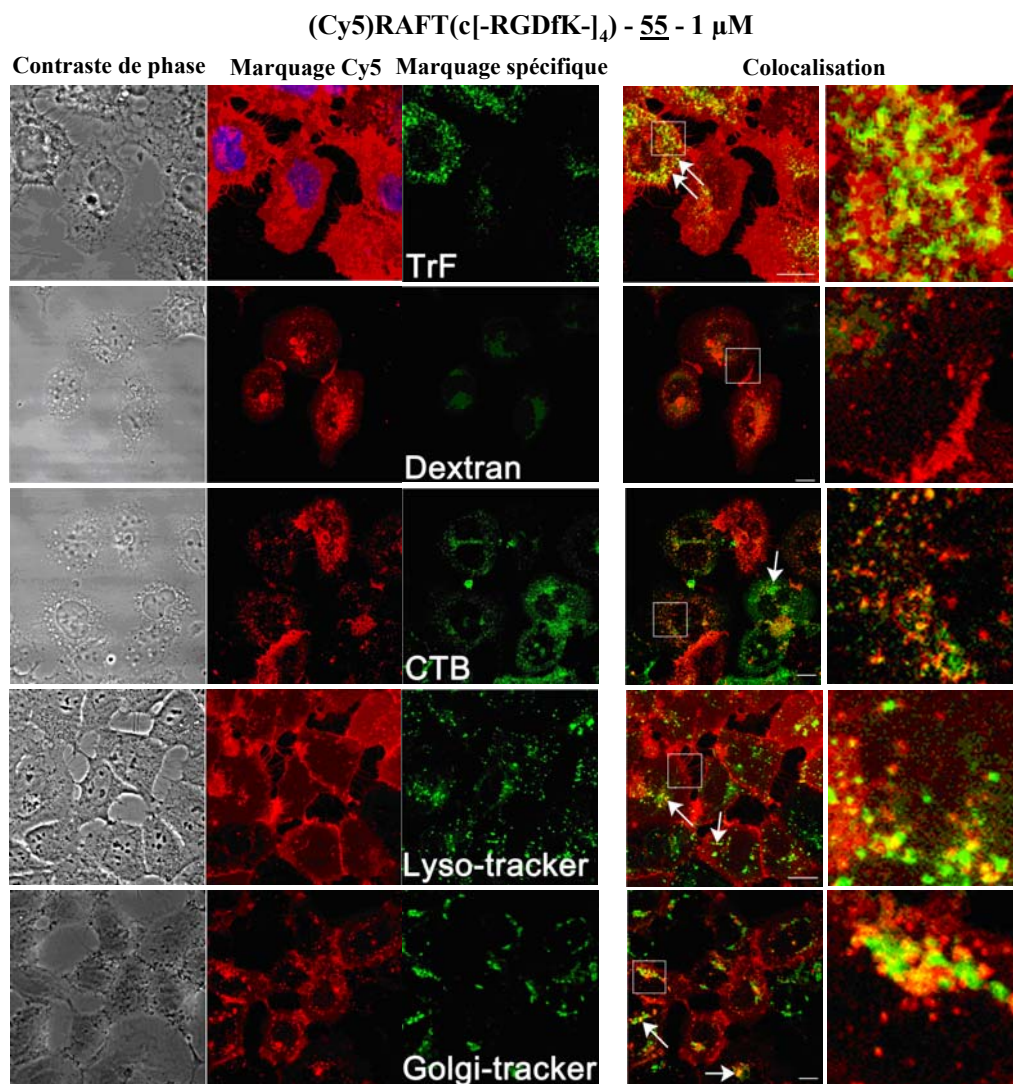


Figure 75 : Clichés d'imagerie confocale de **55** en présence de différents marqueurs de mobilité cellulaire chez Hek293(β 3) - Incubation 10/15 min pour TrF, Dex, CTB ou 90-120 min pour Lyso et Golgi-tracker (Echelle 10 μ m).

La superposition des marquages montre une colocalisation visualisée en jaune de **55** (rouge) majoritairement avec TrF (vert), confirmant que notre vecteur multivalent semble être préférentiellement internalisé par la voie des clathrines. Par contre, l'absence de colocalisation avec le Dextran semble montrer que la macropinocytose n'est pas impliquée dans la voie d'entrée de notre vecteur. Une petite partie du vecteur multivalent colocalise avec CTB, ce qui semble indiquer qu'une petite fraction du composé **55** transite par la voie des cavéoles. Parallèlement, des expériences contrôles réalisées avec le composé c[-RGDfK-] cyanilé n'ont montré que peu de colocalisation avec TrF et CTB, confirmant

que son entrée préférentielle ne semble pas être l'endocytose par la voie des clathrines ou des cavéoles.

D'autres expériences similaires en présence de Lyso-tracker et de Golgi-tracker (respectivement marqueurs des lysosomes et de l'appareil de Golgi) ont permis d'observer le trafic intracellulaire de notre vecteur multivalent **55**. Au bout de deux heures, les marquages de celui-ci et du Golgi-tracker colocalisent, semblant indiquer que notre vecteur multivalent transite par l'appareil de Golgi. Une petite fraction du composé multivalent a également été colocalisée avec un marqueur des organites intracellulaires acides tels que les lysosomes. Le composé **55** semble s'accumuler et/ou être dégradé au niveau des lysosomes.

Ces expériences précisent donc la voie d'entrée préférentielle de notre vecteur par une endocytose récepteur-dépendante médiée par la voie des clathrines. Cette endocytose est induite par la présentation multivalente du ligand -RGD-. Notre vecteur multivalent semble ensuite transiter vers l'appareil de Golgi et les lysosomes. L'internalisation de nos conjugués par une endocytose médiée par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est particulièrement intéressante puisqu'elle permet l'entrée cellulaire d'objets de tailles importantes et de natures variées. Ce résultat nous permet d'envisager l'utilisation de notre système multivalent pour la vectorisation d'éléments divers normalement incapables de traverser la membrane, tels que des peptides non translocateurs ou encore les siRNA et PNA. Néanmoins, ce système présente une limitation importante relative au relargage de la drogue dans le compartiment cellulaire où elle est active. En effet, internalisée *via* un système endosomal, la drogue doit être libérée afin d'atteindre son site d'action, classiquement le cytoplasme (ARNm, Mitochondrie) ou le noyau (ADN). Il sera donc important d'étudier la capacité de chaque drogue à s'échapper des endosomes. Dans l'éventualité d'une rétention endosomale, il pourra être envisagé d'associer à nos conjugués un élément permettant la sortie de l'agent thérapeutique de l'endosome (séquences de localisation ou composés perturbateurs de la membrane endosomale).

★ Quantification de l'Entrée Cellulaire du RAFT(c[-RGDfK-]₄)

La voie d'entrée de notre vecteur ainsi déterminée, nous nous sommes intéressés à la quantification de l'entrée cellulaire de nos molécules. Nous avons donc projeté de réaliser des études nous permettant d'accéder, grâce à une méthode de quantification d'entrée cellulaire par MALDI-TOF, à la cinétique d'internalisation de notre système multivalent. Cette étude devrait permettre d'évaluer l'efficacité de notre vecteur multivalent en terme d'entrée cellulaire. Néanmoins, les essais préliminaires réalisés avec les composés **67** et **68** montrent certaines difficultés : l'étape de lyse cellulaire par traitement thermique lors du protocole expérimental pose le problème de l'instabilité des liaisons oxime de notre composé multivalent et ces liaisons semblent également instables en spectroscopie de masse MALDI-TOF. Nous envisageons donc de modifier le protocole afin de le rendre applicable à nos composés :

- essais de quantification par spectrométrie de masse ESI,
- réduction de la liaison oxime de nos vecteurs multivalents avant internalisation,
- coupure des liaisons oxime avant analyse au MALDI-TOF.

B.3.2. Localisation des Tumeurs *in vivo* chez le Petit Animal

L'imagerie de fluorescence proche infrarouge sur des tumeurs et métastases chez le petit animal a été réalisée avec les composés **53** et **54**. Dans un premier temps le conjugué **53** a été utilisé dans des expériences de détection de tumeurs pulmonaires profondes en tomographie de fluorescence 3D (Figure 76).

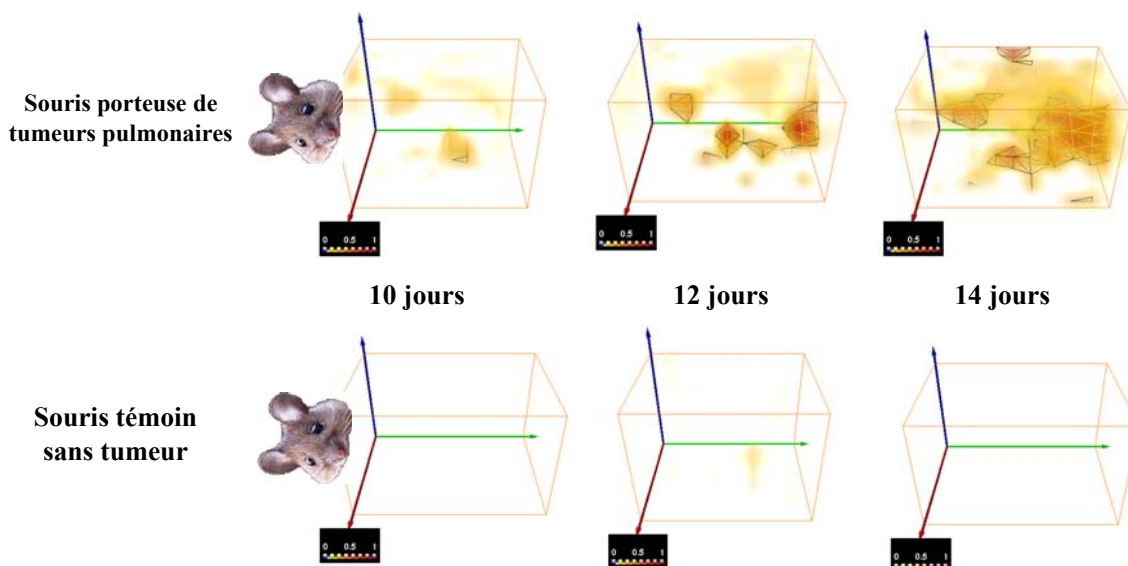


Figure 76 : Clichés de tomographie de fluorescence 3D utilisant le composé **53**.

Le composé **53** permet de visualiser des tumeurs pulmonaires profondes et de suivre l'évolution des tumeurs directement *in vivo* de façon non invasive. Ces tumeurs proviennent de cellules TS/Apc, lignée d'adénocarcinome mammaire murin de statut $\alpha_v\beta_3$ positif. A l'opposé, l'imagerie de fluorescence 2D se révèle peu adaptée à la visualisation de ce type de tumeurs *in vivo* (Figure 77). La tomographie de fluorescence utilisant notre vecteur multivalent conjugué à Alexa 700 est donc un outil extrêmement intéressant pour la détection de tumeurs profondes et leur localisation précise grâce à la reconstitution en 3 dimensions.

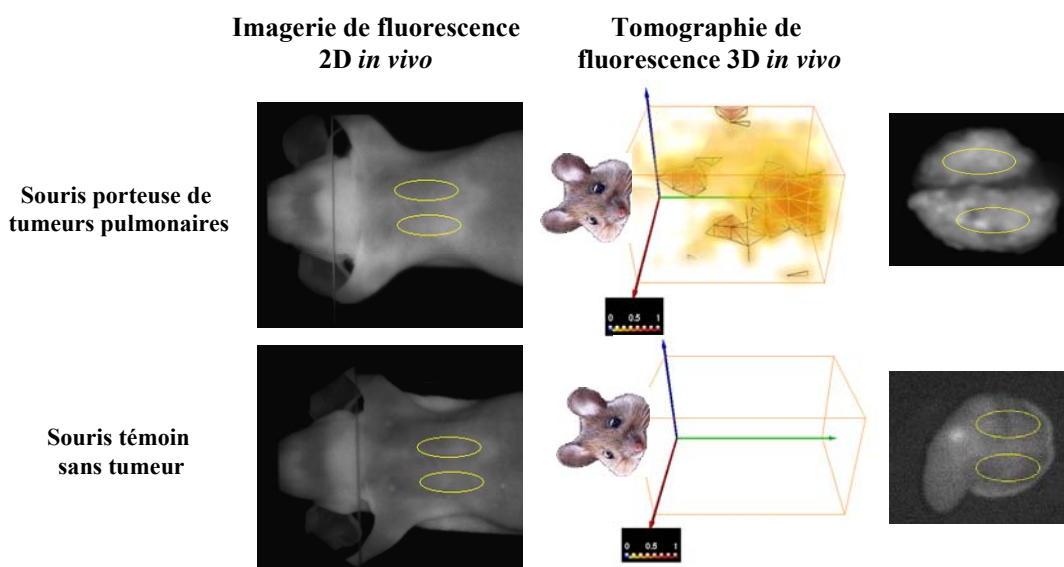


Figure 77 : Clichés d'imagerie de fluorescence 2D et de tomographie de fluorescence 3D obtenus avec le composé **53**.

Une étude comparative de propriétés optiques des conjugués (Alexa700)RAFT (c[-RGDfK-]₄) **53** et (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-]₄) **55** a été réalisée. Les cinétiques de distribution de fluorescence dans la tumeur et dans la peau nous ont permis de déterminer les caractéristiques de chacun des conjugués. En fonction du temps, ces conjugués ont des profils de distribution similaires dans la tumeur et au niveau de la peau mais leurs intensités de fluorescence sont très différentes : le composé **53** a une intensité de fluorescence 22 fois plus importante que le conjugué cyanilé **55** (Figure 78).

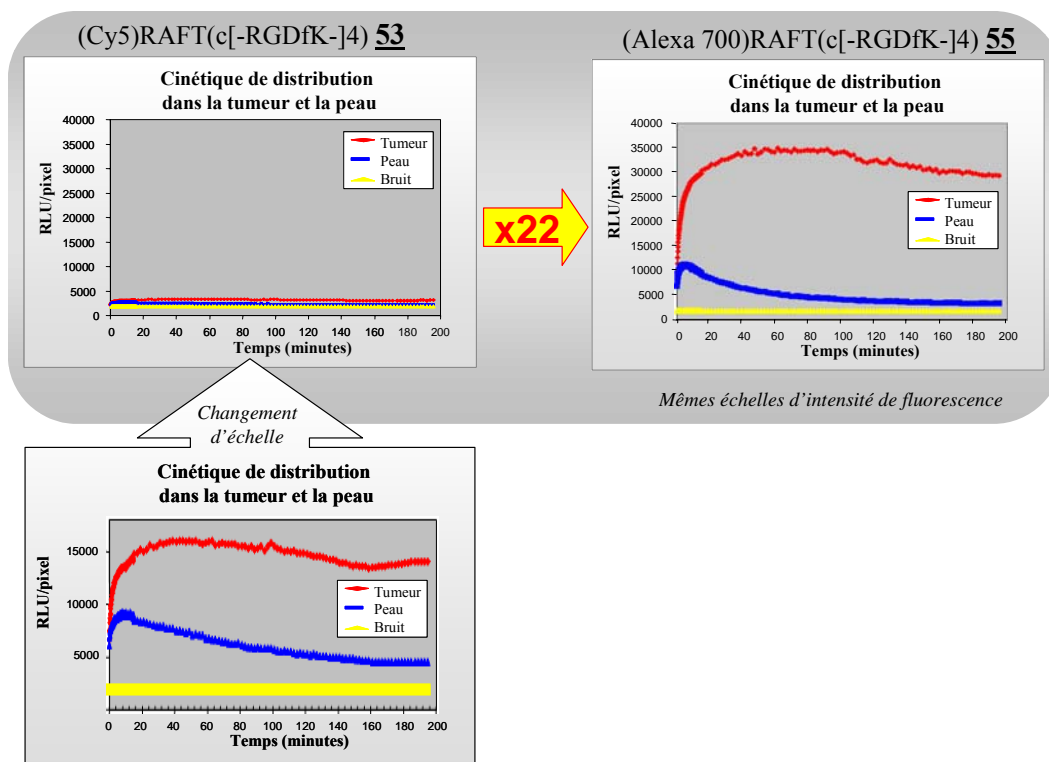


Figure 78 : Cinétiques de distribution de la fluorescence dans la tumeur et dans la peau.

Par ailleurs, le composé **53** s'est également avéré très persistant, il permet une très bonne détection en imagerie optique de tumeurs sous cutanées pendant plusieurs jours (Figure 79). Après une semaine, ce composé conserve un rapport de fluorescence tumeur/muscle très important de l'ordre de 125.

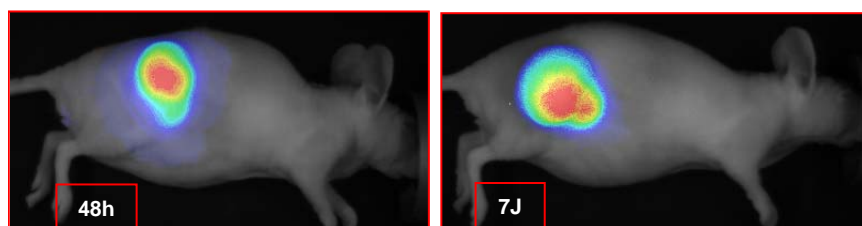


Figure 79 : Clichés d'imagerie de fluorescence utilisant le composé **53**.

B.4. RESUME

La présentation multivalente des ligands -RGD- par le châssis RAFT confère à notre vecteur une bonne spécificité et une excellente affinité pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. L'observation du devenir de notre vecteur en imagerie sur cellule vivante de statut $\alpha_V\beta_3$ a

montré que celui-ci est majoritairement internalisé par une endocytose médiée par la voie des clathrines et qu'il transite dans les endosomes jusqu'à l'appareil de Golgi et les lysosomes.

La tomographie de fluorescence 3D utilisant le composé **53** a permis la visualisation de tumeurs pulmonaires profondes directement *in vivo* de façon non invasive. Par ailleurs, ce composé permet, en imagerie optique, une très bonne détection des tumeurs sous cutanées sur plusieurs jours.

Le RAFT(c[-RGDfK-]₄) est donc un agent de ciblage cellulaire particulièrement efficace *in vivo* pour concentrer des éléments effecteurs au niveau des tumeurs. Par ailleurs, ses propriétés de vectorisation intracellulaire permettent d'envisager son utilisation pour le transport d'un large panel de molécules à but thérapeutique à l'intérieur des cellules néo-angiogéniques et de certaines lignées tumorales. Il faudra néanmoins s'assurer qu'après endocytose, l'agent thérapeutique puisse accéder à sa cible intracellulaire.

C. Synthèse et Caractérisation des Conjugués pour la Thérapie Anti-cancéreuse

Les résultats des études biologiques réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montrés l'efficacité du vecteur multivalent RAFT(c[-RGDfK-]₄) pour le ciblage des tumeurs et offre potentiellement l'opportunité de concentrer les molécules actives à proximité ou à l'intérieur des cellules tumorales. Cela nous a amené à concevoir une nouvelle génération de molécules conjuguées à des divers éléments thérapeutiques. Par ailleurs, afin d'étudier les mécanismes d'action de nos conjugués multivalents, nous avons également conçu un composé hybride présentant un élément cytotoxique et un agent de détection. L'évaluation *in vitro* et *in vivo* de ces conjugués nous permettra de valider leur potentiel pour la thérapie anticancéreuse.

C.1. Conception des Conjugués pour la Thérapie Anti-Cancéreuse

C.1.1. Objectif des Travaux

Cette partie de nos travaux est consacrée à la synthèse de composés RAFT(c[-RGDfK-]₄) conjugués avec divers composés thérapeutiques appartenant à différentes classes de molécules : peptides, acides nucléiques, PNA (*Peptide Nucleic Acid*) et drogue organique (Figure 80).

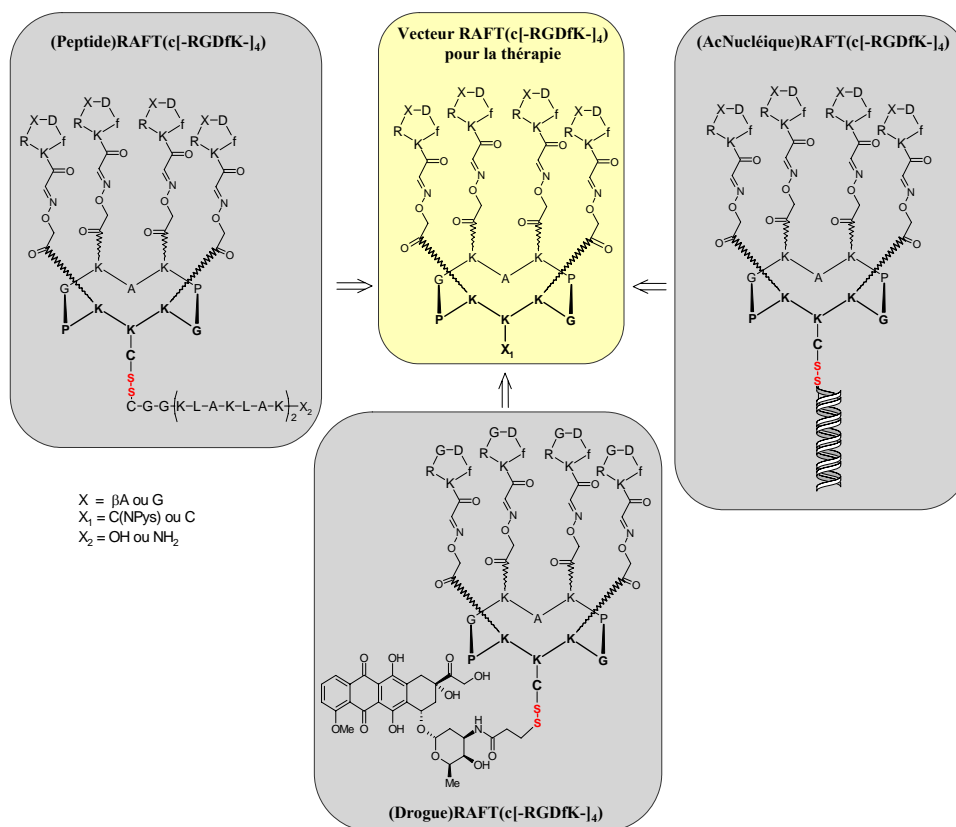


Figure 80 : Schéma rétro-synthétique des différents conjugués RAFT(c[-RGDfK-]₄) pour la thérapie.

Ces protagonistes sont ancrés de manière covalente à la face inférieure de nos vecteurs RAFT(c[-RGDfK-]₄) destinés à la thérapie, *via* un pont disulfure sensible aux environnements réducteurs intracellulaires. Nous avons également préparé les molécules contrôles c[-RGDfK((KLAKLAK)₂-NH₂)-] et c[-RGDfK(SiRNA(pGL3))-] nécessaires aux tests biologiques (Figure 81).

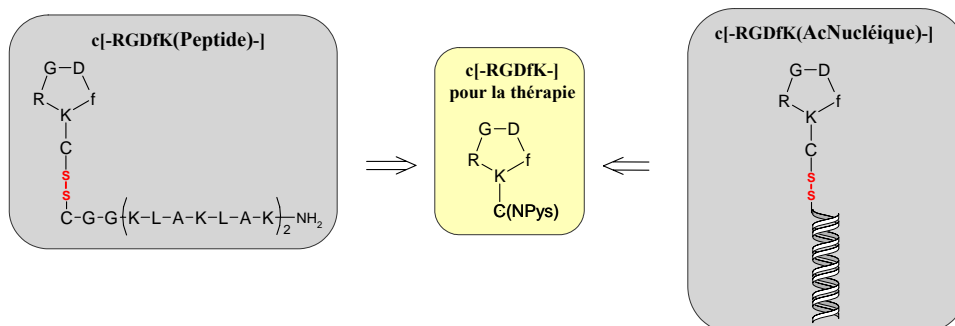


Figure 81 : Schéma rétro-synthétique des différents conjugués c[-RGDfK-] pour la thérapie.

★ Conjugaison des Éléments à Vectoriser par Liaisons Disulfures

Contrairement aux conjugués pour la détection dans lesquels le lien entre le marqueur est un lien stable, il nous est apparu particulièrement pertinent de conjuguer les éléments thérapeutiques au RAFT par un lien labile dans les conditions intracellulaires. L'utilisation de liaisons disulfures pour la conjugaison des molécules actives au vecteur RAFT(c[-RGDfK-]₄) est particulièrement intéressante. En effet, ce lien chimique est labile dans les conditions physiologiques régnant à l'intérieur de la cellule, permettant ainsi le relargage de la drogue vers sa cible intracellulaire. De plus, ce type de libération évite l'amointrissement des propriétés cytotoxiques des drogues rattachées au vecteur. Dans l'organisme, les activités de réduction enzymatique des ponts disulfures s'observent essentiellement de façon intracellulaire dans le cytosol ainsi que dans les endosomes tardifs et les lysosomes. A l'inverse, les environnements extracellulaires ont plutôt des propriétés oxydantes (concentrations beaucoup plus fortes en cystine qu'en cystéine et faibles en glutathion réduit). Toutefois dans le cas des tumeurs, les conditions d'hypoxie peuvent se traduire par des environnements extracellulaires anormalement réducteurs.²¹⁶ Cette stratégie permet donc un relargage possible de la drogue dans le milieu extracellulaire à proximité des tumeurs lors de conditions hypoxiques et dans les cellules de statut $\alpha_v\beta_3$ positif au niveau des endosomes tardifs, des lysosomes et du cytoplasme.

D'un point de vue synthétique, nous avons choisi des méthodes efficaces de formation de liaison disulfure intermoléculaire hétéromérique permettant d'orienter la réaction. En effet, l'utilisation d'un groupement protecteur et d'activateur des fonctions thiol tel que NPys (3-Nitro-2-Pyridinesulfenyl) ou thio-pyridyle permet de diriger la réaction vers la formation du conjugué d'intérêt et de limiter fortement les réactions de formation d'homodimères indésirables.²¹⁷ Ces systèmes d'activation extrêmement efficaces ont été utilisés pour la synthèse de différentes biomolécules, permettant un relargage intracellulaire de molécules actives.⁵⁸ Ces réactions, résultant de l'attaque nucléophile de la fonction thiol libre sur la fonction thiol activée, se déroulent en milieux aqueux légèrement

²¹⁶ Saito, G.; Swanson, J. A.; Lee, K. D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Adv Drug Deliv Rev* **2003**, *55*, 199-215.

²¹⁷ Mezo, G.; Mihala, N.; Andreu, D.; Hudecz, F. Conjugation of epitope peptides with SH group to branched chain polymeric polypeptides via Cys(Npys). *Bioconjug Chem* **2000**, *11*, 484-491.

acide (4-7) sous atmosphère d'argon afin de limiter les réactions d'oxydation responsables de la formation d'homodimères.

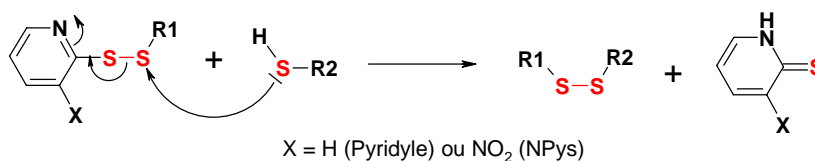


Figure 82 : Mécanisme réactionnel du couplage d'un thiol libre sur un thiol activé.

C.1.2. Choix de Molécules Thérapeutiques à Vectoriser

★ Doxorubicine

La doxorubicine est un agent utilisé en chimiothérapie appartenant à la famille des anthracycline présentant une activité néoplasique sur un large spectre de tumeurs. Malgré l'avènement de nouveaux agents anticancéreux, les anthracyclines antitumorales restent parmi les agents les plus utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Les mécanismes d'actions de ces molécules sont multiples et restent aujourd'hui très controversés. Leur effet cytotoxique semblerait être lié à son action sur l'ADN *via* divers mécanismes cellulaires. La doxorubicine (Adriamycine[®]) est la molécule la plus employée dans les protocoles actuels de chimiothérapie. Elle est utilisée seule ou en combinaison avec d'autres drogues pour le traitement de nombreux cancers dont les lymphomes malins et les leucémies. C'est sa toxicité, entraînant des effets secondaires sévères (cardiaque, hépatique et hématologique), qui limite considérablement les doses à administrer. Il est donc nécessaire de trouver des stratégies permettant de concentrer son action sur les cellules tumorales et ainsi de réduire sa toxicité sur les autres organes. L'ensemble de ces considérations nous a conduit à envisager sa vectorisation par notre système ciblant les tumeurs.

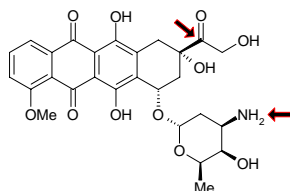


Figure 83 : Schéma de la Doxorubicine (flèches : sites potentiels de fonctionnalisation).

D'un point de vue synthétique, la molécule présente deux sites d'introduction de la fonction thiol (Figure 83). La fonctionnalisation sur le carbonyle suivi de son couplage au RAFT(c[-RGDfK-]₄) ont été décrits précédemment.¹⁵¹ Nous avons donc envisagé de réaliser la fonctionnalisation sur l'autre site, le groupement 3'-amino de l'unité saccharidique afin de permettre son couplage ultérieur au RAFT. Les deux conjugués à la doxorubicine permettront d'évaluer l'influence du site de fonctionnalisation dans l'activité de la doxorubicine. Des études *in vivo* permettront également d'évaluer le gain de la vectorisation ciblée de la doxorubicine par le RAFT(c[-RGDfK-]₄) en terme de toxicité et d'effets secondaires.

★ Peptide (KLAKLAK)₂

Le peptide (KLAKLAK)₂, séquence de quatorze acides aminés, est un composé antibactérien qui est décrit dans la littérature pour induire l'apoptose chez les cellules

eucaryotes après internalisation.²¹⁸ Cette séquence a une activité bactériostatique à 6 μM sur *E. coli* ou *S. aureus* tandis que son activité cytotoxique sur des cellules de mammifères est observée à des concentrations supérieures à 500 μM .²¹⁹ Cette sélectivité peut être attribuée principalement aux différences physicochimiques entre les membranes bactériennes chargées négativement et celles des mammifères globalement neutre. La séquence (KLAKLAK)₂ chargée positivement se lie plus efficacement aux parois bactériennes. La conjugaison de ce peptide à des composés lui permettant de franchir la membrane des cellules eucaryotes (peptide cyclique CNGRC) a montré *in vitro* que les conjugués ont une toxicité nettement supérieure (IC₅₀ de 10 μM) à celle du peptide pro-apoptotique seul (IC₅₀ de 380 μM).²¹⁸ Ce conjugué a également montré un effet anti-tumoral significatif chez le petit animal. La toxicité intracellulaire de la séquence (KLAKLAK)₂ a été attribuée à un mécanisme intrinsèque d'induction de l'apoptose impliquant les mitochondries. Le peptide semble affecter la membrane mitochondriale selon un processus analogue à la destruction de la membrane bactérienne et initie la cascade de signalisation conduisant à l'apoptose de la cellule.²¹⁸ Par ailleurs dans ces travaux, l'utilisation d'acides aminés de série D ou la modification de l'extrémité C-terminale par une amide ont permis de conférer au peptide (KLAKLAK)₂ une plus grande résistance aux dégradations enzymatiques.²²⁰

Ne traversant pas la membrane et cytotoxique uniquement dans le compartiment intracellulaire, ce peptide constitue donc une drogue potentielle particulièrement intéressante à vectoriser. La présentation multivalente de ligand -RGD- induit l'endocytose des conjugués RAFT(c[-RGDfK-]₄) dans les cellules de statut $\alpha_v\beta_3$. La conjugaison du peptide pro-apoptotique (KLAKLAK)₂ à notre vecteur devrait alors favoriser son entrée dans les cellules exprimant l'intégrine limitant ainsi sa toxicité sur les autres cellules.

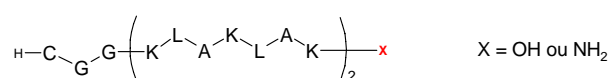


Figure 84 : Schémas des peptides (KLAKLAK)₂.

Afin de permettre sa conjugaison au RAFT par un lien disulfure, ce peptide a été fonctionnalisé sur son extrémité N-terminale par un résidu cystéine. Un petit espaceur de deux résidus glycines entre le site de conjugaison et la séquence (KLAKLAK)₂ est introduit pour assurer la flexibilité de la séquence et minimiser les encombrements avec le vecteur (Figure 84).

★ PNA

Les PNA (Peptide Nucleic Acids) sont des analogues d'acides nucléiques dans lesquels les squelettes phospho(déoxy)ribonucléiques sont remplacés par un squelette peptidique synthétique. Ces derniers, construits à partir d'unités N-(2-aminoéthyl)-glycines, permettent d'obtenir des analogues achiraux, non chargés. Ces acides nucléiques

²¹⁸ Ellerby, H. M.; Arap, W.; Ellerby, L. M.; Kain, R.; Andrusiak, R.; Rio, G. D.; Krajewski, S.; Lombardo, C. R.; Rao, R.; Ruoslahti, E.; Bredesen, D. E.; Pasqualini, R. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* **1999**, *5*, 1032-1038.

²¹⁹ Javadpour, M. M.; Juban, M. M.; Lo, W. C.; Bishop, S. M.; Alberty, J. B.; Cowell, S. M.; Becker, C. L.; McLaughlin, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem* **1996**, *39*, 3107-3113.

²²⁰ del Rio, G.; Castro-Obregon, S.; Rao, R.; Ellerby, H. M.; Bredesen, D. E. APAP, a sequence-pattern recognition approach identifies substance P as a potential apoptotic peptide. *FEBS Lett* **2001**, *494*, 213-219.

peptidiques sont chimiquement stables et résistants aux dégradations enzymatiques.²²¹ Ces composés possèdent des propriétés de reconnaissance spécifiques de l'ADN et de l'ARN obéissant aux règles d'appariements de bases « Watson et Crick ». Les duplexes mixtes PNA/ADN ou PNA/ARN s'avèrent beaucoup plus stables que les appariements classiques ADN/ADN et ARN/ARN. Les PNA possèdent donc des propriétés similaires aux acides nucléiques synthétiques mais avec des stabilités de liaison plus grandes ainsi qu'une meilleure spécificité. Ils ont donc été, depuis leur découverte dans les années 1990,²²² très utilisés en biologie moléculaire, en diagnostic génétique ainsi que pour des applications thérapeutiques.²²³ Par ailleurs, des études *in vitro* ont montrés que les PNA sont capables d'inhiber la transcription mais également la traduction des gènes ciblés, ce qui permet leur utilisation en thérapies antigène et antisens.²²¹ L'activité de ces composés étant intracellulaire et ceux-ci ne possédant pas de propriété de transfection, la grande limitation de ce type de molécule est le problème du passage à travers la membrane cellulaire. Pour contourner cet inconvénient, les PNA ont été associés à des agents de transfection.²²⁴ Dans la même optique et afin d'associer un ciblage à la transfection, nous nous sommes intéressés à leur vectorisation par notre vecteur multivalent.

Dans cette l'optique de thérapie génique ciblée, nous avons choisi de vectoriser un PNA ciblant un gène répresseur de l'apoptose Bcl-2. Ce gène est surexprimé dans un grand nombre de cancers et il est associé à l'initiation tumorale, à la progression de la tumeur ainsi qu'au développement des phénomènes de chimio- et radio-résistances. L'inhibition de Bcl-2 se traduit par une accélération de la mort cellulaire en réponse à un stimulus apoptotique.²²⁵ Oblimersen (Genasens), un PNA s'hybridant avec six codons de l'ARNm de Bcl-2 a montré un arrêt de croissance tumorale chez la souris²²⁶ et est actuellement en phase clinique II et III (seul ou en association) dans de très nombreux cancers.²²³

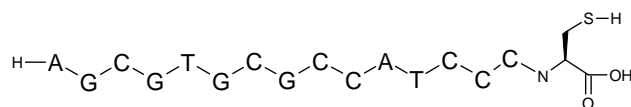


Figure 85 : Schéma du PNA anti Bcl-2.

Le PNA anti Bcl-2 choisi pour la conjugaison avec le RAFT(c[-RGDfK-]₄) est un 15mer ciblant le codon start de l'ARNm de Bcl-2 (4 codons identiques à l'Oblimersen).²²⁷ Celui-ci peut-être fonctionnalisé à son extrémité C-terminale par une cystéine et est ainsi directement utilisable pour un couplage par pont disulfure (Figure 85).

²²¹ Ray, A.; Norden, B. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *Faseb J* **2000**, *14*, 1041-1060.

²²² Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.

²²³ Clinicaltrials.gov G3139, *Oblimersen*, <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=G3139>.

²²⁴ Albertshofer, K.; Siwkowski, A. M.; Wancewicz, E. V.; Esau, C. C.; Watanabe, T.; Nishihara, K. C.; Kinberger, G. A.; Malik, L.; Eldrup, A. B.; Manoharan, M.; Geary, R. S.; Monia, B. P.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Bennett, C. F.; Maier, M. A. Structure-activity relationship study on a simple cationic peptide motif for cellular delivery of antisense peptide nucleic acid. *J Med Chem* **2005**, *48*, 6741-6749.

²²⁵ Oltvai, Z. N.; Milliman, C. L.; Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **1993**, *74*, 609-619.

²²⁶ Cotter, F. E.; Johnson, P.; Hall, P.; Pocock, C.; al Mahdi, N.; Cowell, J. K.; Morgan, G. Antisense oligonucleotides suppress B-cell lymphoma growth in a SCID-hu mouse model. *Oncogene* **1994**, *9*, 3049-3055.

²²⁷ Mologni, L.; Nielsen, P. E.; Gambacorti-Passerini, C. In vitro transcriptional and translational block of the bcl-2 gene operated by peptide nucleic acid. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *264*, 537-543.

★ SiRNA

Les siRNA sont des petits ARN exogènes ou endogènes d'environ 21 nucléotides. Ceux-ci, s'associent à un complexe protéique appelé RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) et sont alors capables, par appariement avec l'ARNm complémentaire, d'inhiber la transcription du gène qu'ils ciblent.²²⁸ Lors d'appariements, l'ARNm est détruit et il n'y a pas de traduction. Les complexes RISC/siRNA, à l'origine de cette destruction, restent ensuite parfaitement fonctionnels, ce qui leur permet d'agir de façon catalytique. Ce système est extrêmement intéressant puisqu'il n'est pas nécessaire d'avoir de grandes quantités de siRNA pour obtenir une réponse biologique significative. Par ailleurs, chargés négativement et de tailles importantes, les siRNA ne possèdent pas de propriété de passage de la membrane cellulaire. Ils sont classiquement associés à des systèmes lipidiques de transfection ne conférant aucune sélectivité cellulaire. Il nous est donc paru particulièrement intéressant d'utiliser notre vecteur multivalent afin d'orienter la transfection sur le type cellulaire présentant l'anomalie génétique à corriger. Ce ciblage devrait permettre un gain en terme d'efficacité de traitement *in vivo*.

Afin de valider l'intérêt de notre système pour la thérapie antisens, nous avons choisi d'empêcher l'expression du gène de la luciférase. Ce dernier est classiquement inséré dans les cellules par l'intermédiaire de plasmides permettant une transfection stable. Ce gène est alors traduit et en présence de luciférine, il permet la synthèse de l'oxyluciférine responsable de l'émission d'un photon (bioluminescence). Si le gène de la luciférase n'est pas actif, il n'y a pas d'émission lumineuse. Ce système est très utilisé en biologie moléculaire pour sa rapidité de réaction de bioluminescence, sa grande sensibilité et sa simplicité d'exécution. Dans notre étude de l'efficacité de transfection par le RAFT(c[-RGDfK-]₄), cette méthode nous permet donc une évaluation rapide et quantitative de l'inhibition d'un gène.

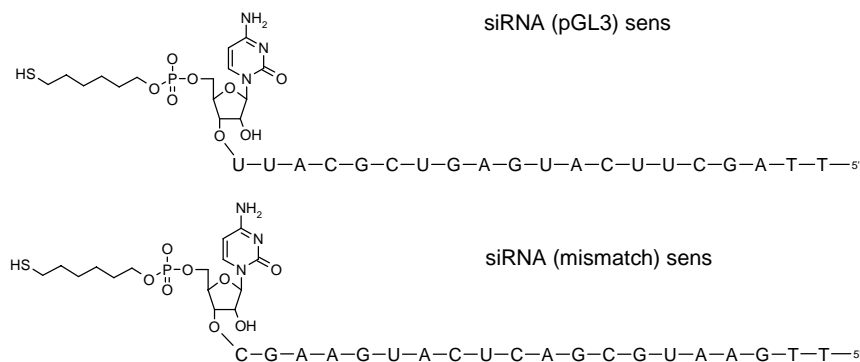


Figure 86 : Structures des siRNA sens (pGL3 ou mismatch).

Le siRNA (pGL3) est un 18 mer dont les deux extrémités sont modifiées (Figure 86). L'extrémité 5' est protégée des dégradations enzymatiques par deux résidus thymines et l'extrémité 3' est chimiquement modifiée par un « linker » carboné en C₆ présentant une fonction thiol libre. Cette dernière fonctionnalisation rend ce siRNA directement utilisable pour son couplage au RAFT par pont disulfure. La molécule contrôle RAFT(c[-RGDfK-]₄) conjugué au siRNA (mismatch) a également été préparée afin de vérifier que les réponses biologiques induites par (siRNA(pGL3))RAFT(c[-RGDfK-]₄) sont séquence-spécifiques (Figure 86). Si notre méthode de transfection ciblée s'avère efficace, ce type de stratégie sera appliqué à des gènes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire ou de l'apoptose.

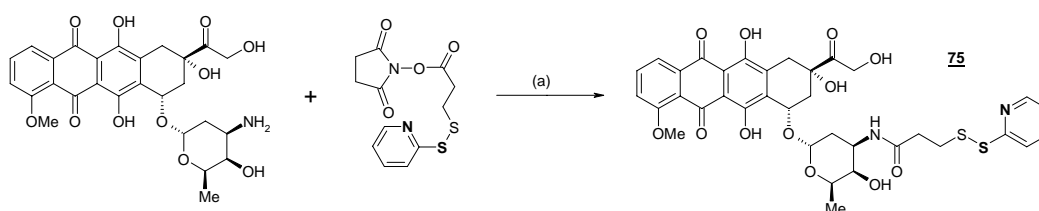
²²⁸ Pai, S. I.; Lin, Y. Y.; Macaes, B.; Meneshian, A.; Hung, C. F.; Wu, T. C. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther* **2006**, *13*, 464-477.

C.2. Synthèse des Conjugués (Drogue)RAFT(c[-RGDfK-]₄)

C.2.1. Synthèse du Conjugué à la Doxorubicine

La synthèse du conjugué (Doxo)RAFT(c[-RGDfK-]₄) utilise la stratégie de couplage disulfure dans laquelle le thiol activé se trouve sur la doxorubicine alors que le RAFT(c[-RGDfK-]₄) présente une fonction thiol libre.

Nous avons dans un premier temps effectué la préparation du dérivé **75** présentant une fonction thiol activée par un groupe thio-pyridyle (Figure 87). La fonctionnalisation est réalisée sur l'amine de la partie saccharidique de la doxorubicine en utilisant l'ester commercial *N*-hydroxysuccinimide de l'acide 3-(2-pyridyldithio)propionique. La réaction est réalisée dans du DMF anhydre en milieu légèrement basique avec un excès du dérivé thio-pyridyle activé (7 eq.). L'ensemble des étapes réactionnelles sur la doxorubicine est réalisé à l'abri de la lumière afin d'éviter sa dégradation en aglycone.



Réactifs : (a) DIPEA, DMF

Figure 87 : Schéma de synthèse de la doxorubicine fonctionnalisée **75**.

La réaction a été arrêtée au bout de 7 heures et le composé **75** est purifié par CLHP. Cette purification permet d'obtenir le composé **75** pur avec un rendement de 24 %. Ce rendement moyen est directement lié à la dégradation de la doxorubicine dans les solvants de purification acide (0,1 % TFA). Un essai de purification par CLHP dans un système de solvants exempts de TFA a permis une purification de l'intermédiaire **75** sans dégradation de la partie doxorubicine et l'augmentation du rendement à 48 %. Le composé a été obtenu pur et caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif (Figure 88).

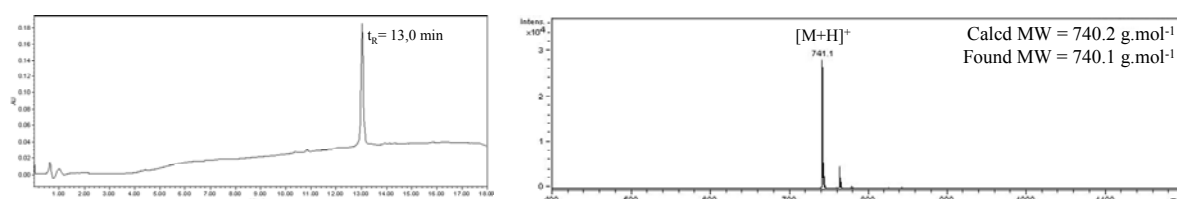
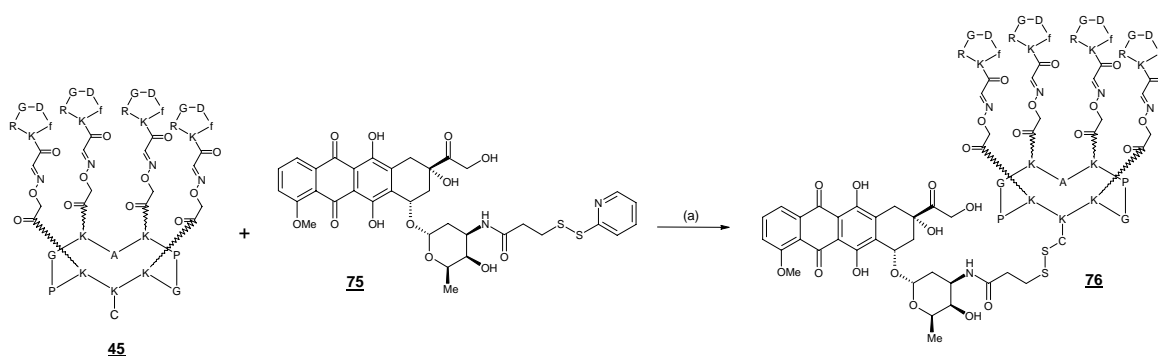


Figure 88 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du dérivé **75**.

Le conjugué (Doxo)RAFT(c[-RGDfK-]₄) est obtenu par couplage de l'intermédiaire **75** au vecteur multivalent **45** présentant la fonction thiol libre (Figure 89). Cette réaction est réalisée en utilisant les réactifs en quantité stoechiométrique dans une solution tamponnée (PBS pH 4,8) contenant du DMF anhydre. Le DMF a été ajouté pour la solubilisation de la doxorubicine.



Réactifs : (a) DMF/PBS(pH 4,8)

Figure 89 : Schéma de synthèse de la doxorubicine fonctionnalisée **76**.

La réaction réalisée sur une petite quantité (0,2 mg) est complète au bout de 90 min. Le produit **76** est alors purifié dans un système de solvants sans TFA puis caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif.

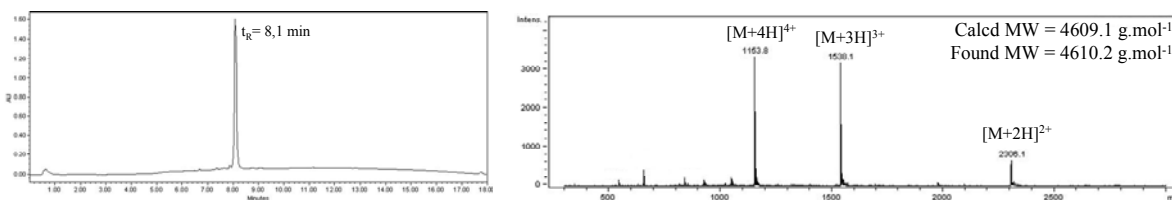


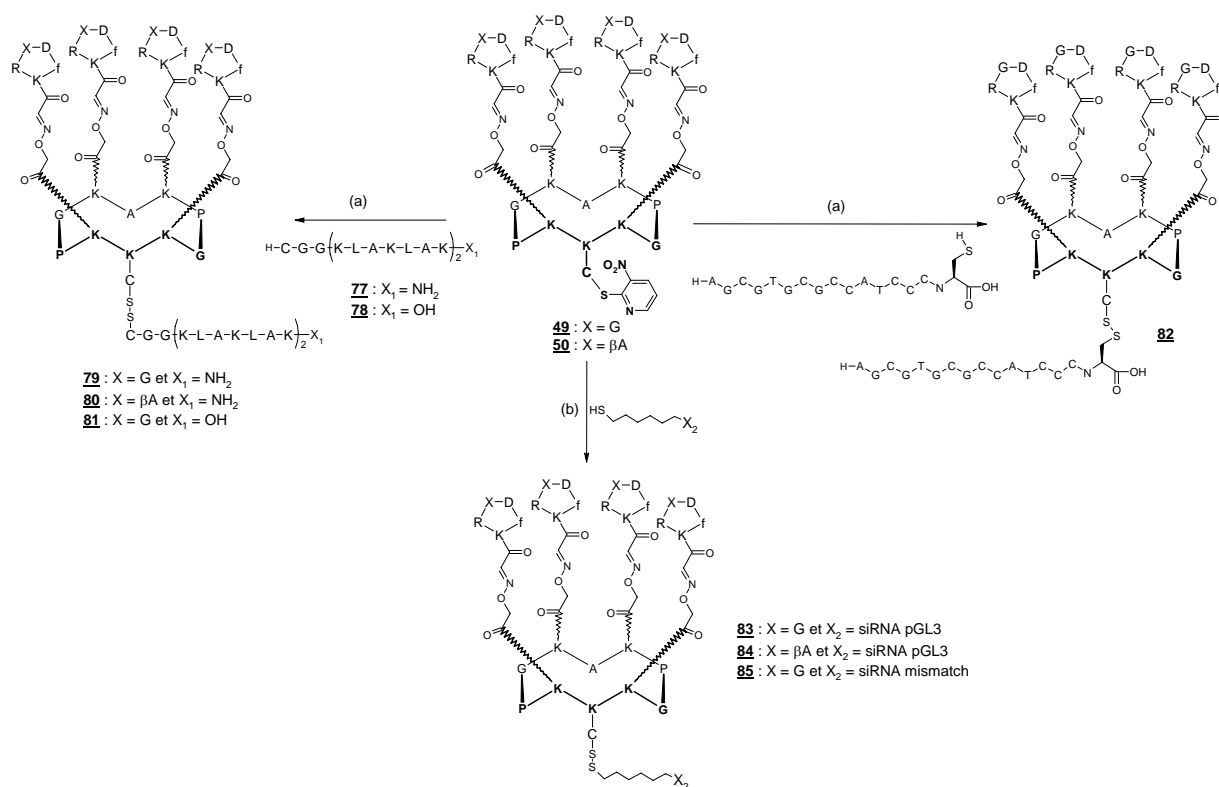
Figure 90 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du conjugué **76**.

Une autre voie de synthèse de **76** avait été envisagée par couplage de la doxorubicine présentant une fonction thiol libre avec le composé **49** S-activé, (C(Npys))RAFT (c[-RGDfK-]₄). Malheureusement, lors des essais de déprotection de la fonction thiol après l'introduction d'un bras espaceur thio-trityle, la doxorubicine s'est dégradée en aglycone. De nombreux essais de fonctionnalisation de la doxorubicine ont donc été nécessaires avant de s'orienter vers la stratégie de synthèse décrite.

C.2.2. Synthèse des Conjugués aux Peptides (KLAKLAK)₂, au PNA et aux SiRNA

La conjugaison des motifs (KLAKLAK)₂, PNA, ou SiRNA au RAFT(c[-RGDfK-]₄) est réalisée en utilisant la stratégie de couplage dans laquelle le groupe thio-activateur N(Pys) est porté par le châssis moléculaire. Les éléments à coupler, les peptides (KLAKLAK)₂, le PNA, et les SiRNA comportent donc une fonction thiol libre.

Les différents conjugués sont obtenus en une étape de synthèse à partir des intermédiaires clef multivalents **49** ou **50** (Figure 91). Toutes les réactions de couplage sont réalisées en absence d'oxygène sous atmosphère inerte en prenant soin de mettre tous les réactifs sous argon au préalable.



Réactifs : (a) DMF/PBS(pH 4,8) ; (b) $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}(3/1)$

Figure 91 : Schémas de synthèse des conjugués RAFT(c[-RGDfK-]₄) aux (KLAKLAK)₂, au PNA et aux siRNA.

Afin de réaliser la synthèse du composé ((KLAKLAK)₂)RAFT(c[-RGDfK-]₄), nous avons préparé le peptide pro-apoptotique sur support solide (SPSS) en stratégie Fmoc/*t*-Bu. Il a été facilement fonctionnalisé sur son extrémité *N*-terminale par un résidu cystéine pour sa conjugaison au RAFT par lien disulfure. Par ailleurs, l'utilisation d'une résine classique (2-chlorotrityle[®]) et d'une résine amine (Rink Amide) nous permet d'obtenir cette séquence avec l'extrémité *C*-terminale porteuse, respectivement, d'une fonction acide carboxylique ou d'une fonction amide. Le couplage des peptides (KLAKLAK)₂ **77** ou **78** aux conjugués multivalents **49** ou **50** en utilisant des quantités stoechiométriques est réalisé dans une solution de DMF anhydre/PBS (pH 4,8) et la réaction est complète au bout de cinq minutes. Le milieu réactionnel est directement injecté en CLHP afin de purifier les produits. Les composés **79**, **80** et **81** sont obtenus avec une bonne pureté et des rendements très satisfaisants de l'ordre de 56-88 %. Ces composés ont été caractérisés en spectrométrie de masse électrospray en mode positif par la présence de différents ions multichargés (Figure 92).

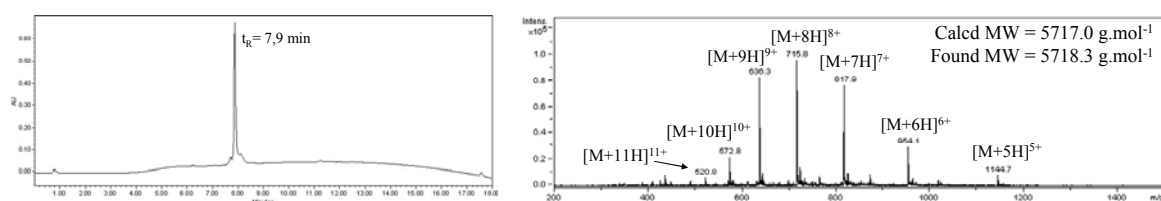


Figure 92 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du conjugué **79**.

La synthèse du conjugué (PNA)RAFT(c[-RGDfK-]₄) **82** a été réalisée sur une petite quantité de matériel (0,2 mg de PNA). Ceci va nous permettre de valider la faisabilité de la synthèse pour ce type de conjugué. Le couplage du PNA anti Bcl-2 au conjugué

multivalent **49** est réalisé dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Le composé **82** est obtenu après purification avec un rendement inférieur à 10 %. Ce rendement faible est probablement lié aux difficultés de solubilisation du PNA entraînant un avancement incomplet de la réaction. Les conditions réactionnelles de ce couplage restent à optimiser. Néanmoins, le produit **82** a été caractérisé avec succès par spectrométrie de masse ESI en mode positif (Figure 93).

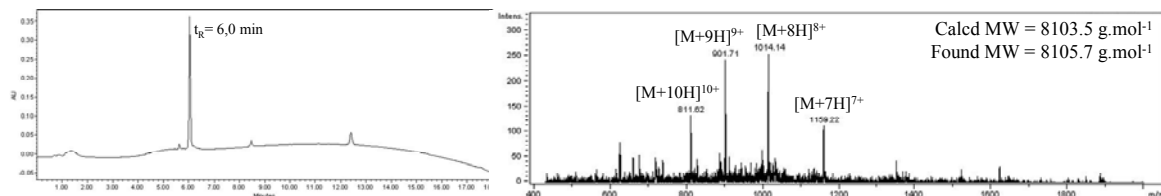


Figure 93 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du conjugué **82**.

Pour coupler le siRNA aux conjugués multivalents **49** et **50**, nous avons utilisé des conditions différentes de celles décrites précédemment en raison des contraintes expérimentales qu'implique la manipulation de siRNA. En effet, ces composés étant extrêmement sensibles à certaines enzymes, il était important de manipuler dans des conditions exemptes de nucléases. Pour ces raisons, nous avons choisi de réaliser ces couplages dans de l'eau sans nucléase à laquelle on ajoute un peu d'acétonitrile (3/1). L'avancement des réactions, suivi par CLHP dans un système de solvant adapté aux oligonucléotides, est très variable. Il dépend principalement de la solubilité des réactifs dans le milieu réactionnel. Les produits **83**, **84** et **85** ont été purifiés et obtenus avec des rendements de l'ordre de 50 à 65 %. Les difficultés de solubilisation des siRNA semblent aussi être à l'origine des rendements moyens obtenus pour certains couplages. Ces conjugués obtenus avec une excellente pureté ont été caractérisés en spectrométrie de masse ESI en mode négatif (Figure 94). Malgré leur poids moléculaire important, la masse obtenue après déconvolution ($M = 10776,2 \text{ g.mol}^{-1}$) est en accord avec la masse théorique ($M = 10777,8 \text{ g.mol}^{-1}$).

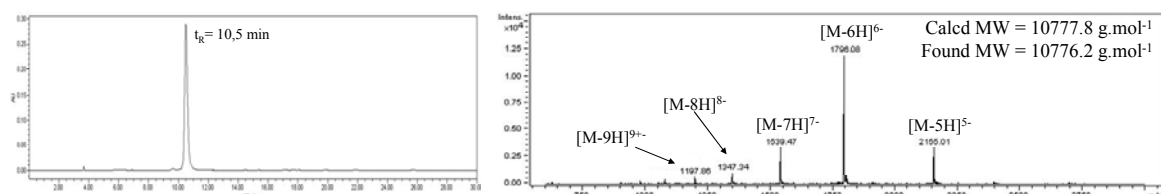


Figure 94 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du conjugué **83**.

La synthèse des molécules contrôles c[-RGDfK(((KLAKLAK)₂-NH₂)]- **86** et c[-RGDfK(SiRNA(pGL3))]- **87** est réalisée grâce à l'introduction, respectivement, du peptide **77** ou du composé siRNA(pGL3) sur le cyclopentapeptide déprotégé **52** dans les mêmes conditions que celles utilisées pour leurs analogues multivalents (Figure 95).

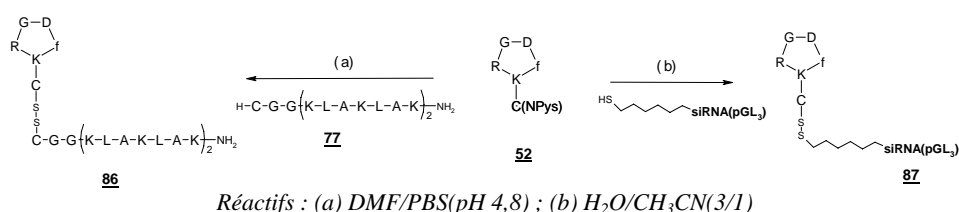


Figure 95 : Schéma de synthèse des composés **86** et **87**.

Les composés **86** et **87** sont alors purifiés par CLHP et obtenus avec des rendements respectivement de 75 % et 33 %.

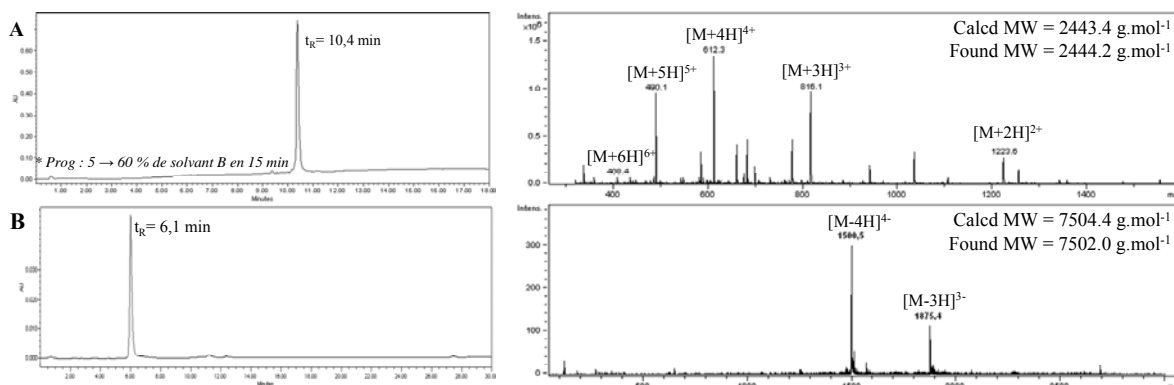


Figure 96 : Chromatogrammes CLHP et spectres de masse ESI des conjugués : A/ 86 ; B/ 87.

C.3. Synthèse d'un Composé pour l'Etude du Devenir Cellulaire du Peptide (KLAKLAK)₂

C.3.1. Objectifs des Travaux et Stratégie de Synthèse

Les études biologiques relatives au composé ((KLAKLAK)₂-NH₂)RAFT (c[-RGDfK-]₄) 79 étant les plus avancées *in vitro* comme *in vivo*, nous nous sommes intéressés à son mécanisme d'action intracellulaire. Afin de suivre le trafic cellulaire de la drogue par microscopie confocale, nous avons conçu un composé hybride bi-fonctionnel présentant le peptide pro-apoptotique (KLAKLAK)₂-NH₂ couplé à un agent de détection, la Cyanine 5. Lors de la conception de cette molécule, il nous est apparu tout à fait pertinent d'associer à ce conjugué un système de quenching de fluorescence (QSY21) permettant de détecter la fluorescence de la Cyanine 5 uniquement après la rupture du pont disulfure (Figure 97). Des études décrites précédemment relatives à notre vecteur multivalent présentant ce type de système (appelé Smart Probe) ont montré un très bon transfert de fluorescence de la Cyanine 5 au Quencher QSY21 se traduisant par une extinction de fluorescence de la Cyanine 5 d'environ 85 %.¹⁵⁶

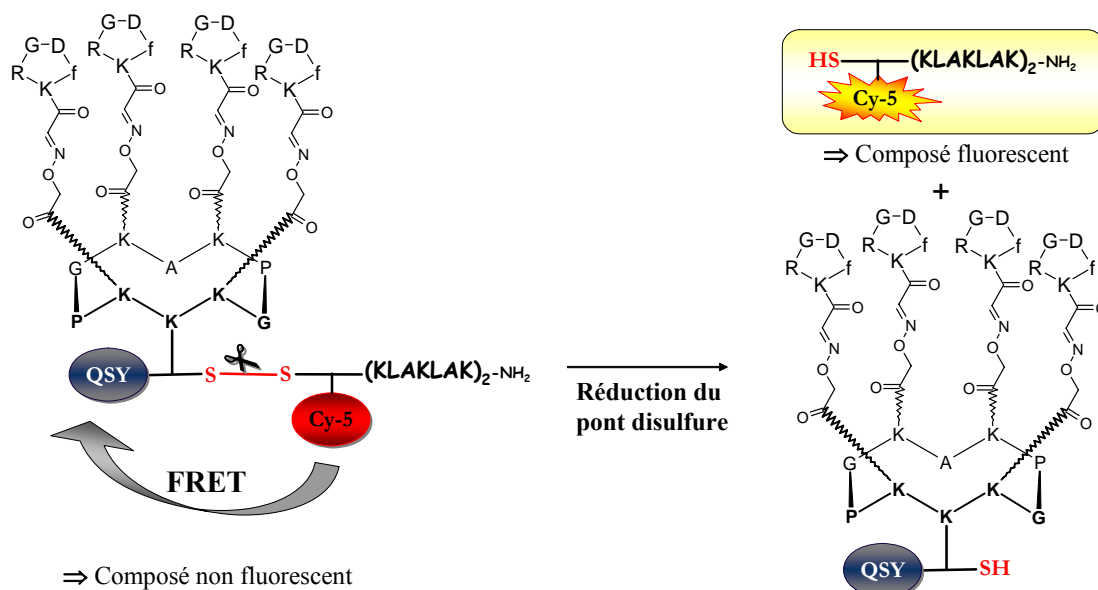


Figure 97 : Schéma de principe du système de quenching de fluorescence dans le composé (Smart Probe (KLAKLAK)₂-NH₂)RAFT(c[-RGDfK-]₄).

Ce procédé, appelé FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*) se caractérise par le transfert de l'état d'énergie excité d'un donneur à un accepteur sans émission de lumière. Ce phénomène a lieu lorsque le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption de l'accepteur (Figure 98). Par ailleurs, le donneur et l'accepteur doivent être situés à des distances comprises entre 1-10 nm. D'autres systèmes de FRET existent dans lesquels le transfert de fluorescence du donneur à l'accepteur entraîne une extinction de fluorescence du donneur et une émission de lumière de l'accepteur. Ces derniers systèmes ont récemment été utilisés pour étudier la réduction des ponts disulfures au cours de phénomènes d'endocytose médiés par des récepteurs.²²⁹

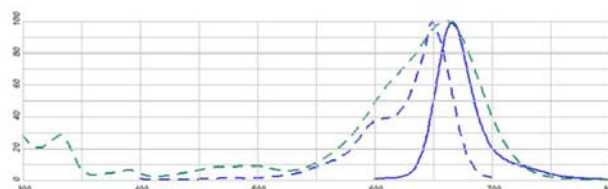


Figure 98 : Spectres d'absorption (pointillé) et d'émission (plein) de la Cyanine 5 (bleu) et du quencher QSY21 (vert).²¹³

Dans l'étude du devenir cellulaire du peptide pro-apoptotique après réduction des ponts disulfures à l'intérieur de la cellule, le système de FRET utilisant le couple de chromophores Cy5/QSY21 présente plusieurs avantages sur un système classique non quenché. Il permet :

- d'étudier la cinétique, ainsi que le lieu de réduction des ponts disulfures,
- de visualiser dans la cellule le peptide (KLAKLAK)₂ non associé au vecteur multivalent,
- d'augmenter la sensibilité de détection par élimination de la fluorescence du composé avant la réduction intracellulaire du lien disulfure.

La molécule hybride résulte du couplage par pont disulfure entre le peptide (KLAKLAK)₂-NH₂ cyanilé et le RAFT(c[-RGDfK-]₄) présentant le quencher (QSY21) sur sa face inférieure. L'introduction des chromophores est réalisée par des couplages peptidiques sur la cystéine du peptide pro-apoptotique protégé sur résine ou sur la cystéine du vecteur multivalent (Figure 99).

²²⁹ Yang, J.; Chen, H.; Vlahov, I. R.; Cheng, J. X.; Low, P. S. Evaluation of disulfide reduction during receptor-mediated endocytosis by using FRET imaging. *Proc Natl Acad Sci* **2006**, *103*, 13872-13877.

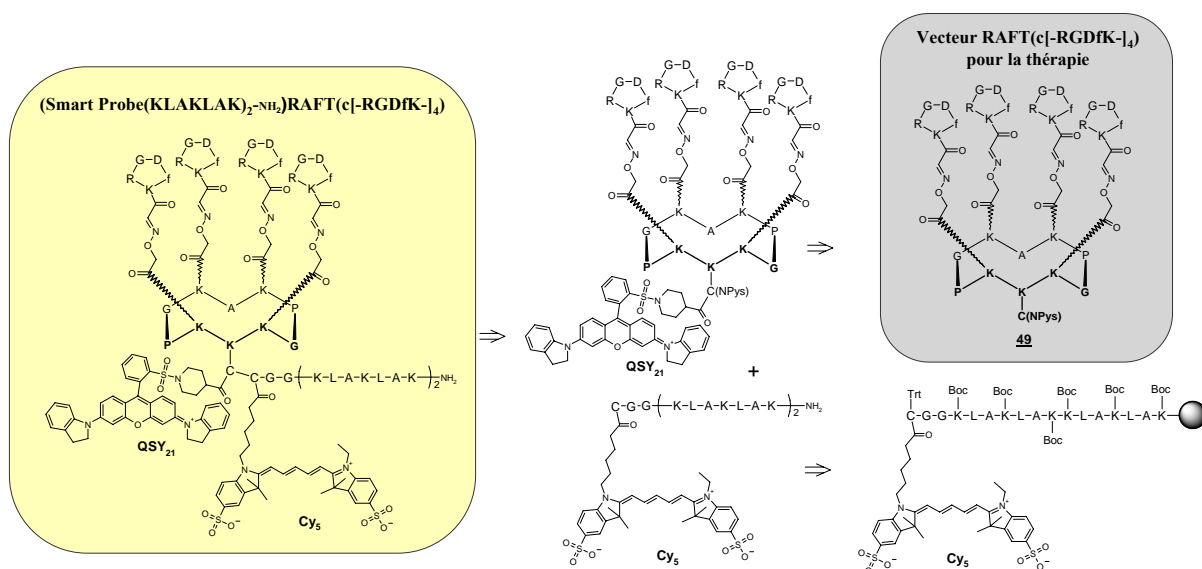
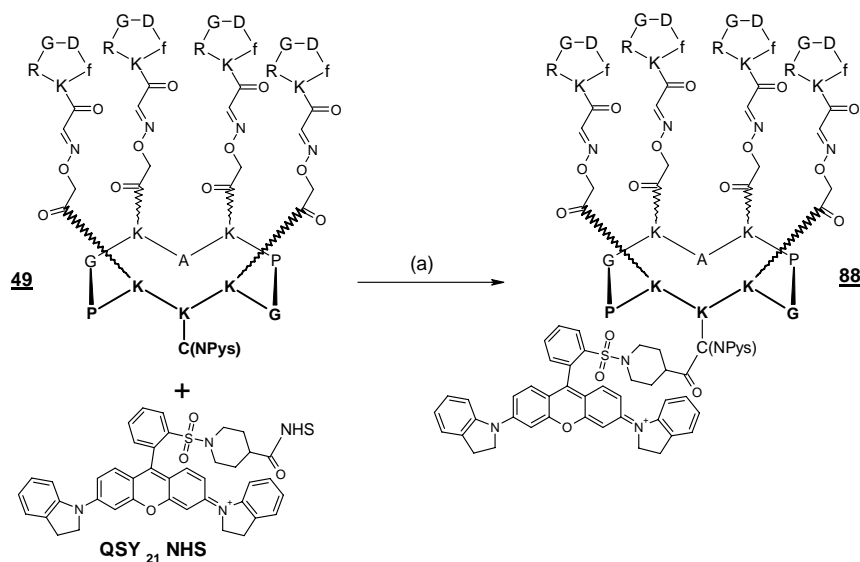


Figure 99 : Schéma rétro-synthétique du composé (SmartProbe(KLAKLAK)₂-NH₂)RAFT(c[-RGDfK-]₄).

C.3.2. Synthèse du Conjugué (Smart Probe (KLAKLAK)₂-NH₂)RAFT(c[-RGDfK-]₄)

La synthèse du composé hybride **92** implique la réalisation de deux précurseurs : le peptide (KLAKLAK)₂-NH₂ cyanilé présentant la fonction thiol libre **91** et le (QSY21)RAFT(c[-RGDfK-]₄) S-activé **88** (Figure 104). Le composé **88** est obtenu en une étape à partir de l'intermédiaire **49**. Le couplage du chromophore au RAFT par un lien amide est rendu possible par l'utilisation de l'ester activé commercial QSY21-NHS. Dans des conditions légèrement basiques, l'amine de l'intermédiaire **49** est acylé à partir de l'acide carboxylique activé du chromophore. La réaction est réalisée dans du DMF anhydre en utilisant un excès de chromophore (2 eq.) (Figure 100).



Réactifs : (a) DMF anh, DIPEA

Figure 100 : Schéma de synthèse du ligand multivalent (QSY21)RAFT(c[-RGDfK-]₄) **88**.

La réaction est incomplète au bout de 24 heures malgré un chauffage du milieu réactionnel à 40°C. Cela est très probablement lié à la mauvaise solubilité du quencher. Il sera envisageable d'utiliser d'autres solvants tel que la NMP dans cette réaction afin d'améliorer la solubilité du chromophore et ainsi la cinétique de réaction. Le composé **88** est purifié par CLHP et est obtenu avec un rendement de l'ordre de 30 %. Ce composé obtenu avec une excellente pureté a été caractérisé par spectrométrie de masse ESI en mode positif (Figure 101).

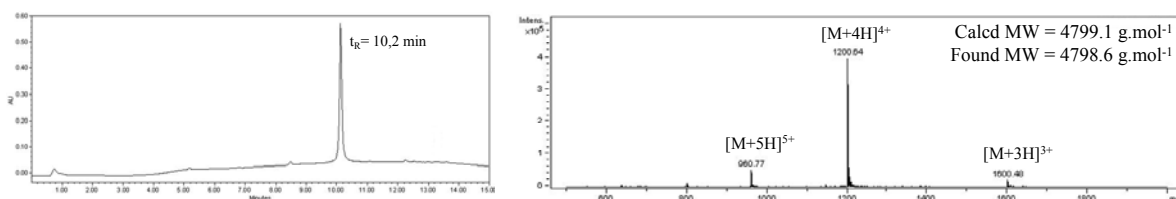


Figure 101 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du conjugué **88**.

Le composé Cy5-(KLAKLAK)₂-NH₂, **91** est préparé sur support solide en deux étapes à partir du peptide **89** synthétisé par SPPS en stratégie Fmoc/*t*-Bu sur une résine Rink Amide (Figure 102).

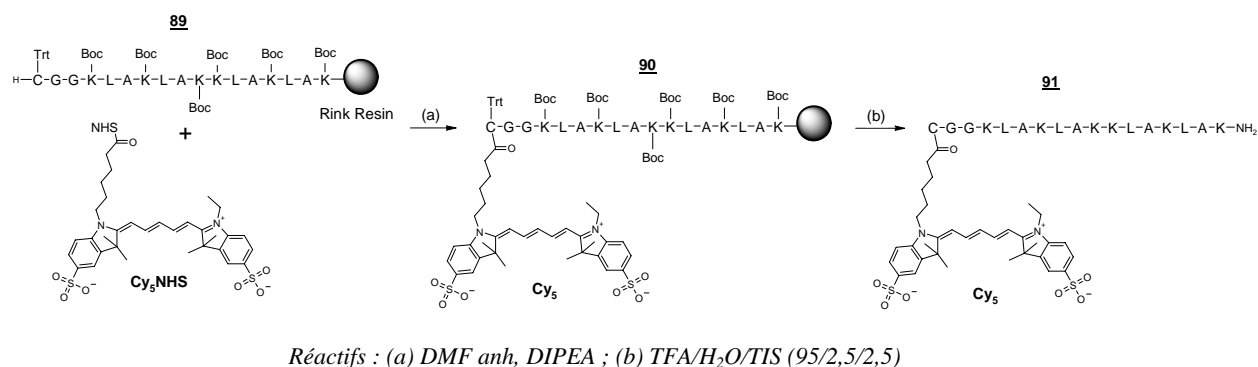


Figure 102 : Schéma de synthèse du composé Cy5-(KLAKLAK)₂-NH₂ **91**.

Dans des conditions légèrement basiques en présence de Cy5-NHS, l'amine *N*-terminale du peptide sur résine **89** est acylée à partir de l'acide carboxylique activé du chromophore. La réaction est réalisée dans du DMF anhydre en utilisant des quantités stoechiométriques de Cyanine 5 par rapport au taux de greffage de la résine. L'avancement de la réaction est de l'ordre de 60 % au bout de 24 heures. Cet avancement moyen peut être expliqué par des conditions de réaction sur résine plus difficiles qu'en solution (accessibilité difficile du peptide sur la résine, solubilité moyenne et encombrement relatif du chromophore). Le peptide **90** est ensuite décroché de la résine et déprotégé en une étape par un traitement en milieu acide fort (90 % TFA) en présence d'agents piègeurs de carbocations. Le peptide **91** est alors purifié par CLHP et est obtenu avec un rendement global de 50 %. Ce composé a été caractérisé par spectrométrie de masse ESI en mode positif (Figure 103).

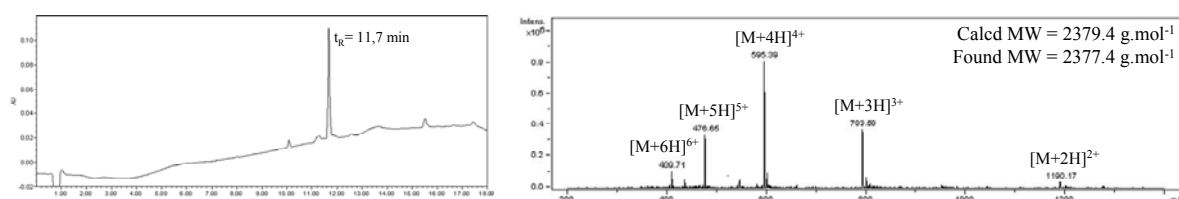
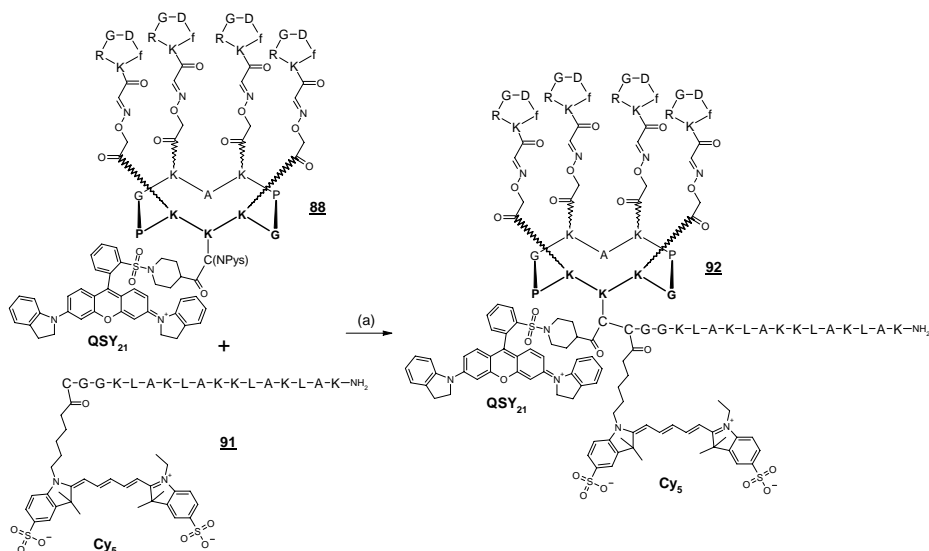


Figure 103 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du conjugué **91**.

Le produit **92** est alors obtenu grâce à l'assemblage par pont disulfure des précurseurs **91** et **88** décrits précédemment.



Réactifs : (a) DMF/PBS(pH 4,8)

Figure 104 : Schéma de synthèse du composé (Smart Probe(KLAKLAK)₂-NH₂)RAFT(c[-RGDfK-]₄) **92**.

Cette réaction est réalisée dans une solution tamponnée à pH 4,8 contenant du DMF anhydre avec un léger excès de conjugué **88** de manière à consommer tout le composé cyanilé. La réaction est complète au bout d'un quart d'heure malgré le fort encombrement stérique engendré par les chromophores présents sur les deux précurseurs à assembler. Le produit **92** est alors purifié et obtenu pur avec un rendement de l'ordre de 60 %. Ce composé a été caractérisé en spectrométrie de masse électrospray en mode positif par la présence de différents ions multichargés (Figure 105). Nous notons que la masse trouvée est en parfait accord avec la masse théorique attendue.

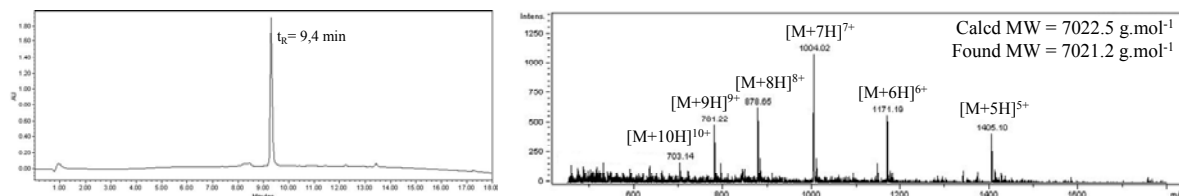


Figure 105 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du conjugué **92**.

C.4. Etudes Biologiques

L'évaluation des conjugués pour la thérapie anti-cancéreuse a été réalisée *in vitro* en collaboration avec le Dr. Z. Jin et *in vivo* avec S. Dufort (INSERM U823, Institut Albert Bonniot). L'efficacité de transfection de notre vecteur et le devenir cellulaire des drogues après vectorisation ont été étudiés avec l'aide, respectivement de M. Guidetti et du Dr. L. Sancey (INSERM U823, Institut Albert Bonniot).

C.4.1. Evaluation de la Toxicité du Conjugué (KLAKLAK)₂RAFT (c[-RGDfK-]₄)

★ Evaluation *in Vitro*

Afin d'évaluer *in vitro* l'efficacité de nos conjugués pro-apoptotiques, nous avons testé leurs effets cytotoxique et apoptotique. Ces tests sont réalisés sur des cellules cancéreuses TS/Apc de statut $\alpha_v\beta_3$ positif (adénocarcinome mammaire murin).

Le test de cytotoxicité consiste à évaluer la survie cellulaire après traitement par nos différents conjugués. Dans cette expérience, les cellules sont cultivées sur boîtes de Pétri puis sont incubées pendant une semaine avec les différents composés dans des conditions classiques permettant la croissance cellulaire (37°C, 5% CO₂). Comme attendu les composés contrôles RAFT(c[-RβADfK-]₄) et ((KLAKLAK)₂-OH)RAFT(c[-RβADfK-]₄) n'induisent pas de mort cellulaire. De manière surprenante, le composé contrôle négatif ((KLAKLAK)₂-NH₂)RAFT(c[-RβADfK-]₄) montre une mort cellulaire de l'ordre de 50 % par rapport à l'expérience réalisée avec le PBS (Figure 106). Ce dernier résultat peut être lié au temps d'incubation important qui pourrait entraîner l'internalisation du composé par une endocytose en phase fluide engendrant une certaine cytotoxicité.

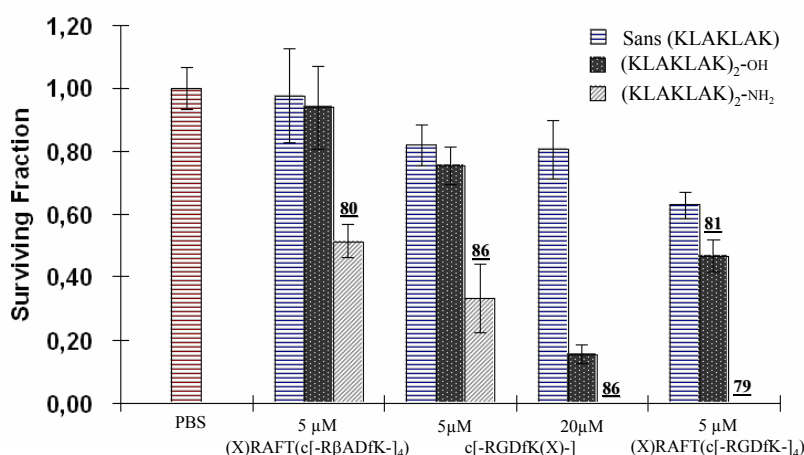


Figure 106 : Evaluation de la survie cellulaire de TS/Apc (pGL3) après traitement avec les conjugués aux peptides (KLAKLAK)₂.

Par ailleurs, à une concentration de 5 μM les conjugués cyclopentapeptides c[-RGDfK((KLAKLAK)₂-)] induisent moins de mort cellulaire que leurs analogues multivalents. De plus, seuls les conjugués au (KLAKLAK)₂-NH₂, présentant une fonction amide à l'extrémité C-terminale, montrent une activité biologique significative suggérant que le peptide pro-apoptotique dont l'extrémité C-terminale n'est pas modifiée est rapidement dégradé par les protéases. Nous n'observons aucune survie cellulaire lors de l'incubation des cellules avec 5 μM de composé ((KLAKLAK)₂-NH₂)RAFT(c[-RGDfK-]₄) **79**. A concentration identique, le cyclopeptide correspondant c[-RGDfK((KLAKLAK)₂-NH₂-)] **86** montre une survie cellulaire supérieure à 30 %. Pour abolir la survie cellulaire avec le conjugué monovalent **86**, il est nécessaire de l'incuber avec les cellules à une concentration supérieure à 20 μM. En effet, nous observons encore quelques colonies sur les boîtes de Pétri traitées à 20 μM de conjugué monovalent **86** alors que nous n'observons aucune survie cellulaire pour celle traitées à 5 μM de conjugué tétravalent **79** (Figure 107). Ces résultats mettent en évidence le bénéfice de la présentation de « cluster » de -RGD- dans l'efficacité de vectorisation et donc d'action du peptide pro-apoptotique.

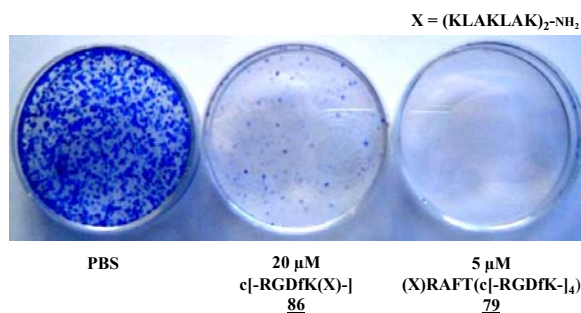


Figure 107 : Résultats des tests de cytotoxicité sur des cellules TS/Apc colorées au bleu de méthylène.

Afin de vérifier si nos composés ont un effet apoptotique après 6 ou 12 heures d'incubation, nous réalisons une coloration des noyaux (Hœchst) permettant de détecter ceux en apoptose. Les résultats obtenus montrent que seul le conjugué multivalent **79** présente des signes significatifs d'apoptose après 12 heures d'incubation (Figure 108). Le peptide pro-apoptotique $(KLAKLAK)_2-NH_2$ vectorisé par notre composé multivalent induit donc l'apoptose. Notre composée RAFT(c[-RGDfK-]₄) semble donc capable de restaurer les propriétés apoptotiques et cytotoxiques du peptide $(KLAKLAK)_2-NH_2$ à l'intérieur de la cellule.

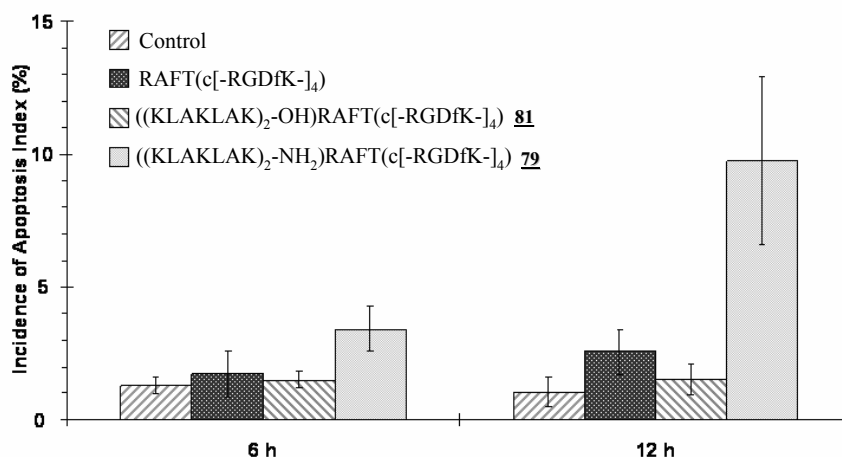


Figure 108 : Résultats des tests d'apoptose sur des cellules TS/Apc marquées au Hœchst.

★ Evaluation *in Vivo*

L'évaluation *in vivo* de nos conjugués a été réalisée sur des souris Nude dans lesquelles ont été implantées en sous cutané des cellules IGROV-1 (lignée cellulaire de carcinome ovarien murin). Cette expérience simule une implantation tumorale. Nos conjugués ont été injectés (0,12 μmol/jour/souris) par i.p. quotidiennement pendant 12 jours sur des lots de 8 à 9 souris, à partir du jour d'implantation des cellules cancéreuses. Le volume des tumeurs des souris de chaque groupe a été suivi tout au long de l'expérience (Figure 109). Les résultats obtenus montrent que le conjugué tétravalent **79** ralentit la progression des tumeurs alors qu'aucun effet n'est observé aux doses étudiées avec le peptide $(KLAKLAK)-NH_2$ ou le RAFT(c[-RGDfK-]₄) non conjugués. Nous n'observons aucun effet non plus avec le peptide contrôle négatif **81**.

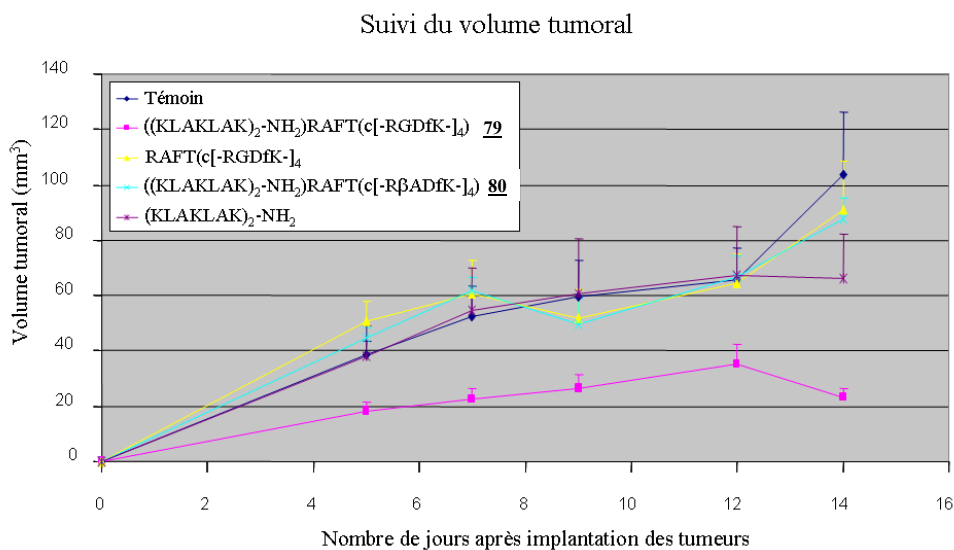


Figure 109 : Résultats *in vivo* du traitement de métastases avec les conjugués aux peptides (KLAKLAK)₂-NH₂.

Ces résultats *in vivo* montrent une activité anti-proliférative du composé **79**. Il semble donc que ce conjugué soit capable, *in vivo* de délivrer le peptide pro-apoptotique à l'intérieur des cellules cancéreuses et d'en empêcher partiellement la prolifération. Ces résultats valident donc le potentiel *in vivo* du composé multivalent RAFT(c[-RGDfK-]₄) à délivrer des éléments cytotoxiques au niveau des tumeurs.

C.4.2. Etude du Devenir Cellulaire du Composé (KLAKLAK)₂

Le devenir cellulaire du peptide (KLAKLAK)₂-NH₂ a été étudié par microscopie confocale sur cellules vivantes grâce au conjugué hybride **92**. Ces tests ont été réalisés sur trois lignées de cellules cancéreuses de statut $\alpha_v\beta_3$ positif : HEK293(β_3), TS/Apc et IGROV-1. Dans ces expériences, les cellules sont incubées pendant 1 heure avec le composé **92**, puis avec un colorant du noyau cellulaire, le colorant de Hoechst (bleu) et enfin les mitochondries sont marquées avec du mitotracker (vert). Quelle que soit la lignée cellulaire, avant 45 minutes nous n'observons aucun marquage de la Cyanine 5 (rouge) (Figure 110). Ce marquage, correspondant au relargage du composé Cy5-(KLAKLAK)₂-NH₂, apparaît au bout d'un peu moins d'une heure. Cette réduction du pont disulfure est localisée au niveau des endosomes.

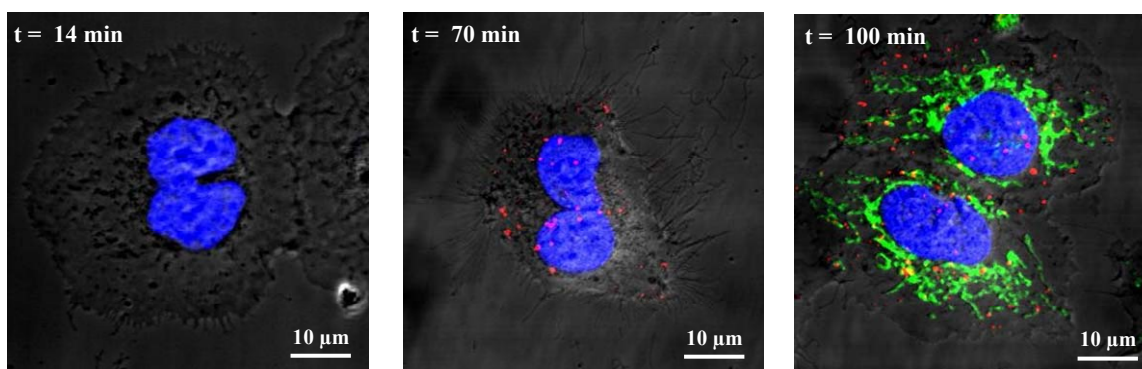


Figure 110 : Clichés d'imagerie confocale sur des cellules HEK293(β_3) après incubation du composé **92** à différents temps.

Le marquage du composé $\text{Cy5-(KLAKLAK)}_2\text{-NH}_2$ initialement endosomique apparaît ensuite sur les mitochondries. En effet, les clichés de microscopie confocale permettent de mettre en évidence une très bonne colocalisation (jaune) du $(\text{KLAKLAK})_2\text{-NH}_2$ (rouge) et des mitochondries (vert) (Figure 111).

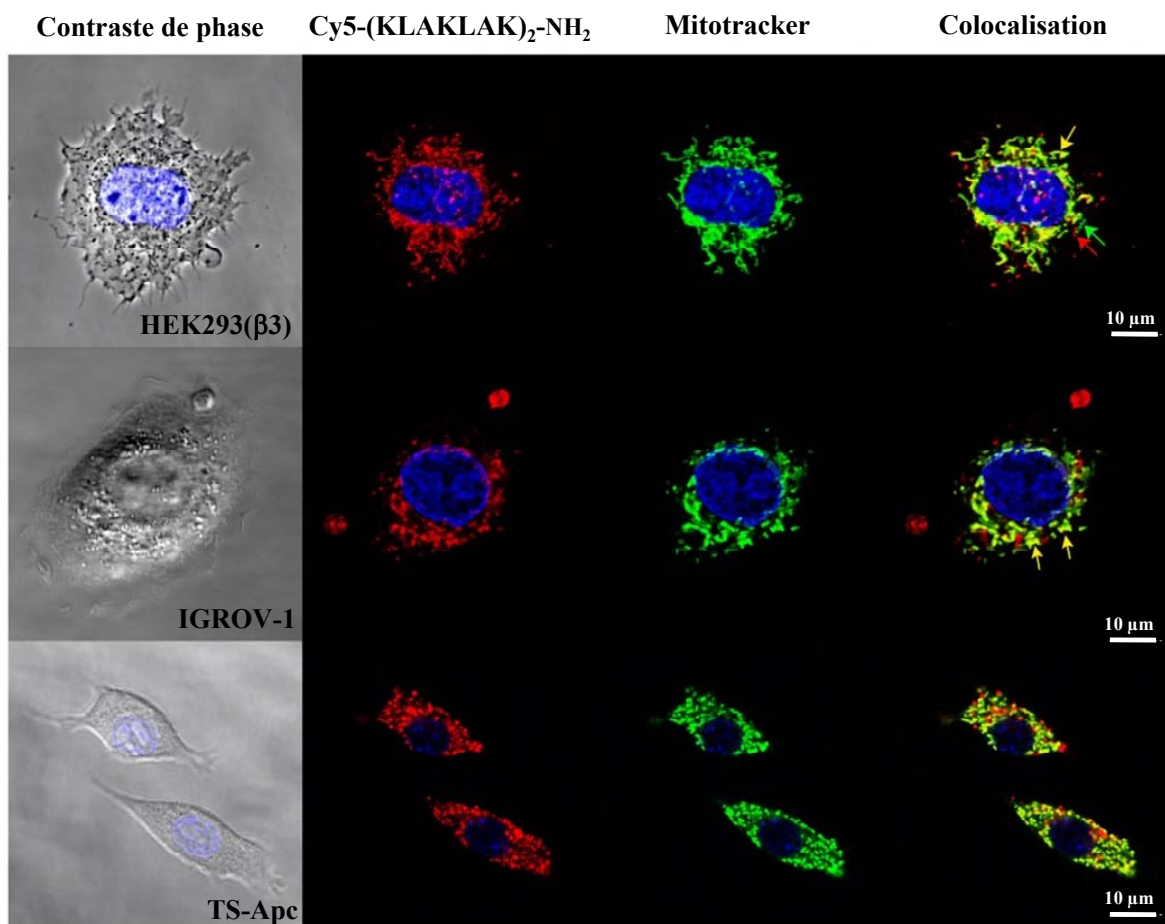


Figure 111 : Clichés d'imagerie confocale après incubation du composé 92 sur différentes lignées cellulaires après 1 à 2 heures.

Le suivi de ces expériences jusqu'à 8 heures ne montre pas de colocalisation totale mais une persistance du composé $\text{Cy5-(KLAKLAK)}_2\text{-NH}_2$ à l'intérieur de vésicules (Figure 112). Cela peut être lié à une entrée endosomale et/ou un trafic à travers la cellule lents, ou plus probablement à un ralentissement des phénomènes cellulaires responsables de l'endocytose dûs aux perturbations cellulaires engendrées par l'action du peptide pro-apoptotique.

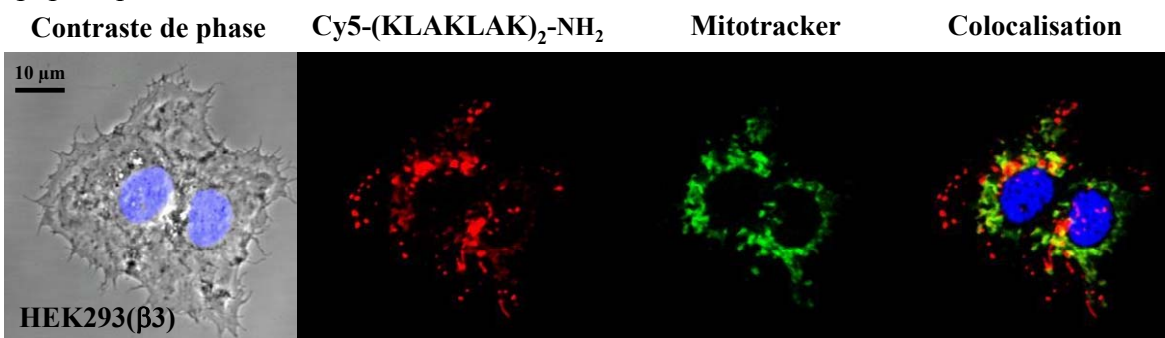


Figure 112: Clichés d'imagerie confocale sur HEK293(β₃) après incubation du composé 92 après 4 heures.

Ces résultats mettent en évidence que le peptide $\text{Cy5-(KLAKLAK)}_2\text{-NH}_2$ est capable de transiter à travers la cellule jusqu'aux mitochondries, site d'action du composé.²¹⁸ Il semble donc que le peptide pro-apoptotique quitte la voie endosomale afin de se concentrer au niveau des mitochondries. On peut émettre l'hypothèse que ce peptide polycationique puisse induire l'éclatement des endosomes.

Les résultats obtenus concordent avec les données de la littérature dans lesquelles l'apoptose observé *in vitro* avec le composé **79** serait le résultat d'une perturbation de la membrane mitochondriale par le peptide pro-apoptotique.²¹⁸ Pour pouvoir confirmer ce mécanisme d'action, il sera envisageable d'utiliser un marqueur mitochondrial dont la dépolarisation de la membrane induit un changement de la longueur d'émission, permettant ainsi d'observer toutes perturbations au niveau des mitochondries.

C.4.3. Evaluation de l'Efficacité de Transfection du Conjugué (SiRNA)RAFT(c[-RGDfK-]₄)

Afin d'évaluer *in vitro* l'efficacité de transfection de nos conjugués pro-apoptotiques nous avons réalisé un test préliminaire. Ce test est réalisé sur des cellules TS/Apc (pGL3) de statut $\alpha_v\beta_3$ positif et exprimant de façon stable le gène de la luciférase. Nous incubons les cellules avec le conjugué **83** annelé à son siRNA(pGL3) anti-sens.

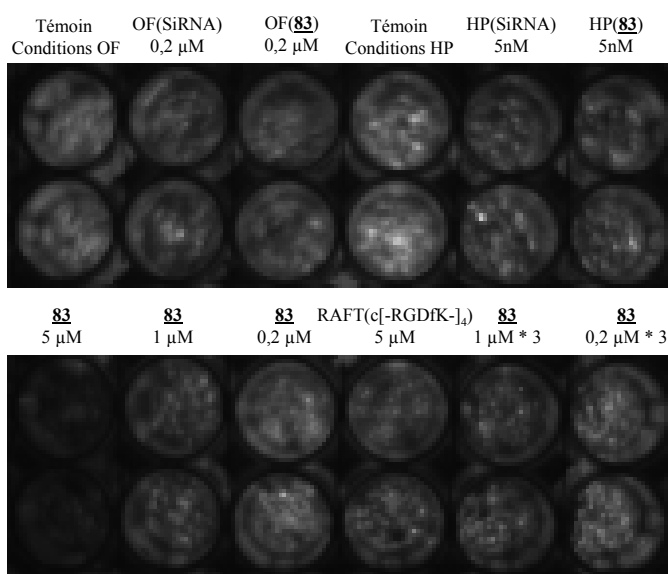


Figure 113: Clichés d'imagerie de fluorescence TS/Apc (pGL3) à 72 h (10000 cellules/puits dans plaque 96 puits).

Nous avons ensuite étudié l'extinction de fluorescence des cellules, 72 heures après avoir incubé les cellules deux heures avec différentes concentrations de conjugué **83** annelé (Figure 113). L'extinction de fluorescence a été quantifiée après lecture directe de la plaque ou de manière indépendante par dosage de la luminescence au spectromètre à fluorescence. Quelle que soit la méthode utilisée pour quantifier l'extinction de fluorescence, les résultats sont significativement peu différents (Figure 114).

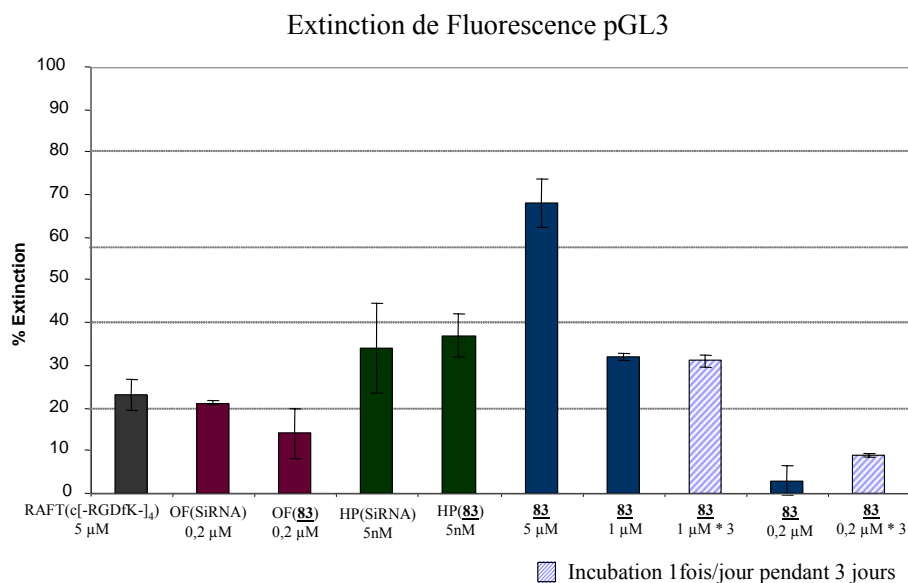


Figure 114: Résultats d’extinction de fluorescence des cellules TS/Apc (pGL3) à 72 h (10000 cellules/puits en plaque 96 puits).

Ces résultats montrent que le conjugué **83** annelé permet une extinction de fluorescence dose-dépendante, mais que l’effet de la répétition de l’incubation (1 fois par jour pendant 3 jours) n’est que modéré. Par ailleurs, les contrôles utilisant des systèmes de transfection Oligofectamine (OF) et HiPerFect (HP) montrent une extinction de fluorescence significativement peu différente pour le siRNA(pGL3) seul ou pour le composé **83** annelé. Néanmoins, les petites quantités cellulaires utilisées dans ces expériences ne nous ont pas permis de réaliser un dosage de protéines fiable et ainsi de pondérer les résultats d’extinction de fluorescence à la quantité de cellules dans chacun des puits. Or, l’extinction de fluorescence étant calculée par rapport au témoin, si le nombre de cellules dans les puits est différent, les résultats d’extinction de fluorescence ne peuvent plus être comparés entre eux. Des expériences antérieures ont montré que le composé RAFT(c[-RGDfK-]₄) est susceptible, à des concentrations de l’ordre de 5 μM, de modifier l’adhésion des cellules HEK293(β3) et d’induire un décollement cellulaire.¹⁵¹ Ce décollement peut alors être à l’origine d’une diminution de la croissance cellulaire résultant en une diminution de la quantité de cellules dans les puits après 72 heures de croissance. D’ailleurs, le résultat surprenant d’extinction de fluorescence observé pour le RAFT(c[-RGDfK-]₄) à 5 μM pourrait être un artefact ne correspondant pas à une extinction de la fluorescence mais à une diminution du nombre de cellules dans le puit. De même, potentiellement, le très bon résultat d’extinction de fluorescence obtenu avec le composé conjugué **83** annelé à 5 μM pourrait aussi être entaché de cet artefact. Ces résultats préliminaires sont donc à confirmer dans des expériences sur des quantités de cellules plus importantes permettant leur dosage protéique et avec des expériences contrôles complémentaires utilisant les conjugués **84**, **85** et **87**.

C.5. RESUME

L’approche synthétique de ces différents conjugués multivalents pour la thérapie anti-cancéreuse s’est avérée efficace et modulaire. En effet, l’utilisation d’un thiol activé peut indifféremment être introduit sur le composé multivalent ou sur le composé à coupler. Ceci permet un couplage disulfure particulièrement efficace. Par ailleurs, le composé **79** a

montré un effet cytotoxique ainsi qu'apoptotique résultant de la vectorisation suivi du relargage du peptide pro-apoptotique. *In vivo*, ce conjugué s'est avéré capable de ralentir le développement tumoral. Nous avons également montré que le peptide pro-apoptotique se concentre au niveau des mitochondries, induisant très probablement leur perturbation responsable de l'apoptose. D'autre part, l'évaluation préliminaire *in vitro* du composé **83** annelé montre des résultats très encourageants à confirmer, conférant à notre vecteur multivalent un potentiel pour la thérapie génique.

Les résultats obtenus avec composé **79** montrent que notre système permet une libération de la drogue en préservant les propriétés intrinsèques des molécules vectorisées. Par ailleurs, la présence de la drogue ne semble pas affecter les propriétés de ciblage de notre vecteur multivalent. Ces résultats confirment que notre composé multivalent RAFT(c[-RGDfK-]₄) semble être un vecteur particulièrement efficace pour la vectorisation ciblée d'éléments thérapeutiques.

D. Synthèse Totale de Clusters de Ligands -RGD- et Adhésion Cellulaire sur Résine

Dans les résultats précédents, nous avons montré que le vecteur tétravalent RAFT(c[-RGDfK-]₄) est dix fois plus affiné pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ que le composé monovalent c[-RGDfK-]. Cette augmentation d'affinité due à la présentation de « cluster » sur le châssis RAFT nous a amené à concevoir d'autres ligands multivalents.

Dans l'optique de tester l'affinité de nombreux ligands multivalents pour divers récepteurs, nous avons envisagé une méthode de synthèse et d'évaluation biologique de nos composés réalisées entièrement sur support solide.

D.1. RAFT Supportés : Outils pour l'Évaluation Biologique de Nouveaux Ligands Multivalents

L'utilisation de molécules supportées dans des tests biologiques est principalement exploitée en chimie combinatoire afin de découvrir de nouvelles molécules d'intérêts biologiques.²³⁰ La technique utilisant l'approche combinatoire de synthèse « *One Bead - One Compound* » a permis la synthèse de larges bibliothèques de molécules peptidiques ou encore organiques.²³¹ Les molécules supportées, sans être séparées du polymère de synthèse, sont évaluées dans différents tests biologiques, dont des tests enzymatiques^{232,233} ou cellulaires.^{231,234} La reconnaissance des billes présentant des molécules actives est réalisée par colorimétrie ou par observation de cellules adhérentes aux billes. La synthèse et l'évaluation biologique de ces molécules sur support sont rendues possibles par le développement de résines adaptées présentant une bonne solvation dans les solvants de synthèse ainsi que dans les milieux biologiques. Les molécules synthétisées et testées sur support solide sont principalement des peptides linéaires,²³⁵ dimériques²³⁶ ou cycliques.²³⁷

²³⁰ Lam, K. S.; Liu, R.; Miyamoto, S.; Lehman, A. L.; Tuscano, J. M. Applications of one-bead one-compound combinatorial libraries and chemical microarrays in signal transduction research. *Acc Chem Res* **2003**, *36*, 370-377.

²³¹ Gibson, C.; Sulyok, G. A.; Hahn, D.; Goodman, S. L.; Holzemann, G.; Kessler, H. Nonpeptidic $\alpha(v)\beta(3)$ Integrin Antagonist Libraries: On-Bead Screening and Mass Spectrometric Identification without Tagging. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*, 165-169.

²³² Ying, L.; Gervay-Hague, J. One-bead-one-inhibitor-one-substrate screening of neuraminidase activity. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1857-1865.

²³³ Dixon, S.; Ziebart, K. T.; He, Z.; Jeddeloh, M.; Yoo, C. L.; Wang, X.; Lehman, A.; Lam, K. S.; Toney, M. D.; Kurth, M. J. Aminodeoxychorismate synthase inhibitors from one-bead one-compound combinatorial libraries: "staged" inhibitor design. *J Med Chem* **2006**, *49*, 7413-7426.

²³⁴ Sebestyén, F.; Dibó, G.; Kovács, A.; Furkua, A. Chemical synthesis of peptide libraries. *Bioorg Med Chem Lett* **1993**, *3*, 413-418.

²³⁵ Kritzer, J. A.; Luedtke, N. W.; Harker, E. A.; Schepartz, A. A rapid library screen for tailoring beta-peptide structure and function. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 14584-14585.

²³⁶ Aggarwal, S.; Harden, J. L.; Denmeade, S. R. Synthesis and screening of a random dimeric peptide library using the one-bead-one-dimer combinatorial approach. *Bioconjug Chem* **2006**, *17*, 335-340.

²³⁷ Aina, O. H.; Marik, J.; Liu, R.; Lau, D. H.; Lam, K. S. Identification of novel targeting peptides for human ovarian cancer cells using "one-bead one-compound" combinatorial libraries. *Mol Cancer Ther* **2005**, *4*, 806-813.

Néanmoins, récemment des approches de synthèse de molécules supportées plus complexes, telles que des petites protéines, ont été développées permettant leur évaluation sur support.²³⁸

Ainsi, afin de trouver de nouveaux ligands sélectifs vis-à-vis de différentes cibles biologiques, nous avons développé une méthode de synthèse de nos macromolécules entièrement réalisée sur support solide. L'évaluation biologique de nos composés toujours rattachés à la résine pourra ensuite être réalisée en présence de la cible cellulaire ou protéique.

Cette stratégie devrait permettre de concevoir à partir d'une résine présentant le châssis RAFT fonctionnalisé par des oxyamines autant de macromolécules multivalentes sur résine qu'on aura de ligands potentiels présentant un aldéhyde (Figure 115).

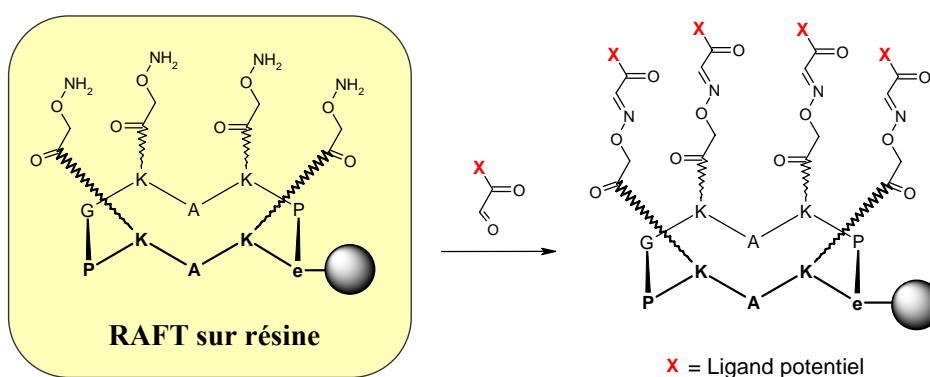


Figure 115: Schéma de conception de macromolécules multivalentes sur support.

Nous avons dans un premier temps étudié la faisabilité du projet en vérifiant que les propriétés de multivalence de notre vecteur, observées en solution, sont conservées sur le support solide. Pour cela, nous avons mis au point une stratégie de synthèse et l'évaluation biologique de notre vecteur multivalent RAFT(c[-RGDfK-]₄) sur support solide. Dans ce travail, il nous a fallu déterminer le taux de greffage en peptide sur la résine permettant de s'affranchir de l'effet de multivalence apporté par la résine. En effet, à une forte charge en peptide, le grand nombre de ligands -RGD- entraîne une concentration locale de motifs -RGD- importante sur la résine empêchant l'observation de l'effet de multivalence du RAFT.

D.2. Synthèse du Vecteur Multivalent RAFT(c[-RGDfK-]₄) sur Support Solide

Afin de vérifier l'effet de multivalence apporté par notre composé tétravalent attaché à un support solide, nous avons choisi de comparer l'adhésion cellulaire sur des résines présentant notre vecteur multivalent RAFT(c[-RGDfK-]₄) et son analogue monovalent RAFT(c[-RGDfK-]₁) (Figure 116). Par ailleurs, afin de confirmer que l'adhésion cellulaire résulte bien de l'interaction des intégrines aux peptides -RGD- présentés par les résines, nous avons également synthétisé un peptide contrôle négatif RAFT(c[-RβADfK-]₄) ne présentant pas d'affinité pour l'intégrine α_vβ₃. Les RAFT(c[-RXDfK-]_n) sont synthétisés à différents taux de greffage sur la résine afin de déterminer la charge adéquate en peptide pour l'observation de l'effet de multivalence du RAFT(c[-RGDfK-]₄).

²³⁸ Johnson, E. C.; Durek, T.; Kent, S. B. Total chemical synthesis, folding, and assay of a small protein on a water-compatible solid support. *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 3283-3287.

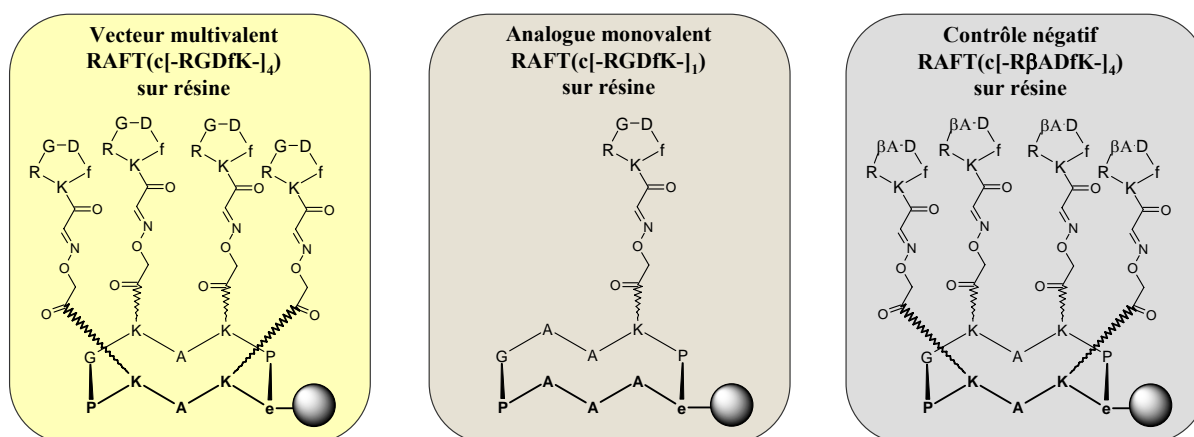


Figure 116: Schéma des macromolécules RAFT(c[-RXDfK-]_n) sur support (n = 1 ou 4).

D.2.1. Stratégie de Synthèse

Les composés RAFT(c[-RXDfK-]_n) (n = 1 ou 4) sont entièrement synthétisés sur support solide. Ils proviennent de l'assemblage par lien éther d'oxime de ligands c[-RXDfK(CO-CHO)-] aux gabarits RAFT attachés à la résine et fonctionnalisés par des oxyamines. Les cyclodécapeptides sont synthétisés sur des supports solides compatibles avec les tests biologiques en milieux aqueux, telles les résines Rink Amide PEGA et NovaSyn[®]TGR. Ces résines permettent la synthèse totale de notre macromolécule et la récupération du peptide en solution à un fort pourcentage de TFA (90 %) pour son analyse (CLHP, SM). L'ancrage à la résine, ainsi que la cyclisation du peptide, sont rendus possible grâce à l'utilisation de l'acide glutamique de la série D non naturelle. Ce dernier est couplé *via* sa chaîne latérale aux fonctions amines des résines. L'extrémité C-terminale, protégée par un groupement allyle, reste alors disponible pour la cyclisation ultérieure du peptide (Figure 117). Le résidu de série D permet une cyclisation induisant un coude β identique à celui de la séquence Pro-Gly.

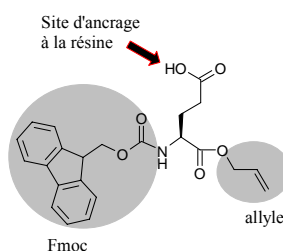


Figure 117: Schéma de l'acide aspartique modifié Fmoc-e-Al.

La synthèse des décapeptides linéaires est réalisée en utilisant le composé **5** permettant d'introduire les fonctions oxyamine protégées. Le groupement protecteur des oxyamines Eei, labile dans des conditions (3% TFA) où le peptide reste accroché à la résine rend donc possible cette synthèse totale du châssis RAFT sur support solide (Figure 118).

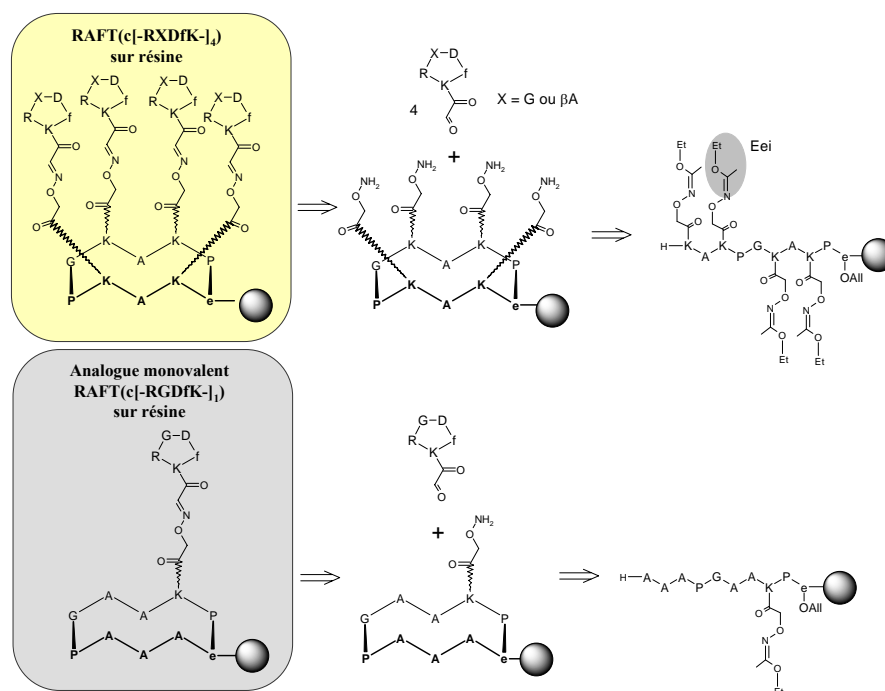


Figure 118: Schéma de conception des macromolécules multivalentes sur support.

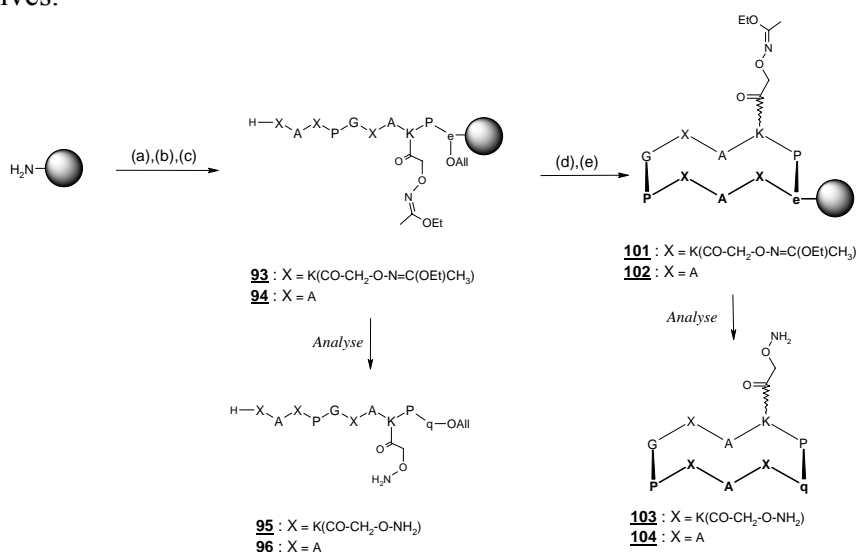
Les peptides linéaires présentant une ou quatre fonctions oxyamine sont cyclisés après élimination du groupement allyle du résidu acide glutamique. Les fonctions oxyamine des peptides cycliques sont ensuite déprotégées permettant ainsi le couplage par lien éther d'oxime du RAFT aux cyclopentapeptides fonctionnalisés par un aldéhyde.

D.2.2. Synthèse des RAFT(c[-RXDfK-]4) et RAFT(c[-RGDfK-]1) sur support solide

Les composés sur résine, RAFT(c[-RXDfK-]4) et RAFT(c[-RGDfK-]1), ont été synthétisés dans un premier temps sur une résine Rink Amide PEGA puis sur une résine NovaSyn®TGR. Ces résines constituées de polymères hydrophiles sont développées pour les synthèses de peptides très hydrophobes (séquences difficiles) ou pour réaliser des tests biologiques sur résine. Les peptides linéaires sont synthétisés par SPPS en utilisant la stratégie Fmoc/*t*-Bu. Ces synthèses ont été réalisées à différents taux de substitution de la résine, allant de 0,2 mmol/g à 2 pmol/g. Les différentes charges en peptide sur la résine sont obtenues en couplant une quantité contrôlée du premier acide aminé correspondant au taux de substitution désiré. Afin que la quantité de Fmoc-e-OAll mise en jeu soit représentative du « *loading* », nous avons optimisé le couplage du Fmoc-e-OAll à la résine pour qu'il soit quantitatif. Pour cela, après avoir contrôlé précisément la quantité d'acide aminé mis en jeu, nous utilisons un excès d'agent de couplage et nous concentrons les réactifs.

Par ailleurs, nous réalisons l'addition des réactifs sous une agitation vive de manière à obtenir une substitution homogène des billes de résine. Nous réalisons ensuite une étape de « *capping* » en acylant les fonctions amine libres de la résine. Le couplage des autres acides aminés est alors réalisé, quel que soit le taux de substitution de la résine, dans les conditions classiques décrites précédemment pour le composé **9** avec des excès d'acides aminés et de PyBOP (Figure 119). L'utilisation de large excès, voire de très larges excès de réactifs lorsque le taux de substitution de la résine est faible, nous garantit des

conditions de concentration en réactifs optimales pour des réactions de couplage quantitatives.



Réactifs : (a) x mmol/g Fmoc-e-OAll, 0,4 mmol PyBOP, DMF, DIPEA ; (b) DMF, Pyridine, Ac₂O (7/2/1) ; (c) 20 % pipéridine/DMF suivi de 9 cycles ; (i) 0,4 mmol Fmoc-AA-OH, 0,4 mmol PyBOP, DMF, DIPEA ; (ii) 20 % pipéridine/DMF ; (d) Pd⁰(PPh₃)₄, PhSiH₃, CH₂Cl₂/DMF ; (e) PyAOP, DMF, DIPEA
 Conditions Analyse : TFA/H₂O (95/5) - (x : loading souhaité de la résine)

Figure 119 : Schéma de synthèse des RAFT sur résine.

Le traitement d'un échantillon de résine avec une solution de TFA/H₂O (95/5) nous permet de décrocher le peptide de son support et de l'analyser. Les chromatogrammes CLHP des deux peptides linéaires **95** et **96** montrent qu'ils sont obtenus avec une bonne pureté (Figure 120). Ces peptides ont été caractérisés par spectrométrie de masse ESI en mode positif.

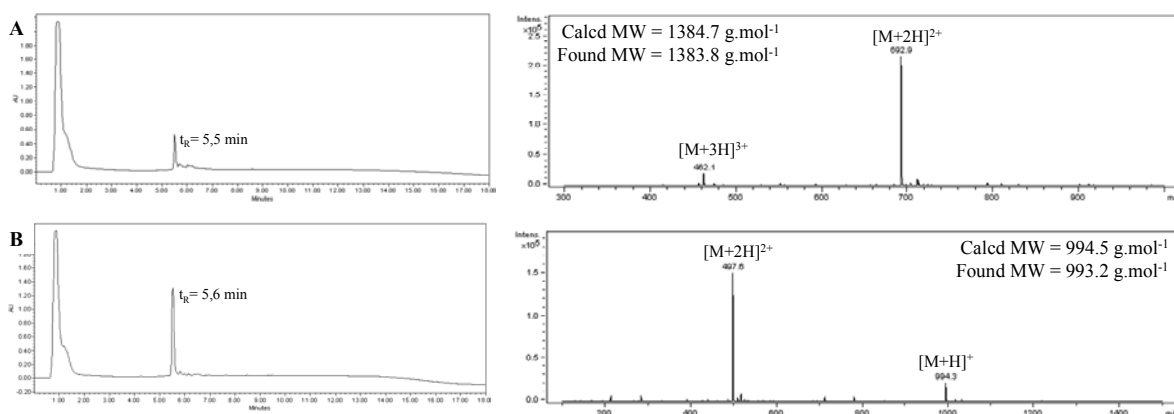


Figure 120 : Chromatogrammes CLHP et spectres de masse ESI des peptides : A/ **95 ; B/ **96**.**

Lors de la synthèse des différents peptides RAFT(c[-RXDfK-]_n) à un taux de greffage identique, afin de s'assurer que les charges en peptides des résines sont identiques, nous réalisons le début des synthèses peptidiques sur un lot de résine commun qu'on ne sépare qu'après la déprotection du quatrième acide aminé.

Le groupe protecteur allyle est ensuite éliminé sur résine dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le groupement Alloc en solution mais en présence d'un excès de réactifs. La fonction amine ainsi régénérée permet la cyclisation intramoléculaire du châssis toujours attaché à la résine. Cette réaction est réalisée avec du PyAOP, agent de couplage décrit pour être très efficace dans les réactions de cyclisation intramoléculaire sur

résine.^{239,240} Les réactions de déprotection du groupe allyle et de cyclisation ont été réalisées en utilisant un large excès de réactifs, identique quel que soit le taux de greffage en peptide sur la résine. Cela nous permet d'obtenir des réactions quantitatives. Les peptides cycliques **101** et **102** sur résine ont été caractérisés après leur décrochage du support (respectivement **103** et **104**) en spectroscopie de masse ESI en mode positif (Figure 121).

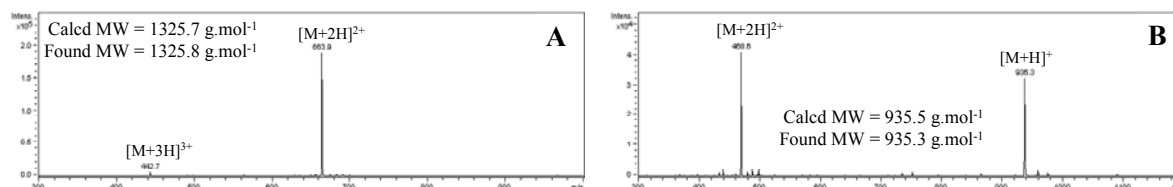
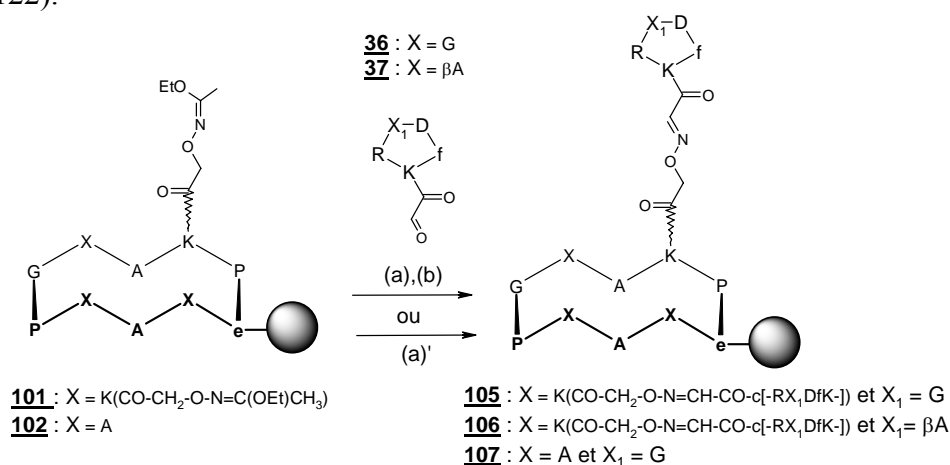


Figure 121 : Spectres de masse ESI des peptides : A/ **103** ; B/ **104**.

L'obtention des macromolécules **105**, **106** et **107** résulte de l'assemblage des cyclopentapeptides **36** ou **37** présentant une fonction aldéhyde aux RAFT supportés (Figure 122).



Réactifs : (a) CH₂Cl₂/TFA/H₂O (94/3/3) ; (b) 2 mmol/g_{résine} c[-RXDfK(CO-CHO)-], DMF ou (a') 2mmol/g_{résine} c[-RXDfK(CO-CHO)-], 3 % TFA, CH₃CN/H₂O (1/1)

Figure 122 : Schéma de synthèse du couplage chimiosélectif des RAFT(c[-RXDfK-]_n) **105**, **106** et **107** sur résine.

Pour cela, les fonctions oxyamine des châssis **101** et **102** sur résine sont déprotégées dans une solution contenant 3 % de TFA et d'eau pendant une demi-heure. Les résines sont alors reprises dans une solution de DMF contenant un excès de peptides **36** ou **37** afin de réaliser le couplage chimiosélectif éther d'oxime sur résine. Au bout de deux heures, les réactions sont complètes et les composés **105**, **106** et **107** sont obtenus avec une pureté satisfaisante sans purification (Figure 123). La caractérisation en spectroscopie ESI des composés sur résine a été réalisée après le décrochement des peptides à partir de petites fractions de résine. Nous avons également réalisé sur résine la réaction « One Pot » détaillée précédemment en solution. Un traitement de la résine **101** dans une solution contenant 3 % de TFA dans CH₃CN/H₂O (1/1) en présence d'un excès de peptide **36** nous a permis d'accéder à un peptide de qualité identique à celui obtenu par la voie de synthèse en deux étapes.

²³⁹ Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. On the use of PyAOP, a phosphonium salt derived from HOAt, in solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38*, 4853-4856.

²⁴⁰ Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.

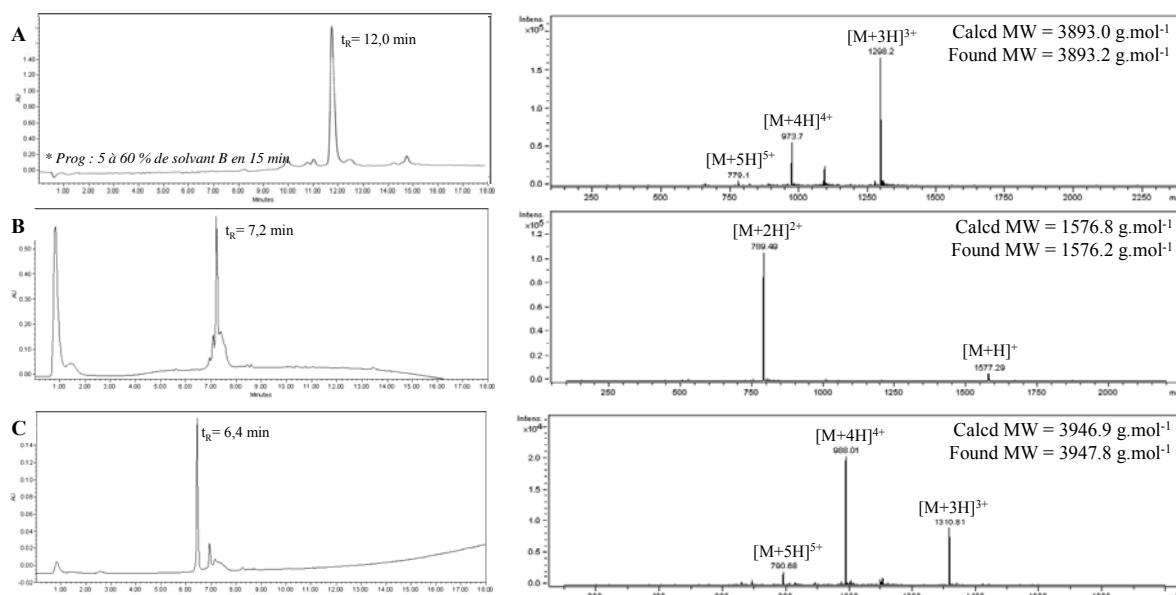


Figure 123 : Chromatogrammes CLHP et spectres de masse ESI des peptides : A/ **105** ; B/ **106** ; C/ **107**.

Toutes les synthèses des RAFT(c[-RXDfK-]₄) et RAFT(c[-RGDfK-]₁) à un même taux de substitution sont réalisées en parallèle avec des solutions de réactifs communes de manière à avoir des conditions de synthèse rigoureusement identiques. Ces travaux réalisés sur des quantités de résine de l'ordre de 50-100 mg ne nous ont pas permis de contrôler les rendements de chacune des réactions.

Il faut noter que lors de la dernière étape de ligation chimiosélective, nous avons observé une rétention non spécifique des cyclopeptides **36** ou **37** au sein du polymère composant la résine PEGA. En effet au cours des synthèses à faibles « *loading* », l'analyse des peptides **105** et **106** par CLHP a montré un pic correspondant aux cyclopeptides **36** ou **37**. Une expérience d'adhésion cellulaire sur une résine acylée traitée dans les conditions de couplage chimiosélectif utilisant **36**, a confirmé la présence du pentapeptide associé à la résine. En effet, cette résine contrôlée ne présentant pas de peptide mais traitée avec le ligand **36** engendre une adhésion cellulaire importante sur résine. De nombreux essais de lavages ont été réalisés pour éliminer ce peptide de la résine, mais se sont avérés inefficaces. Nous avons donc choisi de préparer nos molécules sur une résine NovaSyn[®]TGR ne présentant pas de rétention des cyclopentapeptides lors du couplage chimiosélectif. Les nouvelles synthèses de nos composés à différents « *loading* » sur cette résine ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites pour la résine PEGA.

D.3. Evaluation de l'Adhésion Cellulaire sur les Résines Présentant les Peptides

Les différents lots de résines, fonctionnalisées par nos macromolécules à des taux de greffage de 0,2 mmol/g à 2 pmol/g, ont été évalués lors de tests d'affinité.

D.3.1. Mise au Point du Test d'Adhésion Cellulaire

Le test *in vitro* développé ici repose sur l'adhésion de cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ directement sur le support solide présentant les peptides. Cette adhésion cellulaire est liée à l'affinité des intégrines $\alpha_v\beta_3$ cellulaires pour les peptides présentés par la résine. Les cellules sont visualisées après fixation (désorganisation de la membrane cellulaire) et

coloration. Deux colorants cellulaires, marqueurs du noyau, ont été testés : le rouge nucléaire et le bleu de méthylène. La coloration au bleu de méthylène, présentant un meilleur contraste, s'est avérée la plus performante pour l'exploitation des résultats. Par ailleurs, l'incubation se fait à 37° C, température physiologique de croissance des cellules.

Afin de déterminer les conditions optimales pour réaliser nos expériences d'adhésion cellulaire, nous avons testé différents paramètres comme la concentration cellulaire, le temps d'incubation de la résine avec les cellules et l'agitation lors de l'incubation. Des tests réalisés avec le RAFT(c[-RGDfK-]₄) supporté à un « *loading* » de 0,2 mmol/g avec la lignée cellulaire HEK 293(β3) a montré qu'une demi-heure d'incubation des cellules avec la résine était suffisante pour avoir une adhésion cellulaire importante et spécifique de l'interaction intégrine α_vβ₃/ligand -RGD-. En effet, de manière attendue, les résines **106** présentant les peptides contrôles négatifs RAFT(c[-RβADfK-]₄), n'ayant pas d'affinité avec l'intégrine α_vβ₃, n'ont montré aucune adhésion cellulaire avec la lignée HEK293(β3) (Figure 124). Ce résultat confirme que l'adhésion cellulaire est bien médiée par l'intégrine α_vβ₃.

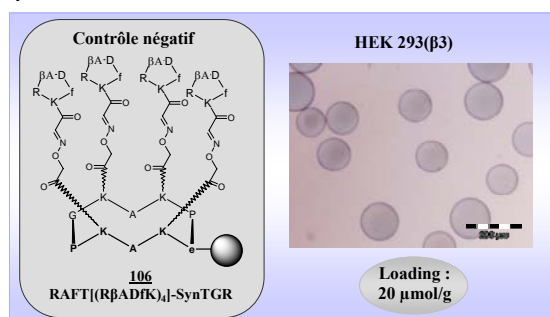


Figure 124 : Cliché du test d'adhésion cellulaire avec la lignée HEK293(β3) sur la résine **106** à un loading 0,2 mmol/g.

Par ailleurs, le paramètre d'agitation s'est avéré important. Sans agitation, les cellules HEK 293(β3), naturellement adhérentes, se déposent sur les résines et y adhèrent de façon non spécifique en amas. En ce qui concerne la concentration cellulaire, les tests d'adhésion réalisés à différentes concentrations ont montré qu'un million de cellules par millilitre (pour de 2 à 10 mg de résine) permet d'obtenir une adhésion importante de cellules, détectées après coloration au bleu de méthylène à la surface des billes de résine (Figure 125).

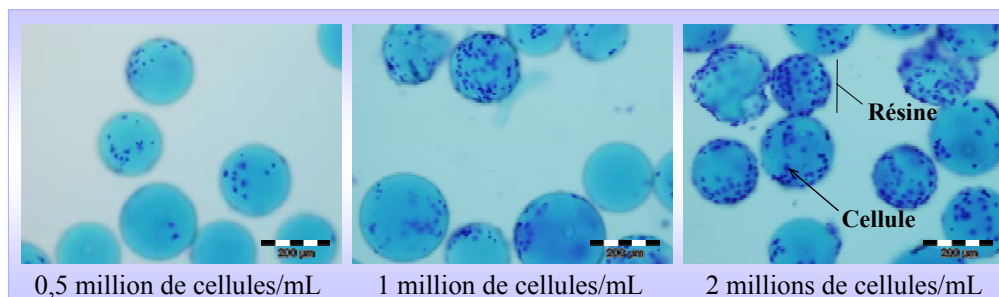


Figure 125 : Clichés des tests d'adhésion à différentes concentrations cellulaires sur **105** à un loading de 0,2 mmol/g (Résine PEGA).

Ces résultats nous ont amenés à choisir, pour réaliser nos expériences, une concentration de 1 million de cellules/mL avec un temps d'incubation de 30 minutes, le tout sous une agitation douce.

D.3.2. Effet de Multivalence

Les conditions du test cellulaire définies, nous nous sommes attachés à déterminer la charge en peptide adéquate pour s'affranchir de l'effet de multivalence lié à la présentation multiple des molécules sur les billes de résine.

Les tests cellulaires ont montré une adhésion de la lignée HEK293(β 3) forte mais significativement peu différente sur les résines Nova Syn TGR **105** et **107** à des « loading » allant de 0,2 mmol/g à 2 μ mol/g (Figure 126). Ces adhésions cellulaires similaires semblent indiquer qu'à ces « loading », les taux de charge en peptide sur la résine sont trop importants pour que l'on puisse observer l'effet de multivalence dû à la présentation sous forme de « cluster » des ligands -RGD- sur RAFT.

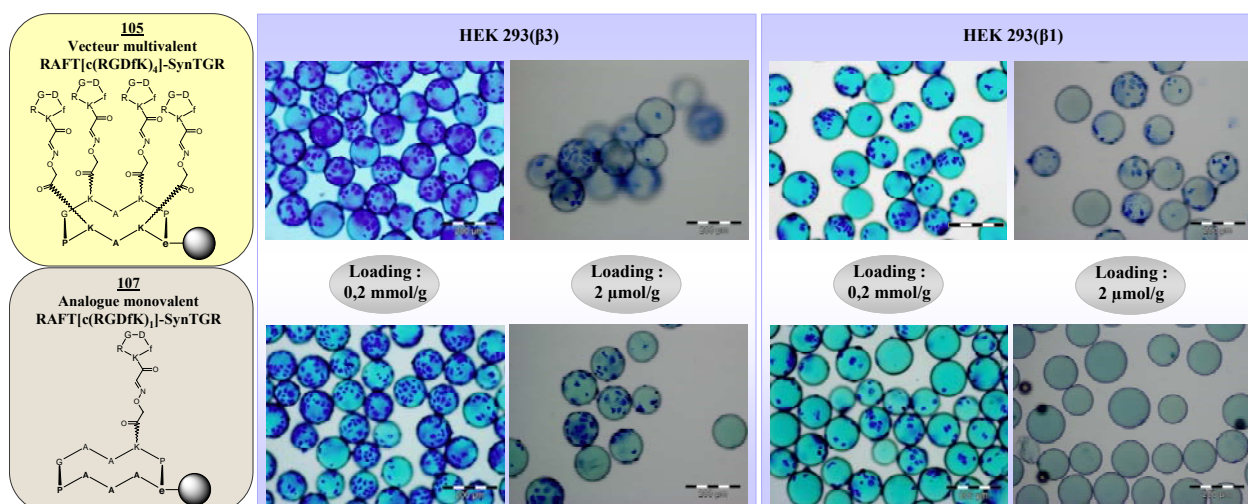


Figure 126 : Clichés des tests d'adhésion cellulaire avec les lignées HEK293(β 3) et HEK293(β 1) sur les résines **105** et **107** à des loading de 0,2 mmol/g et 2 μ mol/g.

Par ailleurs, au « loading » de 0,2 mmol/g, on observe également une adhésion des cellules HEK293(β 1), exprimant le récepteur $\alpha_v\beta_1$ appartenant à la même famille d'intégrine que $\alpha_v\beta_3$, sur les résines **105** et **107** (Figure 126). A cette charge en peptide sur la résine, nous observons une perte de la spécificité de notre composé pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

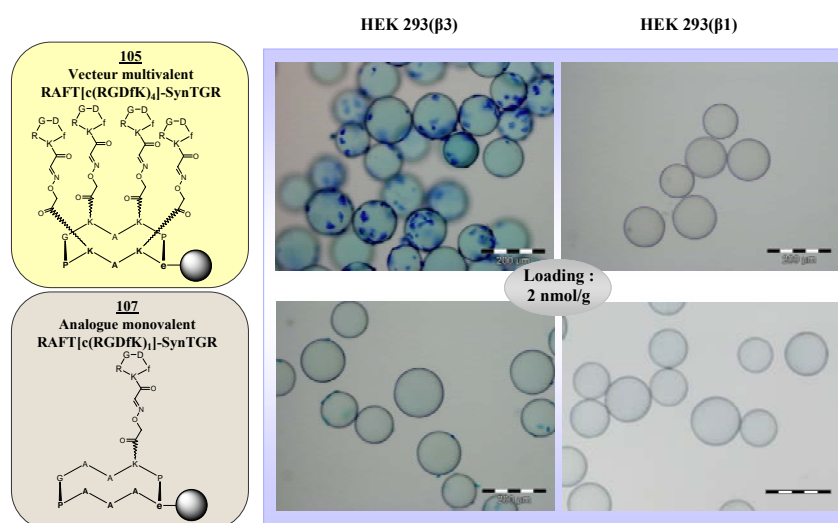


Figure 127 : Clichés des tests d'adhésion cellulaire avec les lignées HEK293(β 3) et HEK293(β 1) sur les résines **105** et **107** à un loading de 2 nmol/g.

Pour un « *loading* » plus faible de 2 nmol/g, nous avons observé une adhésion cellulaire importante uniquement sur les billes de résine **105** portant le gabarit RAFT(c[-RGDfK-]₄). L'adhésion cellulaire diminue très fortement lorsque le peptide sur le support solide est l'analogue monovalent **107** (Figure 127). A ce « *loading* » extrêmement bas, le nombre de molécules RAFT étant beaucoup plus faible (100 000 fois plus faible qu'à 0,2 mmol/g), on s'affranchit de l'effet de multivalence de la résine. On observe ainsi l'effet de la multivalence dû à la présentation des « *cluster* » de -RGD-. Enfin, nous n'observons pas d'adhésion de la lignée cellulaire HEK 293(β1). Cette charge en peptide sur la résine permet d'observer une bonne sélectivité du RAFT(c[-RGDfK-]₄) pour l'intégrine α_vβ₃. Ces résultats confirment donc que l'effet de multivalence du RAFT(c[-RGDfK-]₄) est conservé lorsque celui-ci est supporté. Ils valident donc la possibilité d'utiliser notre châssis moléculaire RAFT sur résine pour développer de nouveaux ligands multivalents de haute affinité pour différents récepteurs.

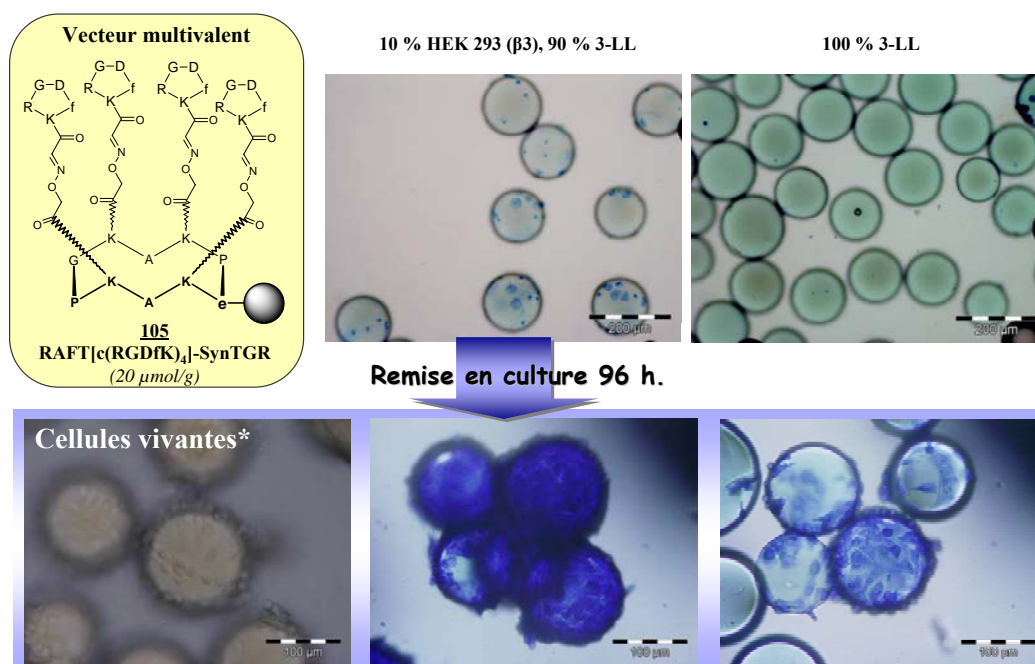
Par ailleurs, nous notons une adhésion cellulaire importante sur la résine **105** dont le « *loading* » est extrêmement faible (2 nmol/g) par rapport aux « *loading* » classiquement utilisés dans les expériences de ce type décrites dans la littérature, de l'ordre de 0,2 à 1 mmol/g.²³⁶ Notre système de présentation multimérique supporté semble donc être particulièrement performant pour la conception de ligands multivalents de haute affinité et spécifiques d'un récepteur.

D.3.3. Tests de Screening Cellulaire

Ayant validé que notre composé **105** sur résine conserve ses propriétés de multivalence, nous avons évalué sa capacité à capter des cellules de statut α_vβ₃ dans un mélange cellulaire. Ce type d'approche permet d'envisager l'utilisation des résines présentant des « *cluster* » de ligands pour des applications diagnostiques, telles que le dépistage de cellules malignes circulantes dans un échantillon biologique.²⁴¹

Des tests simplifiés de « *screening* » ont été réalisés sur la résine **105** (2 μmol/g) avec un mélange de deux lignées cellulaires exprimant ou pas l'intégrine α_vβ₃, respectivement HEK293(β3) et 3-LL (lignée de carcinome pulmonaire murin).

²⁴¹ Aggarwal, S.; Janssen, S.; Wadkins, R. M.; Harden, J. L.; Denmeade, S. R. A combinatorial approach to the selective capture of circulating malignant epithelial cells by peptide ligands. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6077-6086.



* Expérience dans laquelle les cellules ne sont pas fixées et colorées

Figure 128 : Clichés du « screening cellulaire » et de la remise en croissance sur **105** avec les lignées HEK293(β_3) et 3-LL.

Comme attendu, aucune adhésion de cellules « 3-LL » n'est observée sur la résine **105**. Par contre, dans un mélange cellulaire composé de 90 % de cellules 3-LL et de 10 % de cellules HEK293(β_3), la résine **105** permet d'isoler des cellules HEK293(β_3) exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ malgré une proportion faible dans le mélange cellulaire (Figure 128). Par ailleurs, la remise en culture de ces cellules sur les résines pendant 96 heures permet une amplification cellulaire importante.²⁴² Cela permet d'envisager, suite au « screening » d'un milieu biologique, une étude des cellules possédant une affinité pour le ligand présenté par la résine. Par ailleurs, l'étalement particulièrement important de certaines cellules sur ces billes de résine laisse penser que des surfaces fonctionnalisées avec le peptide RAFT(c[-RGDfK-]₄) pourraient être intéressantes dans le développement de surfaces ou d'implants capables d'initier et d'orienter l'adhésion cellulaire.

Ce « screening » cellulaire permet donc une détection des cellules possédant une affinité pour les macromolécules peptidiques présentées par la résine et cela au sein d'un mélange cellulaire.

D.4. RESUME

La méthode de synthèse de nos composés multivalents entièrement réalisée sur résine, notamment l'assemblage chimiosélectif des ligands c[RGDfK] sur le RAFT, représente une voie très originale de synthèse de macromolécules. L'analyse de nos composés sur résine montre que notre stratégie de synthèse permet d'accéder aux composés bruts avec une excellente pureté. Cette méthode permet ensuite une évaluation simple et rapide des molécules vis-à-vis d'une cible biologique.

²⁴² Lau, D. H.; Guo, L.; Liu, R.; Song, A.; Shao, C.; Lam, K. S. Identifying peptide ligands for cell surface receptors using cell-growth-on-bead assay and one-bead one-compound combinatorial library. *Biotechnol Lett* **2002**, *24*, 497-500.

Les tests d'adhésion cellulaire réalisés avec les composés RAFT(c[-RGDfK-]_n) ont permis de déterminer la charge en peptide adéquate (0,2 nmol/g) pour observer l'effet de multivalence du RAFT(c[-RGDfK-]₄) en s'affranchissant de la multivalence apportée par la résine et en conservant la spécificité du composé pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. Ces expériences valident donc la possibilité d'utiliser notre châssis moléculaire sur résine pour l'évaluation biologique de nouveaux ligands multivalents pour l'intégrine ou d'autres récepteurs.

Dans la recherche de nouveaux ligands, le développement de nouvelles méthodes de détection de ligands de haute affinité est primordial. Les tests d'adhésion cellulaire développés ici permettront la mise en place d'une stratégie « *micro-arrays* » qui devrait permettre un gain de temps considérable pour l'évaluation des différents ligands synthétisés. Nous envisageons d'utiliser cette technique pour étudier l'effet d'une modification d'architecture du domaine de reconnaissance cellulaire de notre composé multivalent (modifications de la taille des bras espaceurs ou de la densité des ligands).

Grâce à sa modularité, ce système est facilement adaptable à différents ligands et devient donc une méthode attractive pour tester l'affinité de différents types cellulaires vis-à-vis de ligands potentiels.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos travaux ont été consacrés à la conception de vecteurs synthétiques ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, spécifiquement exprimée sur la néo-vascularisation et certaines lignées tumorales. Notre système de vectorisation est conçu à partir d'un châssis moléculaire RAFT présentant un « *cluster* » de ligand -RGD-. Celui-ci résulte de la conjugaison extrêmement efficace de quatre ligands -RGD- au RAFT par des liaisons éther d'oxime stables en conditions physiologiques.

Des résultats antérieurs ont montré que notre vecteur RAFT(c[-RGDfK-]₄) possède une excellente affinité et spécificité pour l'intégrine et est endocyté *via* un mécanisme actif. *In vivo*, il permet un ciblage efficace des tumeurs. Les propriétés de ce type de vecteur, résultant de l'effet de multivalence de la présentation tétravalente du ligand, nous ont amenés à concevoir une nouvelle génération de conjugués pour l'imagerie et la thérapie anticancéreuse.

La synthèse de nos composés multivalents a été optimisée grâce au développement de nouveaux acides aminés modifiés utilisés dans la construction des précurseurs peptidiques linéaires. Leur utilisation compatible en SPPS diminue le nombre d'étapes de synthèse et de purification. Par ailleurs, la mise en place d'une réaction « *One-Pot* » nous a permis de réaliser la déprotection des fonctions oxyamine et le couplage chimiosélectif des ligands au RAFT en une même étape de synthèse.

Les innovations apportées à la voie de synthèse classique de nos composés permettent de s'affranchir de certaines étapes de synthèse, de diminuer le nombre de purifications intermédiaires et de limiter les réactions secondaires. Ces améliorations permettent une augmentation très significative du rendement global de synthèse de notre vecteur multivalent. Cette méthodologie va être utilisée pour la synthèse de nos peptides en conditions GMP pour de futures applications cliniques (Collaboration avec le laboratoire Synth-Innove, Paris).

Le composé RAFT(c[-RGDfK-]₄) ainsi préparé a été directement utilisé pour sa conjugaison à divers agents de détection par un lien stable. Ces conjugués nous ont permis, en imagerie sur cellules vivantes, d'étudier le mécanisme d'internalisation, ainsi que le « *trafficking* » cellulaire de notre composé. Le vecteur est majoritairement internalisé grâce à une endocytose médiée par la voie des clathrines. Il transite ensuite *via* les endosomes jusqu'à l'appareil de Golgi et les lysosomes. Ces résultats soulèvent la question de la libération des drogues du compartiment endosomal, paramètre qu'il sera nécessaire d'étudier.

Les conjugués destinés à des applications de tomographie ont permis, chez le petit animal, la détection non-invasive de tumeurs pulmonaires profondes non détectables en imagerie optique 2D. Ils permettent également une détection de tumeurs sous cutanées sur plusieurs jours. L'efficacité de ciblage de notre vecteur associée aux propriétés de détection de chromophores particulièrement performants permet d'accéder à de très bons agents de ciblage des tumeurs. Un analogue du conjugué (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-]₄) va d'ailleurs être utilisé dans des protocoles pré-cliniques et cliniques pour l'aide au geste chirurgical pour l'ostéosarcome de l'enfant (Collaboration Pr. R. Rousseau, Centre Léon Bérard, Lyon).

Les résultats d'imagerie obtenus confirment l'efficacité de ciblage cellulaire de notre vecteur. Il concentre les agents effecteurs au niveau des tumeurs, laissant envisager son utilisation en thérapie. Dans cette application nous conjuguons les éléments thérapeutiques au RAFT par un pont disulfure labile en conditions intracellulaires. La formation de ce lien disulfure résulte du couplage d'un composé thiol libre à un composé *S*-activé (NPys/Pyridyle). Cette réaction limite la formation d'homodimères et permet d'accéder à notre vecteur multivalent conjugué à divers agents thérapeutiques : doxorubicine, peptide pro-apoptotique (KLAKLAK)₂, siRNA, PNA. La diversité des molécules conjuguées montre la modularité de notre approche synthétique.

La validation des voies de synthèse des conjugués à la doxorubicine et au PNA sur des petites quantités, permet d'envisager leurs synthèses sur de plus grosses quantités afin d'évaluer l'intérêt biologique de ce type de molécules.

Le conjugué RAFT(c[-RGDfK-]₄) au siRNA induit une diminution de l'expression du gène ciblé. Ce résultat préliminaire particulièrement encourageant suggère le potentiel de notre vecteur RAFT(c[-RGDfK-]₄) pour la thérapie génique. Des expériences complémentaires confirmant ces résultats et étudiant le devenir cellulaire du siRNA après endocytose seront nécessaires pour conclure.

En ce qui concerne le conjugué au peptide pro-apoptotique, les résultats obtenus montrent *in vitro* son effet anti-prolifératif ainsi qu'apoptotique sur des cellules de statut $\alpha_v\beta_3$ positif. Cet effet anti-prolifératif a également été montré *in vivo* chez la souris. Par ailleurs, la synthèse d'un système hybride pour l'étude du devenir cellulaire du peptide pro-apoptotique a permis de confirmer par imagerie confocale sa localisation mitochondriale. Cette localisation conforte l'action mitochondriale du peptide responsable de l'apoptose. Ce composé hybride utilisant un système de quenching de fluorescence permet de visualiser la réduction du pont disulfure majoritairement à l'intérieur des endosomes au bout d'environ une heure. Ces résultats obtenus avec le peptide (KLAKLAK)₂ montrent le potentiel de notre composé multivalent pour la vectorisation ciblée d'éléments thérapeutiques et permet d'envisager son utilisation pour la vectorisation de drogues très toxiques une fois libérées dans le compartiment intracellulaire.

Dans l'optique de développer de nouveaux vecteurs multivalents de haute affinité pour différentes cibles, nous envisageons d'utiliser une méthode d'évaluation des composés dans des tests d'adhésion cellulaire sur le support solide. Pour cela, nous avons développé une méthode de synthèse de notre composé multivalent entièrement sur résine et mis au point le test cellulaire. A une faible charge en peptide sur la résine, le RAFT(c[-RGDfK-]₄) supporté conserve son effet de multivalence et sa spécificité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ validant ainsi la faisabilité du projet.

Grâce à sa modularité, ce système est facilement adaptable à différents ligands et devient donc une méthode efficace et attractive pour tester l'affinité de différents types cellulaires vis-à-vis de ligands potentiels. Cette technique de synthèse et d'évaluation biologique sur résine va être exploitée pour développer de nouveaux ligands multivalent pour l'intégrine ou de manière générale pour découvrir de nouvelles molécules d'intérêts biologiques. Nous envisageons de l'utiliser pour la synthèse de mimés d'anticorps en présentant, après une étude de modélisation moléculaire, jusqu'à quatre éléments différents sur le châssis (Figure 129). La présentation de boucles variables d'anticorps, les « *Complementary Determining Regions* » (CDR) impliquées dans la reconnaissance anticorps/antigène de très haute affinité, est actuellement en cours au laboratoire.

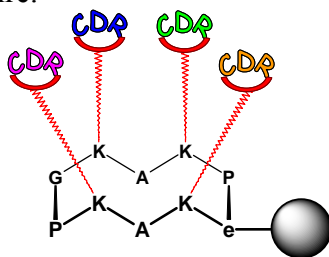


Figure 129 : Mîme d'anticorps sur résine.

Dans leur ensemble, ces travaux apportent de nouvelles voies de synthèse optimisées de nos conjugués, précisent leurs propriétés intracellulaires et valident leur potentiel extrêmement intéressant pour la thérapie et l'imagerie tumorale. De manière générale, ces résultats confortent l'utilisation des gabarits cyclodécapeptidiques RAFT pour la vectorisation ciblée.

PARTIE EXPERIMENTALE

Protocoles de Synthèse

Nous avons pris la liberté de décrire la partie expérimentale du manuscrit en anglais. Ce document pourra alors être employé par tous les utilisateurs du laboratoire, y compris les collaborateurs étrangers, et constitue par ailleurs un outil profitable pour la rédaction des publications relatant nos travaux.

Materials and Equipments

Protected amino acids were obtained from Activo tec (Cambridge, UK), Bachem Biochimie SARL (Voisins-les-Bretonneux, France), France Biochem SA (Meudon, France), Merck Eurolab (Fontenay-sous-Bois, France) or Calbiochem-Novabiochem (Merck Biosciences - VWR, Limonest, France). PyBOP[®] was purchased from Calbiochem-Novabiochem and PyAOP[®] from PerSeptive Biosystems (Foster City, Canada). Rink-amide MBHA[®] and NovaSyn[®] TGR resin were obtained from Calbiochem-Novabiochem, Fmoc-Gly-SASRIN[®] resin from Bachem Biochimie SARL and 2-chlorotritylchloride[®] resins from Advanced ChemTech Europe. Other reagents were obtained from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and Acros (Noisy-le-Grand, France). Cyanine[™] 5 Mono NHS ester was purchased from Amersham Biosciences (Orsay, France), Alexa Fluor[®] 700/750-NHS or QSY[®]21-NHS from Invitrogen (Cergy Pontoise, France) and biotine from Avocado Research Chemicals (Heysham, UK). SiRNA (pGL3) and PNA (Bcl-2) were obtained from Eurogentec (Angers, France).

RP-HPLC analyses were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller, a Waters 2487 Dual Absorbance Detector and a Waters In-Line Degasser. The analytical column used was the Nucleosil 120 Å 3 µm C₁₈ particles, 30 × 4 mm² operated at 1.3 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 15 min run time (classical program 5 to 100 % B in 15 min). UV monitoring was performed most of the time at 214 nm and 250 nm. Solvent A consisted of H₂O containing 0.1% TFA and solvent B of CH₃CN containing 9.9% H₂O and 0.1% TFA (except for oligonucleotide conjugates Solvent A consisted of 20 mM ammonium acetate buffer containing 5% CH₃CN and solvent B consisted of CH₃CN containing 5% H₂O). Water was of Milli-Q quality and was obtained after filtration of distilled water through a Milli-Q[®] cartridge system. CH₃CN and TFA were of HPLC use quality. RP-HPLC purifications were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller and a Waters 2487 Dual Absorbance Detector. Degassing of solvents was performed with 50 mL.min⁻¹ nitrogen. The preparative column, Delta-Pak[™] 300 Å 15 µm C₁₈ particles, 200 × 25 mm² was operated at 22 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 30 min run time. Solvents A and B were the same than the ones used in RP-HPLC analysis.

Electron spray ionization (ESI-MS) mass spectra were obtained on an Esquire 3000 (Bruker). NMR spectra were recorded on BRUKER Avance 300 spectrometers. Chemical shifts are expressed in ppm and calculated taking the solvent peak as an internal reference.

General Procedures for Syntheses of Peptides

Assembly of all linear protected peptides was performed manually or automatically by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl/tertbutyl (Fmoc/*t*Bu) protection strategy. In manual SPPS, device consisted in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit. The latter allowed elimination of excess reagents and solvents under compressed air. Before use, the vessel was treated for 12 h (typically overnight) with $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ as lubricant to prevent resin beads from sticking to the glass inner wall during the synthesis. It was then carefully washed with CH_2Cl_2 until complete acid trace clearance. At the beginning of the synthesis and after each ether washing, the resin was washed and swollen twice with CH_2Cl_2 (20 mL/g resin) for 15 min and once with DMF (20 mL/g resin) for 15 min. Coupling reactions were performed using, relative to the resin loading, 1.5-2 eq. of N_α -Fmoc-protected amino acid *in situ* activated with 1.5-2 eq. PyBOP and 3-4 eq. DIPEA in DMF (10 mL/g resin) for 30 min. The resin was then washed twice with DMF (20 mL/g resin) for 1 min and twice with CH_2Cl_2 (20 mL/g resin) for 1 min. The completeness of amino acid coupling reaction was checked by two tests: Kaiser and TNBS.

Kaiser test required :

- a Ninhydrine (500 mg) solution in 10 mL EtOH,
- a Phenol (80 g) solution in 20 mL EtOH,
- 2 mL of a KCN 1 nM solution diluted in 100 mL Pyridine.

Three drops of each solution were added to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was heated at 80-110°C for 3 min. Remaining of free amino functions resulted in a blue coloration of the resin beads (positive Kaiser test). Coupling reaction with the protected amino acid should then be repeated until the beads remain colourless (negative Kaiser test).

TNBS test required :

- a solution of 1% trinitrobenzenesulfonic acid in DMF,
- a solution of DIPEA/DMF (1:9).

Three drops of each solution were added to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was left at r.t. for 1 min. Remaining of free amino functions resulted in a bright orange-red coloration of the resin beads (positive TNBS test). Coupling reaction with the protected amino acid should then be repeated until the beads remain colourless (negative TNBS test).

N_α -Fmoc protecting groups were removed by treatment with piperidine/DMF (1:4) (10 mL/g resin) for 10 min. The process was repeated three times and the resin was further washed five times with DMF (10 mL/g resin) for 1 min. The completeness of the deprotection was checked by UV measurement. Indeed, Fmoc groups releasing afforded dibenzofulvene whose adduct with piperidine absorbs light in the UV range ($\lambda = 299 \text{ nm}$, $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Cleavage and washing solutions were thus together collected and the volume of the solution was adjusted to a known value (V) with MeOH. Absorbance of this solution at 299 nm gave the amount of Fmoc protecting groups released from the cleavage according to the Beer-Lambert relation:

$$n_{\text{Fmoc}} = (\text{OD}_{299\text{nm}} \times V) / (\epsilon_{299\text{nm}} \times l) \quad \text{with } l = \text{length of optical path.}$$

This method was commonly used for the following of SPPS and to determine, in an indirect manner, the loading of the resin.

Automated syntheses of peptide are performed on ABI 433 A1 Peptide Synthesizer (Applied Biosystems) using standard solid-phase methods or on 348 Ω Synthesizer (Advance ChemTech) using the same conditions as manual procedure.

Synthetic linear peptides were recovered directly upon repeated acid cleavage of the resins according to the following conditions:

Resin type	Cleavage solution	Procedure
2-chlorotritylchloride [®]	TFA/CH ₂ Cl ₂ (1/99)	(10 mL/g resin) – 5 min – 2 times
2-chlorotritylchloride [®]	TFE/AcOH/CH ₂ Cl ₂ (2/1/7)	(10 mL/g resin) – 2 h
SASRIN [®]	TFA/CH ₂ Cl ₂ (1/99)	(10 mL/g resin) – 3 min – 5-7 times
Rink-amide MBHA	TFA/TIS/H ₂ O (90/5/5)	(10 mL/g resin) – 2 h

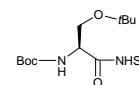
Cyclization reactions of peptides in solution are performed using protected linear peptides. They were dissolved in DMF (0.5 mM) and the pH of the solution was adjusted to 8-9 by addition of DIPEA. PyBOP (1.1 or 1.2 eq.) was added and solution was stirred at r.t. for at least 30 min. Solvent was removed under reduced pressure and residue dissolved in the minimum of CH₂Cl₂. Ether was added to precipitate the peptide. The latter was triturated and washed three times with ether affording crude material, which was, most of the time, further used without additional purification.

Molecular weights of compounds were calculated as TFA salts (one TFA salt (114 g.mol⁻¹) by free amine).

Syntheses of New Modified Amino Acid for SPPS

Boc-Ser(*t*Bu)-*N*-hydroxysuccinimide ester**1**

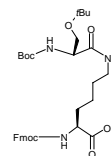
To a stirred solution of Boc-Ser(*t*Bu)-OH (2.8 g, 10 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (1.2 g, 10.7 mmol) in EtOAc/dioxan (1:1, 100 mL) cooled on ice bath were added DCC (2.2 g, 10.7 mmol). After 5 hr stirring at r.t. the reaction mixture was filtered through a pad of Celite with EtOAc and the collected filtrate was concentrated in vacuum. The obtained oily residue was taken into 150 mL ethyl acetate and washed with 5 % aqueous NaHCO₃ (2 x 70 mL), water (2 x 70 mL) and brine (2 x 70 mL). The organic fraction was then dried over Na₂SO₄. Boc-Ser(*t*Bu)-NHS **1** was obtained as a white powder after evaporation of the solvent (3.5 g, 9.8 mmol).

**Yield:** 98 %**RP-HPLC:** RT = 9,8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₁₆H₂₆N₂O₇**Calcd MW = 358.2 g.mol⁻¹Found MW = 359.3 g.mol⁻¹**¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):**

δ 5.41 (1H, d, J = 9.0 Hz), 4.78 (1H, d, J = 9.0 Hz), 3.92 (1H, m), 3.66 (1H, m), 2.82 (4H, s), 1.46 (9H, s), 1.20 (9H, s)

Fmoc-Lys[Boc-Ser(*t*Bu)]-OH**2**

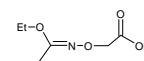
The above Boc-Ser(*t*Bu)-NHS **1** (8.00 g, 22.3 mmol) in CH₂Cl₂ (75 mL) was added dropwise over 30 min to a stirred suspension of finely powdered TFA-salt of Fmoc-lysine (10.90 g, 22.6 mmol) and DIPEA (15.6 mL, 90.0 mmol) in CH₂Cl₂ (130 mL). After 5 hr reaction, the solvent was evaporated off in vacuum and the remaining residue was dissolved in EtOAc (400 ml), followed by washing with 10 % aqueous citric acid solution (70 ml), water (2 x 100 ml), and finally brine (100 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄ and evaporation under vacuum gave 11.85 g of a white solid. This solid was recrystallized from CH₂Cl₂ with a hexane-diethyl ether solution (95/5) giving Fmoc-Lys[Boc-Ser(*t*Bu)]-OH **2** as a pure white powder (8.94 g, 14.6 mmol).

**Yield:** 66 %**RP-HPLC:** RT = 11.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₃₃H₄₅N₃O₈**Calcd MW = 611.3 g.mol⁻¹Found MW = 611.2 g.mol⁻¹**¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):**

δ 7.68 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.55 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.33-7.18 (4H, m), 6.84 (1H, broad s), 6.25 (1H, broad d), 5.62 (1H, broad s), 4.34-4.06 (5H, m), 3.63 (1H, m), 3.36 (1H, m), 3.20-3.05 (2H, m), 1.84 (1H, m), 1.65 (1H, m), 1.47-1.32 (14H, m), 1.09 (9H, s)

2-(1-ethoxyethylideneaminoxy)acetic acid**3**

To a stirred solution of iodoacetic acid (9.00 g, 48.4 mmol) in water (19 mL) at 0 °C was added aqueous NaOH (3.0 ml, 40 % w/w). The resulting solution was allowed to heat to r.t., where after ethyl *N*-hydroxyacetimidate (6.0 g, 58.3 mmol) was added followed by aqueous NaOH (4.5 mL, 40 % w/w) and water (19 mL) (pH of solution >12). After 4.5 hr stirring at 80 °C and cooling to r.t., water was added (70 mL) and the aqueous mixture was washed with CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). The water phase was brought to pH = 2-3 with a 1 M hydrochloride solution. The acidified water phase was then extracted with CH₂Cl₂ (4 x 50 mL), and the combined organic phases from this last extraction was washed with brine (50 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated in vacuum, providing compound **3** as a colourless oil (5.69 g, 35.3 mmol).

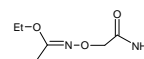
**Yield:** 73 %**RP-HPLC:** RT = 5.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₆H₁₁NO₄**Calcd MW = 161.2 g.mol⁻¹Found MW = 161.0 g.mol⁻¹**NMR ¹H (300 MHz, CDCl₃):**

δ 4.48 (2H, s), 4.00 (2H, q, J = 7.2 Hz),

2.01 (3H, s), 1.27 (3H, t, J = 7.2 Hz)

N*-hydroxysuccinimidyl 2-(1-ethoxyethylideneaminoxy)acetate*4**

To a stirred solution of compound **3** (5.69 g, 35.3 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (4.06 g, 35.3 mmol) in ethyl acetate/dioxan (120 mL, 1/1) at 0 °C was added in one portion DCC (7.28 g, 35.3 mmol). The resulting mixture was stirred at r.t. for 5 hr. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (300 mL) and the solution was washed with 5 % aqueous NaHCO₃ (2 x 75 mL), water (75 mL) and brine (75 mL). The organic solution was dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum to oil **4** (8.69 g, 33.7 mmol) which was used without further purification.

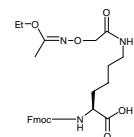
**Yield:** 95 %**RP-HPLC:** RT = 7.6 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**C₁₀H₁₄N₃O₇**Calcd MW = 258,1 g.mol⁻¹**NMR ¹H (300 MHz, CDCl₃):**

δ 4.78 (2H, s), 4.01 (2H, q, J = 7.2 Hz),

2.84 (4H, s), 1.98 (3H, s), 1.28 (3H, t, J = 7.2 Hz)

Fmoc-Lys[*N*-EEI-Aoa]-OH**5**

To a stirred mixture of Fmoc-lysine (6.22 g, 16.9 mmol) and DIPEA (3.0 ml, 17.3 mmol) in CH₂Cl₂ (100 ml) at r.t. was added dropwise over 20 min a solution of the above prepared MHS-ester **4** (4.35 g, 16.9 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIPEA. After 1 hr reaction the unreacted Fmoc-lysine was filtered off and the filtrate was concentrated under vacuum providing an oily residue. After addition of CH₂Cl₂ (100 mL) the organic phase was washed with a concentrated citric acid solution. The aqueous phase was then extracted with methylene chloride (3 x 80 mL). The combined organic phases were then washed with brine (100 mL), dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. To the residue were added 60 mL of acetonitrile and 60 mL of water. The product was lyophilized, thereby providing the compound **5** as a white powder (7.47 g, 14.6 mmol).

**Yield:** 86 %**RP-HPLC:** RT = 10.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₂₇H₃₃N₃O₇**Calcd MW = 511.2 g.mol⁻¹Found MW = 511.3 g.mol⁻¹**NMR ¹H (300 MHz, CDCl₃):**

δ 7.75 (2H, d, J = 7.4 Hz), 7.60 (2H, d,

J = 7.4 Hz), 7.38 (2H, t, J = 7.4 Hz),

7.29 (2H, t, J = 7.4 Hz), 6.50 (1H, t, J =

5.6 Hz), 5.70 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.38-

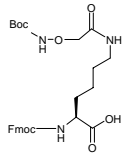
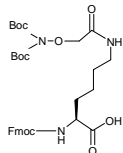
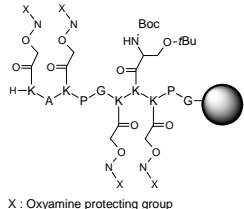
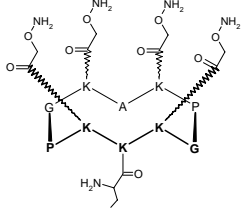
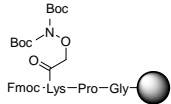
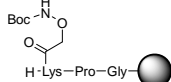
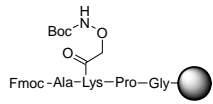
4.36 (5H, m), 4.20 (1H, t, J = 6.9 Hz),

3.96 (2H, q, J = 7.1 Hz), 3.34 (2H, m),

1.96 (3H, s), 1.81 (2H, m), 1.58 (2H,

m), 1.45 (2H, m), 1.24 (3H, t, J = 7.1

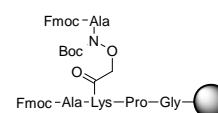
Hz)

Fmoc-Lys[Boc-aminoxyacetyl]-OH	<u>6</u>
<p>The peptide 6 was synthesized as previously described.²⁰¹ (cf. Erreur ! Source du renvoi introuvable.: compound 1)</p>	
Fmoc-Lys[N,N-bis-Boc-aminoxyacetyl]-OH	<u>7</u>
<p>The peptide 7 was synthesized as previously described.²⁰¹ (cf. Erreur ! Source du renvoi introuvable.: compound 2)</p>	
H-K(-CO-CH₂ONX)-K(Boc-S(t-Bu))-K(-CO-CH₂ONX)-P-G-K(-CO-CH₂ONX)-A-K(-CO-CH₂ONX)-P-G- on resin	<u>8</u>
<p>The peptide 8 on resin was synthesized as previously described.²⁰¹ (cf. Erreur ! Source du renvoi introuvable.: compound 2)</p>	 <p>X : Oxyamine protecting group</p>
c[-K(-CO-CH₂ONH₂)-K(Boc-S(t-Bu))-K(-CO-CH₂ONH₂)-P-G-K(-CO-CH₂ONH₂)-A-K(-CO-CH₂ONH₂)-P-G-]	<u>9</u>
<p>The peptide 9 was synthesized as previously described.²⁰¹ (cf. Erreur ! Source du renvoi introuvable.: compound 10)</p>	
Fmoc-K(-CO-CH₂ON(Boc)₂)-P-G- on resin	<u>10</u>
<p>The peptide 10 synthesized on resin was analysed as previously described.²⁰¹ (cf. Erreur ! Source du renvoi introuvable.: compound 11)</p>	
H-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G- on resin	<u>11</u>
<p>The peptide 11 synthesized on resin was analysed as previously described.²⁰¹ (cf. Erreur ! Source du renvoi introuvable.: compound 12)</p>	
Fmoc-A-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G- on resin	<u>12</u>
<p>The peptide 12 synthesized on resin was analysed as previously described.²⁰¹ (cf. Erreur ! Source du renvoi introuvable.: compound 13)</p>	

Fmoc-A-K(-CO-CH₂ON(Boc)-A(Fmoc))-P-G- on resin**13**

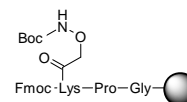
The peptide **13** synthesized on resin was analysed as previously described.²⁰¹

(cf. **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**: compound **14**)

**Fmoc-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G- on resin****14**

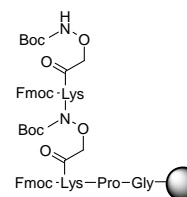
The peptide **14** synthesized on resin was analysed as previously described.²⁰¹

(cf. **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**: compound **15**)

**Fmoc-K[-CO-CH₂ON(Boc)-K(-CO-CH₂ONH(Boc))]-P-G- on resin****15**

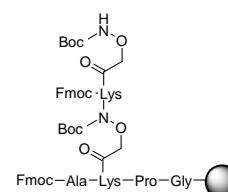
The peptide **15** synthesized on resin was analysed as previously described.²⁰¹

(cf. **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**: compound **16**)

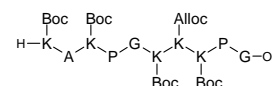
**Fmoc-A-K[-CO-CH₂ON(Boc)-K(-CO-CH₂ONH(Boc))]-P-G- on resin****16**

The peptide **16** synthesized on resin was analysed as previously described.²⁰¹

(cf. **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**: compound **17**)

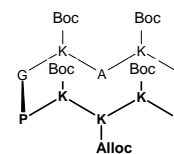
**Syntheses of Cyclodecapeptidic Scaffolds****Classical Synthesis of Cyclodecapeptidic Scaffolds****H-K(Boc)-K(Alloc)-K(Boc)-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-P-G-OH****17**

The linear decapeptide was assembled on Fmoc-G-SASRINTM resin (1.0 g, loading of 0.69 mmol/g) using the general procedure. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1/99). The free linear protected peptide **17** was obtained as a white solid powder (782 mg, 0.478 mmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.

**Yield:** 69 %**RP-HPLC:** RT = 10.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₇₁H₁₂₃N₁₅O₂₁**Calcd MW = 1521.9 g.mol⁻¹Found MW = 1522.1 g.mol⁻¹

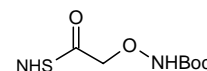
c[-K(Boc)-K(Alloc)-K(Boc)-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-P-G-]**18**

The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide **17** (105 mg, 64.2 μmol). Precipitation and work-up in ether afforded cyclic peptide **18** as a white solid powder (97 mg, 64.2 μmol). This crude material was used without further purification.

**Yield:** Quantitative**RP-HPLC:** RT = 12.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₇₁H₁₂₁N₁₅O₂₀**Calcd MW = 1503.9 g.mol⁻¹Found MW = 1504.1 g.mol⁻¹**NHS-CO-CH₂ONH(Boc)****19**

Tert-Butyloxycarbonyl-aminoxyacetic acid (4.1 g, 21.44 mmol) was dissolved in EtOAc/Dioxane (60 mL, 1/1) and cooled at 0 °C. *N*-hydroxysuccinimide (2.46 g, 21.44 mmol) and DCC (4.4 g, 21.32 mmol) were added. Instantaneously, DCU precipitate was formed.

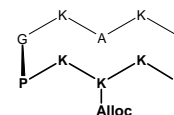
The reaction mixture was stirred for 5 hr at r.t.. DCU was eliminated by filtration and solvent were evaporated under vacuum. EtOAc (150 mL) was added to residue and organic solution was washed with aqueous solution of 5 % NaHCO₃ (4 X 60 mL) and water (4 X 60 mL). The EtOAc phase was dried over Na₂SO₄, evaporated and precipitate in diethyl ether to yield a crude product **19** as white powder (2.91 g, 10.14 mmol). This crude material was used without further purification.

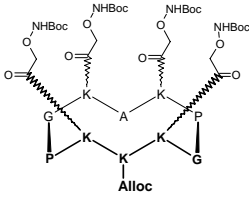
**Yield:** 48 %**RP-HPLC:** RT_{hydrolyse product} = 6.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₁₁H₁₆N₂O₇**Calcd MW = 288.1 g.mol⁻¹Found MW = 288.1 g.mol⁻¹**NMR ¹H (300 MHz, DMSO):**

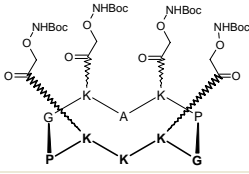
δ 1.42 (s, 9H, CH₃), 2.84 (s, 4H, CH₂-CH₂), 4.83 (s, 2H, CH₂O), 10.37 (br s, 1H, NH)

c[-K-K(Alloc)-K-P-G-K-A-K-P-G-]**20**

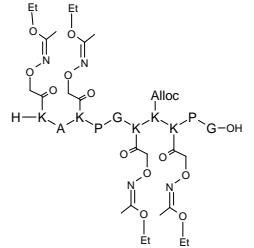
The decapeptide **18** (455 mg, 0.30 mmol) was treated in 30 mL of TFA/CH₂Cl₂ (1/1) solution. The reaction mixture was stirred for 1 hr at r.t.. Product was concentrated under reduced pressure. Precipitation and work-up in diethyl ether afforded peptide **20** as a white solid powder (468 mg, 0.30 mmol). This crude material was used without further purification.

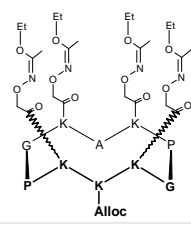
**Yield:** Quantitative**RP-HPLC:** RT = 5.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₅₁H₈₉N₁₅O₁₂**Calcd MW = 1103.7 g.mol⁻¹Found MW = 1103.4 g.mol⁻¹

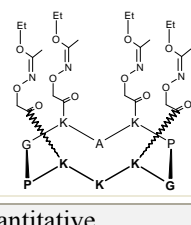
c[-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-K(Alloc)-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-A-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-]		21
<p>To a solution of compound 20 (10.0 mg, 6.41 μmol) in 1 mL anhydrous DMF, were added BocNHCH₂CO-NHS 19 (9.2 mg, 32 mmol) and DIPEA to adjust the pH at 9. The reaction was stirred for 1 hr at r.t. and treated for 30 min with 10 mL MeOH (inactivation of activated ester excess) before being concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound 21 as a white solid powder (10.2 mg, 5.68 μmol). This crude material was used without further purification.</p>		<p>Yield: 89 %</p> <p>RP-HPLC: RT = 10.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₇₉H₁₃₃N₁₉O₂₈ Calcd MW = 1796.0 g.mol⁻¹ Found MW = 1795.2 g.mol⁻¹</p>

c[-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-K-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-A-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-]		22
<p>The peptide 21 (218.8 mg, 0.122 mmol) was dissolved in 10 mL of anhydrous CH₂Cl₂/DMF (3/1) under argon. Phenylsilane (100 eq.) and Pd(PPh₃)₄ (0.2 eq.) were added under argon. The reaction was stirred under argon for 30 min at r.t. The mixture was treated with 1.5 mL of methanol before evaporation of the solvents under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimum of MeOH/CH₂Cl₂ (1/1) then finally precipitated, triturated and washed with diethyl ether affording compound 22 (198.7 mg, 0.108 mmol) as a white powder. This material was further used without additional purification.</p>		<p>Yield: 89 %</p> <p>RP-HPLC: RT = 9.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₇₅H₁₂₉N₁₉O₂₆ Calcd MW = 1713.0 g.mol⁻¹ Found MW = 1712.2 g.mol⁻¹</p>

Optimized Synthesis of Cyclodecapeptidic Scaffolds

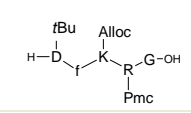
H-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-K(Alloc)-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-P-G-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-P-G-OH		23
<p>The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (2.0 g, loading of 1.1 mmol/g) using the general procedure and amino acid 5. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) through nucleophilic substitution was performed following the procedure given by Advanced ChemTech and yielding to a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/1/7). The free linear protected peptide 23 was obtained as a white solid powder (2.27 g, 1.26 mmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.</p>		<p>Yield: 90 %</p> <p>RP-HPLC: RT = 9.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₇₅H₁₂₇N₁₉O₂₆ Calcd MW = 1693.9 g.mol⁻¹ Found MW = 1693.5 g.mol⁻¹</p>

c[-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-K(Alloc)-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-P-G-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)P-G-]		<u>24</u>
<p>The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide 23 (85 mg, 47 μmol). Precipitation and work-up in ether afforded cyclic peptide 24 as a white solid powder (79 mg, 47 μmol). This crude material was used without further purification.</p>		
	Yield: Quantitative RP-HPLC: RT = 10.8 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min) MS (ESI-MS, positive mode): C₇₅H₁₂₅N₁₉O₂₅ Calcd MW = 1675.9 g.mol ⁻¹ Found MW = 1675.4 g.mol ⁻¹	

c[-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-K-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-P-G-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)P-G-]		<u>25</u>
<p>The peptide 24 (20 mg, 0.012 mmol) was dissolved in 1.5 mL of anhydrous CH₂Cl₂/DMF (3/1) under argon. Phenylsilane (100 eq.) and Pd(PPh₃)₄ (0.2 eq.) were added under argon. The reaction was stirred under argon for 30 min at r.t. The mixture was treated with 0.5 mL of methanol before evaporation of the solvents under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimum of MeOH/ CH₂Cl₂ (1/1) then finally precipitated, triturated and washed with diethyl ether affording compound 25 (21 mg, 0.012 mmol) as a white powder. This material was further used without additional purification.</p>		
	Yield: Quantitative RP-HPLC: RT = 9.8 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min) MS (ESI-MS, positive mode): C₇₁H₁₂₁N₁₉O₂₂ Calcd MW = 1591.9 g.mol ⁻¹ Found MW = 1591.5 g.mol ⁻¹	

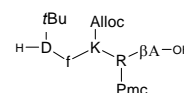
Syntheses of Cyclopentapeptidic Ligands

Classical Synthesis of Cyclopentapeptidic Ligands

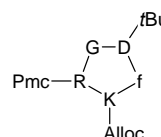
H-D(<i>t</i>Bu)-f-K(Alloc)-R(Pmc)-G-OH		<u>26</u>
<p>The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (1.0 g, loading of 1.4 mmol/g) using the general procedure. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) through nucleophilic substitution was performed following the procedure given by Advanced ChemTech and yielding to a convenient resin loading of 0.5 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1/99). The free linear protected peptide 26 was obtained as a white solid powder (435 mg, 0.381 mmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.</p>		
	Yield: 76 % RP-HPLC: RT = 11.2 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min) C₄₉H₇₃N₉O₁₃S Calcd MW = 1027.5 g.mol ⁻¹	

H-D(*t*Bu)-f-K(Alloc)-R(Pmc)-βA-OH**27**

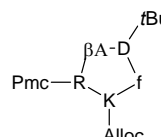
The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (1.0 g, loading of 2.1 mmol/g) using the general procedure. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) through nucleophilic substitution was performed following the procedure given by Advanced ChemTech and yielding to a convenient resin loading of 0.8 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1/99). The free linear protected peptide **27** was obtained as a white solid powder (924.2 mg, 0.80 mmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.

**Yield:** Quantitative**RP-HPLC:** RT = 11.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**C₅₀H₇₅N₉O₁₃S**
Calcd MW = 1041.5 g.mol⁻¹**c[-R(Pmc)-G-D(*t*Bu)-f-K(Alloc)-]****28**

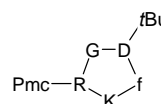
The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide **26** (200 mg, 175 μmol). Precipitation and work-up in ether afforded cyclic peptide **28** as a white solid powder (177 mg, 175 μmol). This crude material was used without further purification.

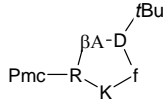
**Yield:** Quantitative**RP-HPLC:** RT = 11.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**C₄₉H₇₁N₉O₁₂S**
Calcd MW = 1009.5 g.mol⁻¹**c[-R(Pmc)-βA-D(*t*Bu)-f-K(Alloc)-]****29**

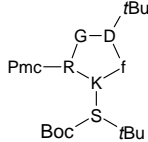
The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide **27** (924.2 mg, 0.8 mmol). Precipitation and work-up in ether afforded cyclic peptide **29** as a sticky oil (818.8 mg, 0.8 mmol). This crude material was used without further purification.

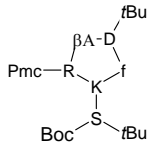
**Yield:** Quantitative**RP-HPLC:** RT = 11.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**C₅₀H₇₅N₉O₁₂S**
Calcd MW = 1023.5 g.mol⁻¹**c[-R(Pmc)-G-D(*t*Bu)-f-K-]****30**


The peptide **28** (150 mg, 0.148 mmol) was dissolved in 13 mL of anhydrous CH₂Cl₂/DMF (3/1) under argon. Phenylsilane (100 eq.) and Pd(PPh₃)₄ (0.2 eq.) were added under argon. The reaction was stirred under argon for 30 min at r.t. The mixture was treated with 1 mL of methanol before evaporation of the solvents under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimum of MeOH/CH₂Cl₂ (1/1) then finally precipitated, triturated and washed with diethyl ether affording compound **30** (99.3 mg, 0.096 mmol) as a white powder. This material was further used without additional purification.

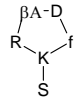

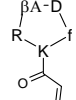
**Yield:** 65 %**RP-HPLC:** RT = 10.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**C₄₅H₆₇N₉O₁₀S**
Calcd MW = 925.5 g.mol⁻¹

c[-R(Pmc)-βA-D(<i>t</i>Bu)-f-K-]		<u>31</u>
<p>The peptide 29 (100 mg, 0.098 mmol) was dissolved in 11 mL of anhydrous CH₂Cl₂/DMF (3/1) under argon. Phenylsilane (100 eq.) and Pd(PPh₃)₄ (0.2 eq.) were added under argon. The reaction was stirred under argon for 30 min at r.t. The mixture was treated with 1 mL of methanol before evaporation of the solvents under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimum of MeOH/CH₂Cl₂ (1/1) then finally precipitated, triturated and washed with diethyl ether affording compound 31 (81 mg, 0.0769 mmol) as a white powder. This material was further used without additional purification</p>		
	Yield: 78 %	
	RP-HPLC: RT = 10.1 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min)	
	C₄₆H₆₉N₉O₁₀S Calcd MW = 939.5 g.mol ⁻¹	

c[-R(Pmc)-G-D(<i>t</i>Bu)-f-K(BocS(<i>t</i>Bu)-]		<u>32</u>
<p>The crude cyclic peptide 30 (142 mg, 0.14 mmol) was dissolved in 16 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. PyBOP (125 mg, 0.24 mmol) and Boc-Ser(<i>t</i>Bu)-OH (63 mg, 0.24 mmol) were added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and the peptide was precipitated, triturated and washed with diethyl ether. Crude product 32 (163 mg, 0.14 mmol) was obtained as a white powder and further used without additional purification.</p>		
	Yield: Quantitative	
	RP-HPLC: RT = 12.9 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min)	
	MS (ESI-MS, positive mode): C₅₇H₈₈N₁₀O₁₄S Calcd MW = 1168.6 g.mol ⁻¹ Found MW = 1168.2 g.mol ⁻¹	

c[-R(Pmc)-βA-D(<i>t</i>Bu)-f-K(BocS(<i>t</i>Bu)-]		<u>33</u>
<p>The crude cyclic peptide 31 (303 mg, 0.29 mmol) was dissolved in 30 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. PyBOP (194 mg, 0.37 mmol) and Boc-Ser(<i>t</i>Bu)-OH (93 mg, 0.35 mmol) were added and the reaction mixture was stirred for 1 hr at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and the peptide was precipitated, triturated and washed with diethyl ether. Crude product 33 (340 mg, 0.29 mmol) was obtained as a white powder and further used without additional purification.</p>		
	Yield: Quantitative	
	RP-HPLC: RT = 12.9 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min)	
	MS (ESI-MS, positive mode): C₅₈H₉₀N₁₀O₁₄S Calcd MW = 1182.6 g.mol ⁻¹ Found MW = 1182.2 g.mol ⁻¹	

c[-R-G-D-f-K(S)-]		<u>34</u>
<p>The cyclopeptide 32 (770 mg, 0.66 mmol) was treated in 66 mL of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 1 hr at r.t. The product was concentrated under reduced pressure. Precipitation and work-up in diethyl ether afforded peptide 34 as a white solid powder (603 mg, 0.66 mmol). This crude material was used without further purification.</p>		
	Yield: Quantitative	
	RP-HPLC: RT = 5.5 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min)	
	MS (ESI-MS, positive mode): C₃₀H₄₆N₁₀O₉ Calcd MW = 690.3 g.mol ⁻¹ Found MW = 690.1 g.mol ⁻¹	

c[-R-βA-D-f-K(S)-]		35
<p>The cyclopeptide 33 (1093 mg, 0.92 mmol) was treated in 66 mL of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 1 hr at r.t. The product was concentrated under reduced pressure. Precipitation and work-up in diethyl ether afforded peptide 35 as a white solid powder (857 mg, 0.92 mmol). This crude material was used without further purification.</p>		
	Yield: Quantitative	
	RP-HPLC: RT = 5.3 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min)	
	MS (ESI-MS, positive mode): C₃₁H₄₈N₁₀O₉ Calcd MW = 704.4 g.mol ⁻¹ Found MW = 704.3 g.mol ⁻¹	
c[-R-G-D-f-K(COCHO)-]		36
<p>Peptide 34 (120 mg, 0.131 mmol) and NaIO₄ (282 mg, 1.32 mmol) were dissolved in 12 mL of water. The mixture was stirred for 20 min and the product was purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclopeptide 36 as a white powder (85 mg, 0.110 mmol).</p>		
	Yield: 84 %	
	RP-HPLC: RT = 5.8 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min)	
	MS (ESI-MS, positive mode): C₂₉H₄₁N₉O₉ Calcd MW = 659.3 g.mol ⁻¹ Found MW = 659.4 g.mol ⁻¹	
c[-R-βA-D-f-K(COCHO)-]		37
<p>Peptide 35 (80 mg, 0.086 mmol) and NaIO₄ (184 mg, 0.86 mmol) were dissolved in 8 mL of water. The mixture was stirred for 20 min and the product was purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclopeptide 37 as a white powder (51 mg, 0.065 mmol).</p>		
	Yield: 76 %	
	RP-HPLC: RT = 5.7 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min)	
	MS (ESI-MS, positive mode): C₃₀H₄₃N₉O₉ Calcd MW = 673.3 g.mol ⁻¹ Found MW = 673.6 g.mol ⁻¹	

Optimized Synthesis of Cyclopentapeptidic Ligands

H-D(<i>t</i>Bu)-f-K(BocS(<i>t</i>Bu))-R(Pmc)-G-OH		<u>38</u>
<p>The linear decapeptide was assembled on Fmoc-G-SASRIN™ resin (2.0 g, loading of 0.69 mmol/g) using the general procedure with amino acid 2. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1/99). The free linear protected peptide 38 was obtained as a white solid powder (1.31 mg, 1.0 mmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.</p>		
	Yield: 73 %	
	RP-HPLC: RT = 12.7 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min)	
	MS (ESI-MS, positive mode): C₅₇H₉₀N₁₀O₁₅S Calcd MW = 1186.6 g.mol ⁻¹ Found MW = 1186.2 g.mol ⁻¹	

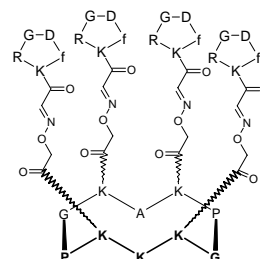
H-D(<i>t</i>Bu)-f-K(BocS(<i>t</i>Bu))-R(Pmc)-βA-OH		<u>39</u>
<p>The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotritylchloride® resin (2 g, loading of 1.4 mmol/g) using the general procedure and amino acid 2. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-βAla-OH) through nucleophilic substitution was performed following the procedure given by Advanced ChemTech and yielding to a convenient resin loading of 0.9 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1/99). The free linear protected peptide 39 was obtained as a white solid powder (1.26 g, 0.96 mmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.</p>		
	Yield: 53 %	
	RP-HPLC: RT = 12.7 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min)	
	MS (ESI-MS, positive mode): C₅₈H₉₂N₁₀O₁₅S Calcd MW = 1200.6 g.mol ⁻¹ Found MW = 1200.2 g.mol ⁻¹	

Syntheses of Multivalent RAFT(c[-RXDfK-]₄) Vectors**Multivalent RAFT(c[-RXDfK-]₄) Vectors for Reporter Group Conjugation**

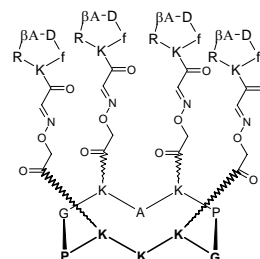
c[-K(-CO-CH₂ONH₂)-K-K(-CO-CH₂ONH₂)-P-G-K(-CO-CH₂ONH₂)-A-K(-CO-CH₂ONH₂)-P-G-]		<u>40</u>
<p>The cyclopeptide 22 (92 mg, 0.050 mmol) was treated in 6 mL of TFA/TIS/H₂O/CH₂Cl₂ (50/5/5/40) solution. The reaction mixture was stirred for 1 hr at r.t. The solvents were evaporated under reduced pressure and the fully deprotected peptide was dissolved in 5 mL of water. A RP-HPLC (5-60% B in 30 min) was performed to afford pure compound 40 as a white solid powder (13.3 mg, 0.007 μmol).</p>		
	Yield: 14 %	
	RP-HPLC: RT = 5.6 min (C ₁₈ , 214 nm, 5-100% B in 15 min)	
	MS (ESI-MS, positive mode): C₅₅H₉₇N₁₉O₁₈ Calcd MW = 1312.5 g.mol ⁻¹ Found MW = 1312.6 g.mol ⁻¹	

RAFT(c[-RGDfK-]₄)**41**

The pure peptides **25** (10 mg, 6.0 μmol) and **36** (36.3 mg, 46.9 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/H₂O (1/9) solution. The mixture was stirred for 1 hr and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **41** as a white powder (18.7 mg, 4.2 mmol).

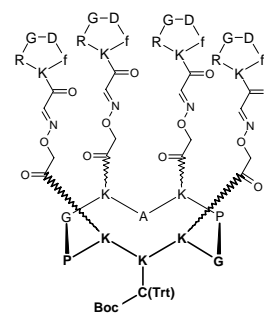
**Yield:** 70 %**RP-HPLC:** RT = 10.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₁₇₁H₂₅₃N₅₅O₅₀**Calcd MW = 3876.9 g.mol⁻¹Found MW = 3877.0 g.mol⁻¹**Multivalent RAFT(c[-RGDfK-]₄) Vectors for Drug Conjugation****RAFT(c[-RβADfK-]₄)****42**

The pure peptides **25** (10 mg, 6.0 μmol) and **37** (36.6 mg, 46.8 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/H₂O (1/9) solution. The mixture was stirred for 1 hr and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **42** as a white powder (13.2 mg, 2.9 μmol).

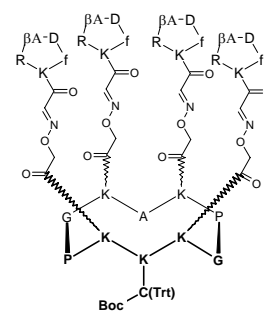
**Yield:** 49 %**RP-HPLC:** RT = 9.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₁₇₅H₂₆₁N₅₅O₅₀**Calcd MW = 3933.0 g.mol⁻¹Found MW = 3932.2 g.mol⁻¹

(BocC(Trt))RAFT(c[-RGDfK-]₄)**43**

PyBOP (0.07 mg, 0.125 μmol) and Boc-Cys(Trt)-OH (0.07 mg, 0.14 μmol) were dissolved in 200 μL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. The pure peptide **41** (0.6 mg, 0.135 μmol) was added and the reaction mixture was stirred for 1 hr at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **43** as a white powder (0.6 mg, 0.13 μmol).

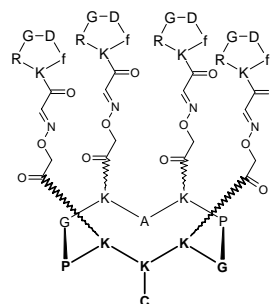
**Yield:** 93 %**RP-HPLC :** RT = 9.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode) :****C₁₉₈H₂₈₀N₅₆O₅₃S**Calcd MW = 4322.1 g.mol⁻¹Found MW = 4322.3 g.mol⁻¹**(BocC(Trt))RAFT(c[-RβADfK-]₄)****44**

PyBOP (0.11 mg, 0.22 μmol) and Boc-Cys(Trt)-OH (0.11 mg, 0.22 μmol) were dissolved in 200 μL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. The pure peptide **42** (1 mg, 0.222 μmol) was added and the reaction mixture was stirred for 1 hr at r.t. The product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **44** as a white powder (0.9 mg, 0.186 μmol).

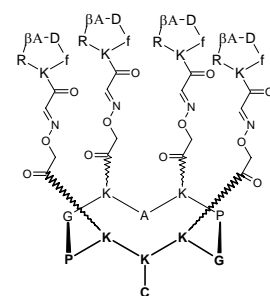
**Yield:** 84 %**RP-HPLC:** RT = 9.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₂₀₂H₂₈₈N₅₆O₅₃S**Calcd MW = 4378.1 g.mol⁻¹Found MW = 4378.4 g.mol⁻¹

(C)RAFT(c[-RGDfK-]₄)**45**

The cyclopeptide **43** (0.6 mg, 0.125 μmol) was treated in 250 μL of TFA/TIS/H₂O/CH₂Cl₂ (45/5/5/45) solution. The reaction mixture was stirred for 40 min at r.t. The product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **45** as a white powder (0.4 mg, 88 nmol).

**Yield:** 71 %**RP-HPLC:** RT = 7.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₁₇₄H₂₅₈N₅₆O₅₁S**Calcd MW = 3979.9 g.mol⁻¹Found MW = 3979.9 g.mol⁻¹**(C)RAFT(c[-RβADfK-]₄)****46**

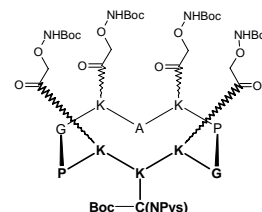
The cyclopeptide **44** (0.6 mg, 0.124 μmol) was treated in 250 μL of TFA/TIS/H₂O/CH₂Cl₂ (45/5/5/45) solution. The reaction mixture was stirred for 40 min at r.t. The product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **46** as a white powder (0.4 mg, 87 nmol).

**Yield:** 70 %**RP-HPLC:** RT = 7.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₁₇₈H₂₆₆N₅₆O₅₁S**Calcd MW = 4036.0 g.mol⁻¹Found MW = 4036.1 g.mol⁻¹

c[-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-K(BocC(NPys))-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-A-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-]

47

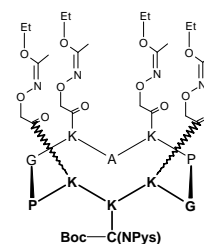
The crude peptide **22** (100 mg, 54.7 μmol) was dissolved in 6 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. PyBOP (30.4 mg, 58.4 μmol) and Boc-Cys(NPys)-OH (21.9 mg, 58.4 μmol) were added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The peptide **47** was obtained as a white solid powder (113 mg, 54.7 μmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.

**Yield:** Quantitative**RP-HPLC:** RT = 11.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₈₃H₁₃₆N₂₂O₂₉S₂**Calcd MW = 2069.0 g.mol⁻¹Found MW = 2068.1 g.mol⁻¹

c[-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-K(BocC(NPys))-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-P-G-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-P-G-]

48

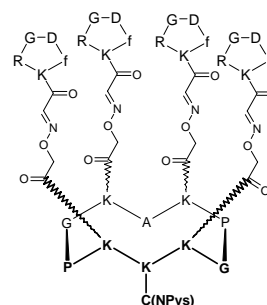
The crude peptide **25** (20 mg, 11.7 μmol) was dissolved in 1.5 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. PyBOP (7.9 mg, 15.2 μmol) and Boc-Cys(NPys)-OH (5.7 mg, 15.2 μmol) were added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The peptide **48** was obtained as a white solid powder (22.8 mg, 11.7 μmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.

**Yield:** Quantitative**RP-HPLC:** RT = 12.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₈₄H₁₃₆N₂₂O₂₇S₂**Calcd MW = 1948.9 g.mol⁻¹Found MW = 1947.8 g.mol⁻¹

(C(NPys))RAFT(c[-RGDFK-]₄)

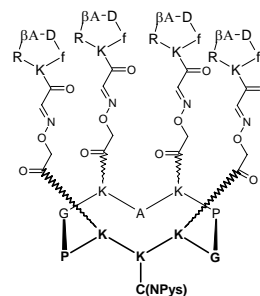
49

The pure peptides **48** (5 mg, 2.57 μmol) and **36** (18 mg, 23.3 μmol) were dissolved in 250 μL of TFA/H₂O (7/3) solution. The mixture was stirred for 20 min and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **49** as a white powder (7.3 mg, 1.55 μmol).

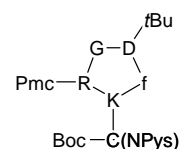
**Yield:** 60 %**RP-HPLC:** RT = 7.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₁₇₉H₂₆₀N₅₈O₅₃S₂**Calcd MW = 4133.9 g.mol⁻¹Found MW = 4134.7 g.mol⁻¹

(C(NPys))RAFT(c[-RβADfK-]₄)**50**

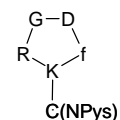
Peptides **48** (7.0 mg, 3.59 μmol) and **37** (13.7 mg, 17.4 μmol) were dissolved in 2 mL of TFA/H₂O (3/7) solution. The mixture was stirred for 1 hr and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **50** as a white powder (13.5 mg, 2.84 μmol).

**Yield:** 79 %**RP-HPLC:** RT = 10.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₁₈₃H₂₆₈N₅₈O₅₃S₂**Calcd MW = 4189.9 g.mol⁻¹Found MW = 4191.0 g.mol⁻¹**c[-R(Pmc)-G-D(tBu)-f-K(BocC(Npys)-)]****51**

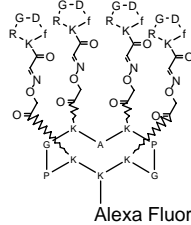
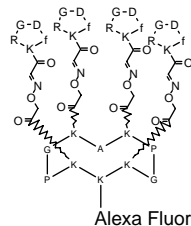
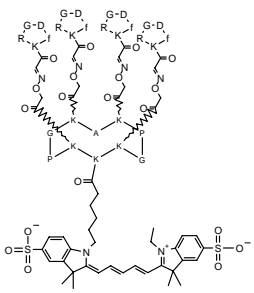
The crude peptide **30** (50 mg, 48.1 μmol) was dissolved in 6 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. PyBOP (42.1 mg, 80 μmol) and Boc-Cys(NPys)-OH (30.4 mg, 80 μmol) were added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The peptide **51** was obtained as a white solid powder (43.1 mg, 36.4 μmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.

**Yield :** 76 %**RP-HPLC:** RT = 9.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₅₃H₇₄N₁₂O₁₃S₃**Calcd MW = 1182.5 g.mol⁻¹Found MW = 1182.5 g.mol⁻¹**c[-R-G-D-f-K(C(Npys)-)]****52**

Peptides **51** (41.8 mg, 35.4 μmol) was treated in 5 mL of TFA/CH₂Cl₂ (9/1) solution. The mixture was stirred for 50 min and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **52** as a white powder (16 mg, 14.7 μmol).

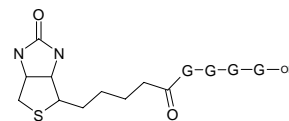
**Yield:** 42 %**RP-HPLC:** RT = 7.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):****C₃₅H₄₈N₁₂O₁₀S₂**Calcd MW = 860.3 g.mol⁻¹Found MW = 860.4 g.mol⁻¹

Syntheses of Reporter Group-Conjugated Compounds

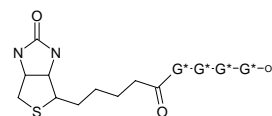
FLUOR[®]700-RAFT(c[-RGDfK-]₄)		53
<p>The purified peptide 41 (10.0 mg, 2.25 μmol) was dissolved in 450 μL of anhydrous DMF adjusted with DIPEA to pH 9. This solution was added to ALEXA FLUOR[®]700 carboxylic acid, succinimidyl ester (3.15 mg, 2.25 μmol). The mixture was stirred for 8 hr and the product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min). After lyophilization, the conjugate 53 was obtained as a deep blue solid powder (7.3 mg, 1.38 μmol).</p>	 <p style="text-align: center;">Alexa Fluor₇₀₀</p>	<p>Yield: 61 %</p> <p>RP-HPLC: RT = 7.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): Calcd MW = 4846.9 g.mol⁻¹ Found MW = 4848.1 g.mol⁻¹</p>
ALEXA FLUOR[®]750-RAFT(c[-RGDfK-]₄)		
<p>The purified peptide 41 (4.1 mg, 0.922 μmol) was dissolved in 770 μL of anhydrous DMF adjusted with DIPEA to pH 9. This solution was added to ALEXA FLUOR[®]750 carboxylic acid, succinimidyl ester (1 mg, 0.77 μmol). The mixture was stirred for 3 hr and the product was purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min). After lyophilization, the conjugate 54 was obtained as a deep blue solid powder (1.1 mg, 0.211 μmol).</p>	 <p style="text-align: center;">Alexa Fluor₇₅₀</p>	<p>Yield: 23 %</p> <p>RP-HPLC: RT = 7.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): Calcd MW = 4744.2 g.mol⁻¹ Found MW = 4745.5 g.mol⁻¹</p>
Cy5-RAFT(c[-RGDfK-]₄)		
<p>The purified peptide 41 (7.0 mg, 1.57 μmol) was dissolved in 1.6 mL of anhydrous DMF adjusted with DIPEA to pH 9. This solution was added to CyTM 5 Mono NHS Ester (1 mg, 1.27 μmol). The mixture was stirred for 3 hr and the product was purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min). After lyophilization, the conjugate 55 was obtained as a deep blue solid powder (5.2 mg, 1.05 μmol).</p>		<p>Yield: 67 %</p> <p>RP-HPLC: RT = 8.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₂₀₄H₂₉₃N₅₇O₅₇S₂ Calcd MW = 4517.1 g.mol⁻¹ Found MW = 4516.9 g.mol⁻¹</p>

H(G)₄-Biotine**56**

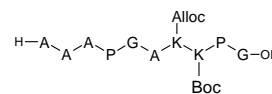
The linear decapeptide was assembled automatically on ABI 433 A1 Peptide Synthesizer on Fmoc-G-Sasrin[®] (0.25 M, loading of 0.67 mmol/g) using standard solid-phase methods. The peptide was released from the resin by TFA/CH₂Cl₂ (1:99) treatment. The free linear protected peptide **56** was obtained as a white solid powder (114 mg, 0.241 mmol) after precipitation, triturating and washing in ether. This crude material was used without further purification.

**Yield:** 96 %**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₈H₂₈N₆O₇SCalcd MW = 472.2 g.mol⁻¹Found MW = 472.1 g.mol⁻¹**D(G)₄-Biotine****57**

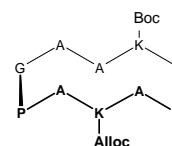
The linear decapeptide was assembled manually on 2-chlorotriylchloride[®] (250 mg, loading of 0.58 mmol/g) using standard solid-phase methods. The peptide was released from the resin by TFA/CH₂Cl₂ (1:99) treatment. The free linear protected peptide **57** was obtained as a white solid powder (70 mg, 0.145 mmol) after precipitation, triturating and washing in ether. This crude material was used without further purification.

**Yield:** Quantitative**MS (ESI-MS, positive mode) :**C₁₈H₂₀N₆O₇SD₈Calcd MW = 480.2 g.mol⁻¹Found MW = 480.1 g.mol⁻¹**H-A-K(Alloc)-A-P-G-A-A-K(Boc)-P-G-OH****58**

The linear decapeptide was assembled automatically (ABI 433 A1 Peptide Synthesizer) on Fmoc-G-SASRIN[™] resin (0.25 g, loading of 0.69 mmol/g) using the general procedure. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1/99). The free linear protected peptide **58** was obtained as a white solid powder (127 mg, 0.109 mmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification

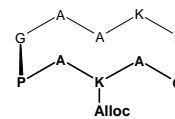
**Yield:** 63 %**RP-HPLC:** RT = 6.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₇H₇₈N₁₂O₁₅Calcd MW = 1050.6 g.mol⁻¹Found MW = 1050.5 g.mol⁻¹**c[-A-K(Alloc)-A-P-G-A-A-K(Boc)-P-G-]****59**

The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide **58** (127 mg, 0.109 mmol). Precipitation and work-up in diethyl ether afforded cyclic peptide **59** as a white solid powder (113 mg, 0.109 mmol). This crude material was used without further purification.

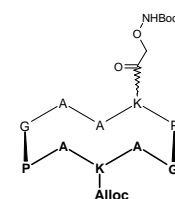
**Yield:** Quantitative**RP-HPLC:** RT = 7.6 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₇H₆₈N₁₂O₁₂Calcd MW = 1032.6 g.mol⁻¹Found MW = 1032.4 g.mol⁻¹

c[-A-K(Alloc)-A-P-G-A-A-K-P-G-]**60**

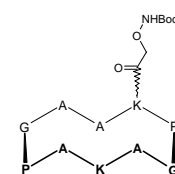
The decapeptide **59** (113 mg, 0.109 mmol) was treated in 16 mL of TFA/CH₂Cl₂ (1/1) solution. The reaction mixture was stirred for 1 hr at r.t. Product was concentrated under reduced pressure. Precipitation and work-up in diethyl ether afforded peptide **60** as a white solid powder (114 mg, 0.109 mmol). This crude material was used without further purification.

**Yield:** Quantitative**RP-HPLC:** RT = 6.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₂H₆₈N₁₂O₁₂Calcd MW = 932.5 g.mol⁻¹Found MW = 932.3 g.mol⁻¹**c[-A-K(Alloc)-A-P-G-A-A-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-]****61**

To a solution of compound **60** (114 mg, 0.109 mmol) in 16 mL anhydrous DMF, were added BocNHCH₂CO-NHS **19** (38 mg, 0.13 mmol) and DIPEA to adjust the pH at 9.0. The reaction was stirred for 1 h at r.t. before being concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated, triturated and washed with diethyl ether to yield compound **61** as a white solid powder (120.5 mg, 0.109 mmol). This crude material was used without further purification.

**Yield:** Quantitative**RP-HPLC:** RT = 7.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₉H₇₉N₁₃O₁₆Calcd MW = 1105.6 g.mol⁻¹Found MW = 1102.4 g.mol⁻¹**c[-A-K-A-P-G-A-A-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-]****62**

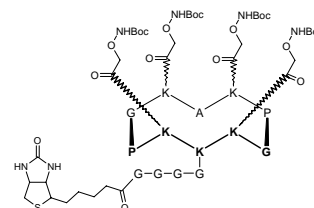
The peptide **61** (120.5 mg, 0.109 mmol) was dissolved in 16 mL of anhydrous CH₂Cl₂/DMF (3/1) under argon. Phenylsilane (100 eq.) and Pd(PPh₃)₄ (0.2 eq.) were added under argon. The reaction was stirred under argon for 30 min at r.t. The mixture was treated with 1.5 mL of methanol before evaporation of the solvents under reduced pressure. The product was purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min) affording compound **62** as a white powder (62 mg, 0.054 mmol).

**Yield:** 50 %**RP-HPLC:** RT = 8.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₅H₇₅N₁₃O₁₄Calcd MW = 1021.6 g.mol⁻¹Found MW = 1018.7 g.mol⁻¹

c[-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-K(H(G)₄-Biotine)-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-A-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-]

63

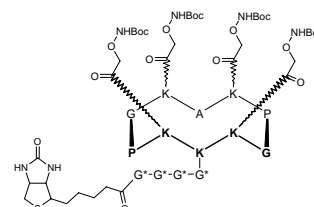
The crude peptide **22** (10 mg, 5.47 μmol) was dissolved in 2.5 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. PyBOP (3.5 mg, 6.6 μmol) and compound **56** (3.2 mg, 6.78 μmol) were added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The peptide **63** was obtained as a white solid powder (11.2 mg, 5.17 μmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.

**Yield:** 95 %**RP-HPLC:** RT = 9.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₉₃H₁₅₅N₂₅O₃₂SCalcd MW = 2166.1 g.mol⁻¹Found MW = 2166.9 g.mol⁻¹

c[-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-K(D(G)₄-Biotine)-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-A-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-]

64

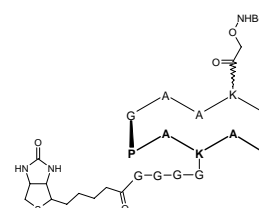
The crude peptide **22** (12 mg, 6.57 μmol) was dissolved in 3.3 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. PyBOP (4.1 mg, 7.9 μmol) and compound **57** (3.8 mg, 7.91 μmol) were added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The peptide **64** was obtained as a white solid powder (14.0 mg, 6.44 μmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.

**Yield:** 98 %**RP-HPLC:** RT = 9.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₉₃H₁₄₇N₂₅O₃₂SD₈Calcd MW = 2174.1 g.mol⁻¹Found MW = 2175.1 g.mol⁻¹

c[-A-K(H(G)₄-Biotine)-A-P-G-A-A-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-]

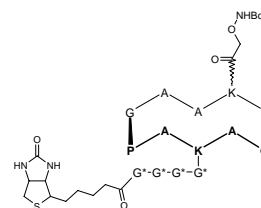
65

The crude peptide **62** (10 mg, 8.82 μmol) was dissolved in 3 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. PyBOP (5.5 mg, 10.6 μmol) and compound **56** (5.0 mg, 10.59 μmol) were added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The peptide **65** was obtained as a white solid powder (13.0 mg, 8.82 μmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.

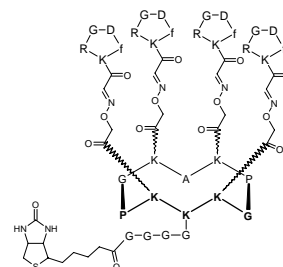
**Yield:** Quantitative**RP-HPLC:** RT = 6.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₆₃H₁₀₁N₁₉O₂₀S₂Calcd MW = 1475.7 g.mol⁻¹Found MW = 1476.0 g.mol⁻¹

c[-A-K(D(G)₄-Biotine)-A-P-G-A-A-K(-CO-CH₂ONH(Boc))-P-G-]**66**

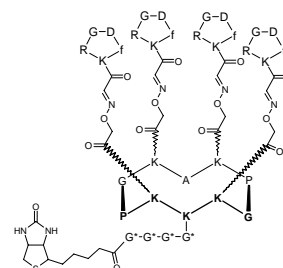
The crude peptide **62** (15 mg, 13.2 μmol) was dissolved in 2 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. PyBOP (8.3 mg, 15.8 μmol) and compound **57** (7.5 mg, 15.6 μmol) were added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The peptide **66** was obtained as a white solid powder (19.7 mg, 13.2 μmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.

**Yield:** Quantitative**RP-HPLC:** RT = 6.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₆₃H₉₃N₁₉O₂₀SD₈Calcd MW = 1483.7 g.mol⁻¹Found MW = 1483.5 g.mol⁻¹**(Biotine-H(G)₄)RAFT(c[-RGDfK-]₄)****67**

The crude peptide **63** (13.2 mg, 6.09 μmol) and compound **36** (37 mg, 47.0 μmol) were dissolved in 5 mL of TFA/H₂O (9/1) and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording compound **67** as a white powder (10.7 mg, 2.23 μmol).

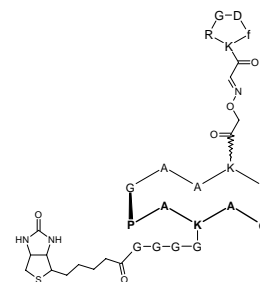
**Yield:** 37 %**RP-HPLC:** RT = 7.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₈₉H₂₇₉N₆₁O₅₆SCalcd MW = 4331.1 g.mol⁻¹Found MW = 4332.8 g.mol⁻¹**(Biotine-D(G)₄)RAFT(c[-RGDfK-]₄)****68**

The crude peptide **64** (14 mg, 6.44 μmol) and compound **36** (40 mg, 51.7 μmol) were dissolved in 2 mL of TFA/H₂O (9/1) and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording compound **68** as a white powder (12.7 mg, 2.65 μmol).

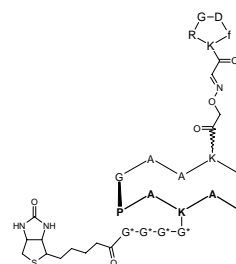
**Yield:** 41 %**RP-HPLC:** RT = 7.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₈₉H₂₇₁N₆₁O₅₆SD₈Calcd MW = 4339.1 g.mol⁻¹Found MW = 4340.8 g.mol⁻¹

(Biotine-H(G)₄)RAFT(c[-RGDfK-]₁)**69**

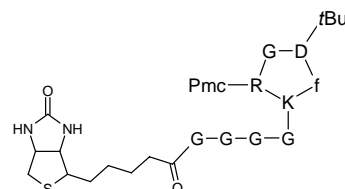
The crude peptide **65** (10 mg, 6.77 μmol) and compound **36** (13 mg, 16.8 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/H₂O (9/1) and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording compound **69** as a white powder (7.5 mg, 3.52 μmol).

**Yield:** 52 %**RP-HPLC:** RT = 6.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₈₇H₁₃₂N₂₈O₂₆SCalcd MW = 2018.3 g.mol⁻¹Found MW = 2017.7 g.mol⁻¹**(Biotine-D(G)₄)RAFT(c[-RGDfK-]₄)****70**

The crude peptide **66** (20 mg, 13.48 μmol) and compound **36** (20.9 mg, 27.0 μmol) were dissolved in 1.5 mL of TFA/H₂O (9/1) and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording compound **70** as a white powder (12.7 mg, 5.63 μmol).

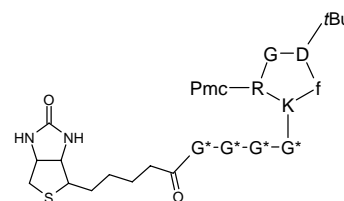
**Yield:** 42 %**RP-HPLC:** RT = 6.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₈₇H₁₂₄N₂₈O₂₆SD₈Calcd MW = 2026.3 g.mol⁻¹Found MW = 2025.5 g.mol⁻¹**c[-R(Pmc)-G-D(*t*Bu)-f-K(H(G)₄-Biotine)-]****71**

The crude peptide **30** (20 mg, 19.24 μmol) was dissolved in 2 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. PyBOP (12 mg, 23 μmol) and compound **56** (11.0 mg, 23.3 μmol) were added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The peptide **71** was obtained as a white solid powder (25.0 mg, 18.12 μmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.

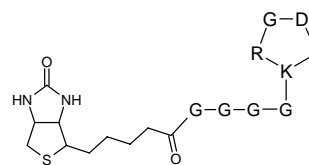
**Yield:** 94 %**RP-HPLC:** RT = 9.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₆₃H₉₅N₁₅O₁₆S₂Calcd MW = 1379.3 g.mol⁻¹Found MW = 1379.5 g.mol⁻¹

c[-R(Pmc)-G-D(tBu)-f-K(D(G)₄-Biotine)-]**72**

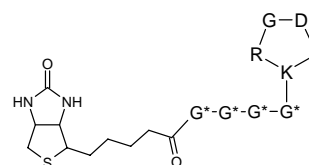
The crude peptide **30** (20 mg, 19.24 μmol) was dissolved in 2 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. PyBOP (12 mg, 23 μmol) and compound **57** (11.0 mg, 22.9 μmol) were added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The peptide **72** was obtained as a white solid powder (23.0 mg, 16.58 μmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.

**Yield:** 86 %**RP-HPLC:** RT = 8.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₆₃H₈₇N₁₅O₁₆S₂D₈Calcd MW = 1387.3 g.mol⁻¹Found MW = 1387.6 g.mol⁻¹**c[-RGDfK(H(G)₄-Biotine)-]****73**

The peptide **71** (25 mg, 18.12 μmol) was treated in 2 mL of TFA/TIS/H₂O (90/5/5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 hr at r.t. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording compound **73** as a white powder (3.0 mg, 2.56 μmol).

**Yield:** 14 %**RP-HPLC:** RT = 6.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₅H₆₇N₁₅O₁₃SCalcd MW = 1057.5 g.mol⁻¹Found MW = 1057.4 g.mol⁻¹**c[-RGDfK(D(G)₄-Biotine)-]****74**

The peptide **72** (23 mg, 16.58 μmol) was treated in 2 mL of TFA/TIS/H₂O (90/5/5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 hr at r.t. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording compound **74** as a white powder (2.9 mg, 2.46 μmol).

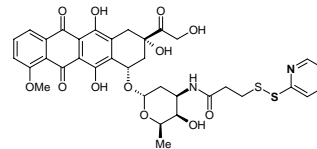
**Yield:** 15 %**RP-HPLC:** RT = 6.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₅H₅₉N₁₅O₁₃SD₈Calcd MW = 1065.5 g.mol⁻¹Found MW = 1065.4 g.mol⁻¹

Syntheses of Drug-Conjugated Compounds

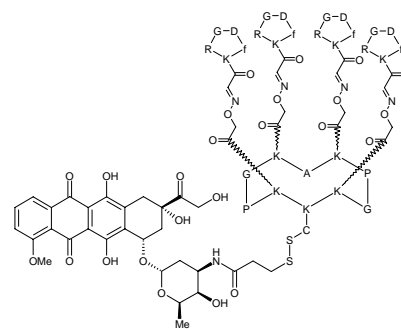
3'-[3-(2-pyridyldithio)propionic amide] doxorubicine

75

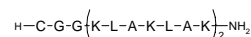
Doxorubicin hydrochloride (2 mg, 3.4 μmol) was dissolved in 2.3 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. 3-(2-pyridyldithio)propionic acid NHS Ester (10.6 mg, 34 μmol) was added and the reaction mixture was stirred for 7 hr at r.t. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min – solvent without TFA) affording compound **75** as a red powder (1.2 mg, 1.62 μmol).

**Yield:** 48 %**RP-HPLC:** RT = 13.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₃₅H₅₃N₂O₁₂S₂Calcd MW = 740.2 g.mol⁻¹Found MW = 740.1 g.mol⁻¹(Doxo)RAFT(c[-RGDfK-]₄)**76**

Compound **75** (0.2 mg, 0.27 μmol) and peptide **45** (0.32 mg, 70.3 nmol) was dissolved in 44 μL of DMF/PBS (pH 4.8) (3/1) under argon. The reaction mixture was stirred for 90 min at r.t. under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min – solvent without TFA) affording compound **76** as a red powder.

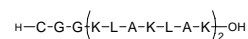
**RP-HPLC:** RT = 8.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₀₄H₂₈₉N₅₇O₆₃S₂Calcd MW = 4609.1 g.mol⁻¹Found MW = 4610.2 g.mol⁻¹H-CGG-(KLAKLAK)₂-NH₂**77**

The linear peptide was assembled on RINK resin (300 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. The peptide was released from the resin by 3 hr treatment using cleavage solution of TFA/EDT/TIS/H₂O (90/5/2.5/2.5). The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording compound **77** as a white powder (159.5 mg, 60.0 μmol).

**Yield:** 29 %**RP-HPLC:** RT = 10.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₉H₁₅₀N₂₄O₁₇SCalcd MW = 1739.1 g.mol⁻¹Found MW = 1739.9 g.mol⁻¹

H-CGG-(KLAKLAK)₂-OH**78**

The linear peptide was assembled on 2-chlorotriptylchloride[®] resin using the general procedure automatically on 348 Ω Synthesizer. The peptide was released from the resin by 3 hr treatment using cleavage solution of TFA/EDT/TIS/H₂O (90/5/2.5/2.5). The product was purified by RP-HPLC affording compound **78** as a white powder.

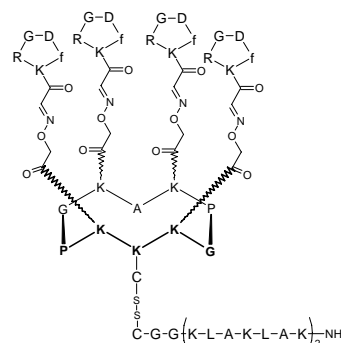


RP-HPLC: RT = 10.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

C₇₉H₁₄₉N₂₃O₁₈S
Calcd MW = 1740.1 g.mol⁻¹

((KLAKLAK)₂-NH₂)RAFT(c[-RGDfK-]₄)**79**

Compound **49** (15 mg, 3.19 μmol) and peptide **77** (9.4 mg, 3.56 μmol) were dissolved in 700 μL of DMF/PBS (pH 4.8) (3/1) under argon. The reaction mixture was stirred for 5 min at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording compound **79** as a white powder (20.3 mg, 2.82 μmol).



Yield: 88 %

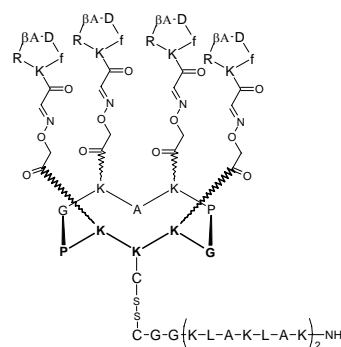
RP-HPLC: RT = 7.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₂₅₃H₄₀₆N₈₀O₆₈S₂
Calcd MW = 5717.0 g.mol⁻¹
Found MW = 5718.3 g.mol⁻¹

((KLAKLAK)₂-NH₂)RAFT(c[-RβADfK-]₄)**80**

Compound **50** (10.0 mg, 2.10 μmol) and peptide **77** (6.2 mg, 2.34 μmol) were dissolved in 400 μL of DMF/PBS (pH 4.8) (3/1) under argon. The reaction mixture was stirred for 5 min at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording compound **80** as a white powder (12.3 mg, 1.70 μmol).



Yield: 81 %

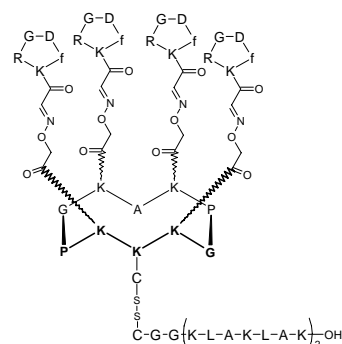
RP-HPLC: RT = 8.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

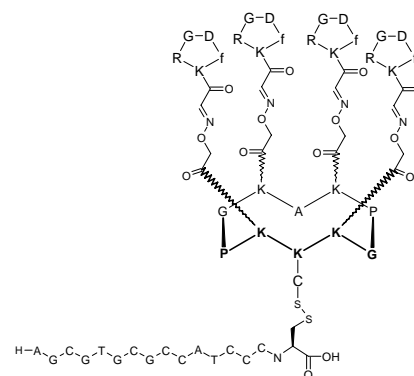
C₂₅₇H₄₁₄N₈₀O₆₈S₂
Calcd MW = 5773.1 g.mol⁻¹
Found MW = 5776.0 g.mol⁻¹

((KLAKLAK)₂-OH)RAFT(c[-RGDfK-]₄)**81**

Compound **49** (5.0 mg, 1.06 μmol) and peptide **78** (3.0 mg, 1.18 μmol) were dissolved in 250 μL of DMF/PBS (pH 4.8) (3/1) under argon. The reaction mixture was stirred for 5 min at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording compound **81** as a white powder (4.2 mg, 0.59 μmol).

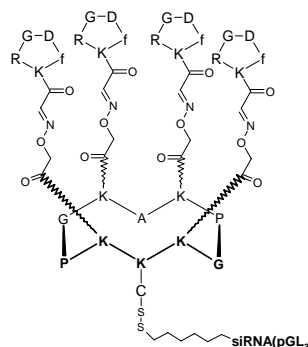
**Yield:** 56 %**RP-HPLC:** RT = 8.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₅₃H₄₀₅N₇₉O₆₉S₂Calcd MW = 5718.0 g.mol⁻¹Found MW = 5719.6 g.mol⁻¹**(PNA(Bcl-2))RAFT(c[-RGDfK-]₄)****82**

Compound **49** (0.5 mg, 106 nmol) and PNA anti Bcl-2 (0.2 mg, 50 nmol) were dissolved in 500 μL of DMF/PBS (pH 4.8) (3/1) under argon. The reaction mixture was stirred for 5 min at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording compound **82** as a white powder (0.67 nmol).

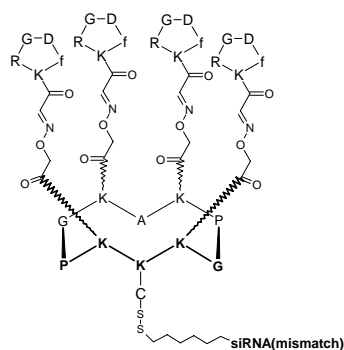
**Yield:** 1.3 %**RP-HPLC:** RT = 6.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₃₃₅H₄₆₀N₁₄₂O₉₈S₂Calcd MW = 8103.5 g.mol⁻¹Found MW = 8105.7 g.mol⁻¹

(siRNA(pGL3))RAFT(c[-RGDfK-]₄)**83**

In nuclease free condition, compound **49** (0.7 mg, 149 nmol) and siRNA pGL3 sens thiol (0.8 mg, 118 nmol) were dissolved in 400 μ L of H₂O/CH₃CN (3/1) under argon. The reaction mixture was stirred for 2 hr at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min – oligonucleotide solvent system) affording compound **83** as a white powder (61 nmol).

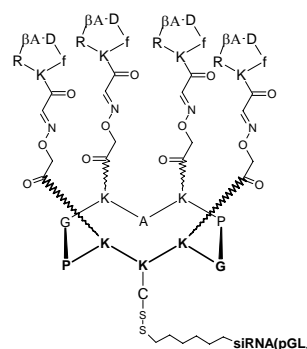
**Yield:** 52 %**RP-HPLC:** RT = 10.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 30 min - oligo)**MS (ESI-MS, negative mode):**C₃₇₉H₅₁₈N₁₂₇O₂₀₁P₂₁S₂Calcd MW = 10777.8 g.mol⁻¹Found MW = 10776.2 g.mol⁻¹**(siRNA(mismatch))RAFT(c[-RGDfK-]₄)****84**

In nuclease free condition, compound **49** (0.74 mg, 157 nmol) and siRNA mismatch sens thiol (1 mg, 148 nmol) were dissolved in 400 μ L of H₂O/CH₃CN (3/1) under argon. The reaction mixture was stirred for 24 hr at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min - oligonucleotide solvent system) affording compound **84** as a white powder (82 nmol).

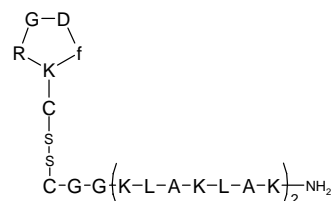
**Yield:** 55 %**RP-HPLC:** RT = 12.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 30 min - oligo)**MS (ESI-MS, negative mode):**C₃₇₈H₅₁₉N₁₂₆O₂₀₀P₂₁S₂Calcd MW = 10736.8 g.mol⁻¹Found MW = 10734.9 g.mol⁻¹

(siRNA(pGL3))RAFT(c[-RβADfK-]4)**85**

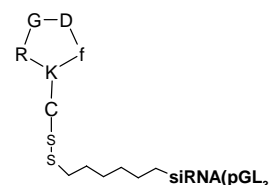
In nuclease free condition, compound **50** (1.1 mg, 231 nmol) and siRNA pGL3 sens thiol (1.3 mg, 191 nmol) were dissolved in 400 μL of H₂O/CH₃CN (3/1) under argon. The reaction mixture was stirred for 6 hr at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min - oligonucleotide solvent system) affording compound **85** as a white powder (125 nmol).

**Yield:** 65 %**RP-HPLC:** RT = 10.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 30 min - oligo)**MS (ESI-MS, negative mode):**C₃₈₃H₅₂₆N₁₂₇O₂₀₁P₂₁S₂Calcd MW = 10833.9 g.mol⁻¹Found MW = 10830.6 g.mol⁻¹**c[-RGDfK((KLAKLAK)₂-NH₂)-]****86**

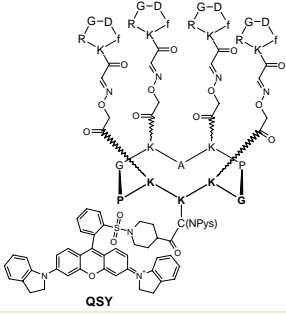
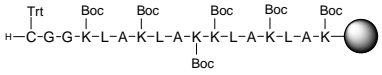
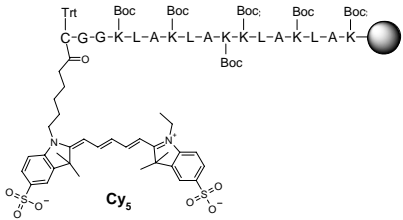
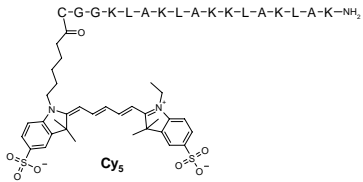
Compound **52** (5 mg, 4.59 μmol) and peptide **77** (12.3 mg, 4.64 μmol) were dissolved in 600 μL of DMF/PBS (pH 4.8) under argon. The reaction mixture was stirred for 5 min at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording compound **86** as a white powder (12.3 mg, 3.43 μmol).

**Yield:** 75 %**RP-HPLC:** RT = 10.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₀₉H₁₉₄N₃₄O₂₅S₂Calcd MW = 2443.5 g.mol⁻¹Found MW = 2444.2 g.mol⁻¹**c[-RGDfK((siRNA(pGL3)))-]****87**

In nuclease free condition, compound **52** (0.1 mg, 92 nmol) and siRNA pGL3 sens thiol (592 μg, 87 nmol) were dissolved in 400 μL of H₂O/CH₃CN (3/1) under argon. The reaction mixture was stirred for 6 hr at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min - oligonucleotide solvent system) affording compound **87** as a white powder (29 nmol).

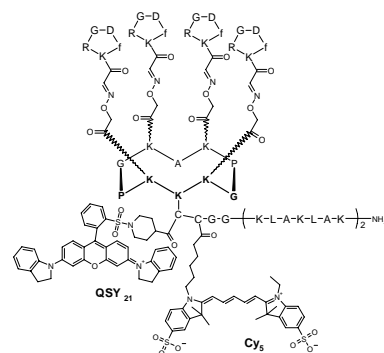
**Yield:** 33 %**RP-HPLC:** RT = 5.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 30 min - oligo)**MS (ESI-MS, negative mode):**C₂₃₅H₃₀₆N₈₁O₁₅₈P₂₁S₂Calcd MW = 7504.2 g.mol⁻¹Found MW = 7502.4 g.mol⁻¹

Syntheses of Drug(Reporter Group)-Conjugated Compounds

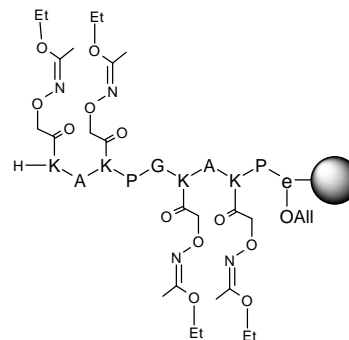
(QSY21)RAFT(c[-RGDfK-]₄)		88
<p>Peptide 49 (10.0 mg, 2.13 μmol) was dissolved in 200 μL of anhydrous DMF adjusted with DIPEA to pH 9. This solution was added to QSY[®]21 carboxylic acid succinimidyl ester (3.5 mg, 4.3 mmol). The mixture was stirred for 26 hr at 40 °C and the product was purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min). After lyophilization, the conjugate 88 was obtained as a deep blue solid powder (3 mg, 0.57 mmol).</p>		<p>Yield: 27 %</p> <p>RP-HPLC: RT = 10.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₂₁₂H₂₈₈N₆₀O₅₆S₃ Calcd MW = 4799.1 g.mol⁻¹ Found MW = 4798.6 g.mol⁻¹</p>
C(Trt)GG-(K(Boc)LAK(Boc)LAK(Boc))₂-on resin		
<p>The linear peptide 89 was assembled automatically (ABI 433 A1 Peptide Synthesizer) on RINK resin (140 mg, 0.1 M, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and capping steps after each coupling except the last one (pyridine/Ac₂O/DMF (2/1/7)).</p>		89
(Cy5)-C(Trt)GG-(K(Boc)LAK(Boc)LAK(Boc))₂-on resin		
<p>Peptide on resin 89 (1.0 mg) was solved in 50 μL of anhydrous DMF adjusted with DIPEA to pH 9. 20 μL of Cy[™]5 Mono NHS Ester solution (0.2 mg, 0.25 μmol) in anhydrous DMF was added to the resin solution. The mixture was stirred for 24 hr at r.t. The conjugate 90 on resin was obtained as a deep blue resin.</p>		90
(Cy5)-C(Trt)GG-(K(Boc)LAK(Boc)LAK(Boc))₂-on resin		
<p>The peptide 91 was released from the resin 90 (1.2 mg of resin, 0.25 μmol of peptide) using 100 μL cleavage solution of TFA/TIS/H₂O (95/5/5). The mixture was stirred for 1 hr at r.t. The free linear unprotected peptide 91 was obtained as a blue solid powder (0.5 mg, 157 nmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification.</p>		91
<p>Yield: 63 %</p> <p>RP-HPLC: RT = 11.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₂₁₂H₁₉₀N₂₆O₂₄S₃ Calcd MW = 2379.4 g.mol⁻¹ Found MW = 2377.4 g.mol⁻¹</p>		

(Smart Probe(KLAKLAK)₂-NH₂)RAFT(c[-RGDfK-]₄)**92**

Compounds **91** (0.5 mg, 157 nmol) and **88** (2 mg, 380 nmol) were dissolved in 400 μ L of DMF/PBS (pH 4.8) under argon. The reaction mixture was stirred for 15 min at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min) affording compound **92** as a deep blue powder (0.8 mg, 97 nmol).

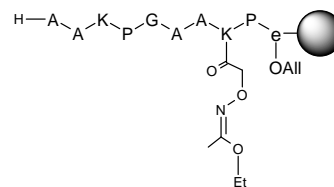
**Yield:** 62 %**RP-HPLC:** RT = 9.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₃₂₇H₄₈₁N₈₅O₇₉S₅Calcd MW = 7021.5 g.mol⁻¹Found MW = 7021.2 g.mol⁻¹**Syntheses of RAFT(c[-RXDfK-]_n) on Resin****H-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-P-G-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)P-e(Resin)-OAll****93**

The assembly of fully protected peptide on resin **93** was carried out on 100 mg NovaSyn TGR or PEGA resin, swelled in CH₂Cl₂ (6 mL, 15 min) and DMF (6 mL, 3 min). Stirred on a flask, the first coupling reaction was performed, by using 1 eq. of Fmoc-e-Al amino acid (relative to the resin loading targeted between 0.2 mmol/g and 0.2 pmol/g) activated *in situ* in DMF (1.5-3 mL) for 1 hr with 0.4 mmol/g of PyBOP and DIPEA to adjust pH to 8-9. Then the resin was capped with a solution of pyridine/Ac₂O/DMF (2/1/7). Other coupling reactions were performed manually on a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit by using 0.4 mmol/g of classical Fmoc-AA-OH amino acids or building block **5** activated *in situ* in DMF (6 mL) for 30 min with 0.4 mmol/g PyBOP and DIPEA to adjust pH to 8-9. Fmoc protecting groups were removed by 3 treatments with a piperidine/DMF solution (1/4) for 10 min (10 mL/g resin). Between each coupling or deprotection steps, the resins were washed with DMF (6 mL x 4) and CH₂Cl₂ (6 mL).

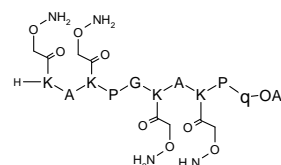


H-A-A-A-P-G-A-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)P-e(Resin)-OAll**94**

The assembly of fully protected peptide on resin **94** was carried out on 100 mg NovaSyn TGR or PEGA resin, swelled in CH₂Cl₂ (6 mL, 15 min) and DMF (6 mL, 3 min). Stirred on a flask, the first coupling reaction was performed, by using 1 eq. of Fmoc-e-Al amino acid (relative to the resin loading targeted between 0.2 mmol/g and 0.2 pmol/g) activated *in situ* in DMF (1.5-3 mL) for 1 hr with 0.4 mmol/g of PyBOP and DIPEA to adjust pH to 8-9. Then the resin was capped with a solution of pyridine/Ac₂O/DMF (2/1/7). Other coupling reactions were performed manually on a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit by using 0.4 mmol/g of classical Fmoc-AA-OH amino acids or building block **5** activated *in situ* in DMF (6 mL) for 30 min with 0.4 mmol PyBOP and DIPEA to adjust pH to 8-9. Fmoc protecting groups were removed by 3 treatments with a piperidine/DMF solution (1/4) for 10 min (10 mL/g resin). Between each coupling or deprotection steps, the resins were washed with DMF (6 mL x 4) and CH₂Cl₂ (6 mL).

**H-K(-CO-CH₂O-NH₂)-A-K(-CO-CH₂O-NH₂)-P-G-K(-CO-CH₂O-NH₂)-A-K(-CO-CH₂O-NH₂)P-q-OAll****95**

Sample of resin **93** was treated by TFA/H₂O (9/1) solution affording deprotected free peptide **95**.



RP-HPLC: RT = 5.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

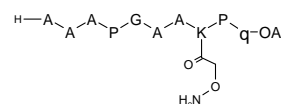
C₅₈H₁₀₀N₁₈O₂₁

Calcd MW = 1384.7 g.mol⁻¹

Found MW = 1383.8 g.mol⁻¹

H-A-A-A-P-G-A-A-K(-CO-CH₂O-NH₂)P-q-OAll**96**

Sample of resin **94** was treated by TFA/H₂O (9/1) solution affording deprotected free peptide **96**.



RP-HPLC: RT = 5.6 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₄₃H₂₀N₁₂O₁₅

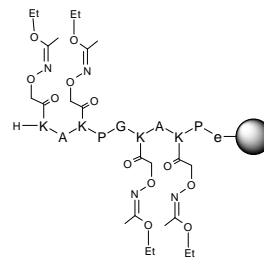
Calcd MW = 994.5 g.mol⁻¹

Found MW = 994.3 g.mol⁻¹

H-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-P-G-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)P-e(Resin)-OH

97

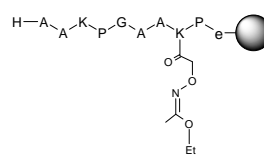
The linear decapeptide on resin **93** (50 mg), previously swelled in dry CH₂Cl₂ under argon (6 mL 15 min), was treated in dry CH₂Cl₂ (6 mL) under argon by adding successively phenylsilane (4.92 mL, 40 mmol) followed after 3 min by Pd(PPh₃)₄ (46 mg, 0.04 mmol). The reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The linear peptide on resin **97** was washed in CH₂Cl₂ (6mL x 2), in dioxane/H₂O (9/1), then in DMF (6mL) and CH₂Cl₂ (6 mL).



H-A-A-A-P-G-A-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)P-e(Resin)-OH

98

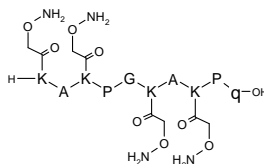
The linear decapeptide on resin **94** (50 mg), previously swelled in dry CH₂Cl₂ under argon (6 mL 15 min), was treated in dry CH₂Cl₂ (6 mL) under argon by adding successively phenylsilane (4.92 mL, 40 mmol) followed after 3 min by Pd(PPh₃)₄ (46 mg, 0.04 mmol). The reaction mixture was stirred for 30 min at r. t. The linear peptide on resin **98** was washed in CH₂Cl₂ (6mL x 2), in dioxane/H₂O (9/1), then in DMF (6mL) and CH₂Cl₂ (6 mL).



H-K(-CO-CH₂O-NH₂)-A-K(-CO-CH₂O-NH₂)-P-G-K(-CO-CH₂O-NH₂)-A-K(-CO-CH₂O-NH₂)P-q-OH

99

Sample of resin **97** was treated by TFA/H₂O (9/1) solution affording deprotected free peptide **99**



RP-HPLC: RT = 4.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₅₅H₉₇N₁₉O₂₀

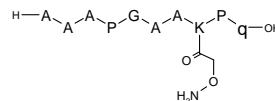
Calcd MW = 1343.7 g.mol⁻¹

Found MW = 1343.5 g.mol⁻¹

H-A-A-A-P-G-A-A-K(-CO-CH₂O-NH₂)P-q-OH

100

Sample of resin **98** was treated by TFA/H₂O (9/1) solution affording deprotected free peptide **100**.



RP-HPLC: RT = 4.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₄₀H₆₇N₁₃O₁₄

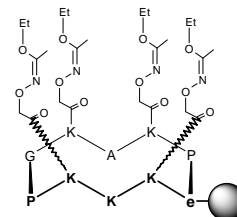
Calcd MW = 953.5 g.mol⁻¹

Found MW = 953.5 g.mol⁻¹

c[-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-P-G-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)P-e(Resin)-]

101

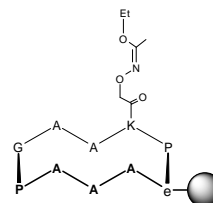
The linear decapeptide on resin **97** (50 mg), previously swelled in dry CH₂Cl₂ (6 mL, 15 min), was solvated in DMF (6 mL) and the pH value was adjusted to 8-9 by addition of DIPEA. PyAOP (0.4 mmol/g) was added and the mixture was stirred at r.t. for 1 hr. The cyclodecapeptide resin **101** was washed with DMF (6 mL x 4) and CH₂Cl₂ (6 mL).



c[-A-A-A-P-G-A-A-K(-CO-CH₂ON=C(CH₃)OEt)P-e(Resin)-]

102

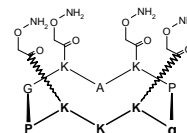
The linear decapeptide on resin **98** (50 mg), previously swelled in dry CH₂Cl₂ (6 mL, 15 min), was solvated in DMF (6 mL) and the pH value was adjusted to 8-9 by addition of DIPEA. PyAOP (0.4 mmol/g) was added and the mixture was stirred at r.t. for 1 hr. The cyclodecapeptide resin **102** was washed with DMF (6 mL x 4) and CH₂Cl₂ (6 mL).



c[-K(-CO-CH₂O-NH₂)-A-K(-CO-CH₂O-NH₂)-P-G-K(-CO-CH₂O-NH₂)-A-K(-CO-CH₂O-NH₂)P-q-]

103

Sample of resin **101** was treated by TFA/H₂O (9/1) solution affording deprotected free peptide **103**.



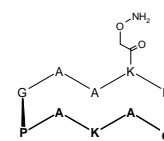
RP-HPLC: RT = 5.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₅₅H₉₅N₁₉O₁₉
Calcd MW = 1325.7 g.mol⁻¹
Found MW = 1325.8 g.mol⁻¹

c[-A-A-A-P-G-A-A-K(-CO-CH₂O-NH₂)P-q-]

104

Sample of resin **102** was treated by TFA/H₂O (9/1) solution affording deprotected free peptide **104**.

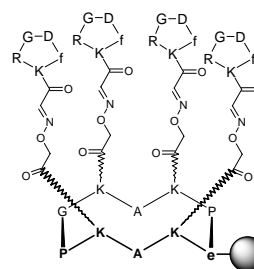


RP-HPLC: RT = 5.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₄₀H₆₅N₁₃O₁₃
Calcd MW = 935.5 g.mol⁻¹
Found MW = 935.3 g.mol⁻¹

RAFT(c[-RGDfK-]₄)-Resin**105**

The cyclodecapeptide on resin **101**, previously swelled in dry CH₂Cl₂ (6 mL, 15 min), was treated by TFA/H₂O/CH₂Cl₂ (94/3/3) solution for 30 min, under vigorous stirring and then washed with DMF. Solution of peptide **36** (1 mmol/g) in dry DMF was added to the resin. The mixture was stirred at r.t. for 2 hr. The cyclodecapeptide on resin **105** was washed with DMF (6 mL x 4), MeOH (6 mL), H₂O 0.1 % TFA (6 mL x 40) and MeOH (6 mL). Sample of resin **105** was treated by TFA/H₂O (9/1) solution affording free peptide for analysis.



RP-HPLC: RT = 12.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

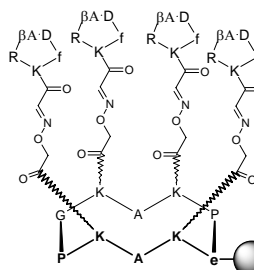
C₁₇₁H₂₅₁N₅₅O₅₁

Calcd MW = 3893.0 g.mol⁻¹

Found MW = 3893.2 g.mol⁻¹

RAFT(c[-RβADfK-]₄)-Resin**106**

The cyclodecapeptide on resin **101**, previously swelled in dry CH₂Cl₂ (6 mL, 15 min), was treated by TFA/H₂O/CH₂Cl₂ (94/3/3) solution for 30 min, under vigorous stirring and then washed with DMF. Solution of peptide **37** (1 mmol/g) in dry DMF was added to the resin. The mixture was stirred at r.t. for 2 hr. The cyclodecapeptide on resin **106** was washed with DMF (6 mL x 4), MeOH (6 mL), H₂O 0.1 % TFA (6 mL x 40) and MeOH (6 mL). Sample of resin **106** was treated by TFA/H₂O (9/1) solution affording free peptide for analysis.



RP-HPLC: RT = 7.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

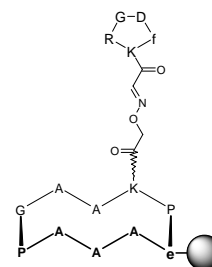
C₁₇₅H₂₅₉N₅₅O₅₁

Calcd MW = 3946.9 g.mol⁻¹

Found MW = 3947.8 g.mol⁻¹

RAFT(c[-RGDfK-]₁)-Resin**107**

The cyclodecapeptide on resin **102**, previously swelled in dry CH₂Cl₂ (6 mL, 15 min), was treated by TFA/H₂O/CH₂Cl₂ (94/3/3) solution for 30 min, under vigorous stirring and then washed with DMF. Solution of peptide **36** (0.4 mmol/g) in dry DMF was added to the resin. The mixture was stirred at r.t. for 2 hr. The cyclodecapeptide on resin **107** was washed with DMF (6 mL x 4), MeOH (6 mL), H₂O 0.1 % TFA (6 mL x 40) and MeOH (6 mL). Sample of resin **107** was treated by TFA/H₂O (9/1) solution affording free peptide for analysis.



RP-HPLC: RT = 6.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₆₉H₁₀₄N₂₂O₂₁

Calcd MW = 1576.8 g.mol⁻¹

Found MW = 1576.2 g.mol⁻¹

Protocoles des Tests Biologiques

Materials and Equipments

HEK293(β_3) and HEK293(β_1) cells are subclones of the human embryonic kidney HEK293 cell line, stably transfected by a plasmid encoding the human β_3 and β_1 subunits respectively. They were cultured in DMEM enriched with 4.5 g.L⁻¹ glucose and supplemented with 1 % glutamine, 10 % FBS, penicillin (50 U.mL⁻¹), streptomycin (50 μ g.mL⁻¹) and G418 (700 μ g.mL⁻¹). IGROV-1, a human ovarian cancer cell line and Ts/Apc, a mouse mammary carcinoma model, were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 1 % glutamine, 10 % FBS, penicillin (50 U.mL⁻¹) and streptomycin (50 μ g.mL⁻¹). The Ts/Apc medium was supplemented with beta-mercaptoethanol (50 nM). 3-LL cells are a subclone of murine Lewis lung carcinoma, not expressing $\alpha_v\beta_3$ integrin. They were cultured in DMEM enriched with 4.5 g.L⁻¹ glucose and supplemented with 1% glutamine, 10 % FBS, penicillin (50 U.mL⁻¹), streptomycin (50 μ g.mL⁻¹) and G418 (700 μ g.mL⁻¹). All cells were maintained at 37°C under an atmosphere of 5 % CO₂. Cell cultures were carried out by D. Desplanques (UMR823, Institut Albert Bonniot).

Fluorescence correlation spectroscopy studies were performed with the ConfoCor 2 system (Carl Zeiss, Jena, Germany) using a 40 X water immersion C-Apochromat objective lens (N.A. = 1.2). Optical and fluorescence microscopies were performed with an Olympus BX41 fluorescence microscope. Confocal laser scanning microscopy was performed using a LSM510 confocal laser microscope (Carl Zeiss, France) equipped with an Ar laser (457 nm, 488 nm, 514 nm), two HeNe lasers (543 nm and 633 nm) and femtosecond Ti/Sa laser, 'Tsunami' Spectra-Physics (wavelength from 690 to 1100 nm). The non-invasive *in vivo* imaging and tomography were performed with a cooled CCD Camera (ORCAII-BT-512G or ORCA EG, HAMAMATSU PHOTONICS, Massy, France).

***In vitro* Assays**

★ Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) Assays

Interaction assays were performed at room temperature in HBSS containing Mg²⁺ and Ca²⁺. Samples of 1 to 40 nM of soluble integrin $\alpha_v\beta_3$ were mixed with 0.6 nM of (Cy5)RAFT-(c[-RGDfK]₄) **55** and (Cy5)RAFT-(c[-R β ADfK]₄) or 2.4 nM of c[-RGDfK(Cy5)-]. FCS measurements were performed 2 min after mixing. Theoretical calculation was made using Origin software (version 6.1). The measurements were carried out at room temperature in eight-well Lab-Tek I chambered coverglass (Nalge Nunc International). The 633 nm He-Ne laser beam was focused in order to illuminate 50 μ m solutions at 150 μ m over the cover glass. The fluorescence emission was collected through a pinhole and a 650-nm-long pass filter. Photon counts were detected by an Avalanche PhotoDiode (APD) at 20 MHz for 30 s. For each sample, FCS measurements were repeated 15 times. The data evaluation was performed using the Zeiss FCS Fit software. Most of the intensity autocorrelation curves were fitted using a free diffusion model with two components: the peptide coupled to the fluorochrome alone and the fluorescent peptide-integrin complex.

★ Confocal Microscopy of Peptide Internalization

Twenty-four hours before experiments, HEK293(β_3) cells were seeded in 4-wells Lab-Tek I chambered coverglass. Cells were starved for 30 minutes and incubated with DMEM w/o red phenol alone or containing amantadine 1 mM, nystatin 1 μ M or both for another 30 minutes at 37°C, 5 % CO₂. Then, 1 μ M (Cy5)RAFT-(c[-RGDfK]₄) **55** or 1 μ M c[-RGDfK(Cy5)-] was added to medium, together with 5 μ M of Hoechst, for 10 minutes. Confocal microscopy was performed using an x40 oil immersion objective. The 633 nm laser intensity was about 10 or 30 %, depending on the peptide-Cy5.

★ Confocal Microscopy of Peptide Trafficking

Twenty-four hours before experiments, HEK293(β_3) cells were seeded in 4-wells Lab-Tek I chambered coverglass. Cells were starved for 30 minutes and incubated at 37°C, 5 % CO₂ with DMEM w/o red phenol containing 1 μ M (Cy5)RAFT-(c[-RGDfK]₄) **55** or 1 μ M c[-RGDfK(Cy5)-] and either 10 μ g/ml transferrin-FITC (TrF) (Invitrogen France), 0.5 μ g/ml Cholera Toxin B subunit conjugated to Alexa fluor 555 (CTB) (Molecular Probes) or 250 μ g/ml Dextran-Alexa546 10000MW (Molecular Probes). Confocal imaging was performed after 10 to 15 minutes incubation. Golgi- and Lyso-tracker were incubated before peptide-Cy5. For Golgi-tracker, cells were incubated 30 minutes at 4°C with 5 μ M NBD C₆-Ceramide (Molecular Probes) in HBSS and rinsed 3 times with ice-cold medium before addition of Cy5-peptide. Lyso-tracker green (Invitrogen) was added to cell medium at 50 nM, 37°C, 30 minutes before addition of Cy5-peptide.

★ Cytotoxicity Assays

Twenty-four hours before treatment, 200 Ts/Apc cells were seeded in Petri dishes with RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS, penicillin (50 U.mL⁻¹), streptomycin (50 mg.mL⁻¹) and β -mercaptoethanol (2.5.10⁻¹M) and incubated at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere. Medium was removed and replaced for 1 hr with appropriate medium w/o β -mercaptoethanol, antibiotics and FBS. Cells were treated with different concentrations of (KLAKLAK)₂ conjugates and control peptides. After a one week incubation, cell colonies were washed 2 times with PBS and cells were fixed with ethanol for 15 min. Cell colonies were then dried (15 min at 37°C) and stained with methylene blue 1 % in buffer 0.01M pH 8.5 (15 min). After tap water washing, Petri dishes were dried and cell colonies were counted.

★ Apoptosis Induction Assays

Twenty-four hours before transfection, 10⁴ Ts/Apc cells/well were seeded in 96-well assay plates with RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS, penicillin (50 U.mL⁻¹), streptomycin (50 mg.mL⁻¹) and β -mercaptoethanol (0.25 M) and incubated at 37°C under a 5 % CO₂ atmosphere. Medium was removed and replaced for 1 hr in appropriate medium w/o β -mercaptoethanol, antibiotics and FBS. Cells were treated with different concentrations of (KLAKLAK)₂ conjugates and control peptides. After 6 or 12 hr of incubation, cells were washed 2 times in PBS and cells were fixed with PFA 0.5 % at room temperature for 5-10 min. Cells were then stained 5 min with Hoechst (5 μ M). Cell nuclei were observed in moviol by microscopy.

★ **Confocal Microscopy of (SmartProbe(KLAKLAK)₂-NH₂RAFT(-RGDfK-14)) 92.**

Cells were cultured in four-well Lab-Tek I chambered coverglass in the appropriate medium. Medium was removed and conjugate (Smart Probe(KLAKLAK)₂-NH₂)RAFT (c[-RGDfK-14]) 92 was added at 2 μM for 1 hr in appropriate medium w/o FBS and red phenol. Then, mitotracker red (Invitrogen) 100 nM was added to cell medium for 10 minutes together with Hoechst 5 μM. Cells were carefully rinsed and medium was replaced for further hours. Cells were observed through confocal microscopy at 37°C, 5 % CO₂. Confocal slices were of 0.5 or 1 μm thickness. Images were treated with ImageJ software 1.37v.

★ **SiRNA Conjugate Transfection Assays**

Stable transfections of Ts/Apc cells by pGL3 gene were performed using Jet-PEI (Polyplus Transfection, Illkirch, France). Twenty-four hours before transfection, 10⁴ Ts/Apc cells/well were seeded in 96-well assay plates with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, penicillin (50 U.mL⁻¹), streptomycin (50 mg.mL⁻¹) and β-mercaptoethanol (0.25 M) and incubated at 37 °C under a 5 % CO₂ atmosphere. Medium was removed and replaced for 1 hr with appropriate medium w/o β-mercaptoethanol, antibiotics and FBS. Conjugate 83 were annealed using stoichiometric anti-sens siRNA in annealing solution (providing by Eurogentec) for 2 min at 96 °C followed by 2 hr at room temperature. Cells were treated with different concentrations of annealed conjugate 83 or in control conditions using annealed siRNA transfected by Oligofectamine (200 nM of annealed siRNA) or HiPerFect (5 nM of annealed siRNA). We also performed control experiments using annealed conjugate 83 transfected by Oligofectamine (Invitrogen) (200 nM of 83) or HiPerFect (Qiagen) (5 nM of 83). Incubations were performed during 4 hr at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere, then culture medium was added to get a final 10 % FBS concentration. At 72 hr, medium was removed and replaced by appropriate medium containing luciferin (10 mg/mL) for 5 min before luminescence quantification.

★ **Cell Adhesion on Resin**

An amount of 2-20 mg of beads was washed 5 min with water and PBS before equilibration in PBS (15 min) and finally suspension in DMEM w/o FBS. Beads were incubated with media for 30 min at room temperature. HEK293(β3), HEK293(β1) and 3-LL cells were removed from culture flasks using trypsin treatment, washed and re-suspended in DMEM w/o FBS at a final density of 1 million cells/mL. 1 mL of cell suspension was mixed with the beads and incubated at 37 °C with gentle shaking for 30 min. Beads were gently washed 3 times with DMEM w/o FBS and cells were fixed with ethanol. After 20 min of fixation, beads were dried (2 hr at 37°C), then stained with methylene blue 1 % in borate buffer (30 min). The dye was eliminated and the beads were washed 3 times with PBS before microscopy observation in moviol.

***In vivo* Assays**

*** Tumour Detection Experiments**

For scattered deep tumours targeting experiments, Female Swiss nude mice (5 weeks old) from Janvier (France) were injected intravenously with Ts/Apc tumour cells (10^6 cells in 100 μ l PBS). After 10, 12 or 14 days, mice were injected intravenously with (Alexa700)RAFT(c[-RGDfK-]₄) **53** (0.4 μ mol/kg). 3 hours later, mice were anesthetized (isoflurane/oxygen 3.5% for induction and 1.5% thereafter) and were placed in the imaging setup. Anesthetized animals were illuminated by a laser source (690 nm) equipped with interference filters.

For subcutaneous tumour targeting experiments, PBS solution containing Cy5 or Alexa700-labelled RGD-peptides (0.4 μ mol/kg (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-]₄) **55** and 0.4 μ mol/kg (Alexa700)RAFT(c[-RGDfK-]₄) **53**) were injected in the tail vein of anaesthetized animals with subcutaneous tumours formed by the rapidly growing and highly angiogenic murine TS/Apc breast carcinoma model. Anesthetized animals were illuminated by 633 nm Light Emitting Diodes (LEDs) or laser source (690 nm) equipped with interference filters.

*** Evaluation of antitumour effect of (KLAKLAK)₂ conjugate**

Female NMRI nude mice, 6-8 weeks old from Janvier (France), were maintained under specific pathogen-free conditions. IGROV-1 ($20 \cdot 10^6$ cells per mouse) in PBS were injected subcutaneously in the back of each animal. From cell establishment, 200 μ L of 0.6 mM RGD-peptides in PBS (KLAKLAK)₂-NH₂RAFT(c[-RGDfK-]₄) **79**, (KLAKLAK)₂-NH₂RAFT(c[-R β ADfK-]₄) **80**, (KLAKLAK)₂-NH₂ and RAFT(c[-RGDfK-]₄) were administrated i.p. daily (12 days). Antitumour effects were evaluated by tumour size measurements and a final histological examination at the end of the experiment (n = 8 or 9/group).

ANNEXES

Références Bibliographiques

1. Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E. Acides aminés, peptides, protéines et acides nucléiques. *Traité de Chimie Organique* ed. De Boeck & Larcier, Paris. **1999**, 1158-1159.
2. Lacave, R.; Larsen, C.-J.; Robert, J. *Cancérologie fondamentale*. ed. J. Libbey-Eurotext, Montrouge, **2005**, XIV-437 p.
3. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
4. Ferlay, J.; Bray, F.; Pisani, P.; Parkin, D. M. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, IARC CancerBase No 5, version 2.0. *IARC Press Lyon* **2004**.
5. Ferlay, J.; Autier, P.; Boniol, M.; Heanue, M.; Colombet, M.; Boyle, P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology* **2007**, *18*, 581-592.
6. Stewart, B. W.; Kleihues, P. Le cancer, un fardeau mondial. *Le cancer dans le monde* ed. IARC Press, Lyon. **2005**, 13-19.
7. *World Health Organisation*, <http://www.who.int/features/qa/15/fr/index.html>.
8. Sullivan, D. C.; Kelloff, G. Seeing into cells. The promise of in vivo molecular imaging in oncology. *EMBO Rep* **2005**, *6*, 292-296.
9. Robert, J. Pharmacologie des médicaments anticancéreux. *Cancérologie Fondamentale* ed. J. Libbey-Eurotext, Montrouge. **2005**, 403-413.
10. Schrama, D.; Reisfeld, R. A.; Becker, J. C. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 147-159.
11. Clinicaltrials.gov *Ranibizumab Injections to Treat Retinal Tumors in Patients With Von Hippel-Lindau Syndrome*, <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00089765>.
12. Chua, Y. J.; Cunningham, D. Panitumumab. *Drugs Today* **2006**, *42*, 711-719.
13. Adams, G. P.; Weiner, L. M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 1147-1157.
14. Lippert, J. W. Vascular disrupting agents. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15*, 605-615.
15. Hinnen, P.; Eskens, F. A. Vascular disrupting agents in clinical development. *Br J Cancer* **2007**, *96*, 1159-1165.
16. Edelstein, M. L.; Abedi, M. R.; Wixon, J.; Edelstein, R. M. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med* **2004**, *6*, 597-602.
17. Eckhardt, S. Molecular targeted therapy: a strategy of disillusion or optimism? *J Lab Clin Med* **2006**, *147*, 108-113.
18. Chari, R. V. Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs. *Acc Chem Res* **2008**, *41*, 98-107.
19. Payne, G. Progress in immunoconjugate cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 207-212.
20. Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* **2001**, *1*, 118-129.
21. Wu, A. M.; Senter, P. D. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 1137-1146.
22. Azria, D.; Spano, J.-P. *Thérapies ciblées en cancérologie*. ed. J. Libbey-Eurotext, Montrouge, **2006**, VI-127 p.
23. Sharkey, R. M.; Goldenberg, D. M. Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med* **2005**, *46*, 115-127.
24. Xu, H.; Baidoo, K.; Gunn, A. J.; Boswell, C. A.; Milenic, D. E.; Choyke, P. L.; Brechbiel, M. W. Design, synthesis, and characterization of a dual modality positron emission tomography and fluorescence imaging agent for monoclonal antibody tumor-targeted imaging. *J Med Chem* **2007**, *50*, 4759-4765.
25. Gutowski, M.; Carcenac, M.; Pourquier, D.; Larroque, C.; Saint-Aubert, B.; Rouanet, P.; Pelegrin, A. Intraoperative immunophotodetection for radical resection of cancers: evaluation in an experimental model. *Clin Cancer Res* **2001**, *7*, 1142-1148.
26. Holliger, P.; Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 1126-1136.
27. Carter, P. J. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* **2006**, *6*, 343-357.
28. Sidhu, S. S.; Fellouse, F. A. Synthetic therapeutic antibodies. *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 682-688.
29. Vyas, S. P.; Sihorkar, V. Endogenous carriers and ligands in non-immunogenic site-specific drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2000**, *43*, 101-164.

30. Daniels, T. R.; Delgado, T.; Helguera, G.; Penichet, M. L. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clin Immunol* **2006**, *121*, 159-176.
31. Jaracz, S.; Chen, J.; Kuznetsova, L. V.; Ojima, I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorg Med Chem* **2005**, *13*, 5043-5054.
32. Low, P. S.; Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D. Discovery and Development of Folic-Acid-Based Receptor Targeting for Imaging and Therapy of Cancer and Inflammatory Diseases. *Acc Chem Res* **2008**, *41*, 120-129.
33. Ruoslahti, E. Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Semin Cancer Biol* **2000**, *10*, 435-442.
34. Aina, O. H.; Sroka, T. C.; Chen, M. L.; Lam, K. S. Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers* **2002**, *66*, 184-199.
35. Mammen, M.; Chio, S.-K.; Whitesides, G. M. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* **1998**, *37*, 2755-2794.
36. Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 14922-14933.
37. Schraa, A. J.; Kok, R. J.; Berendsen, A. D.; Moorlag, H. E.; Bos, E. J.; Meijer, D. K.; De Leij, L. F.; Molema, G. Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting. *J Control Release* **2002**, *83*, 241-251.
38. Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction. *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 2348-2368.
39. Carlson, C. B.; Mowery, P.; Owen, R. M.; Dykhuizen, E. C.; Kiessling, L. L. Selective tumor cell targeting using low-affinity, multivalent interactions. *ACS Chem Biol* **2007**, *2*, 119-127.
40. Rawat, A.; Vaidya, B.; Khatni, K.; Goyal, A. K.; Gupta, P. N.; Mahor, S.; Paliwal, R.; Rai, S.; Vyas, S. P. Targeted intracellular delivery of therapeutics: an overview. *Pharmazie* **2007**, *62*, 643-658.
41. Liu, T. C.; Galanis, E.; Kim, D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol* **2007**, *4*, 101-117.
42. Owen, R. M.; Carlson, C. B.; Xu, J.; Mowery, P.; Fasella, E.; Kiessling, L. L. Bifunctional ligands that target cells displaying the alpha v beta3 integrin. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 68-82.
43. Wu, H.; Seki, T.; Dmitriev, I.; Uil, T.; Kashentseva, E.; Han, T.; Curiel, D. T. Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum Gene Ther* **2002**, *13*, 1647-1653.
44. Couvreur, P.; Vauthier, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res* **2006**, *23*, 1417-1450.
45. Cheong, I.; Huang, X.; Thornton, K.; Diaz, L. A., Jr.; Zhou, S. Targeting cancer with bugs and liposomes: ready, aim, fire. *Cancer Res* **2007**, *67*, 9605-9608.
46. Russ, V.; Wagner, E. Cell and tissue targeting of nucleic acids for cancer gene therapy. *Pharm Res* **2007**, *24*, 1047-1057.
47. Samad, A.; Sultana, Y.; Aqil, M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Delivery* **2007**, *4*, 297-305.
48. Schiffelers, R. M.; Ansari, A.; Xu, J.; Zhou, Q.; Tang, Q.; Storm, G.; Molema, G.; Lu, P. Y.; Scaria, P. V.; Woodle, M. C. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, 149.
49. Park, J. W.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Colbern, G.; Shalaby, R.; Baselga, J.; Shao, Y.; Nielsen, U. B.; Marks, J. D.; Moore, D.; Papahadjopoulos, D.; Benz, C. C. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res* **2002**, *8*, 1172-1181.
50. Torchilin, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *Aaps J* **2007**, *9*, 128-147.
51. Clinicaltrials.gov *Safety Study of Infusion of SGT-53 to Treat Solid Tumors*, <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00470613>.
52. Torchilin, V. P. Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev* **2006**, *58*, 1532-1555.
53. Vasir, J. K.; Labhasetwar, V. Polymeric nanoparticles for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **2006**, *3*, 325-344.
54. Temsamani, J.; Vidal, P. The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Drug Discov Today* **2004**, *9*, 1012-1019.
55. Gupta, B.; Levchenko, T. S.; Torchilin, V. P. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev* **2005**, *57*, 637-651.
56. Patel, L. N.; Zaro, J. L.; Shen, W. C. Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharm Res* **2007**, *24*, 1977-1992.

57. Deshayes, S.; Morris, M.; Heitz, F.; Divita, G. Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**, *60*, 537-547.
58. Maurel, F.; Debart, F.; Cavelier, F.; Thierry, A. R.; Lebleu, B.; Vasseur, J. J.; Vives, E. Toward high yield synthesis of peptide-oligonucleotide chimera through a disulfide bridge: a simplified method for oligonucleotide activation. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 5084-5087.
59. Dirksen, A.; Langereis, S.; De Waal, B. F.; Van Genderen, M. H.; Hackeng, T. M.; Meijer, E. W. A supramolecular approach to multivalent target-specific MRI contrast agents for angiogenesis. *Chem Commun* **2005**, 2811-2813.
60. Liu, Y.; Deisseroth, A. Tumor vascular targeting therapy with viral vectors. *Blood* **2007**, *107*, 3027-3033.
61. Dass, C. R.; Choong, P. F. Targeting of small molecule anticancer drugs to the tumour and its vasculature using cationic liposomes: lessons from gene therapy. *Cancer Cell Int* **2006**, *6*, 17.
62. Sonvico, F.; Mornet, S.; Vasseur, S.; Dubernet, C.; Jaillard, D.; Degrouard, J.; Hoebeke, J.; Duguet, E.; Colombo, P.; Couvreur, P. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjug Chem* **2005**, *16*, 1181-1188.
63. Liu, Y.; Miyoshi, H.; Nakamura, M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *Int J Cancer* **2007**, *120*, 2527-2537.
64. Derfus, A. M.; Chen, A. A.; Min, D. H.; Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N. Targeted quantum dot conjugates for siRNA delivery. *Bioconjug Chem* **2007**, *18*, 1391-1396.
65. Maynard, H. D.; Okada, S. Y.; Grubbs, R. H. Inhibition of cell adhesion to fibronectin by oligopeptide-substituted polynorbornenes. *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 1275-1279.
66. Cheng, Y.; Gao, Y.; Rao, T.; Li, Y.; Xu, T. Dendrimer-based prodrugs: design, synthesis, screening and biological evaluation. *Comb Chem High Throughput Screen* **2007**, *10*, 336-349.
67. Darbre, T.; Reymond, J. L. Peptide dendrimers as artificial enzymes, receptors, and drug-delivery agents. *Acc Chem Res* **2006**, *39*, 925-934.
68. Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. Calixarene-based multivalent ligands. *Chem Soc Rev* **2007**, *36*, 254-266.
69. Jensen, K. J.; Brask, J. Carbohydrates in peptide and protein design. *Biopolymers* **2005**, *80*, 747-761.
70. Tong, R.; Cheng, J. Anticancer Polymeric Nanomedicines. *Polymer Reviews* **2007**, *47*, 345 - 381.
71. Fichter, K. M.; Zhang, L.; Kiick, K. L.; Reineke, T. M. Peptide-Functionalized Poly(ethylene glycol) Star Polymers: DNA Delivery Vehicles with Multivalent Molecular Architecture. *Bioconjug Chem* **2008**, *19*, 76-88.
72. Tam, J. P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85*, 5409-5413.
73. Thumshirn, G.; Hersel, U.; Goodman, S. L.; Kessler, H. Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chemistry - A European Journal* **2003**, *9*, 2717-2725.
74. Ni, J.; Powell, R.; Baskakov, I. V.; Devico, A.; Lewis, G. K.; Wang, L. X. Synthesis, conformation, and immunogenicity of monosaccharide-centered multivalent HIV-1 gp41 peptides containing the sequence of DP178. *Bioorg Med Chem* **2004**, *12*, 3141-3148.
75. Li, H.; Wang, L. X. Cholic acid as template for multivalent peptide assembly. *Org Biomol Chem* **2003**, *1*, 3507-3513.
76. Guarise, C.; Prins, L. J.; Scrimin, P. Fully symmetrical functionalization of multivalent scaffold molecules on solid support. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11670-11674.
77. Langenhan, J. M.; Thorson, J. S. Recent Carbohydrate-Based Chemoselective Ligation Applications. *Curr Org Synth* **2005**, *2*, 59-81.
78. Kent, S. Total chemical synthesis of enzymes. *J Pept Sci* **2003**, *9*, 574-593.
79. Papot, S.; Tranoy, I.; Tillequin, F.; Florent, J. C.; Gesson, J. P. Design of selectively activated anticancer prodrugs: elimination and cyclization strategies. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2002**, *2*, 155-185.
80. Kratz, F.; Muller, I. A.; Ryppa, C.; Warnecke, A. Prodrug Strategies in Anticancer Chemotherapy. *ChemMedChem* **2007**, *11*, 20-53.
81. Kratz, F.; Abu Ajaj, K.; Warnecke, A. Anticancer carrier-linked prodrugs in clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* **2007**, *16*, 1037-1058.
82. Sausville, E.; Lorusso, P.; Quinn, M.; Forman, K.; Leamon, C.; Morganstern, D.; Bever, S.; Messmann, R. A phase I study of EC145 administered weeks 1 and 3 of a 4-week cycle in patients with refractory solid tumors. *Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings* **2007**, *25*, 2577.
83. Herbst, R. S. Role of novel targeted therapies in the clinic. *Br J Cancer* **2005**, *92*, S21-27.

84. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **2003**, *9*, 653-660.
85. Goldman, E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* **1907**, *2*, 1236-1240.
86. Algire, G. H.; Chalkley, H. W. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. *J Natl Cancer Inst* **1945**, *41*, 111-124.
87. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **1971**, *285*, 1182-1186.
88. Zetter, B. R. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* **1998**, *49*, 407-424.
89. Auguste, P.; Lemiere, S.; Larrieu-Lahargue, F.; Bikfalvi, A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol* **2005**, *54*, 53-61.
90. Bamias, A.; Dimopoulos, M. A. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. *Eur J Intern Med* **2003**, *14*, 459-469.
91. Hanahan, D.; Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **1996**, *86*, 353-364.
92. Carmeliet, P.; Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **2000**, *407*, 249-257.
93. Ferrara, N.; Kerbel, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **2005**, *438*, 967-974.
94. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **2005**, *438*, 932-936.
95. Bikfalvi, A. Tumor angiogenesis. *Bull Cancer* **2003**, *90*, 449-458.
96. Alessi, P.; Ebbinghaus, C.; Neri, D. Molecular targeting of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1654*, 39-49.
97. Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **2005**, *307*, 58-62.
98. Luo, B. H.; Springer, T. A. Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol* **2006**, *18*, 579-586.
99. Xiong, J. P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R.; Scott, D. L.; Joachimiak, A.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* **2001**, *294*, 339-345.
100. Takagi, J.; Petre, B. M.; Walz, T.; Springer, T. A. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **2002**, *110*, 599-511.
101. Kim, M.; Carman, C. V.; Springer, T. A. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **2003**, *301*, 1720-1725.
102. Luo, B. H.; Carman, C. V.; Springer, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **2007**, *25*, 619-647.
103. Buensuceso, C.; De Virgilio, M.; Shattil, S. J. Detection of integrin alpha IIb beta 3 clustering in living cells. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 15217-15224.
104. Hynes, R. O. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* **2002**, *8*, 918-921.
105. Reynolds, L. E.; Wyder, L.; Lively, J. C.; Taverna, D.; Robinson, S. D.; Huang, X.; Sheppard, D.; Hynes, R. O.; Hodivala-Dilke, K. M. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* **2002**, *8*, 27-34.
106. Max, R.; Gerritsen, R. R.; Nooijen, P. T.; Goodman, S. L.; Sutter, A.; Keilholz, U.; Ruitter, D. J.; De Waal, R. M. Immunohistochemical analysis of integrin alphav beta3 expression on tumor-associated vessels of human carcinomas. *Int J Cancer* **1997**, *71*, 320-324.
107. Brooks, P. C.; Montgomery, A. M.; Rosenfeld, M.; Reisfeld, R. A.; Hu, T.; Klier, G.; Cheresch, D. A. Integrin alphav beta3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **1994**, *79*, 1157-1164.
108. Lim, E. H.; Danthi, N.; Bednarski, M.; Li, K. C. A review: Integrin alphav beta3-targeted molecular imaging and therapy in angiogenesis. *Nanomedicine* **2005**, *1*, 110-114.
109. Posey, J. A.; Khazaeli, M. B.; Delgrosso, A.; Saleh, M. N.; Lin, C. Y.; Huse, W.; Lobuglio, A. F. A pilot trial of Vitaxin, a humanized anti-vitronectin receptor (anti alphav beta3) antibody in patients with metastatic cancer. *Cancer Biother Radiopharm* **2001**, *16*, 125-132.
110. Clinicaltrials.gov Vitaxin, <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=vitaxin>.
111. Hsu, A. R.; Veeravagu, A.; Cai, W.; Hou, L. C.; Tse, V.; Chen, X. Integrin alphav beta3 Antagonists for Anti-Angiogenic Cancer Treatment. *Recent Pat on Anti-Cancer Drug Discovery* **2007**, *2*, 143-158.
112. Harris, T. D.; Kalogeropoulos, S.; Nguyen, T.; Liu, S.; Bartis, J.; Ellars, C.; Edwards, S.; Onthank, D.; Silva, P.; Yalamanchili, P.; Robinson, S.; Lazewatsky, J.; Barrett, J.; Bozarth, J. Design, synthesis, and evaluation of radiolabeled integrin alphav beta3 receptor antagonists for tumor imaging and radiotherapy. *Cancer Biother Radiopharm* **2003**, *18*, 627-641.
113. Sutcliffe-Goulden, J. L.; O'doherty, M. J.; Marsden, P. K.; Hart, I. R.; Marshall, J. F.; Bansal, S. S. Rapid solid phase synthesis and biodistribution of 18F-labelled linear peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2002**, *29*, 754-759.

114. Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Aumailley, M.; Timpl, R. Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. *Eur J Biochem* **1992**, *210*, 911-921.
115. Pfaff, M.; Tangemann, K.; Muller, B.; Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Timpl, R.; Engel, J. Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alphaIIb beta3, alpha v beta3, and alpha5 beta1 integrins. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 20233-20238.
116. Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Matha, B.; Lohof, E.; Holzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha v beta3 integrin antagonists. *J Med Chem* **1999**, *42*, 3033-3040.
117. Goodman, S. L.; Holzemann, G.; Sulyok, G. A.; Kessler, H. Nanomolar small molecule inhibitors for alpha v beta6, alpha v beta5, and alpha v beta3 integrins. *J Med Chem* **2002**, *45*, 1045-1051.
118. Clinicaltrials.gov *Cilengitide*, <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=cilengitide>.
119. Kelleman, A.; Mattern, R. H.; Pierschbacher, M. D.; Goodman, M. Incorporation of thioether building blocks into an alpha v beta3-specific RGD peptide: synthesis and biological activity. *Biopolymers* **2003**, *71*, 686-695.
120. Koivunen, E.; Wang, B.; Ruoslahti, E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *Biotechnology* **1995**, *13*, 265-270.
121. Holig, P.; Bach, M.; Volkel, T.; Nahde, T.; Hoffmann, S.; Muller, R.; Kontermann, R. E. Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells. *Protein Eng Des Sel* **2004**, *17*, 433-441.
122. Temming, K.; Schiffelers, R. M.; Molema, G.; Kok, R. J. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug Resist Updat* **2005**, *8*, 381-402.
123. Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha v beta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **2002**, *296*, 151-155.
124. Mitjans, F.; Meyer, T.; Fittschen, C.; Goodman, S.; Jonczyk, A.; Marshall, J. F.; Reyes, G.; Piulats, J. In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alpha v integrins. *Int J Cancer* **2000**, *87*, 716-723.
125. Burke, P. A.; Denardo, S. J.; Miers, L. A.; Lamborn, K. R.; Matzku, S.; Denardo, G. L. Cilengitide targeting of alpha v beta3 integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res* **2002**, *62*, 4263-4272.
126. Haubner, R.; Wester, H. J.; Reuning, U.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Diefenbach, B.; Kessler, H.; Stocklin, G.; Schwaiger, M. Radiolabeled alpha v beta3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J Nucl Med* **1999**, *40*, 1061-1071.
127. Haubner, R.; Wester, H. J.; Burkhart, F.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Weber, W.; Goodman, S. L.; Kessler, H.; Schwaiger, M. Glycosylated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics. *J Nucl Med* **2001**, *42*, 326-336.
128. Haubner, R.; Wester, H. J.; Weber, W. A.; Mang, C.; Ziegler, S. I.; Goodman, S. L.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Kessler, H.; Schwaiger, M. Noninvasive imaging of alpha v beta3 integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res* **2001**, *61*, 1781-1785.
129. Chen, X.; Tohme, M.; Park, R.; Hou, Y.; Bading, J. R.; Conti, P. S. Micro-PET imaging of alpha v beta3-integrin expression with 18F-labeled dimeric RGD peptide. *Mol Imaging* **2004**, *3*, 96-104.
130. Chen, X.; Hou, Y.; Tohme, M.; Park, R.; Khankaldyyan, V.; Gonzales-Gomez, I.; Bading, J. R.; Laug, W. E.; Conti, P. S. Pegylated Arg-Gly-Asp peptide: 64Cu labeling and PET imaging of brain tumor alpha v beta3-integrin expression. *J Nucl Med* **2004**, *45*, 1776-1783.
131. Jia, B.; Shi, J.; Yang, Z.; Xu, B.; Liu, Z.; Zhao, H.; Liu, S.; Wang, F. 99mTc-labeled cyclic RGDfK dimer: initial evaluation for SPECT imaging of glioma integrin alpha v beta3 expression. *Bioconjug Chem* **2006**, *17*, 1069-1076.
132. Garanger, E.; Boturyn, D.; Dumy, P. Tumor targeting with RGD peptide ligands-design of new molecular conjugates for imaging and therapy of cancers. *Anticancer Agents Med Chem* **2007**, *7*, 552-558.
133. Liu, S. Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin alpha v beta3 targeted radiotracers for tumor imaging. *Mol Pharm* **2006**, *3*, 472-487.
134. Dumy, P.; Favrot, M.-C.; Boturyn, D.; Coll, J.-L. Synthesis and characterization of novel systems for guidance and vectorization of compounds having a therapeutic activity. Brevet PCT/FR2003/002773 WO 2004/02894, 19 Septembre 2003.
135. Mutter, M.; Altmann, K.-H.; Tuchscherer, G.; Vuilleumier, S. Strategies for the de novo design of proteins. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 771-785.
136. Mutter, M.; Tuchscherer, G. Non-native architectures in protein design and mimicry. *Cell Mol Life Sci* **1997**, *53*, 851-863.

137. Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron Lett* **1995**, *36*, 1255-1258.
138. Garanger, E.; Boturyn, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Chemoselectively addressable template: a valuable tool for the engineering of molecular conjugates. *J Org Chem* **2006**, *71*, 2402-2410.
139. Singh, Y.; Dolphin, G. T.; Razkin, J.; Dumy, P. Synthetic Peptide templates for molecular recognition: recent advances and applications. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1298-1314.
140. Boturyn, D.; Defrancq, E.; Dolphin, G. T.; Garcia, J.; Labbe, P.; Renaudet, O.; Dumy, P. RAFT Nanoconstructs: surfing to biological applications. *J Pept Sci* **2008**, *14*, 224-240.
141. Futaki, S. Peptide ion channels: design and creation of function. *Biopolymers* **1998**, *47*, 75-81.
142. Tuchscherer, G.; Servis, C.; Corradin, G.; Blum, U.; Rivier, J.; Mutter, M. Total chemical synthesis, characterization, and immunological properties of an MHC class I model using the TASP concept for protein de novo design. *Protein Sci* **1992**, *1*, 1377-1386.
143. Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J. Control of amyloid beta-peptide protofibril formation by a designed template assembly. *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 2699-2702.
144. Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Deriaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. Chemoselective assembly and immunological evaluation of multiepitopic glycoconjugates bearing clustered Tn antigen as synthetic anticancer vaccines. *Bioconjug Chem* **2005**, *16*, 1149-1159.
145. Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M. Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates: an NMR and restrained molecular dynamics investigation. *Biopolymers* **1996**, *39*, 297-308.
146. Peng, Z. H. Solid phase synthesis and NMR conformational studies on cyclic decapeptide template molecule. *Biopolymers* **1999**, *49*, 565-574.
147. Peluso, S.; Ruckle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M. Crystal structure of a synthetic cyclodecapeptide for template-assembled synthetic protein design. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 432-437.
148. Katsara, M.; Tselios, T.; Deraos, S.; Deraos, G.; Matsoukas, M. T.; Lazoura, E.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Round and round we go: cyclic peptides in disease. *Curr Med Chem* **2006**, *13*, 2221-2232.
149. Boturyn, D.; Dumy, P. A convenient access to $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$ integrin ligand conjugates: regioselective solid-phase functionalisation of an RGD based peptide. *Tetrahedron Lett* **2001**, *42*, 2787-2790.
150. Boturyn, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 5730-5739.
151. Garanger, E. Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie. 280 p. Thèse: *Chimie-Biologie* Université Joseph Fourier, **2005**.
152. Garanger, E.; Boturyn, D.; Coll, J. L.; Favrot, M. C.; Dumy, P. Multivalent RGD synthetic peptides as potent $\alpha v\beta 3$ integrin ligands. *Org Biomol Chem* **2006**, *4*, 1958-1965.
153. Garanger, E.; Boturyn, D.; Jin, Z.; Dumy, P.; Favrot, M. C.; Coll, J. L. New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol Ther* **2005**, *12*, 1168-1175.
154. Sancey, L.; Ardisson, V.; Riou, L. M.; Ahmadi, M.; Marti-Batlle, D.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Fagret, D.; Ghezzi, C.; Vuillez, J. P. In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the $\alpha v\beta 3$ integrin-targeted tracer (99m)Tc-RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2007**, *34*, 2037-2047.
155. Texier, I.; Coll, J.-L.; Dumy, P.; Boturyn, D.; Favrot, M.-C. Target vector with activable imaging function. Brevet PCT/FR2006/001749 WO 2007/010128, 25 janvier 2007.
156. Razkin, J.; Josserand, V.; Boturyn, D.; Jin, Z. H.; Dumy, P.; Favrot, M.; Coll, J. L.; Texier, I. Activatable fluorescent probes for tumour-targeting imaging in live mice. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069-1072.
157. Jin, Z. H.; Razkin, J.; Josserand, V.; Boturyn, D.; Grichine, A.; Texier, I.; Favrot, M. C.; Dumy, P.; Coll, J. L. In Vivo Noninvasive Optical Imaging of Receptor-Mediated RGD Internalization Using Self-Quenched Cy5-Labeled RAFT-c-(RGDfK-)(4). *Mol Imaging* **2007**, *6*, 43-55.
158. Su, S.; Acquilano, D. E.; Arumugasamy, J.; Beeler, A. B.; Eastwood, E. L.; Giguere, J. R.; Lan, P.; Lei, X.; Min, G. K.; Yeager, A. R.; Zhou, Y.; Panek, J. S.; Snyder, J. K.; Schaus, S. E.; Porco, J. A., Jr. Convergent synthesis of a complex oxime library using chemical domain shuffling. *Org Lett* **2005**, *7*, 2751-2754.
159. Roberts, K. D.; Lambert, J. N.; Ede, N. J.; Bray, A. M. Preparation of cyclic peptide libraries using intramolecular oxime formation. *J Pept Sci* **2004**, *10*, 659-665.
160. Edupuganti, O. P.; Defrancq, E.; Dumy, P. Head-to-tail oxime cyclization of oligodeoxynucleotides for the efficient synthesis of circular DNA analogues. *J Org Chem* **2003**, *68*, 8708-8710.

161. Hang, H. C.; Bertozzi, C. R. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Acc Chem Res* **2001**, *34*, 727-736.
162. Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates: chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Chemistry - A European Journal* **2001**, *7*, 3976-3984.
163. Chen, X.; Lee, G. S.; Zettl, A.; Bertozzi, C. R. Biomimetic engineering of carbon nanotubes by using cell surface mucin mimics. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 6111-6116.
164. Kochendoerfer, G. G.; Kent, S. B. Chemical protein synthesis. *Curr Opin Chem Biol* **1999**, *3*, 665-671.
165. Singh, Y.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Preparation of a multitopic glycopeptide-oligonucleotide conjugate. *Org Lett* **2005**, *7*, 1359-1362.
166. Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G. Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjug Chem* **1992**, *3*, 138-146.
167. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **1963**, *85*, 2149-2154.
168. Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*. ed. C. W. Rees, CRC Press, New York, **1997**, 278 p.
169. Sakakibara, S.; Shimonishi, Y.; Kishida, Y.; Okada, M.; Sugihara, H. Use of anhydrous hydrogen fluoride in peptide synthesis. I. Behavior of various protective groups in anhydrous hydrogen fluoride. *Bull Chem Soc Jpn* **1967**, *40*, 2164-2167.
170. Pietta, P. G.; Marshall, G. R. Amide protection and amide supports in solid-phase peptide synthesis. *Journal of the Chemical Society* **1970**, *11*, 650-651.
171. Matsueda, G. R.; Stewart, J. M. A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid phase synthesis of peptide amides. *Peptides* **1981**, *2*, 45-50.
172. Wang, S. S. p-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J Am Chem Soc* **1973**, *95*, 1328-1333.
173. Atherton, E.; Clive, D. L.; Sheppard, R. C. Letter: Polyamide supports for polypeptide synthesis. *J Am Chem Soc* **1975**, *97*, 6584-6585.
174. Rivier, J.; Wolbers, R.; Burgus, R. *Application of high pressure liquid chromatography to peptides*. Pept., Proc. Am. Pept. Symp., 5th, **1977**, ed. Wiley, New York, 52-55.
175. Barany, G.; Merrifield, R. B. A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function. *J Am Chem Soc* **1977**, *99*, 7363-7365.
176. Chang, C. D.; Meienhofer, J. Solid-phase peptide synthesis using mild base cleavage of N alpha-fluorenylmethoxycarbonylamino acids, exemplified by a synthesis of dihydrosomatostatin. *Int J Pept Protein Res* **1978**, *11*, 246-249.
177. Geysen, H. M.; Meloan, R. H.; Barteling, S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**, *81*, 3998-4002.
178. Houghten, R. A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1985**, *82*, 5131-5135.
179. Sucholeiki, I. New developments in solid phase synthesis supports. *Annual Reports in Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity* **1999**, *2*, 9-14.
180. Albericio, F.; Barany, G. An acid-labile anchoring linkage for solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions. *Int J Pept Protein Res* **1987**, *30*, 206-216.
181. Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methyl ester resin. *Tetrahedron Lett* **1987**, *28*, 3787-3790.
182. Stuber, W.; Knolle, J.; Breipohl, G. Synthesis of peptide amides by Fmoc-solid-phase peptide synthesis and acid labile anchor groups. *Int J Pept Protein Res* **1989**, *34*, 215-221.
183. Sieber, P. An improved method for anchoring of 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids to 4-alkoxybenzyl alcohol resins. *Tetrahedron Lett* **1987**, *28*, 6147-6150.
184. Mergler, M.; Tanner, R.; Gosteli, J.; Grogg, P. Peptide synthesis by a combination of solid-phase and solution methods. I. A new very acid-labile anchor group for the solid phase synthesis of fully protected fragments. *Tetrahedron Lett* **1988**, *29*, 4005-4008.
185. Barlos, K.; Gatos, D.; Kapos, S.; Papaphotiu, G.; Schaefer, W.; Yao, W. Esterification of partially protected peptide fragments with resins. Synthesis of Leu15-gastrin I using 2-chlorotrityl chloride resin. *Tetrahedron Lett* **1989**, *30*, 3947-3950.
186. Jung, G. *Combinatorial chemistry : synthesis, chemistry, screening*. ed. Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, 634 p.
187. Erdelyi, M.; Gogoll, A. Rapid microwave-assisted solid phase peptide synthesis. *Synthesis* **2002**, *11*, 1592-1596.

188. White, P.; Keyte, J. W.; Bailey, K.; Bloomberg, G. Expediting the Fmoc solid phase synthesis of long peptides through the application of dimethylloxazolidine dipeptides. *J Pept Sci* **2004**, *10*, 18-26.
189. Melnyk, O.; Fruchart, J. S.; Grandjean, C.; Gras-Masse, H. Tartric acid-based linker for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide alpha-oxo aldehydes. *J Org Chem* **2001**, *66*, 4153-4160.
190. Spetzler, J. C.; Hoeg-Jensen, T. Masked side-chain aldehyde amino acids for solid-phase synthesis and ligation. *Tetrahedron Lett* **2002**, *43*, 2303-2306.
191. Shin, H.; Cama, E.; Christianson, D. W. Design of amino acid aldehydes as transition-state analogue inhibitors of arginase. *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 10278-10284.
192. Garcia, J. M.; Far, S.; Diesis, E.; Melnyk, O. Determination of glyoxylyl-peptide concentration using oxime chemistry and RP-HPLC analysis. *J Pept Sci* **2006**, *12*, 734-738.
193. Gaertner, H. F.; Rose, K.; Cotton, R.; Timms, D.; Camble, R.; Offord, R. E. Construction of protein analogues by site-specific condensation of unprotected fragments. *Bioconjug Chem* **1992**, *3*, 262-268.
194. Lang, I.; Donze, N.; Garrouste, P.; Dumy, P.; Mutter, M. Chemoselectively addressable HCan building blocks in peptide synthesis: L-homocanaline derivatives. *J Pept Sci* **1998**, *4*, 72-80.
195. Spetzler, J. C.; Hoeg-Jensen, T. Preparation and application of O-amino-serine, Ams, a new building block in chemoselective ligation chemistry. *J Pept Sci* **1999**, *5*, 582-592.
196. Khomutov, A. R.; Vepsalainen, J.; Shvetsov, A. S.; Hyvonen, T.; Keinanen, T.; Pustobaev, V. N.; Eloranta, T. O.; Khomutov, R. M. Synthesis of Hydroxylamine Analogues of Polyamines. *Tetrahedron Lett* **1996**, *52*, 13751-13766.
197. Brask, J.; Jensen, K. J. Carbopeptides: chemoselective ligation of peptide aldehydes to an aminoxy-functionalized D-galactose template. *J Pept Sci* **2000**, *6*, 290-299.
198. Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP: a new peptide coupling reagent devoid of toxic byproduct. *Tetrahedron Lett* **1990**, *31*, 205-208.
199. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* **1970**, *34*, 595-598.
200. Hancock, W. S.; Battersby, J. E. A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid. *Anal Biochem* **1976**, *71*, 260-264.
201. Foillard, S.; Ohsten Rasmussen, M.; Razkin, J.; Boturnyn, D.; Dumy, P. 1-Ethoxyethylidene, a New Compatible Protecting Group for the Stepwise SPPS of Aminoxy Peptides. *J Org Chem* **2008**, *73*, 983-991.
202. Bonnet, D.; Grandjean, C.; Rousselot-Pailley, P.; Joly, P.; Bourel-Bonnet, L.; Santraine, V.; Gras-Masse, H.; Melnyk, O. Solid-phase functionalization of peptides by an alpha-hydrazinoacetyl group. *J Org Chem* **2003**, *68*, 7033-7040.
203. Thieret, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibe, F.; Albericio, F. Use of Alloc-amino acids in solid-phase peptide synthesis. Tandem deprotection-coupling reactions using neutral conditions. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38*, 7275-7278.
204. Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H. Stereoisomeric Peptide Libraries and Peptidomimetics for Designing Selective Inhibitors of the avb3 Integrin for a New Cancer Therapy. *Angew Chem Int Ed Engl* **1997**, *36*, 1374-1389.
205. Jencks, W. P. Studies on the mechanism of oxime and semicarbazone formation. *J Am Chem Soc* **1959**, *81*, 475-481.
206. Nishikawa, H.; Sakai, T. Derivatization and chromatographic determination of aldehydes in gaseous and air samples. *J Chromatogr, A* **1995**, *710*, 159-165.
207. Houdier, S.; Legrand, M.; Boturnyn, D.; Croze, S.; Defrancq, E.; Lhomme, J. A new fluorescent probe for sensitive detection of carbonyl compounds. *Analytica Chimica Acta* **1999**, *382*, 253-263.
208. Molecular Expression *Endosomes and Endocytosis*,
<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/endosomes/endosomes.html>.
209. Aussedat, B.; Sagan, S.; Chassaing, G.; Bolbach, G.; Burlina, F. Quantification of the efficiency of cargo delivery by peptidic and pseudo-peptidic Trojan carriers using MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758*, 375-383.
210. Burlina, F.; Sagan, S.; Bolbach, G.; Chassaing, G. Quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides by MALDI-TOF mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 4244-4247.
211. Girault, S.; Chassaing, G.; Blais, J. C.; Brunot, A.; Bolbach, G. Coupling of MALDI-TOF mass analysis to the separation of biotinylated peptides by magnetic streptavidin beads. *Anal Chem* **1996**, *68*, 2122-2126.
212. Flanagan, J. H., Jr.; Khan, S. H.; Menchen, S.; Soper, S. A.; Hammer, R. P. Functionalized tricarboyanine dyes as near-infrared fluorescent probes for biomolecules. *Bioconjug Chem* **1997**, *8*, 751-756.

213. Invitrogen *Fluorescence Spectra Viewer*, <http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/>.
214. Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P.; Bishop-Stewart, J.; Bhargat, M., K.; Millard, P. J.; Mao, F.; Leung, W.-Y.; Haugland, R. P. Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *J Histochem Cytochem* **1999**, *47*, 1179-1188.
215. Freitag, S.; Le Trong, I.; Klumb, L.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. Structural studies of the streptavidin binding loop. *Protein Sci* **1997**, *6*, 1157-1166.
216. Saito, G.; Swanson, J. A.; Lee, K. D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Adv Drug Deliv Rev* **2003**, *55*, 199-215.
217. Mezo, G.; Mihala, N.; Andreu, D.; Hudecz, F. Conjugation of epitope peptides with SH group to branched chain polymeric polypeptides via Cys(Npys). *Bioconjug Chem* **2000**, *11*, 484-491.
218. Ellerby, H. M.; Arap, W.; Ellerby, L. M.; Kain, R.; Andrusiak, R.; Rio, G. D.; Krajewski, S.; Lombardo, C. R.; Rao, R.; Ruoslahti, E.; Bredesen, D. E.; Pasqualini, R. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* **1999**, *5*, 1032-1038.
219. Javadvpour, M. M.; Juban, M. M.; Lo, W. C.; Bishop, S. M.; Alberty, J. B.; Cowell, S. M.; Becker, C. L.; McLaughlin, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem* **1996**, *39*, 3107-3113.
220. Del Rio, G.; Castro-Obregon, S.; Rao, R.; Ellerby, H. M.; Bredesen, D. E. APAP, a sequence-pattern recognition approach identifies substance P as a potential apoptotic peptide. *FEBS Lett* **2001**, *494*, 213-219.
221. Ray, A.; Norden, B. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *Faseb J* **2000**, *14*, 1041-1060.
222. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
223. Clinicaltrials.gov G3139, *Oblimersen*, <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=G3139>.
224. Albertshofer, K.; Siwkowski, A. M.; Wancewicz, E. V.; Esau, C. C.; Watanabe, T.; Nishihara, K. C.; Kinberger, G. A.; Malik, L.; Eldrup, A. B.; Manoharan, M.; Geary, R. S.; Monia, B. P.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Bennett, C. F.; Maier, M. A. Structure-activity relationship study on a simple cationic peptide motif for cellular delivery of antisense peptide nucleic acid. *J Med Chem* **2005**, *48*, 6741-6749.
225. Oltvai, Z. N.; Milliman, C. L.; Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **1993**, *74*, 609-619.
226. Cotter, F. E.; Johnson, P.; Hall, P.; Pocock, C.; Al Mahdi, N.; Cowell, J. K.; Morgan, G. Antisense oligonucleotides suppress B-cell lymphoma growth in a SCID-hu mouse model. *Oncogene* **1994**, *9*, 3049-3055.
227. Mologni, L.; Nielsen, P. E.; Gambacorti-Passerini, C. In vitro transcriptional and translational block of the bcl-2 gene operated by peptide nucleic acid. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *264*, 537-543.
228. Pai, S. I.; Lin, Y. Y.; Macaes, B.; Meneshian, A.; Hung, C. F.; Wu, T. C. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther* **2006**, *13*, 464-477.
229. Yang, J.; Chen, H.; Vlahov, I. R.; Cheng, J. X.; Low, P. S. Evaluation of disulfide reduction during receptor-mediated endocytosis by using FRET imaging. *Proc Natl Acad Sci* **2006**, *103*, 13872-13877.
230. Lam, K. S.; Liu, R.; Miyamoto, S.; Lehman, A. L.; Tuscano, J. M. Applications of one-bead one-compound combinatorial libraries and chemical microarrays in signal transduction research. *Acc Chem Res* **2003**, *36*, 370-377.
231. Gibson, C.; Sulyok, G. A.; Hahn, D.; Goodman, S. L.; Holzemann, G.; Kessler, H. Nonpeptidic alpha(v)beta(3) Integrin Antagonist Libraries: On-Bead Screening and Mass Spectrometric Identification without Tagging. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*, 165-169.
232. Ying, L.; Gervay-Hague, J. One-bead-one-inhibitor-one-substrate screening of neuraminidase activity. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1857-1865.
233. Dixon, S.; Ziebart, K. T.; He, Z.; Jeddloh, M.; Yoo, C. L.; Wang, X.; Lehman, A.; Lam, K. S.; Toney, M. D.; Kurth, M. J. Aminodeoxychorismate synthase inhibitors from one-bead one-compound combinatorial libraries: "staged" inhibitor design. *J Med Chem* **2006**, *49*, 7413-7426.
234. Sebestyén, F.; Dibó, G.; Kovács, A.; Furkua, A. Chemical synthesis of peptide libraries. *Bioorg Med Chem Lett* **1993**, *3*, 413-418.
235. Kritzer, J. A.; Luedtke, N. W.; Harker, E. A.; Schepartz, A. A rapid library screen for tailoring beta-peptide structure and function. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 14584-14585.
236. Aggarwal, S.; Harden, J. L.; Denmeade, S. R. Synthesis and screening of a random dimeric peptide library using the one-bead-one-dimer combinatorial approach. *Bioconjug Chem* **2006**, *17*, 335-340.
237. Aina, O. H.; Marik, J.; Liu, R.; Lau, D. H.; Lam, K. S. Identification of novel targeting peptides for human ovarian cancer cells using "one-bead one-compound" combinatorial libraries. *Mol Cancer Ther* **2005**, *4*, 806-813.

238. Johnson, E. C.; Durek, T.; Kent, S. B. Total chemical synthesis, folding, and assay of a small protein on a water-compatible solid support. *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 3283-3287.
239. Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. On the use of PyAOP, a phosphonium salt derived from HOAt, in solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38*, 4853-4856.
240. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
241. Aggarwal, S.; Janssen, S.; Wadkins, R. M.; Harden, J. L.; Denmeade, S. R. A combinatorial approach to the selective capture of circulating malignant epithelial cells by peptide ligands. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6077-6086.
242. Lau, D. H.; Guo, L.; Liu, R.; Song, A.; Shao, C.; Lam, K. S. Identifying peptide ligands for cell surface receptors using cell-growth-on-bead assay and one-bead one-compound combinatorial library. *Biotechnol Lett* **2002**, *24*, 497-500.

RESUMES

Synthèse de nouveaux vecteurs peptidiques pour la thérapie anticancéreuse et l'imagerie tumorale

La recherche actuelle sur le cancer se tourne vers des « stratégies ciblées » afin de développer de nouvelles méthodes diagnostiques plus sensibles et performantes, ainsi que de nouvelles thérapies plus efficaces mais aussi mieux tolérées. Dans ce contexte, nos travaux sont consacrés à la conception de vecteurs synthétiques ciblant un récepteur cellulaire surexprimé par les tumeurs, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ce ciblage permet de concentrer les drogues ou les éléments de détection au niveau tumoral. L'outil utilisé pour la construction chimique de nos vecteurs est un châssis décapeptidique cyclique RAFT (*Regioselectively Addressable Functionalized Template*) présentant deux domaines indépendants permettant de séparer les deux fonctions du vecteur. Sur un domaine, la fonction de ciblage est assurée par la présentation multivalente de ligands -RGD- spécifiques du récepteur. L'autre domaine du vecteur supporte les molécules d'intérêt à vectoriser : agents thérapeutiques pour limiter la prolifération du foyer malin ou agents de détection pour l'imagerie médicale.

Au cours de ces travaux, nous avons optimisé les voies de synthèse classiques de nos composés, augmentant ainsi significativement les rendements de synthèse. Les conjugués destinés à l'imagerie optique proche infrarouge ont permis une détection non invasive particulièrement performante de tumeurs profondes ou sous-cutanées chez la souris. D'autre part, notre vecteur a été couplé à un large panel de composés thérapeutiques. Conjugué à un peptide apoptotique, notre système a montré un effet anti-prolifératif tumoral chez le petit animal. Parallèlement, nous avons également validé une nouvelle méthode d'évaluation de ligands multivalents sur résine pouvant être exploitée pour découvrir de nouvelles molécules d'intérêt biologique. L'ensemble de ces résultats conforte l'utilisation des gabarits RAFT pour la thérapie et l'imagerie tumorale.

Mots clés : Thérapie anti-cancéreuse, Imagerie tumorale, Néo-angiogenèse tumorale, Intégrine $\alpha_v\beta_3$, Vectorisation non-virale, Cyclodécapeptide RAFT, Ligand -RGD-, Multivalence, Liaisons éthers d'oxime, Liaisons disulfures, FRET

Synthesis of new peptide vectors for the anti-cancer therapy and the tumour imaging

Current research on cancer focuses on “targeted strategies” in order to develop sensitive and powerful diagnostic methods, as well as effective and better tolerated therapies. In this context, our works are devoted to the design of synthetic vectors targeting a cellular receptor, the $\alpha_v\beta_3$ integrin, which is over-expressed in tumours. This allows the accumulation of drugs or detection elements in tumours. The tool used for the construction of our vectors is a cyclodecapeptide scaffold (RAFT: *Regioselectively Addressable Functionalized Template*) which presents two independent sides and allows the separation of the vector functions. On one side, the targeting function is provided by multivalent presentation of -RGD- specific ligands for the $\alpha_v\beta_3$ integrin. The other side of the vector supports the molecules of interest for the delivery of therapeutic agents to limit the proliferation of tumours or detection agents for medical imaging.

During this work, we optimized the classical synthetic routes of our compounds, increasing thus significantly the synthetic yields. Conjugates for the optical imaging using near infra-red allowed us a particularly powerful non-invasive detection of deep or subcutaneous tumours in mice. In addition, our vector was coupled with a broad panel of therapeutic compounds. For instance, when conjugated to an apoptotic peptide, our system showed an antiproliferate effect on tumours in small animals. In parallel, we validated a new evaluation method of multivalent ligands on resin with the aim of discovering new molecules of biological interest. All these results support the use of RAFT scaffold for tumour therapy and imaging.

Keywords: Anti-cancer therapy, Tumour imaging, Tumour neo-angiogenesis, $\alpha_v\beta_3$ integrin, Non-viral vectorisation, Cyclodecapeptide scaffold RAFT, -RGD- ligand, Multivalency, Oxime ligation, Disulfide bridge, FRET

Discipline : Chimie-Biologie
