



HAL
open science

Synthèse par ingénierie moléculaire de vecteurs peptidiques pour des applications anticancéreuses

Mathieu Galibert

► **To cite this version:**

Mathieu Galibert. Synthèse par ingénierie moléculaire de vecteurs peptidiques pour des applications anticancéreuses. Chimie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT: . tel-00547615

HAL Id: tel-00547615

<https://theses.hal.science/tel-00547615>

Submitted on 16 Dec 2010

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 DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité **Chimie-Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

GALIBERT Mathieu

le **29 novembre 2010**

Synthèse par ingénierie moléculaire de vecteurs peptidiques pour des applications anticancéreuses

Thèse dirigée par **Boturyn Didier** et codirigée par **Dumy Pascal**

JURY

Pr. Sylvain COTTAZ, CNRS UPR 5301, Grenoble
Dr. Gilles GUICHARD, CNRS UMR 5248, Bordeaux
Dr. Oleg MELNYK CNRS UMR 8161, Lille
Dr. Vincent AUCAGNE, CNRS UPR 4301, Orléans
Dr. Franck MOLINA, CNRS UMR3145, Montpellier
Dr. Didier BOTURYN, CNRS UMR5250, Grenoble

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Thèse préparée au sein du Département de Chimie Moléculaire dans l'Ecole Doctorale Chimie et
Science du Vivant.



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité **Chimie-Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

GALIBERT Mathieu

le **29 novembre 2010**

Synthèse par ingénierie moléculaire de vecteurs peptidiques pour des applications anticancéreuses

Thèse dirigée par **Boturyn Didier** et codirigée par **Dumy Pascal**

JURY

Pr. Sylvain COTTAZ, CNRS UPR 5301, Grenoble
Dr. Gilles GUICHARD, CNRS UMR 5248, Bordeaux
Dr. Oleg MELNYK CNRS UMR 8161, Lille
Dr. Vincent AUCAGNE, CNRS UPR 4301, Orléans
Dr. Franck MOLINA, CNRS UMR3145, Montpellier
Dr. Didier BOTURYN, CNRS UMR5250, Grenoble

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Thèse préparée au sein du Département de Chimie Moléculaire dans l'Ecole Doctorale Chimie et Science du Vivant.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Pascal Dumy, directeur du Département de Chimie Moléculaire, responsable de l'équipe « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires » pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et financé mes travaux de thèse.

Je remercie tout particulièrement le Dr. Didier Boturyn, mon directeur de thèse, pour m'avoir encadré, conseillé au quotidien et accordé sa confiance dans mes travaux.

Je souhaite également remercier les personnes qui ont rapporté ou examiné ce travail et formé le jury lors de ma soutenance :

- Pr. Sylvain Cottaz, Professeur au Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales de Grenoble.*
- Dr. Gilles Guichard, Directeur de Recherche à l'Institut de Chimie et Biologie de Bordeaux.*
- Dr. Oleg Melnyk, Directeur de Recherche à l'Institut de Biologie de Lille.*
- Dr. Vincent Aucagne, Chargé de Recherche au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans*
- Dr. Franck Molina, Directeur du laboratoire Sysdiag de Montpellier.*

Je remercie le Pr. Pierre Labbé et Hajra Bassit pour les études SPR. Je remercie le Dr Jean-Luc Coll et Dr. Lucie Sancey pour leur collaboration dans l'évaluation biologique des composés. Je remercie les stagiaires qui m'ont apportés de l'aide dans mes travaux : Fabien, Maud, Jérémy et Marc. Je remercie les membres de l'équipe « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires » pour leurs aides et leurs conseils. Je remercie les personnes que j'ai rencontrées durant cette thèse: Corinne, Emilie, Isabelle, Ludivine, Marie Laure, Michael, Myriam, Stéphanie, Romaric et Régine. Je remercie plus particulièrement mes collègues thésards : Pierre, pour les discussions scientifiques et les pauses clopes ; et mon colloc roux, Julien, pour m'avoir diverti ces trois années. Je remercie Aurélie pour son soutien et avoir passé son dimanche à me faire répéter.

Pour finir je veux dédier ces travaux à ma famille : à ma sœur et mon frère, Marie et Thomas et enfin à mes parents, Sylvie et Philippe, pour leur gentillesse et leur soutien qu'ils m'ont apportés tout au long de ces années.

Sommaire

Abréviations.....	1
Listes des acides amines naturels	2
INTRODUCTION.....	3
I. La vectorisation en Cancérologie.....	5
I.1. Généralités sur le cancer	5
I.1.1. Méthodes actuelles de détection et de traitements des cancers	6
I.2. Les agents de ciblage.....	9
I.2.1. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques	9
I.2.2. Ligands des récepteurs membranaires	15
I.2.3. Anticorps monoclonaux versus petits ligands	21
I.3. Les vecteurs cellulaires	22
I.3.1. Les Nanoparticules	22
I.3.2. Peptides et protéines de translocations	23
I.3.3. Vecteurs viraux.....	24
II. État de l'art sur l'amélioration des vecteurs.....	26
II.1. Méthodes d'optimisation des anticorps monoclonaux	26
II.1.1. Conception de fragments de mAb par voie biologique	26
II.1.2. Conception de mimes de CDR par voie chimique	28
II.2. Conception de vecteurs multivalents	30
II.2.1. L'effet de multivalence.....	30
II.2.2. Les nano-vecteurs comme supports de haute valence	31
II.2.3. Les supports à faible valence	32
III. Stratégies pour préparer de nouveaux vecteurs pour des applications anticancéreuses.....	37
III.1. Châssis moléculaire RAFT.....	37
III.1.1. Structure.....	37
III.1.2. Application.....	38
III.1.3. Conception de vecteurs ciblés pour la cancérologie.....	40
III.2. Méthode de conjugaison pour l'assemblage de biomolécules.....	44
III.2.1. Couplages chimiques traditionnels.....	44
III.2.2. Ligations chimiosélectives.....	44
III.3. Objectifs des travaux réalisés	48
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	51
A. Procédures de synthèse.....	53
A.1. Stratégie de synthèse.....	53
A.2. Les ligations utilisées.....	54
A.2.1. Ether d'oxime.....	54
A.2.2. Lien Triazole	55
A.2.3. Ligation Thioéther.....	56
A.3. Synthèse sur phase solide.....	57
A.4. Introduction des groupes fonctionnels chimiosélectifs	57
A.4.1. Synthèse d'acides aminés modifiés.....	58
A.5. Assemblage biomoléculaire par ligation chimiosélective	65

A.5.1.	Assemblage biomoléculaire par ligation Oxime	65
A.5.2.	Assemblage biomoléculaire par ligation CuAAC	69
A.6.	Assemblage biomoléculaire via deux ligations chimiosélectives orthogonales	72
A.6.1.	Procédure de synthèse de sites discontinus par ligation Oxime-CuAAC	73
A.6.2.	Procédure de synthèse de vecteurs multivalents conjugués par ligation Oxime-CuAAC	77
A.6.3.	Assemblage biomoléculaire combinant ligation oxime et thioéther.....	79
A.6.4.	Assemblage biomoléculaire combinant ligation CuAAC et thioéther.....	81
A.7.	Assemblage biomoléculaire via trois ligations chimiosélectives orthogonales	83
A.7.1.	Premier modèle d'assemblage.....	84
A.7.2.	Second modèle d'assemblage	87
A.7.3.	Troisième modèle d'assemblage	89
A.8.	Bilan des travaux	93
B.	Conception de mimes d'anticorps thérapeutiques	94
B.1.	Modèle choisi : Le Rituximab	94
B.1.1.	La protéine CD20.....	94
B.1.2.	Caractéristique du Rituximab.....	95
B.1.3.	Etude de l'interaction Rituximab-CD20.....	96
B.2.	Recherche de fragments de Rituximab interagissant avec l'épitope CD20.....	98
B.2.1.	Principe de la méthode SPOT	98
B.2.2.	Synthèse de peptide par méthode SPOT.....	99
B.2.3.	Synthèse de l'épitope et du peptide contrôle marqués.....	99
B.2.4.	Révélation.....	101
B.2.5.	Interprétation des plaques.....	103
B.3.	Quantification de l'affinité des fragments par SPR	107
B.3.1.	Principe de la SPR.....	107
B.3.2.	Mise en place du système CD20 pour l'étude SPR.....	109
B.3.3.	Mesure de la constante de dissociation du Rituximab et des fragments identifiés par méthode SPOT	110
B.4.	Synthèse et évaluation en SPR des fragments de mAb sur le châssis multivalent	113
B.4.1.	Montages des fragments côté N-terminal sur les châssis par ligations oxime ..	113
B.4.2.	Montages des fragments côté C-terminal sur les châssis par ligations CuAAC	114
B.4.3.	Synthèse de montages bitopiques.....	116
B.4.4.	Evaluation en SPR des différents montages	117
B.5.	Identification des résidus des différents fragments intervenant dans la reconnaissance de l'épitope	119
B.6.	Synthèse et évaluation in vitro des fragments de mAb sur le châssis multivalent.....	120
B.6.1.	Synthèse des différents montages.....	120
B.6.2.	Evaluation des différents montages.....	123
B.7.	Bilan des travaux	124
C.	Synthèse et caractérisation de vecteurs multivalents de ligands RGD pour l'imagerie tumorale	126
C.1.	Conception des vecteurs multivalents pour l'imagerie	126
C.1.1.	Stratégie.....	126
C.1.2.	Molécule de détection pour la Tomographie à fluorescence proche infrarouge	127
C.1.3.	Molécules de détection pour l'IRM.....	128
C.1.4.	Molécule de détection pour la Tomographie à émission de positron	128

C.2.	Synthèses des vecteurs multivalents conjugués aux différents marqueurs.....	130
C.2.1.	Synthèses des conjugués pour Tomographie à fluorescence proche infrarouge	130
C.2.2.	Synthèses des conjugués pour l'IRM	131
C.2.3.	Synthèses des conjugués pour la Tomographie à émission de positron	132
C.3.	Etudes biologiques des vecteurs multivalents	134
C.3.1.	Evaluation de l'affinité des vecteurs multivalents.....	134
C.3.2.	Localisation des Tumeurs in vivo par Tomographie à fluorescence proche infrarouge	135
C.3.3.	Localisation des Tumeurs in vivo par Tomographie à émission de positron	136
C.4.	Bilan des travaux	137
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		139
PARTIE EXPERIMENTALE		145
I. Protocoles de Synthèse		147
I.1.	Materials and Equipments	147
I.1.1.	Reagents.....	147
I.1.2.	Equipments.....	147
I.2.	General Procedures for Peptides Syntheses	148
I.2.1.	Syntheses of linear protected peptides by SPPS.....	148
I.2.2.	General Procedure for Cyclization Reactions.	148
I.3.	Synthesis protocols	149
II. Méthode SPOT		197
II.1.	Peptide synthesis on cellulose membranes	197
II.2.	SPOT revelation	197
III. Etudes SPR		198
IV. Protocoles des Tests Biologiques		199
IV.1.	Cell lines and culture conditions.....	199
IV.2.	Competitive cell adhesion assays	199
IV.3.	Fluorescence Reflectance Imaging (2D-FRI).....	199
IV.4.	Pet studies	200
IV.4.1.	⁶⁴ Cu Radiolabeling	200
IV.4.2.	Cell Binding and Competitive Inhibition Assay	200
IV.4.3.	Animal Models.....	201
IV.4.4.	Biodistribution and Receptor Blocking Experiments	201
IV.4.5.	microPET Studies.....	201
ANNEXES		203
Annexe I		205
Annexe II.....		211
Annexe III		219
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		225

Abréviations

Ac	Acétyl	MeOH	Méthanol
AcOEt	acetate d'éthyl	NHS	N-hydroxysuccinimide
AcOH	Acide acétique	PBS	Phosphate Buffer Saline
AcONa	Acétate de sodium	PET	Positron Emission Tomography
AcONH₄	Acétate d'ammonium	PyAOP	(7-Azabenzotriazol-1- yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
ADN	Acide Désoxyribonucléique	PyBOP[®]	(Benzotriazol-1- yloxy)tris(pyrrolidino)phosphoni- um hexafluorophosphate
OAlI	Allyl ester	RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Template
Alloc	Allyloxycarbonyl	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ARN	Acide Ribonucléique	RP-HPLC	Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography
Boc	Tertio-butyloxycarbonyl	r.t.	Room temperature
BSA	Bovine Serum Albumine	RT	Retention Time
CD	Cell Differentiation	SASRIN	Super Acid Sensitive Resin
CDR	Complementary Determining Region	s.c.	Sous-cutané
CuAAC	Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions	siRNA	Small interfering RNA
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance	SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide	Succ	Succinimide
Dde	1-(4,4-diméthyl-2,6- dioxocyclohex-1-ylidène)éthyle	t.a.	Température ambiante
DIPEA	N,N-Diisopropyléthylamine	TASP	Template Assembled Synthetic Protein
DMF	N,N-Diméthylformamide	tBu	Tertio-butyl
DMSO	Diméthylsulfoxyde	TEP	Tomographie à émission de positron
EDT	Éthanedithiol	TFA	Acide trifluoroacétique
EGF	Endothelial Growth Factor	TIS	Triisopropylsilane
EPR	Enhanced Permeability and Retention	TNBS	Acide trinitrobenzènesulfonique
équiv.	Équivalent molaire	TNFα	Tumeur Necrosis Factor α
ESI	Electrospray Ionisation	t_R	Temps de rétention
Et₂O	Éther diéthylique	Trt	Triphénylméthyl (ou trityl)
EtOH	Éthanol	UV	Ultraviolet
FDA	Food and Drug Administration	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor		
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine		
Fmoc	9-Fluorénylméthylloxycarbonyl		
FRET	Förster Resonance Energy Transfer		
HEK(293)	Lignée de cellules épithéliales de rein embryonnaire humain		
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole		
IC₅₀	Concentration inhibant de 50% un paramètre		
IR	Infrarouge		
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique		
IGF	Insulin-Like Growth Factor		
i.v.	Intraveineuse		
K_D	Constante de dissociation		

Listes des acides aminés naturels

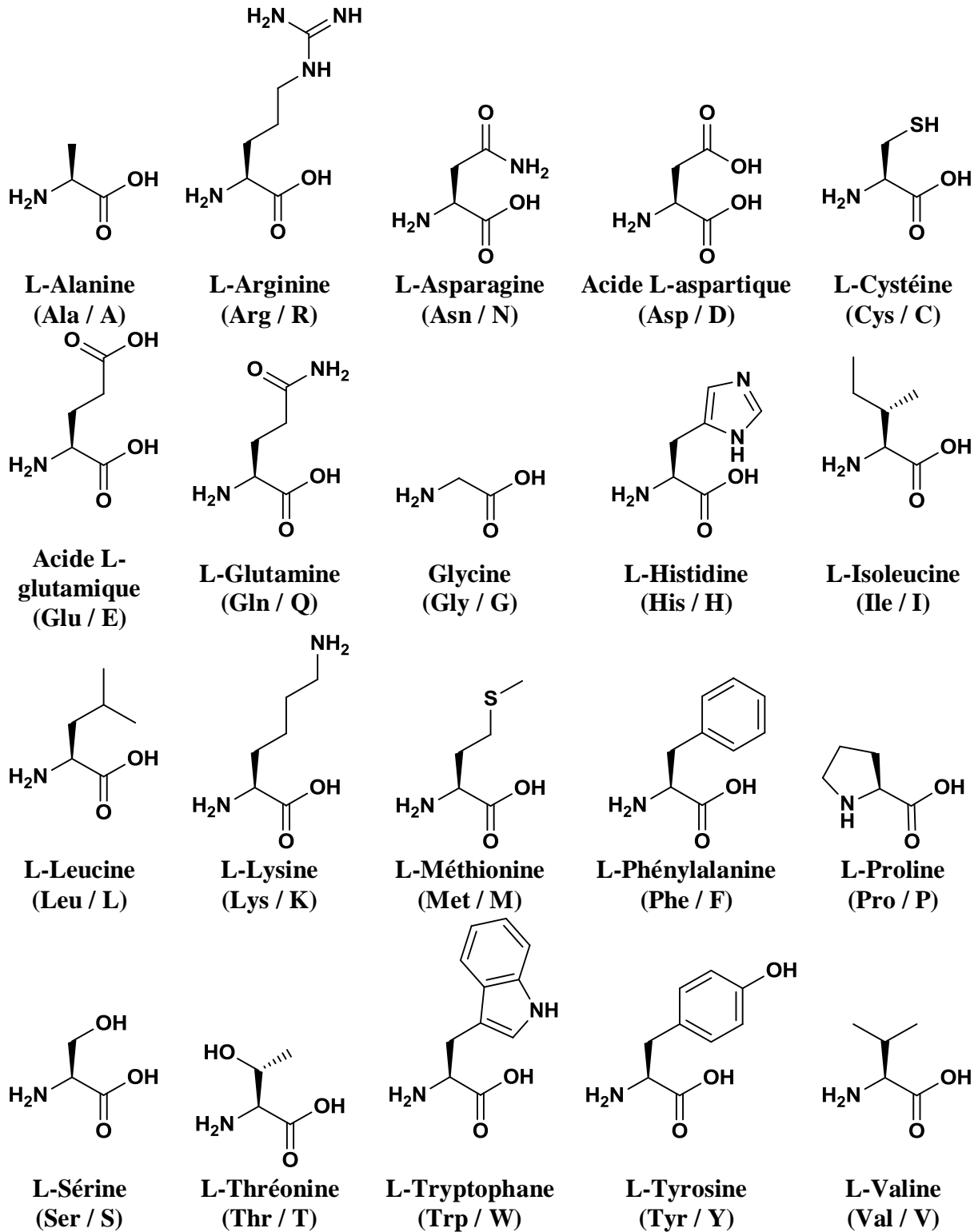


Figure 1 : Structures des 20 acides aminés naturels (codes à trois et une lettres).

INTRODUCTION

I. La vectorisation en Cancérologie

Il existe trois armes pour lutter contre le cancer représentées par la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cette dernière permet incontestablement de sauver des vies mais au prix d'une toxicité importante. Ces effets secondaires, dus à un manque de sélectivité envers les cellules tumorales, limitent les doses d'agents thérapeutiques administrées. La cancérologie clinique nécessite donc le développement de nouvelles méthodes de diagnostic plus sensibles et plus performantes, ainsi que de nouvelles thérapies plus efficaces mais aussi mieux tolérées. La recherche sur le cancer se tourne vers le développement de « stratégies ciblées » comme la vectorisation de composés actifs. Celle-ci est permise grâce aux progrès de la recherche notamment dans la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule cancéreuse. Le but principal de cette thérapie est d'augmenter l'efficacité thérapeutique et de réduire la toxicité du traitement.

I.1. Généralités sur le cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anarchique de cellules qui échappent à certains mécanismes de régulation comme l'apoptose et la croissance cellulaire. On distingue généralement trois types de cancer : les carcinomes (cancers des tissus épithéliaux), les sarcomes (cancers des tissus conjonctifs) et les cancers hématopoiétiques (cancers des cellules sanguines). Hanahan et Weinberg ont recensé six caractéristiques spécifiques acquises par les cellules cancéreuses (Figure 2).¹

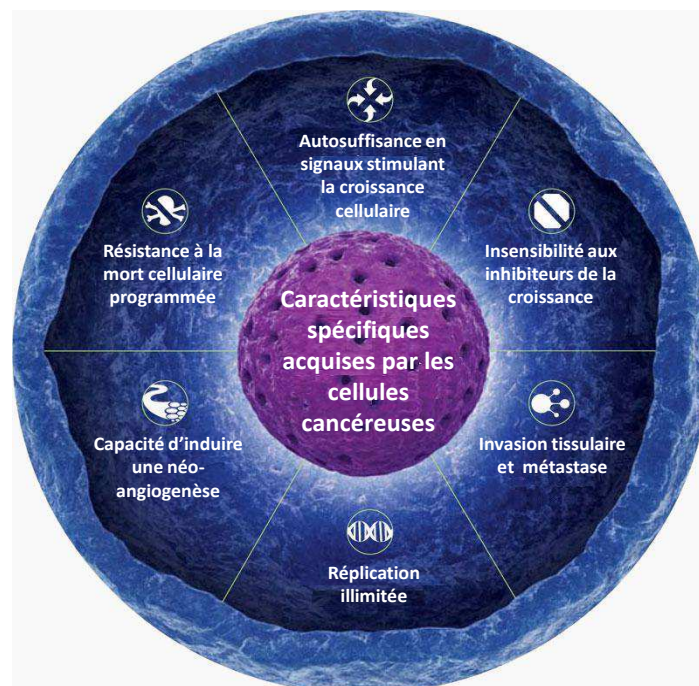


Figure 2 : Caractéristiques spécifiques acquises par les cellules cancéreuses ²

¹ Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, 100 (1), 57-70.

² Genentech biooncology. <http://www.biooncology.com/images/pathways-lg.jpg>.

La première particularité des cellules cancéreuses vient de leur capacité de croissance excessive. La division des cellules saines est contrôlée par un ensemble de signaux de croissance mitogène provenant du milieu extracellulaire. La cellule maligne est capable de générer ses propres signaux de croissance (TGF α , PDGF...) qui stimulent son propre développement. De plus, la surexpression des récepteurs aux facteurs de croissance induit une hypersensibilité aux facteurs de croissance comme EGFR/erB et HER2 surexprimés dans les carcinomes du sein. Le développement accru des cellules cancéreuses est aussi dû à leurs résistances aux inhibiteurs de croissance qui permettent de réguler la mitose. Les cellules tumorales sont capables de résister à l'apoptose (mort cellulaire programmée) en sécrétant des facteurs de survie cellulaire (IGF-1, IGF-2, IL-3) et en rendant inactifs les récepteurs aux facteurs de mort cellulaire (FAS ou TNF α). Ces caractéristiques particulières permettent aux cellules tumorales de se multiplier de manière illimitée.

Une autre particularité importante réside dans leur capacité à induire une néoangiogenèse.³ Ce phénomène est un processus clé dans le développement de la tumeur. Pour stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins autour de la tumeur, la cellule cancéreuse libère des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF ou les FGF-1 et -2. La formation de ce réseau vasculaire permet de fournir les nutriments essentiels au développement de la tumeur. Ce processus est indispensable à la progression des tumeurs ce qui représente une cible intéressante pour le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses.

Enfin, le processus d'invasion des tissus et la formation de métastases représentent le caractère gravissime du développement du cancer. Leurs propriétés de migration sont dues à la perte ou la modification de protéines de surface intervenant dans les processus d'adhésion intercellulaire. La sécrétion d'enzymes permet aux cellules tumorales de pénétrer peu à peu les membranes des capillaires lymphatiques et sanguins. Ces métastases empruntent la circulation sanguine et envahissent les différentes parties de l'organisme pour y développer d'autres foyers tumoraux. A l'inverse d'une tumeur localisée, les thérapies utilisées pour traiter les cancers généralisés sont rarement efficaces.

I.1.1. Méthodes actuelles de détection et de traitements des cancers

★ Méthodes de détections

La détection avancée des cancers est capitale pour permettre un traitement curatif efficace. Actuellement les méthodes utilisées pour le diagnostic sont généralement des techniques d'imagerie médicale et l'examen après prélèvements de tissus. Les méthodes d'imagerie médicale comprennent la radiographie (rayons X), l'échographie (ultrasons), l'IRM (résonance magnétique nucléaire) et les techniques nucléaires (radioactivités). Ces techniques permettent de détecter des tumeurs de l'ordre du millimètre. Certaines de ces techniques nécessitent l'utilisation de substances pouvant améliorer la détection des tumeurs. Pour l'IRM, l'utilisation de composé comme le Gadolinium permet d'augmenter le contraste et de repérer plus facilement les défauts tissulaires. Les techniques nucléaires reposent sur le principe de la scintigraphie qui permet de visualiser la fixation d'un traceur radioactif injecté

³ Carmeliet, P., Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature **2005**, 438 (7070), 932-936.

au patient. Différents agents de contraste comme le ^{99m}Tc sont utilisés et peuvent être conjugués avec des agents de ciblage pour augmenter la spécificité. La tomographie à émission de positron (TEP) permet de réaliser des clichés en trois dimensions grâce à l'utilisation de métabolites radioactifs marqués au ^{18}F ou au ^{64}Cu comme le ^{18}F -fluoro-desoxy-glucose.⁴ Ces composés ont une durée de vie plus courte que les radiotraceurs conventionnels ce qui diminue les risques d'exposition aux radiations.

★ Les différents traitements utilisés

Plusieurs méthodes de traitements thérapeutiques sont utilisées pour soigner les cancers mais la chirurgie reste le moyen le plus couramment utilisé pour les traiter (excepté pour les cancers hématopoïétiques). L'ablation d'une tumeur permet une guérison efficace si cette dernière n'est pas métastasée. Cependant, cette méthode peut s'avérer problématique dans le cas de cancer d'organes vitaux. Généralement, la radio- et la chimiothérapie sont les techniques utilisées pour compléter ou remplacer les traitements chirurgicaux.

La radiothérapie est une méthode utilisant des rayonnements ionisants en occasionnant des dommages à l'ADN provoquant l'apoptose de la cellule. Dans le cas d'une radiothérapie externe, la source de rayonnement est située à l'extérieur du patient. À l'inverse, la technique de curiethérapie suggère une source de rayonnement à proximité de la tumeur après implantation d'un composé radioactif. Cette méthode permet de délivrer un rayonnement plus précis et plus spécifique en épargnant les cellules saines environnantes.

La chimiothérapie a recours à divers composés qui affectent certains mécanismes cellulaires essentiels provoquant l'apoptose de la cellule. Les agents alkylants comme les sels de platines ou les cyclophosphamides agissent directement au niveau de l'ADN en formant des liaisons inter-brins entraînant une incapacité de réplication. Les antimétabolites, comme le 5-fluorouracile, empêchent la synthèse de l'ADN en remplaçant les nucléotides ou en inhibant l'ADN polymérase. Les inhibiteurs des topoisomérases (I et II) comme la doxorubicine empêchent la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire. La dernière grande classe d'anticancéreux regroupe divers alcaloïdes comme la vinorelbine ou les dérivés de taxane qui empêchent la mitose en inhibant l'assemblage des tubulines en microtubules.

Les produits utilisés en chimiothérapie agissent en général sur toutes les cellules qui se multiplient. Ils peuvent donc affecter de nombreuses cellules saines et plus particulièrement les cellules sanguines (lymphocytes, plaquettes...). Cette thérapie entraîne aussi de nombreux effets secondaires liés à une forte toxicité cardiaque et hépatique.

★ Les stratégies de ciblage

Depuis une cinquantaine d'années, beaucoup d'études dans le domaine de l'oncologie se sont portées sur la thérapie ciblée notamment la vectorisation des composés actifs. Le but principal de cette thérapie est d'augmenter l'efficacité thérapeutique et de réduire la toxicité du traitement. Le comportement des molécules vectorisées est régi par la pharmacocinétique et la biodistribution des molécules effectrices. De plus, une vectorisation spécifique vers les

⁴ Gambhir, S. S., Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* **2002**, 2 (9), 683-693.

tissus ciblés permet d'augmenter la concentration des molécules effectrices dans les cellules augmentant ainsi son efficacité.

La stratégie de vectorisation des molécules est basée sur le ciblage actif ou passif. La plupart des études se sont portées vers le développement de systèmes multifonctionnels combinant propriétés de ciblage tumoral et propriétés effectrices résultant du couplage d'éléments thérapeutiques ou de détection à l'agent de ciblage.⁵ Le ciblage actif 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). Ces ligands peuvent être de natures diverses comme les peptides, les lipides, les oligosaccharides, les oligonucléotides, les molécules organiques ou les anticorps monoclonaux (Tableau 1).⁶ Le ciblage passif exploite les différences biochimiques (surexpression d'une enzyme) et/ou physiologiques (vascularisation) entre les tissus sains et les tissus cancéreux. Ainsi en utilisant des vecteurs inertes comme des larges molécules (synthétiques ou biopolymères) ou des nanoparticules (liposomes ou nanosphères), on peut influencer la biodistribution sans avoir une interaction directe avec les cellules tumorales.

Ligands	Cibles	Exemples de cancers ciblés
Peptides RGD	Intégrines ($\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$)	Cellules endothéliales vasculaires des tumeurs solides
Acide Folique	Récepteurs à l'acide folique (FR-a, FR-b, FR-g)	Cancer des ovaires, de l'endomètre et des reins
Acide hyaluronique	Récepteurs à l'acide Hyaluronique (CD44, RHAMM, HARLEC)	Cancers du colon, des ovaires, de l'estomac et certaines leucémies
Glucosamine	Récepteurs aux Asialoglycoprotéines	Hépatocytes cancéreux
Transferrine	Récepteurs à transferrine	Plusieurs types de cellules cancéreuses
Anticorps		
Anti-VEGFR	Récepteurs au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF1-4)	Cellules endothéliales vasculaires des tumeurs solides
Anti-EGFR	Récepteurs au Facteur de croissance épidermique (EGF1, EGF2)	Cancer du sein
Anti-CD	Cluster de différenciation (CD20, CD22, CD19, CD33)	Lymphomes
Anti-MUC1	MUC1	Cancer du sein et de la vessie
Anti-PSA	Antigène prostatique spécifique	Cancer de la prostate

Tableau 1 : Exemples de ligands utilisés pour cibler les marqueurs tumoraux

⁵ Kratz, F.; Muller, I. A.; Ryppa, C.; Warnecke, A., Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *ChemMedChem* **2008**, 3 (1), 20-53.

⁶ Allen, T. M., Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2002**, 2 (10), 750-63.

I.2. Les agents de ciblage

I.2.1. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

Les anticorps monoclonaux (mAb) sont des immunoglobulines (Ig) produites par un même clone de lymphocyte B. Au contraire des anticorps polyclonaux, les mAbs sont monospécifiques et homogènes ce qui en fait des outils efficaces pour le développement de la recherche et du diagnostic. La première méthode de production fut introduite par Köhler et Milstein en 1975.⁷ Cette méthode débute par l'immunisation d'une souris par inoculation de l'antigène. Les lymphocytes B sont ensuite isolés puis fusionnés avec des myélomes afin d'obtenir des hybridomes immortels. Après sélection d'un hybridome sécrétant un anticorps de spécificité connue, le clone sera capable de produire une quantité illimitée de mAbs.

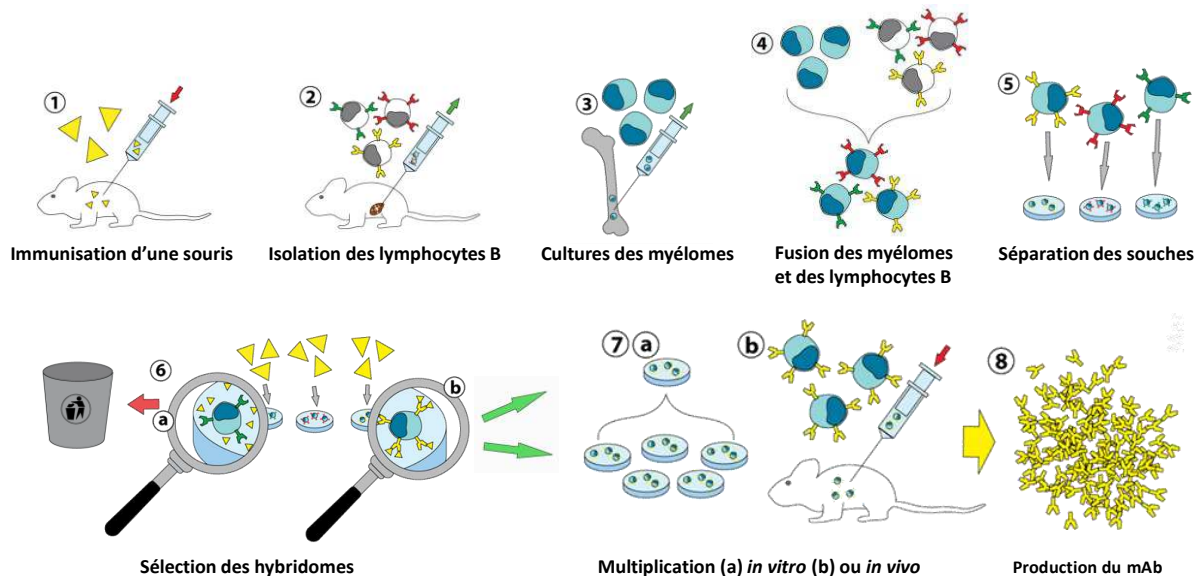


Figure 3 : Processus d'obtention de mAb selon Köhler et Milstein⁸

* Structures et fonctions

Les mAbs sont des glycoprotéines symétriques composées de deux chaînes lourdes (représentées en vert) et deux chaînes légères (représentées en bleu) reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures (Figure 4). Les anticorps comportent deux domaines distincts : le domaine Fab (Fragment antigen binding) et le domaine constant Fc (Fragment crystallizable). Le domaine Fab, composé en partie des domaines variables des chaînes H et L (VH et VL), présente le site de fixation à l'antigène appelé CDR (complementary determining region, représenté en rouge). La très grande diversité des anticorps est due à la forte variation d'acides aminés au niveau des régions CDR. Ce domaine hypervariable est constitué de six boucles : trois sur la chaîne légère (L1, L2 et L3) et trois sur la chaîne lourde (H1, H2 et H3). Le domaine Fc, composé de deux chaînes lourdes, détermine la fonction effectrice de

⁷ Kohler, G.; Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, 256 (5517), 495-7.

⁸ <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Hybridomtechnik.png>.

l'anticorps. Ce domaine est nécessaire pour activer les cellules immunocompétentes (Cellules NK, macrophages, neutrophiles) et/ou activer la cascade du complément.

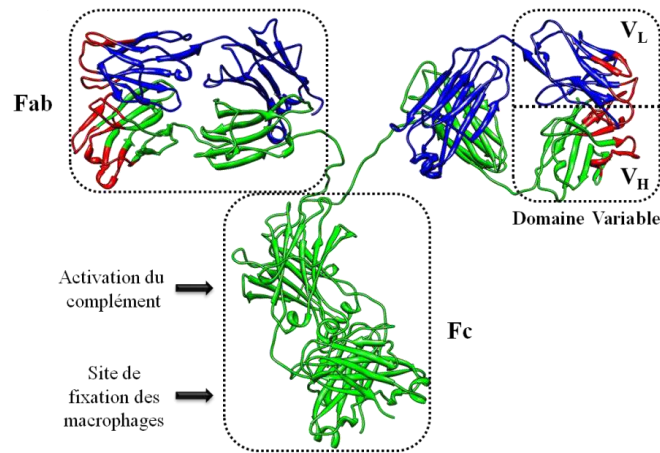


Figure 4 : Structure d'une immunoglobuline G1

L'efficacité d'un mAb dépend des caractéristiques de l'antigène ciblé comme sa fonction, sa structure ou sa densité sur la surface de la cellule. Les caractéristiques du mAb comme sa spécificité, son affinité et son isotopie doivent aussi être prises en compte. Les Immunoglobulines de types G1 (IgG1) peuvent en particulier déclencher la cascade du complément après leur fixation à la surface de la cellule-cible, provoquant ainsi la lyse de la cellule grâce au complexe d'attaque membranaire (Figure 5a).⁹ Ce même type d'anticorps est capable d'activer les cellules immunocompétentes possédant les récepteurs Fc appropriés comme les macrophages, les neutrophiles ou les cellules NK (Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'un anticorps). Une fois activés, ces lymphocytes NK peuvent lyser la cellule liée à l'anticorps par libération de perforine (Figure 5b). Ces mécanismes ont été prouvés *in vitro* mais très peu d'études ont prouvé leur existence *in vivo*. Les mAbs peuvent aussi agir en interférant entre un ligand et son récepteur inhibant ainsi la transduction d'un signal (Figure 5c). Dans ce cas précis, la partie Fc n'est pas utilisée. Cette stratégie est fréquemment employée pour inhiber les signaux de croissance en ciblant les ligands ou les récepteurs intervenant dans le processus de croissance tumorale (EGF, HER2) ou de néo-angiogenèse (VEGF).

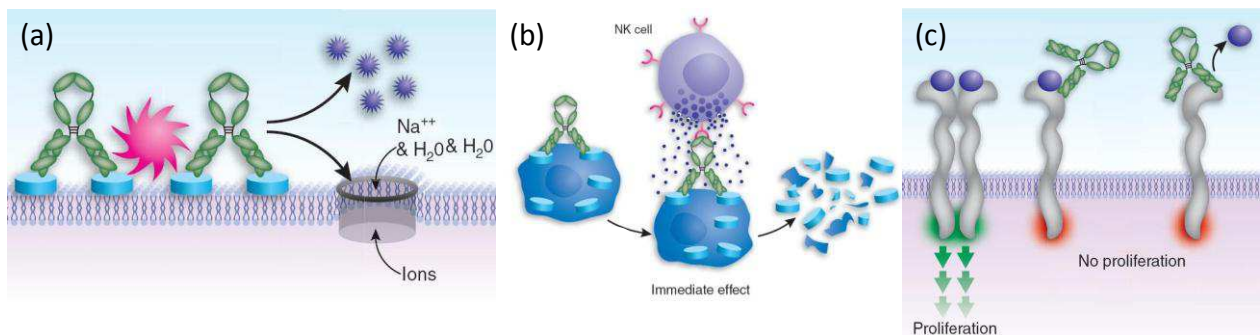


Figure 5 : (a) Activation de la cascade du complément (b) Activation des cellules immunocompétentes (c) inhibition de la transduction du signal⁹

⁹ Reichert, J. M.; Rosensweig, C. J.; Faden, L. B.; Dewitz, M. C., Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* **2005**, 23 (9), 1073-1078.

★ Les différentes cibles et traitements

L'efficacité d'un mAb en thérapie anticancéreuse dépend fortement de la nature de la cible. Idéalement, la cible présente à la surface d'une cellule tumorale doit être à la fois accessible, homogène et abondante. Les stratégies les plus prometteuses et les plus avancées se sont portées sur les réactivités auto-immunes, la thérapie antivirale et la thérapie anticancéreuse.

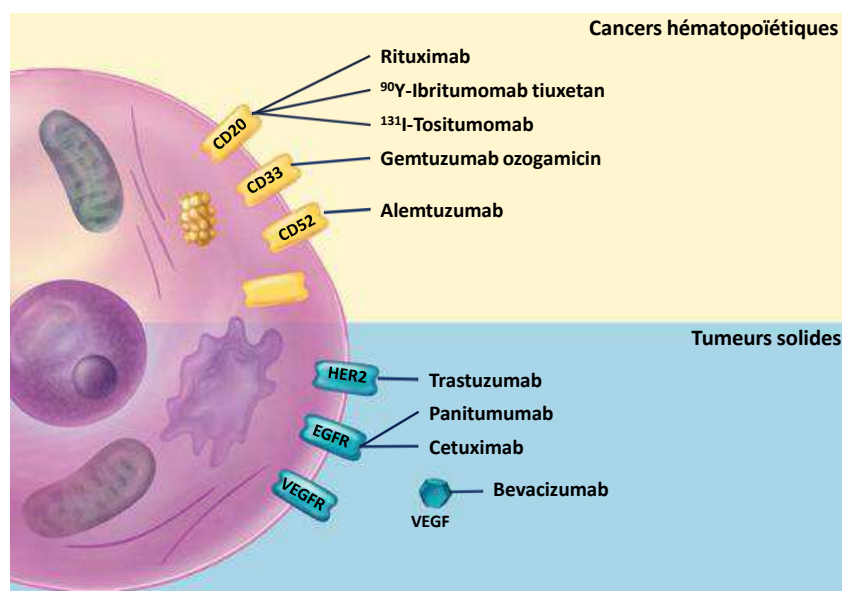


Figure 6 : Anticorps monoclonaux anticancéreux sur le marché et leurs cibles (CD = Cluster de différenciation ; EGFR = Récepteur de facteur de croissance endothéliale ; VEGFR = Récepteur de facteur de croissance vasculaire)¹⁰

Dans le domaine de l'oncologie, les mAbs étudiés en clinique ciblent une multitude de glycoprotéines, glycolipides et oligosaccharides présents à la surface des cellules cancéreuses. En 2007, 206 mAbs anticancéreux étaient étudiés en clinique sur plus de 76 cibles différentes.¹¹ Parmi ces cibles, on retrouve les facteurs de croissance épithéliaux (EGF, HER2), les facteurs de croissance vasculaires (VEGF), l'EpCAM (« Epithelial Cell Adhésion Molecule ») pour traiter les carcinomes épithéliaux et les clusters de différenciation utilisés pour cibler les lymphomes (Figure 6, Tableau 2).

Le Rituximab fut le premier mAb à être approuvé par la FDA pour le traitement d'un cancer.¹² Cette IgG-1 chimérique est dirigée contre une protéine transmembranaire CD20 exprimée exclusivement par les lymphocytes B matures. Plusieurs études ont montré leur efficacité pour les traitements de lymphome Non-Hodkinien. Le Rituximab a la capacité d'activer les cellules immunocompétentes, d'activer la cascade du complément et d'induire une apoptose directe sur certaines lignées de cellules présentant le CD20. De plus, les essais

¹⁰ Gerber, D. E., Targeted therapies: A new generation of cancer treatments. *Am Fam Phys* **2008**, 77 (3), 311-319.

¹¹ Reichert, J. M.; Valge-Archer, V. E., Outlook - Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, 6 (5), 349-356.

¹² McLaughlin, P.; Grillo-Lopez, A. J.; Link, B. K.; Levy, R.; Czuczman, M. S.; Williams, M. E.; Heyman, M. R.; Bence-Bruckler, I.; White, C. A.; Cabanillas, F., et al., Rituximab chimeric Anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* **1998**, 16 (8), 2825-2833.

cliniques combinant le Rituximab avec des agents anticancéreux (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine) ont montré une amélioration du traitement sans induire une toxicité supplémentaire.¹³

Nom Générique	Description	Cible	indication	Année d'approbation
Rituximab	Chimérique, IgG1	anti-CD20	Lymphome Non-Hodkinien	1997
Trastuzumab	Humanisé, IgG1	anti-HER2	Cancer métastatique du sein	1998
Alemtuzumab	Humanisé, IgG1	anti-CD52	leucémie lymphoïde chronique	2001
Bevacizumab	Humanisé, IgG1	anti-VEGF	cancers colorectaux métastatiques	2004
Cetuximab	Chimérique, IgG1	anti-EGFR	cancers colorectaux métastatiques	2003
Panitumumab	Humain, IgG2	anti-EGFR	cancers colorectaux métastatiques	2006
Nimotuzumab	Chimérique	anti-EGFR	Carcinome spinocellulaire	2005
Catumaxomab	Murin	Anti-EpCAM Anti-CD33	Traitement de l'ascite maligne	2009
Ofatumumab	Humain, IgG1	anti-CD20	leucémie lymphoïde chronique	2009
Immuno conjugués				
Gemtuzumab ozogamicin	Humanisé, IgG4	anti-CD33, immunotoxin	Traitement de l'ascite maligne	2000
Ibritumomab tiuxetan	Murine, IgG1 radiolabelled (Y-90)	anti-CD20,	Lymphome Non-Hodkinien	2002
¹³¹ I-Tositumomab	Murine, IgG2a, radiolabelled (I-131)	anti-CD20	Lymphome Non-Hodkinien	2003

Tableau 2 : Anticorps monoclonaux anticancéreux actuellement sur le marché¹⁴

★ Les conjugués mAb

Les mAbs peuvent être aussi utilisés en tant que vecteurs en les conjuguant avec des composés actifs comme des éléments radioactifs ou cytotoxiques. Ces immunoconjugués peuvent ainsi augmenter la spécificité de la chimio ou radiothérapie et améliorer l'efficacité de l'immunothérapie.¹⁵ Malheureusement, ce type de molécule reste très difficile à produire et présente des problèmes de sécurité plus importants par rapport à leur homologue nu. Les mAbs ont été conjugués avec une large variété de molécules comme des protéines ou des

¹³ (a) Czuczman, M. S.; Grillo-Lopez, A. J.; White, C. A.; Saleh, M.; Gordon, L.; LoBuglio, A. F.; Jonas, C.; Klippenstein, D.; Dallaire, B.; Varns, C., Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* **1999**, 17 (1), 268-76; (b) Lenz, G.; Dreyling, M.; Hoster, E.; Wormann, B.; Duhrsen, U.; Metzner, B.; Eimermacher, H.; Neubauer, A.; Wandt, H.; Steinhauer, H., et al., Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: Results of a prospective randomized trial of the German low grade lymphoma study group (GLSG). *J Clin Oncol* **2005**, 23 (9), 1984-1992.

¹⁴ Weiner, L. M.; Surana, R.; Wang, S. Z., Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2010**, 10 (5), 317-327.

¹⁵ Sharkey, R. M.; Goldenberg, D. M., Use of antibodies and immunoconjugates for the therapy of more accessible cancers. *Adv Drug Deliver Rev* **2008**, 60 (12), 1407-1420.

petites molécules cytotoxiques (vinblastine, méthotrexate, doxorubicine, calicheamicin...). Ces composés actifs sont greffés sur le mAb de façon covalente via un espaceur, alors que les protéines immunotoxiques peuvent être produites par conjugaison chimique ou génie génétique. Actuellement, le seul mAb conjugué avec une immunotoxine, présent sur le marché, est le « Gemtuzumab ozogamicin » utilisé pour traiter certaines leucémies.¹⁶ Le développement de ces immunotoxines demeure difficile car les protéines toxiques peuvent être immunogènes et la faible dose délivrée au niveau des sites tumoraux rend les composés moins efficaces. De plus, l'internalisation est nécessaire pour l'activité cytotoxique du composé. Dans le cas d'un mAb nu, une internalisation trop rapide aura pour effet de diminuer la réponse immunitaire.

Une autre façon d'utiliser les mAbs comme agents thérapeutiques est de les coupler à des éléments radioactifs. Ces Radioimmunoconjugués offrent de nombreux avantages dans le traitement du cancer. La destruction des cellules ne se fonde pas sur le système immunitaire de l'hôte mais se produit par les effets ionisants émis par des particules radioactives. Ces particules radioactives toxiques sont efficaces sur une distance de plusieurs cellules. Actuellement, seulement deux mAbs thérapeutiques radioconjugués (Ibritumomab tiuxetan, Tositumomab-I131) ont été approuvés pour leur mise sur le marché.¹⁷ Ces radioimmunoconjugués sont tous deux dirigés contre l'antigène soluble CD20 permettant de cibler les Lymphomes Non-Hodgkinien. Par ailleurs, la quantité de mAbs radioactifs délivrée au niveau de la tumeur peut être mesurée de façon non invasive par imagerie médicale.¹⁸

★ Problèmes liés à l'utilisation des anticorps monoclonaux pour la thérapie ciblée

L'intérêt d'utiliser les anticorps monoclonaux dans la thérapie ciblée réside dans leur grande spécificité envers une multitude de cibles et leur capacité à induire une réponse immunitaire. Leur efficacité a rencontré plusieurs obstacles notamment dus à leur grande taille si on les compare aux médicaments conventionnels. En effet, les mAb sont des protéines volumineuses et de ce fait elles ont une cinétique de biodistribution plus longue et des propriétés de pénétration tissulaire limitées. Leur capacité à atteindre des tumeurs solides et les sites d'inflammation reste relativement faible. Par contre, leur grande taille génère un temps de demi-vie dans le sérum considérablement long pouvant aller de 6 jours à 21 jours. En effet, les mAb étant largement supérieurs au seuil de clairance rénal (60-70kDa), ils ne

¹⁶ (a) Hamann, P. R.; Hinman, L. M.; Hollander, I.; Beyer, C. F.; Lindh, D.; Holcomb, R.; Hallett, W.; Tsou, H. R.; Upešlaciš, J.; Shochat, D., et al., Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. *Bioconj Chem* **2002**, 13 (1), 47-58; (b) Sievers, E. L.; Larson, R. A.; Stadtmauer, E. A.; Estey, E.; Lowenberg, B.; Dombret, H.; Karanes, C.; Theobald, M.; Bennett, J. M.; Sherman, M. L., et al., Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* **2001**, 19 (13), 3244-3254.

¹⁷ (a) Witzig, T. E.; Gordon, L. I.; Cabanillas, F.; Czuczman, M. S.; Emmanouilides, C.; Joyce, R.; Pohlman, B. L.; Bartlett, N. L.; Wiseman, G. A.; Padre, N., et al., Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **2002**, 20 (10), 2453-2463; (b) Witzig, T. E.; Flinn, I. W.; Gordon, L. I.; Emmanouilides, C.; Czuczman, M. S.; Saleh, M. N.; Cripe, L.; Wiseman, G.; Olejnik, T.; Multani, P. S., et al., Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **2002**, 20 (15), 3262-3269.

¹⁸ Wu, A. M.; Senter, P. D., Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* **2005**, 23 (9), 1137-1146.

sont pas éliminés par les glomérules rénaux ce qui est un atout majeur pour le ciblage d'antigènes solubles.¹⁹

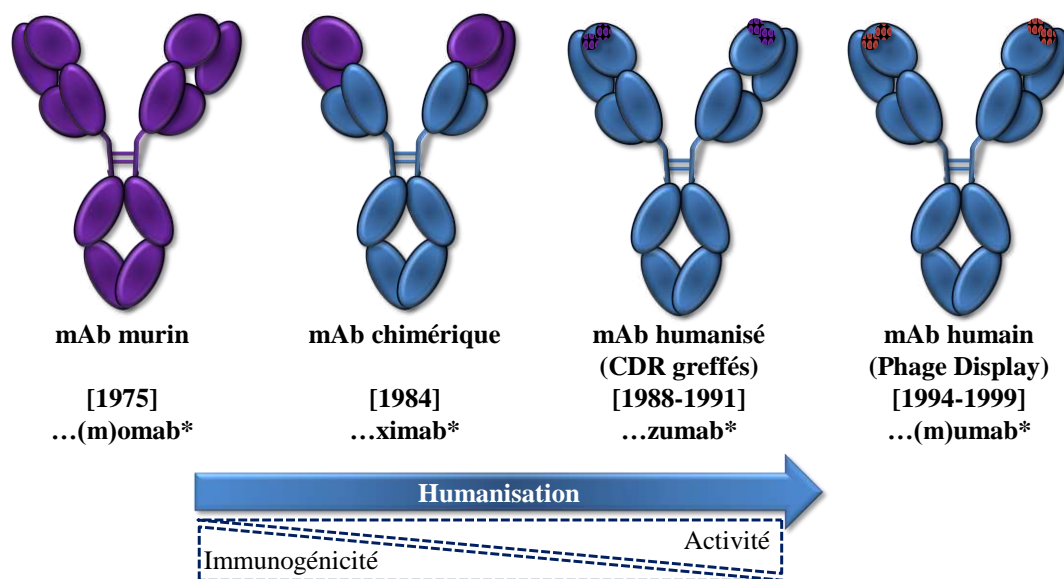


Figure 7 : Evolution des anticorps monoclonaux pour la thérapie (*terminaison du nom du mAb)

Un autre obstacle au niveau clinique est lié à la nature du mAb. Les mAbs provenant de cellules murines génèrent divers problèmes. Le domaine Fc est souvent incapable d'interagir avec les récepteurs des cellules humaines du système immunitaire afin d'induire une réponse. Par ailleurs, le développement d'anticorps humains anti-souris peut générer des allergies et des chocs anaphylactiques, et diminuer l'efficacité du traitement. Ce problème fut en partie résolu en produisant des mAbs chimériques qui combinent le domaine variable de l'anticorps (Fab) avec le domaine constant (Fc) d'un anticorps humain (Figure 7). Les mAbs chimériques sont moins immunogènes et plus efficaces pour activer le système immunitaire par rapport aux mAb murins. De plus, la chimérisation d'un mAb permet d'augmenter sa persistance dans la circulation allant de deux jours pour un mAb murin à deux semaines pour un mAb chimérique. Grâce au développement du génie génétique, il est maintenant possible de produire des mAbs humanisés ou totalement humains.²⁰ Cette stratégie est la plus efficace car elle permet de diminuer très largement les réactions allergiques mais ces mAbs sont très coûteux car très difficiles à concevoir.^{21,22}

L'exploitation optimale des mAbs thérapeutiques dépend aussi de leur mode de préparation entièrement biologique. De nos jours, ceux-ci sont produits à partir de cellules procaryotes (*E. Coli*) ou eucaryotes CHP (Chinese hamster ovary) dans des fermenteurs dont la capacité maximale ne peut excéder 10 000 L pour une production finale de quelques

¹⁹ Breedveld, F. C., Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* **2000**, 355 (9205), 735-740.

²⁰ Lonberg, N., Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* **2005**, 23 (9), 1117-1125.

²¹ Adams, G. P.; Weiner, L. M., Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **2005**, 23 (9), 1147-1157.

²² Hoogenboom, H. R., Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* **2005**, 23 (9), 1105-1116.

kilogrammes par batch.²³ Cette limitation provient des conditions de culture qui doivent être homogènes à l'intérieur du fermenteur.²⁴

Si le mode d'action des mAbs utilisés en oncologie est bien connu *in vitro*, leur voie d'action *in vivo* est très discutée. La partie Fc semble importante pour l'efficacité de la thérapie : il existe néanmoins un polymorphisme génétique pour le récepteur reconnaissant la partie Fc du mAb (FcγR) exprimé sur les cellules NK et les macrophages ce qui rend une partie des patients résistant au traitement par le Rituximab.²⁵ Par ailleurs, la glycosylation du domaine Fc est critique pour l'activation des cellules immunitaires²⁶ et une mutation de l'oligosaccharide peut entraîner une modification de l'efficacité du mAb.²⁷

I.2.2. Ligands des récepteurs membranaires

★ Ciblage des cancers avec les molécules organiques

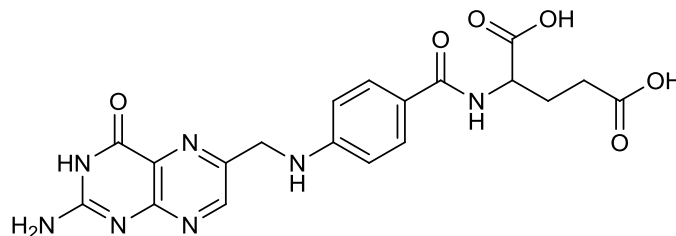


Figure 8 : Schéma de l'acide folique

La molécule organique la plus étudiée pour cibler les tumeurs est l'acide folique (vitamine B9). Ce composé intervient dans la formation de nouvelles cellules en participant à la biosynthèse des bases nucléiques. Il existe deux récepteurs membranaires pour cette molécule, FR-α et FR-β. L'expression de ces deux récepteurs dans les tissus seins est faible et restreinte à certaines cellules épithéliales. A contrario, ces récepteurs sont surexprimés au niveau de plusieurs tumeurs en particulier dans le cancer des ovaires, de l'endomètre et des reins. L'acide folique possède une haute affinité avec les récepteurs FR ($K_D < 1\text{nM}$)²⁸ et garde ses propriétés de ligand une fois couplé via le carboxyl-γ ce qui en fait un outil intéressant pour la vectorisation en cancérologie. Ainsi, l'acide folique a été conjugué avec

²³ Biotech-Production. http://www.roche.com/research_and_development/innovation_and_technologies/biotechnology/production.html.

²⁴ Carson, K. L., Flexibility-the guiding principle for antibody manufacturing. *Nat Biotechnol* **2005**, 23 (9), 1054-1058.

²⁵ Cartron, G.; Dacheux, L.; Salles, G.; Solal-Celigny, P.; Bardos, P.; Colombat, P.; Watier, H., Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma RIIIa gene. *Blood* **2002**, 99 (3), 754-758.

²⁶ Shinkawa, T.; Nakamura, K.; Yamane, N.; Shoji-Hosaka, E.; Kanda, Y.; Sakurada, M.; Uchida, K.; Anazawa, H.; Satoh, M.; Yamasaki, M., et al., The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* **2003**, 278 (5), 3466-3473.

²⁷ Siberil, S.; Dutertre, C. A.; Boix, C.; Bonnin, E.; Menez, R.; Stura, E.; Jorieux, S.; Fridman, W. H.; Teillaud, J. L., Molecular aspects of human Fc gamma R interactions with IgG: Functional and therapeutic consequences. *Immunol Lett* **2006**, 106 (2), 111-118.

²⁸ Elnakat, H.; Ratnam, M., Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv Drug Deliver Rev* **2004**, 56 (8), 1067-1084.

divers composés pour la cancérologie ou l'imagerie tumorale. Parmi les conjugués étudiés, on retrouve des nanoparticules,²⁹ des agents de chimiothérapie,³⁰ des éléments radioactifs³¹ ou des agents de contrastes³² pour l'imagerie IRM. Cependant, pour être efficace pendant le traitement, la prise de ce type médicament doit s'effectuer à jeun. En effet, l'acide folique présent dans certains aliments peut se retrouver dans le sérum du patient et rentrer en compétition avec le ligand.

* Ciblage des cancers avec les oligosaccharides

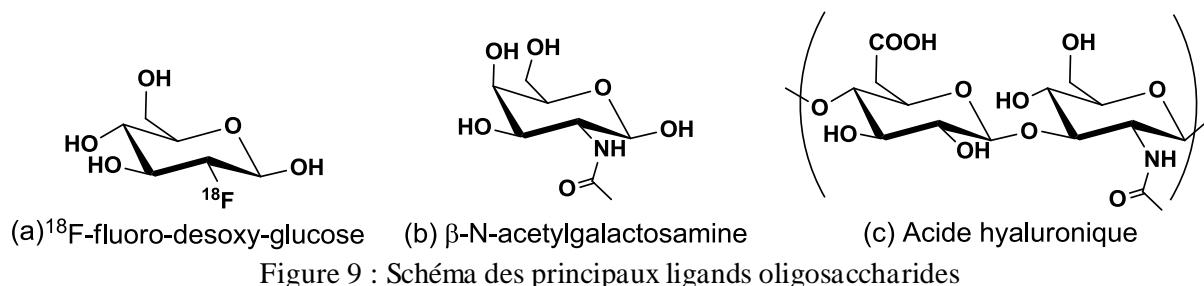


Figure 9 : Schéma des principaux ligands oligosaccharides

Les oligosaccharides peuvent être utilisés en tant que ligands pour cibler divers récepteurs membranaires comme les transporteurs de glucose, les galectines, les récepteurs à l'acide hyaluronique et les récepteurs d'asialoglycoprotéines (ASGPR).

Les transporteurs de glucose (GLUT) sont des protéines transmembranaires spécifiques au glucose permettant ainsi son entrée dans la cellule. Les cellules tumorales ayant une activité métabolique importante surexpriment ces récepteurs par rapport aux cellules saines. La stratégie visant ces récepteurs est très utilisée en imagerie médicale notamment en Tomographie à émission de positron (TEP) grâce à l'utilisation d'un traceur radioactif le ¹⁸F-fluoro-desoxy-glucose (¹⁸F-FDG)³³ (Figure 9a). Cette imagerie fonctionnelle permet de détecter des micro-métastases invisibles sur les clichés radiographiques ou encore de suivre l'évolution ou la réponse à un traitement antitumoral.

D'autres études se sont portées sur le ciblage des récepteurs d'asialoglycoprotéines (ASGPR). Ces lectines surexprimées au niveau des cellules cancéreuses du foie sont visées afin d'améliorer les traitements des carcinomes hépatiques. Ce récepteur possède une haute affinité envers les résidus galactosyles et les β-N-acétylgalactosamines (Figure 9b) présents sur les glycoprotéines. Certaines études ont montré que l'affinité des ligands pour l'ASGPR est fortement dépendante du nombre, de la distance et de l'arrangement tridimensionnel des

²⁹ Asadishad, B.; Vosoughi, M.; Alamzadeh, I.; Tavakoli, A., Synthesis of Folate-Modified, Polyethylene Glycol-Functionalized Gold Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *J Disper Sci Technol* **2010**, 31 (4), 492-500.

³⁰ (a) Gabizon, A.; Tzemach, D.; Gorin, J.; Mak, L.; Amitay, Y.; Shmeeda, H.; Zalipsky, S., Improved therapeutic activity of folate-targeted liposomal doxorubicin in folate receptor-expressing tumor models. *Cancer Chemoth Pharm* **2010**, 66 (1), 43-52; (b) Leamon, C. P.; Reddy, J. A., Folate-targeted chemotherapy. *Adv Drug Deliver Rev* **2004**, 56 (8), 1127-1141.

³¹ Zhang, Y. D.; Lu, J., Tc-99m Labeled Folate Tumor Imaging Agents. *Prog Chem* **2010**, 22 (4), 603-609.

³² Wiener, E. C.; Konda, S.; Shadron, A.; Brechbiel, M.; Gansow, O., Targeting dendrimer-chelates to tumors and tumor cells expressing the high-affinity folate receptor. *Invest Radiol* **1997**, 32 (12), 748-754.

³³ Rigo, P.; Paulus, P.; Kaschten, B. J.; Hustinx, R.; Bury, T.; Jerusalem, G.; Benoit, T.; Foidart-Willems, J., Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur J Nucl Med* **1996**, 23 (12), 1641-1674.

oligosaccharides. Afin de concevoir des vecteurs ayant de hautes affinités ($KD < 1nM$), les dérivés de galactoses doivent être présentés de manière multivalente.³⁴ En se basant sur cette stratégie, divers composés multivalents ont été conjugués avec des agents de contraste comme le gadolinium pour l'imagerie IRM afin de détecter les cancers hépatiques.³⁵ D'autres composés conjugués avec des agents cytotoxiques³⁶ ont montré une bonne sélectivité et une internalisation des molécules par endocytose permettant l'activité du composé actif. Cependant, l'utilisation de ce ligand reste assez limitée car il cible essentiellement les cancers hépatiques et non les autres types de cancers.

Les études qui ont montré le plus de succès portent sur l'utilisation de l'acide hyaluronique (Figure 9c). L'acide hyaluronique (AH) est un polysaccharide linéaire chargé négativement composé de deux unités répétées : l'acide D-glucuronique et la N-acétyl-D-Glucosamine. L'AH possède diverses fonctions dans la matrice extracellulaire comme la croissance cellulaire, la différenciation et la migration. Il existe une multitude de récepteurs à AH et certains comme les récepteurs CD44 et RHAMM sont surexprimés sur un grand nombre de cellules tumorales impliquées dans les cancers du colon, des ovaires, de l'estomac et dans certaines leucémies.³⁷ Il a été démontré que l'affinité de l'AH avec les récepteurs CD44 est dépendante de la taille de l'oligomère. Aussi pour avoir une affinité convenable l'oligomère doit avoir une taille supérieure à 20 unités.³⁸ La spécificité tumorale de l'interaction AH-CD44 et sa biocompatibilité ont été un atout majeur pour la conception et la synthèse de vecteur ciblé. Ainsi, divers agents cytotoxiques comme la doxorubicine³⁹ ou le taxol⁴⁰ ont été conjugués à l'acide hyaluronique permettant l'internalisation du composé dans la cellule par endocytose. Cependant, la synthèse à grande échelle de ces composés reste difficile et coûteuse à cause d'un poids moléculaire très élevé.

Les oligosaccharides sont relativement peu exploités pour cibler les récepteurs tumoraux. Sous leur forme monomérique ces ligands possèdent une très faible affinité pour leur récepteur (1 mM). Ces ligands doivent nécessairement être exprimés de manière multivalente afin de présenter des affinités exploitables.

³⁴ Merwin, J. R.; Noell, G. S.; Thomas, W. L.; Chiou, H. C.; Derome, M. E.; McKee, T. D.; Spitalny, G. L.; Findeis, M. A., Targeted delivery of DNA using YEE(GalNAcAH)₃, a synthetic glycopeptide ligand for the asialoglycoprotein receptor. *Bioconj Chem* **1994**, 5 (6), 612-620.

³⁵ (a) Fulton, D. A.; Elemento, E. M.; Aime, S.; Chaabane, L.; Botta, M.; Parker, D., Glycoconjugates of gadolinium complexes for MRI applications. *Chem Commun* **2006**, (10), 1064-1066; (b) Prata, M. I. M.; Santos, A. C.; Torres, S.; Andre, J. P.; Martins, J. A.; Neves, M.; Garcia-Martin, M. L.; Rodrigues, T. B.; Lopez-Larrubia, P.; Cerdan, S., et al., Targeting of lanthanide(III) chelates of DOTA-type glycoconjugates to the hepatic asialoglycoprotein receptor: cell internalization and animal imaging studies. *Contrast Media Mol I* **2006**, 1 (6), 246-258.

³⁶ (a) Seymour, L. W.; Ferry, D. R.; Anderson, D.; Hesselwood, S.; Julyan, P. J.; Poyner, R.; Doran, J.; Young, A. M.; Burtles, S.; Kerr, D. J., et al., Hepatic drug targeting: Phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *J Clin Oncol* **2002**, 20 (6), 1668-1676; (b) Di Stefano, G.; Derenzini, M.; Kratz, F.; Lanza, M.; Fiume, L., Liver-targeted doxorubicin: effects on rat regenerating hepatocytes. *Liver Int* **2004**, 24 (3), 246-252.

³⁷ Toole, B. P.; Wight, T. N.; Tammi, M. I., Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J Biol Chem* **2002**, 277 (7), 4593-4596.

³⁸ Ponta, H.; Sherman, L.; Herrlich, P. A., CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2003**, 4 (1), 33-45.

³⁹ Luo, Y.; Bernshaw, N. J.; Lu, Z. R.; Kopecek, J.; Prestwich, G. D., Targeted delivery of doxorubicin by HPMA copolymer-hyaluronan bioconjugates. *Pharm Res* **2002**, 19 (4), 396-402.

⁴⁰ Leonelli, F.; La Bella, A.; Migneco, L. M.; Bettolo, R. M., Design, synthesis and applications of hyaluronic acid-paclitaxel bioconjugates. *Molecules* **2008**, 13 (2), 360-378.

★ Ciblage des cancers avec les peptides

De nombreux ligands protéiques interagissent avec leurs récepteurs via une séquence spécifique. Quand ce domaine correspond à une petite séquence peptidique, il est possible de concevoir et de synthétiser un ligand peptidique qui possède des propriétés similaires à la protéine originelle. L'exemple le plus probant est le ligand peptidique RGD (Arg-Gly-Asp) dont la séquence est contenue dans divers ligands protéiques tels que la vitronectine, le fibrinogène ou la thrombospondine. Ces protéines sont des ligands naturels de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui intervient lors de la formation de la néo-vascularisation tumorale. Cette protéine transmembranaire est surexprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux néo-angiogéniques et par de nombreuses lignées tumorales humaines ce qui en fait une cible intéressante pour une thérapie ciblée.⁴¹

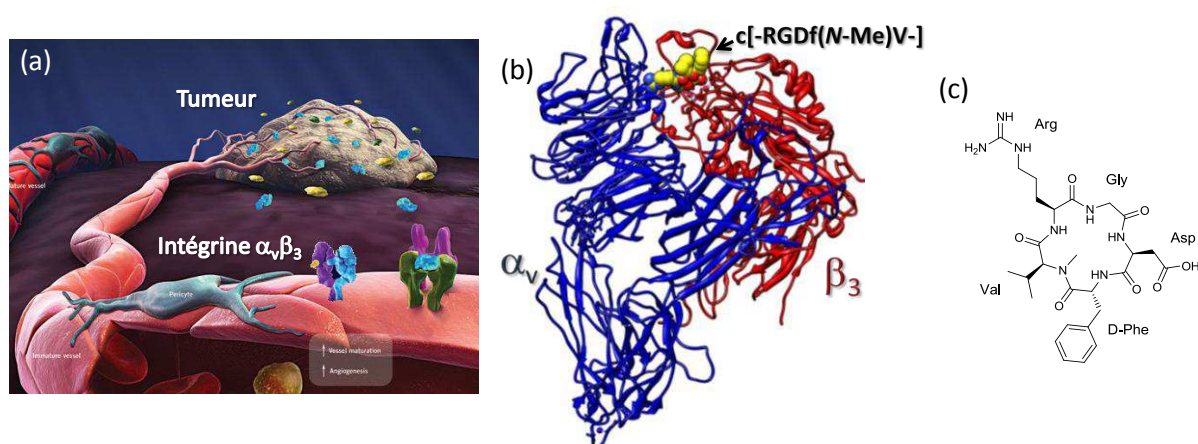


Figure 10 : (a) Schéma de la néoangiogénèse tumorale² (b) Représentation de la structure du domaine extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ associée au ligand c[-RGDf(N-Me)V-]⁴² (c) Structure du Cilengitide c[-RGDf(N-Me)V-].

De nombreux peptides linéaires présentant la séquence -RGD- ont été développés mais ces composés se sont révélés peu affins et peu spécifique in vivo.⁴³ En effet, les peptides linéaires peuvent adopter différentes conformations ce qui diminue l'affinité avec le récepteur. Ils peuvent aussi être rapidement dégradés par les protéases ce qui diminue leur biodisponibilité. Des études se sont donc portées sur le développement de peptides cycliques de conformation réduite présentant le motif -RGD-. De nombreux penta- et hexapeptides cycliques ont été conçus puis évalués par des tests d'affinité pour diverses intégrines.⁴⁴ Ces tests d'affinité ont permis la sélection d'un cyclopentapeptide, le c[-RGDfV-] possédant une très bonne affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ purifiée (IC_{50} 50 nM en compétition avec la

⁴¹ Ferrara, N.; Kerbel, R. S., Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **2005**, 438 (7070), 967-974.

⁴² Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R. G.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Aranout, 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 (5565), 151-155.

⁴³ 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 F-18-labelled linear peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2002**, 29 (6), 754-759.

⁴⁴ 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 (3), 911-21.

vitronectine), comparable à l'affinité de la vitronectine.⁴⁵ Une autre particularité de ce peptide provient de sa très bonne sélectivité pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. D'autres dérivés ont ensuite été développés comme le dérivé N α -méthylé sur le résidu Valine qui s'est révélé être le plus affin et le plus sélectif pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (IC₅₀ 0,58 nM en compétition avec la vitronectine).⁴⁶ Ce cyclopentapeptide c[-RGDf(N-Me)V-] est actuellement évalué, sous le nom de Cilengitide (Merck KGaA), dans des études cliniques de phases II et III pour le traitement de glioblastomes multiformes, de mélanomes de stades avancés et de cancers métastasés de la prostate.

Les propriétés des cyclopentapeptides -RGD- ont été largement étudiées grâce à des analogues du Cilengitide radiomarqués. Parmi ceux-ci, le c[-RGDyV-] radiomarqué à ¹²⁵I a montré une accumulation rapide et importante du composé au niveau de la tumeur (2-4 % ID/g en 10 min).⁴⁷ Ces cyclopentapeptides -RGD- ont été très largement utilisés pour la vectorisation d'éléments thérapeutiques et de détection (Tableau 3). L'un des premiers bioconjugué évalué fut le conjugué doxorubicine-RGD qui a montré une activité similaire à la doxorubicine libre tout en diminuant la toxicité au niveau du foie et du cœur. Depuis de nombreux peptides -RGD- conjugués avec des agents cytotoxiques ont été développés et testés avec succès en clinique. Dans le domaine de l'imagerie, une multitude de conjugués peptides -RGD- ont été conçus et évalués en clinique. La nature du conjugué dépend de la technique d'imagerie. Les premières études réalisées en TEP utilisaient des peptides RGD couplés avec un ¹⁸F-Galactose. Cependant la durée de vie du ¹⁸F étant relativement courte, d'autres alternatives furent développées. La stratégie la plus prometteuse est d'utiliser le ⁶⁴Cu qui a une durée de vie plus longue que le ¹⁸F. Pour cela le peptide RGD doit être couplé avec un composé permettant la chélation du Cuivre comme le DOTA ou le Cyclam. Les conjugués RGD-DOTA furent aussi utilisés pour chélater le Gadolinium utilisé comme agent de contraste en IRM. L'imagerie optique peut être aussi utilisée pour détecter des tumeurs en conjuguant le peptide -RGD- avec des fluorophores proche-infrarouge. Récemment, Ruoslahti et coll. ont montré que la coadministration du composé iRGD améliore l'efficacité des agents anticancéreux en augmentant la perméabilité des vaisseaux et des tissus.⁴⁸ Ce phénomène permet de diminuer les effets secondaires de la chimiothérapie et ne nécessite aucune conjugaison chimique entre le peptide et le composé actif.

⁴⁵ 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 (32), 20233-8.

⁴⁶ Goodman, S. L.; Holzemann, G.; Sulyok, G. A.; Kessler, H., Nanomolar small molecule inhibitors for alphav(beta)6, alphav(beta)5, and alphav(beta)3 integrins. *J Med Chem* **2002**, 45 (5), 1045-51.

⁴⁷ Haubner, R.; Wester, H. J.; Reuning, U.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Diefenbach, B.; Kessler, H.; Stocklin, G.; Schwaiger, M., Radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin antagonists: A new class of tracers for tumor targeting. *J Nucl Med* **1999**, 40 (6), 1061-1071.

⁴⁸ Sugahara, K. N.; Teesalu, T.; Karmali, P. P.; Kotamraju, V. R.; Agemy, L.; Greenwald, D. R.; Ruoslahti, E., Coadministration of a Tumor-Penetrating Peptide Enhances the Efficacy of Cancer Drugs. *Science* **2010**, 328 (5981), 1031-1035.

Conjugués	Description	Référence
RGD-Doxorubicine	Agent cytotoxique	49
RGD-cisplatine	Agent cytotoxique	50
RGD-Paclitaxel	Agent cytotoxique	51
RGD-(KLAKLAK)	Peptide pro-apoptotique	52
RGD-Fc	Fragment Fc d'un IgG	53
RGD-Galacto- ¹⁸ F	Imagerie TEP	54
RGD- ^{99m} Tc	Radio traceur	55
RGD-DOTA-[⁶⁴ Cu]	Imagerie TEP	56
RGD-DOTA-[Gd]	Imagerie IRM	57
RGD-Cyanine5	Imagerie optique	58

Tableau 3 : Exemples de conjugues peptide –RGD-

★ Ciblage des cancers avec les aptamères

Les aptamères sont des oligonucléotides de 15 à 100 nucléotides sélectionnés à partir d'une banque combinatoire de séquences selon leur aptitude à reconnaître une cible. Cette technologie de production d'aptamère nommé SELEX a été mise au point par Tuerk et al. et Ellington et al. en 1990.^{59,60} Les aptamères présentent des affinités et spécificités comparables

⁴⁹ Arap, W.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E., Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* **1998**, 279 (5349), 377-380.

⁵⁰ Mukhopadhyay, S.; Barnes, C. M.; Haskel, A.; Short, S. M.; Barnes, K. R.; Lippard, S. J., Conjugated platinum(IV)-peptide complexes for targeting angiogenic tumor vasculature. *Bioconj Chem* **2008**, 19 (1), 39-49.

⁵¹ Chen, X. Y.; Plasencia, C.; Hou, Y. P.; Neamati, N., Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery. *J Med Chem* **2005**, 48 (4), 1098-1106.

⁵² Ellerby, H. M.; Arap, W.; Ellerby, L. M.; Kain, R.; Andrusiak, R.; Del Rio, G.; Krajewski, S.; Lombardo, C. R.; Rao, R.; Ruoslahti, E., et al., Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* **1999**, 5 (9), 1032-1038.

⁵³ Li, J. J.; Ji, J. F.; Holmes, L. M.; Burgin, K. E.; Barton, L. B.; Yu, X. Z.; Wagner, T. E.; Wei, Y. Z., Fusion protein from RGD peptide and Fc fragment of mouse immunoglobulin G inhibits angiogenesis in tumor. *Cancer Gene Ther* **2004**, 11 (5), 363-370.

⁵⁴ 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)beta(3) integrin expression using F-18-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res* **2001**, 61 (5), 1781-1785.

⁵⁵ Su, Z.; Liu, G. Z.; Gupta, S.; Zhu, Z. H.; Rusckowski, M.; Hnatowich, D. J., In vitro and in vivo evaluation of a technetium-99m-labeled cyclic RGD peptide as a specific marker of alpha(V)beta(3) integrin for tumor imaging. *Bioconj Chem* **2002**, 13 (3), 561-570.

⁵⁶ Wu, Y.; Zhang, X. Z.; Xiong, Z. M.; Cheng, Z.; Fisher, D. R.; Liu, S.; Gambhir, S. S.; Chen, X. Y., microPET imaging of glioma integrin alpha(V)beta(3) expression using Cu-64-labeled tetrameric RGD peptide. *J Nucl Med* **2005**, 46 (10), 1707-1718.

⁵⁷ Park, J. A.; Lee, J. J.; Jung, J. C.; Yu, D. Y.; Oh, C.; Ha, S.; Kim, T. J.; Chang, Y. M., Gd-DOTA Conjugate of RGD as a Potential Tumor-Targeting MRI Contrast Agent. *ChemBioChem* **2008**, 9 (17), 2811-2813.

⁵⁸ Jin, Z. H.; Jossierand, V.; Razkin, J.; Garanger, E.; Boturyn, D.; Favrot, M. C.; Dumy, P.; Coll, J. L., Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)(4). *Mol Imaging* **2006**, 5 (3), 188-197.

⁵⁹ Tuerk, C.; Gold, L., Systematic evolution of ligands by exponential enrichment - RNA ligands to bacteriophage-T4 DNA-polymerase. *Science* **1990**, 249 (4968), 505-510.

à celles des anticorps pour des molécules variées comme les acides aminés, antibiotiques, motifs ARN ou ADN, protéines. La liaison de l'aptamère à sa cible induit un réarrangement plus ou moins important de l'oligonucléotide avec l'adoption d'une nouvelle structure intégrant la cible. La richesse structurale des oligonucléotides permet de comprendre leur efficacité en tant que ligands et leur utilisation dans de nombreux domaines comme l'étude des interactions entre acides nucléiques et protéines, la détection, la purification, l'imagerie de cibles moléculaires ou la régulation de l'expression des gènes.

Plusieurs dizaines d'aptamères à visée thérapeutique sont actuellement en développement contre diverses pathologies (cancer, inflammation, maladies auto-immunes) et ont montré des effets positifs sur des modèles animaux.⁶¹ Une dizaine d'aptamères sont en phase d'essai clinique, et un aptamère dirigé contre le facteur d'angiogenèse VEGF a obtenu l'approbation de la FDA et de l'Union Européenne pour traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge.⁶² Par ailleurs, le faible poids moléculaire des aptamères, leur bonne délivrance tissulaire et leur clairance sanguine rapide en font de bons candidats pour l'imagerie. Le développement de méthodes de conjugaison des oligonucléotides aux nanoparticules, associé aux techniques d'imagerie a ouvert une voie au développement des aptamères comme outils pour l'imagerie moléculaire *in vivo*.^{63,64}

I.2.3. Anticorps monoclonaux versus petits ligands

Quels types d'agents de ciblage doivent être privilégiés ? Les anticorps monoclonaux ou les autres ligands ? Tous deux présentent à la fois des avantages et des inconvénients. Les ligands non-mAb sont des composés relativement simples donc peu coûteux à produire et facilement fonctionnalisables. Leur principal inconvénient provient parfois de leur manque de sélectivité. Les ligands comme les peptides RGD, les folates ou les transferrines peuvent parfois se lier à des tissus non-ciblés. Grâce aux récentes avancées des technologies Phage-Display, les mAbs peuvent être sélectionnés pour présenter un haut degré de spécificité et une excellente affinité avec le tissu ciblé. Certains mAbs comme le Rituximab possèdent une cytotoxicité intrinsèque grâce à leur capacité à induire une réponse immunitaire. L'utilisation de ces mAbs en synergie avec la chimiothérapie permet de traiter les tumeurs par deux voies différentes ce qui améliore l'efficacité du traitement. Malgré les nombreuses avancées technologiques dans la production de mAb, ces composés sont limités par leur coût de production élevé, leur stabilité durant le stockage et leur fonctionnalisation parfois difficile.

⁶⁰ Ellington, A. D.; Szostak, J. W., *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**, 346 (6287), 818-822.

⁶¹ Keefe, A. D.; Pai, S.; Ellington, A., Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, 9 (7), 537-550.

⁶² Gragoudas, E. S.; Adamis, A. P.; Cunningham, E. T.; Feinsod, M.; Guyer, D. R.; Neova, V. I. S. O., Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **2004**, 351 (27), 2805-2816.

⁶³ Hwang, D. W.; Ko, H. Y.; Lee, J. H.; Kang, H.; Ryu, S. H.; Song, I. C.; Lee, D. S.; Kim, S., A Nucleolin-Targeted Multimodal Nanoparticle Imaging Probe for Tracking Cancer Cells Using an Aptamer. *J Nucl Med* **2010**, 51 (1), 98-105.

⁶⁴ Lee, J. H.; Yigit, M. V.; Mazumdar, D.; Lu, Y., Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates. *Adv Drug Deliver Rev* **2010**, 62 (6), 592-605.

I.3. Les vecteurs cellulaires

Il existe principalement trois familles de vecteurs cellulaires : les nanoparticules qui exploitent les anomalies des tissus cancéreux, les peptides de translocations (CPP) permettant l'entrée cellulaire et des systèmes plus complexes comme les vecteurs viraux. Pour délivrer un composé vers une cellule, le choix du système doit tenir compte de la nature de la cellule ciblée ainsi que la nature de la molécule à vectoriser.

I.3.1. Les Nanoparticules

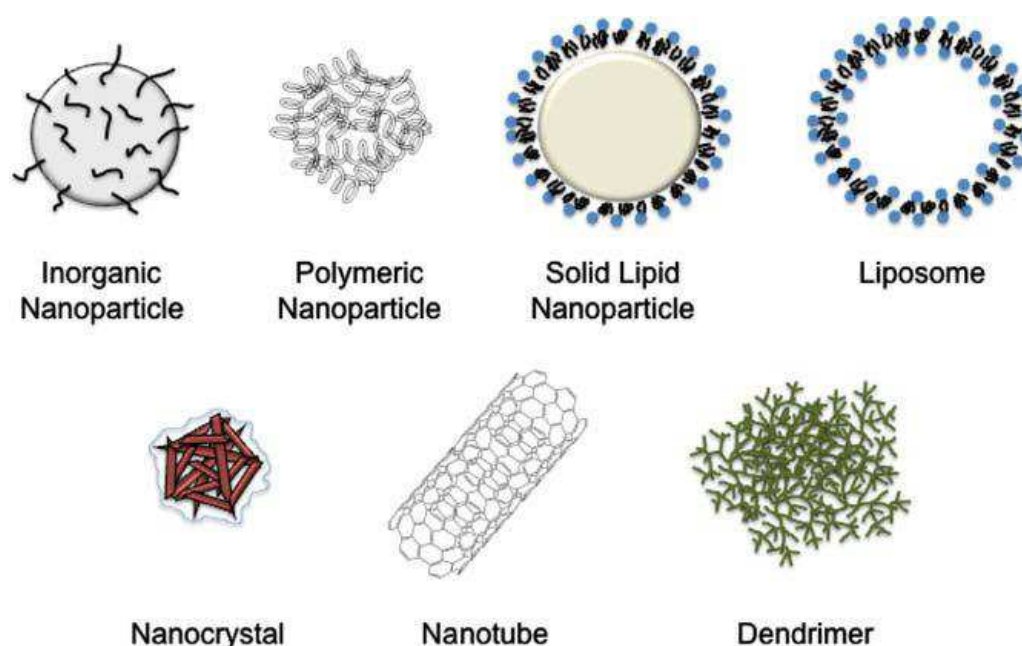


Figure 11 : Types de nano-vecteur ⁶⁶

Les importantes avancées en nanotechnologie ont permis de développer des systèmes de nanovecteurs dans le domaine de l'imagerie et la thérapie anticancéreuse. Les nanoparticules sont des composés de taille comprise entre 5 et 200 nm. Leur utilisation offre un meilleur contrôle pharmacocinétique et permet une biodistribution de molécules à délivrer en grande quantité. Ces vecteurs permettent de protéger le composé jusqu'à sa cible en limitant sa dégradation et en diminuant leurs interactions prématurées avec l'environnement. Par ailleurs, leur taille conséquente diminue fortement leur clairance rénale ce qui induit une durée de vie dans le plasma de plusieurs jours. Le ciblage passif exploite les caractéristiques physiologiques des tumeurs qui permettent aux nanovecteurs de s'accumuler dans la tumeur par effet EPR (enhanced permeability and retention).⁶⁵ Cet effet spécifique aux tissus tumoraux est dû à la grande perméabilité des vaisseaux sanguins et au dysfonctionnement du drainage lymphatique. Ainsi, l'absorption du médicament dans les tissus ainsi que sa distribution au niveau des tumeurs sont améliorées de manière significative. Plusieurs types

⁶⁵ Matsumura, Y.; Maeda, H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer-chemotherapy-mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* **1986**, 46 (12), 6387-6392.

de nano-vecteurs ont été développés comme les polymères, les particules polymériques, les nanotubes de carbone, les nanoparticules inorganiques, les dendrimères et les liposomes (Figure 11).⁶⁶ Selon la nature du nanovecteur, le composé à délivrer peut être soit directement greffé par lien covalent (polymère, micelle, dendrimère), soit encapsulé à l'intérieur d'une cavité dans le cas des liposomes ou autres particules polymériques. Ces nano-vecteurs ont été étudiés pour une grande variété d'applications comme la vectorisation d'anticancéreux, l'imagerie, l'ablation ou l'irradiation des tumeurs (Tableau 4).⁶⁷ Cependant, la taille importante des nanovecteurs présente quelques limitations car certaines tumeurs solides ne présentent pas l'effet EPR ce qui a pour conséquence de réduire fortement la biodistribution et la rétention du médicament. Par ailleurs, ces vecteurs étant uniquement guidés par une vectorisation passive présentent une très faible spécificité envers les cellules tumorales. Pour compenser ces inconvénients, la surface des nanovecteurs peut être modifiée par des ligands afin qu'ils interagissent spécifiquement avec les cellules tumorales (cf. p31).

Type de nano-vecteur	Molécule vectorisée	Nom commercial	Description
Styrene (polymère)	Neocarzinostatin (protéine)	Zinostatin/Stimalmer	Cancer des hépatocytes
PEG	L-asparaginase	Oncaspar	Leucémie lymphoïde chronique
Liposomes	Doxorubicine	Myocet	Cancer du sein récurrent et Sarcome de Kaposi
Nanoparticule d'albumine	Paclitaxel	Abraxane	Cancer métastatique du sein

Tableau 4 : Exemples de nanovecteurs conjugués sur le marché

I.3.2. Peptides et protéines de translocations

Durant les dix dernières années, un certain nombre de peptides ayant la particularité de traverser les membranes cellulaires ont été identifiés. Certains de ces peptides appelés CPP (Cell Penetrating Peptide)⁶⁸ sont relativement courts (10 à 27 résidus) et proviennent d'origines diverses (Tableau 5). Certains ont été inspirés par des séquences de protéines naturelles comme des protéines de surface de virus et de bactéries, alors que d'autres sont purement synthétiques.

⁶⁶ Faraji, A. H.; Wipf, P., Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17 (8), 2950-2962.

⁶⁷ Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; FaroKhazad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R., Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* **2007**, 2 (12), 751-760.

⁶⁸ (a) Lindgren, M.; Hallbrink, M.; Prochiantz, A.; Langel, U., Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* **2000**, 21 (3), 99-103; (b) Tamsamani, J.; Vidal, P., The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Drug Discov Today* **2004**, 9 (23), 1012-1019.

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

Tableau 5 : Exemples d'agents de translocation

Ces agents de translocation ont été conjugués à une grande variété de composés dans le but de permettre leur pénétration intracellulaire.⁶⁹ Ainsi, ils ont permis la vectorisation cellulaire de petites molécules, de peptides, de protéines, d'acides nucléiques⁷⁰ ou de nanoparticules.⁷¹ Bien que ces systèmes aient montré une certaine efficacité de vectorisation *in vitro* et *in vivo*, ils ne possèdent aucune spécificité envers les tissus tumoraux. Les CPP interagissent potentiellement avec toutes les membranes cellulaires et ne peuvent être utilisés seuls dans une stratégie anticancéreuse.

I.3.1. Vecteurs viraux

Les virus sont des microorganismes qui sont capables de libérer leur matériel génétique et de se répliquer en utilisant le système cellulaire de la cellule hôte. Ces dix dernières années, les vecteurs viraux ont pris de l'importance notamment dans le domaine de l'oncologie. Cependant, l'utilisation des virus en thérapie nécessite un grand nombre de modifications. Premièrement le virus doit être non pathogène tout en gardant son activité infectieuse contre les cellules humaines. Pour rendre ces virus spécifiques aux cellules tumorales, la surface des virus peut être modifiée en greffant divers ligands comme des mAb⁷² ou des peptides RGD⁷³ reconnaissant spécifiquement des antigènes tumoraux ou des récepteurs membranaires (Figure 12a). Une fois reconnu le virus pénètre à l'intérieur de la cellule cible et libère son matériel génétique pouvant induire une apoptose ou activer les systèmes immunitaires via le système MHC (Figure 12b). Cette stratégie a été employée avec succès : de nombreux virus oncolitiques sont actuellement en phase clinique. Le seul succès

⁶⁹ Gupta, B.; Levchenko, T. S.; Torchilin, V. P., Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliver Rev* **2005**, 57 (4), 637-651.

⁷⁰ Hassane, F. S.; Saleh, A. F.; Abes, R.; Gait, M. J.; Lebleu, B., Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cell Mol Life Sci* **2010**, 67 (5), 715-726.

⁷¹ Torchilin, V. P.; Rammohan, R.; Weissig, V.; Levchenko, T. S., TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, 98 (15), 8786-8791.

⁷² Tai, C. K.; Logg, C. R.; Park, J. M.; Anderson, W. F.; Press, M. F.; Kasahara, N., Antibody-mediated targeting of replication-competent retroviral vectors. *Hum Gene Ther* **2003**, 14 (8), 789-802.

⁷³ (a) Gollan, T. J.; Green, M. R., Redirecting retroviral tropism by insertion of short, nondisruptive peptide ligands into envelope. *J Virol* **2002**, 76 (7), 3558-3563; (b) Borovjagin, A. V.; Krendelchtchikov, A.; Ramesh, N.; Yu, D. C.; Douglas, J. T.; Curiel, D. T., Complex mosaicism is a novel approach to infectivity enhancement of adenovirus type 5-based vectors. *Cancer Gene Ther* **2005**, 12 (5), 475-486.

clinique est celui de l'adenovirus oncolitique Onyx-15, approuvé uniquement par la Chine en 2005, utilisé dans les traitements du cancer du cou et de la tête.⁷⁴

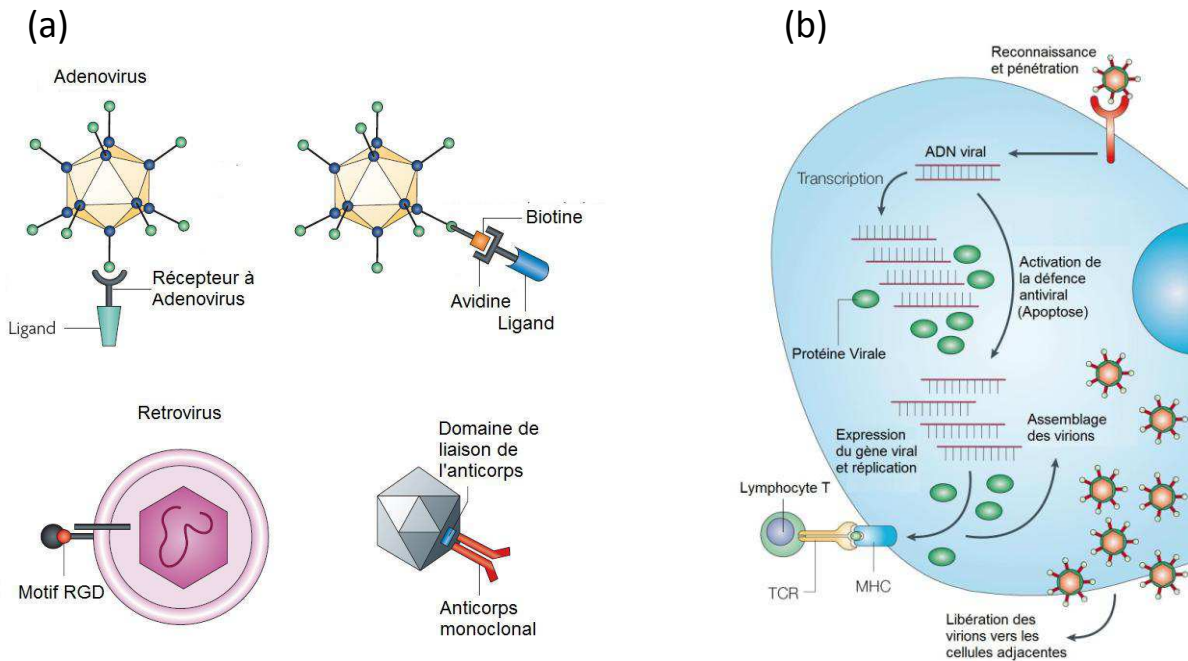


Figure 12 : (a) Schéma de virus modifiés pour le ciblage⁷⁵ (b) Mode d'action des virus oncotiques⁷⁶

⁷⁴ Khuri, F. R.; Nemunaitis, J.; Ganly, I.; Arseneau, J.; Tannock, I. F.; Romel, L.; Gore, M.; Ironside, J.; MacDougall, R. H.; Heise, C., et al., A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* **2000**, 6 (8), 879-885.

⁷⁵ Waehler, R.; Russell, S. J.; Curiel, D. T., Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **2007**, 8 (8), 573-587.

⁷⁶ Parato, K. A.; Senger, D.; Forsyth, P. A. J.; Bell, J. C., Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* **2005**, 5 (12), 965-976.

II. État de l'art sur l'amélioration des vecteurs

Les vecteurs cellulaires et les agents de ciblage présentent différentes limitations comme la spécificité, la biodisponibilité, l'affinité ou le coût de production. De nombreuses méthodes ont donc été développées dans l'optique d'optimiser les vecteurs pour une stratégie ciblée en cancérologie.

II.1. Méthodes d'optimisation des anticorps monoclonaux

II.1.1. Conception de fragments de mAb par voie biologique

Comme il a été démontré précédemment, le principal défaut des anticorps monoclonaux est notamment dû à leur taille conséquente qui limite la pénétration intra-tumorale. De plus, leur longévité dans le sérum n'est pas souhaitable dans les cas de radioimmunothérapie ou d'imagerie car il provoquerait une irradiation des tissus sains ainsi qu'une mauvaise résolution. Les nombreux progrès dans le domaine de l'ADN recombinant ont permis de contourner ces problèmes en produisant des fragments d'anticorps.

Les premiers fragments étudiés ont été les scFv (single chain Fragment variable) qui sont composés du domaine variable de la chaîne lourde et légère reliés entre eux par un bras espaceur flexible. Ces fragments, bien que présentés de façon monovalente, ont la particularité de garder les propriétés de reconnaissance de l'anticorps entier en termes de spécificité et d'affinité.⁷⁷ Leur taille réduite permet ainsi une meilleure biodisponibilité au niveau des tumeurs comparée aux IgG entiers. Cependant, ce bénéfice est contrebalancé par une durée de vie trop courte dans le sérum (2 h) et, par conséquent, la disponibilité de ces fragments pour atteindre leur cible (antigènes...) est nettement diminuée. Ces fragments ont des propriétés idéales pour l'imagerie mais sont par contre inefficaces pour la thérapie.

Afin d'augmenter la durée de vie de ces fragments dans le sérum, plusieurs stratégies alternatives ont été menées, la plus prometteuse étant la conjugaison d'un polymère soluble comme les PEG ou l'albumine. La conjugaison de ces fragments au PEG permet d'augmenter considérablement la taille et ainsi diminuer la clairance dans le sang ($t_{1/2}$ =14 jours).⁷⁸ Cette modification confère au fragment une meilleure stabilité et une immunogénicité moindre mais peut parfois altérer l'affinité du fragment à son antigène. D'autres études ont montré que le remplacement du PEG par de l'albumine du sérum humain permettait d'augmenter le temps de demi-vie sans affecter l'activité du fragment.⁷⁹

⁷⁷ Bird, R. E.; Hardman, K. D.; Jacobson, J. W.; Johnson, S.; Kaufman, B. M.; Lee, S. M.; Lee, T.; Pope, S. H.; Riordan, G. S.; Whitlow, M., Single-Chain Antigen-Binding Proteins. *Science* **1988**, 242 (4877), 423-426.

⁷⁸ Nelson, A. L.; Reichert, J. M., Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat Biotechnol* **2009**, 27 (4), 331-337.

⁷⁹ Huhlov, A.; Chester, K. A., Engineered single chain antibody fragments for radioimmunotherapy. *Q J Nucl Med Mol Im* **2004**, 48 (4), 279-288.

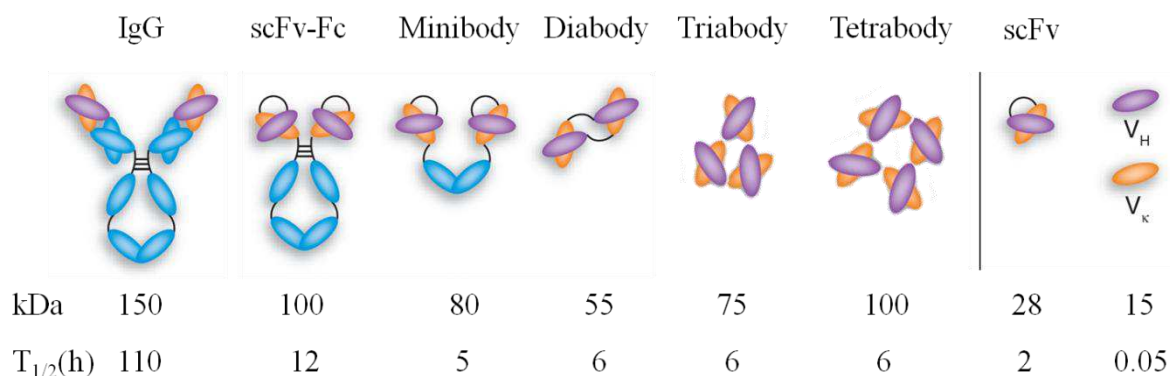


Figure 13 : Comparaison des différents anticorps et leur temps de $\frac{1}{2}$ vie respectif ⁸¹

D'autres paramètres importants doivent aussi être pris en compte comme la valence. En effet les anticorps sont des systèmes bivalents ce qui a pour effet d'augmenter l'affinité envers sa cible. La conception de fragments multivalents (Diabody, Triabody, Tetrabody) ⁸⁰ ont montré une meilleure affinité pour l'antigène, une meilleure rétention aux niveaux des tumeurs ainsi qu'une durée de vie plus longue due à l'augmentation de la taille (Figure 13). ⁸¹ De manière générale, la multimérisation est un bon compromis entre le temps de vie dans le sérum, la pénétration tumorale et l'affinité pour l'épitope (Figure 14).

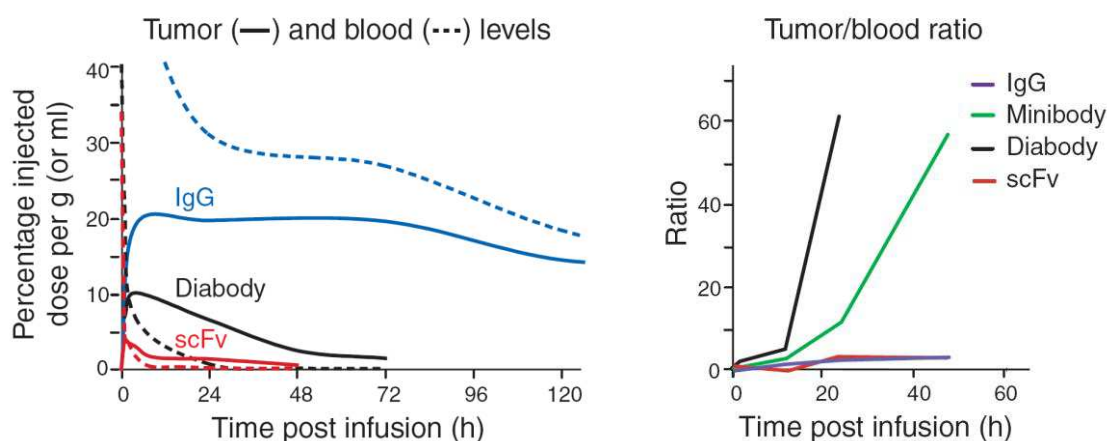


Figure 14 : Biodistribution de différents formats de mAb ⁸¹

Le développement de fragments d'anticorps a permis de concevoir des fragments, dits bispécifiques pouvant reconnaître deux antigènes spécifiques différents. De nombreux fragments recombinés comme les minibodies ⁸² ou les diabody bispécifiques ⁸³ ont été

⁸⁰ Todorovska, A.; Roovers, R. C.; Dolezal, O.; Kortt, A. A.; Hoogenboom, H. R.; Hudson, P. J., Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods* **2001**, 248 (1-2), 47-66.

⁸¹ Holliger, P.; Hudson, P. J., Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **2005**, 23 (9), 1126-1136.

⁸² Hu, S. Z.; Shivery, L.; Raubitschek, A.; Sherman, M.; Williams, L. E.; Wong, J. Y. C.; Shively, J. E.; Wu, A. M., Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-C(H)3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res* **1996**, 56 (13), 3055-3061.

⁸³ Holliger, P.; Prospero, T.; Winter, G., Diabodies - small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**, 90 (14), 6444-6448.

développés et utilisés selon différentes stratégies.⁸⁴ La voie la plus intéressante est de concevoir un fragment pouvant reconnaître simultanément un récepteur tumoral et une cellule immunitaire dans le but d'activer la lyse cellulaire. Les minibodies ont été créés selon ce concept, ces derniers sont des composés bivalents (2 scFv) comportant une partie de la région Fc d'un mAb pouvant activer le système immunitaire. De nombreux minibodies sont actuellement en tests cliniques et représentent un bon compromis entre un anticorps entier et un fragment de petite taille.

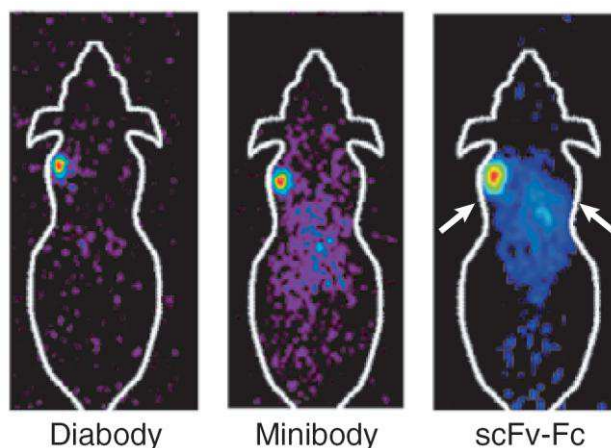


Figure 15 : Comparaison d'imagerie TEP de souris présentant un cancer du colon après 18h d'infusion de radiotracteur ^{124}I conjugué au Diabody, minibody ou scFV-Fc⁸¹

En ce qui concerne leur utilisation en tant que vecteur ciblé pour la thérapie, les fragments d'anticorps ont été conjugués avec diverses immunotoxines ou cytokines⁸⁵ mais leur temps de vie dans le sérum étant relativement court, cette stratégie est actuellement peu exploitée. Par contre, dans le domaine de l'imagerie, ces fragments ont eu un certain succès clinique grâce à leur rapide clairance dans le sang ainsi qu'une biodisponibilité accrue. Les fragments multivalents comme les diabodies ou les minibodies conjugués aux composés radioactifs (^{124}I , ^{64}Cu) ont montré de très bonnes résolutions en imagerie PET (Figure 15).⁸⁶

II.1.2. Conception de mimes de CDR par voie chimique

Afin de moduler les différentes propriétés des anticorps monoclonaux, des approches entièrement synthétiques ont été envisagées comme alternatives aux méthodes biologiques. Bien qu'intéressante, il existe très peu d'exemples dans la littérature qui utilisent cette voie chimique pour concevoir des mimes d'anticorps. Comme il a été mentionné précédemment, l'interaction antigène-anticorps se fait via des séquences précises du domaine variable appelé CDR (Complementary Determining Region). Les études menées par Park et al. se sont portées sur la conception de peptides cycliques pouvant mimer l'une des boucles CDR d'un anticorps (Herceptin) ciblant les récepteurs HER-2.⁸⁷ En se basant sur la séquence et la

⁸⁴ Hollander, N., Bispecific antibodies for cancer therapy. *Immunotherapy* **2009**, 1 (2), 211-222.

⁸⁵ Kaspar, M.; Trachsel, E.; Neri, D., The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Res* **2007**, 67 (10), 4940-8.

⁸⁶ Olafsen, T.; Wu, A. M., Antibody Vectors for Imaging. *Semin Nucl Med* **2010**, 40 (3), 167-181.

⁸⁷ Park, B. W.; Zhang, H. T.; Wu, C. J.; Berezov, A.; Zhang, X.; Dua, R.; Wang, Q.; Kao, G.; O'Rourke, D. M.; Greene, M. I., et al., Rationally designed anti-HER2/neu peptide mimetic disables p185(HER2/neu) tyrosine kinases in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* **2000**, 18 (2), 194-198.

structure de la boucle CDRH3, différents peptides ont été synthétisés et un de ces peptides a montré des activités similaires à l'anticorps d'origine. Une autre étude suivant la même approche s'est portée sur un anticorps anti-TNF α .⁸⁸ Dans cette étude, Feng et al ont utilisé l'analyse cristallographique du complexe mAb-TNF et des techniques de modélisation pour concevoir un peptide pouvant mimer l'activité de l'anticorps. Ce peptide présentant une séquence similaire à la boucle CDRH2 n'a pas montré d'aussi bonnes activités in vitro que l'anticorps de référence. Ces stratégies de mimes d'anticorps sont basées sur la structure d'une seule boucle hypervariable parmi les six présentes sur le domaine variable de l'anticorps. L'interaction antigène-anticorps se fait via plusieurs boucles CDR, généralement 3 ou 4. Concevoir un mème d'anticorps en tenant compte des résidus des différentes boucles permettrait ainsi d'augmenter l'affinité envers l'antigène. Casset et al. ont conçu un peptide cyclique formé par la juxtaposition de résidu provenant des 5 boucles CDR d'un anticorps anti-CD4.⁸⁹ Ce peptide de 27 résidus possède une affinité pour sa cible (CD4) supérieure à l'anticorps d'origine (0.9 nM). Malheureusement, les tests in vitro n'ont pas été concluants et ont montré une faible activité biologique.

Dernièrement, Timmerman et al. ont élaboré une nouvelle approche plus complexe permettant de concevoir des mimes de mAb possédant une activité anticancéreuse in vivo.⁹⁰ En s'appuyant sur une stratégie combinatoire, différents fragments peptidiques provenant de différentes boucles CDR sont disposés puis cyclisés sur un « template » (Figure 16). Plusieurs macromolécules comportant de une à trois boucles de CDR différentes ont pu être synthétisées puis testées in vitro ainsi qu'in vivo. Malgré des constantes d'affinité relativement faibles comparées au mAb (K_D de l'ordre du μM) certains de ces assemblages peptidiques ont présenté des activités anti-tumorales in vivo.

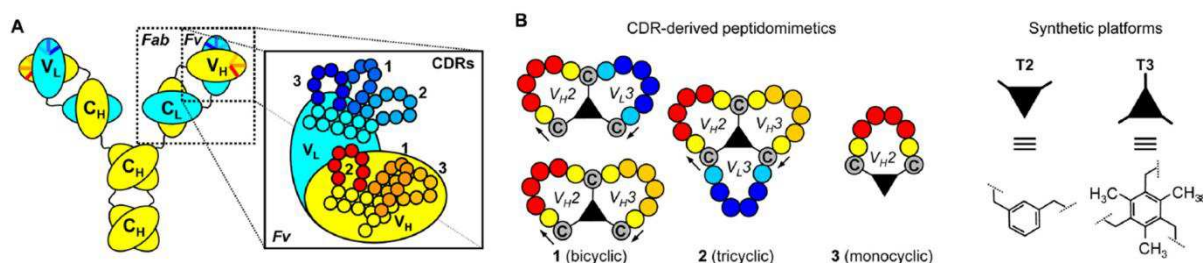


Figure 16 : Structure d'un mAb et des peptidomimétiques dérivés de CDR⁹⁰

⁸⁸ Feng, J. N.; Li, Y.; Zhang, W.; Shen, B. F., Rational design of potent mimic peptide derived from monoclonal antibody: antibody mimic design. *Immunol Lett* **2005**, 98 (2), 311-316.

⁸⁹ Casset, F.; Roux, F.; Mouchet, P.; Bes, C.; Chardes, T.; Granier, C.; Mani, J. C.; Pugnieri, M.; Laune, D.; Pau, B., et al., A peptide mimetic of an anti-CD4 monoclonal antibody by rational design. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, 307 (1), 198-205.

⁹⁰ Timmerman, P.; Barderas, R.; Desmet, J.; Altschuh, D.; Shochat, S.; Hollestelle, M. J.; Hoppener, J. W. M.; Monasterio, A.; Casal, J. I.; Meloen, R. H., A Combinatorial Approach for the Design of Complementarity-determining Region-derived Peptidomimetics with in Vitro Anti-tumoral Activity. *J Biol Chem* **2009**, 284 (49), 34126-34134.

II.2. Conception de vecteurs multivalents

II.2.1. L'effet de multivalence

Au lieu d'augmenter la force d'interaction entre un ligand et son récepteur, la nature utilise le plus souvent des systèmes multivalents afin d'améliorer l'affinité de manière considérable. Ces interactions multiples jouent souvent un rôle crucial dans les systèmes biologiques. Elles permettent d'induire des réponses spécifiques qui ne peuvent pas être observées dans le cas d'une interaction monovalente. Ce système rentre en jeu dans de nombreux mécanismes biologiques comme les réponses immunitaires, l'adhérence des membranes cellulaires, la transduction du signal, l'endocytose, et plusieurs systèmes enzymatiques.⁹¹ L'effet de multivalence dans les phénomènes de reconnaissance peut s'expliquer selon différents mécanismes.⁹²

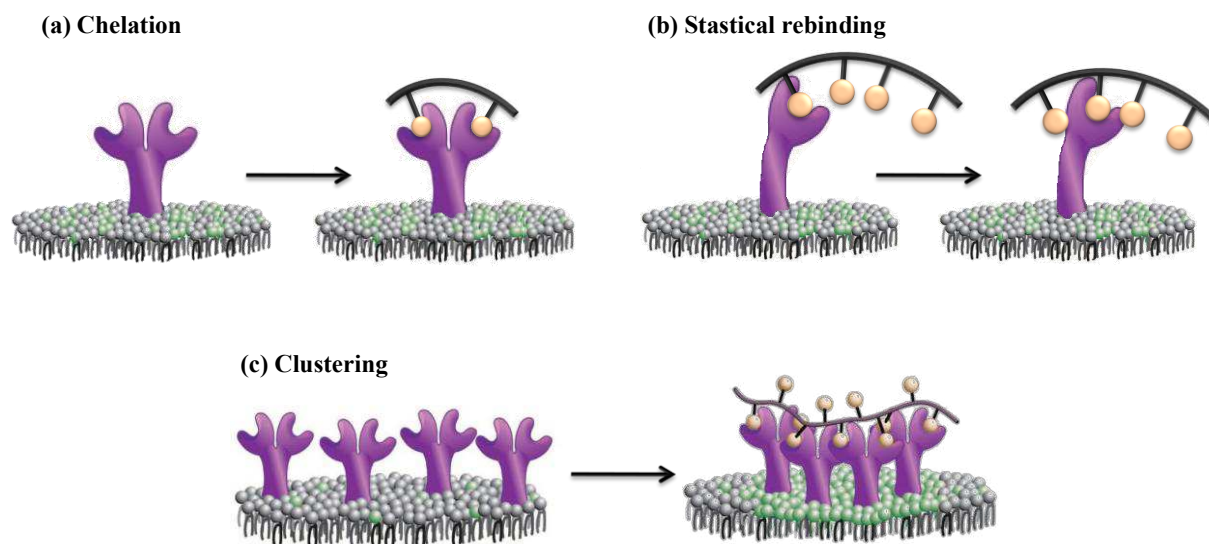


Figure 17 : Mécanismes impliqués dans la reconnaissance d'un ligand multivalent par sa cible

L'effet de « chélation » met en jeu un ligand multivalent interagissant avec un récepteur possédant plusieurs sites de liaison comme les anticorps ou les lectines (Figure 17a). L'effet de « statistical rebinding » fait intervenir un ligand multivalent dont les différentes unités peuvent se lier successivement sur le même site de liaison (Figure 17b). Ce phénomène est dû à la concentration locale élevée du ligand à proximité du récepteur. Ces deux effets induisent une augmentation de l'affinité apparente grâce à une diminution de l'énergie d'association du couple ligand-récepteur. Pour finir, l'effet « cluster » met en jeu un ligand multivalent interagissant avec de multiples récepteurs à la surface de la cellule (Figure 17c). Ce processus est facilité par la fluidité de la bicouche lipidique et permet de créer un « cluster » de récepteur pouvant induire un phénomène cellulaire comme l'endocytose.⁹³ Cet

⁹¹ Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M., Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew Chem Int Ed* **1998**, 37 (20), 2755-2794.

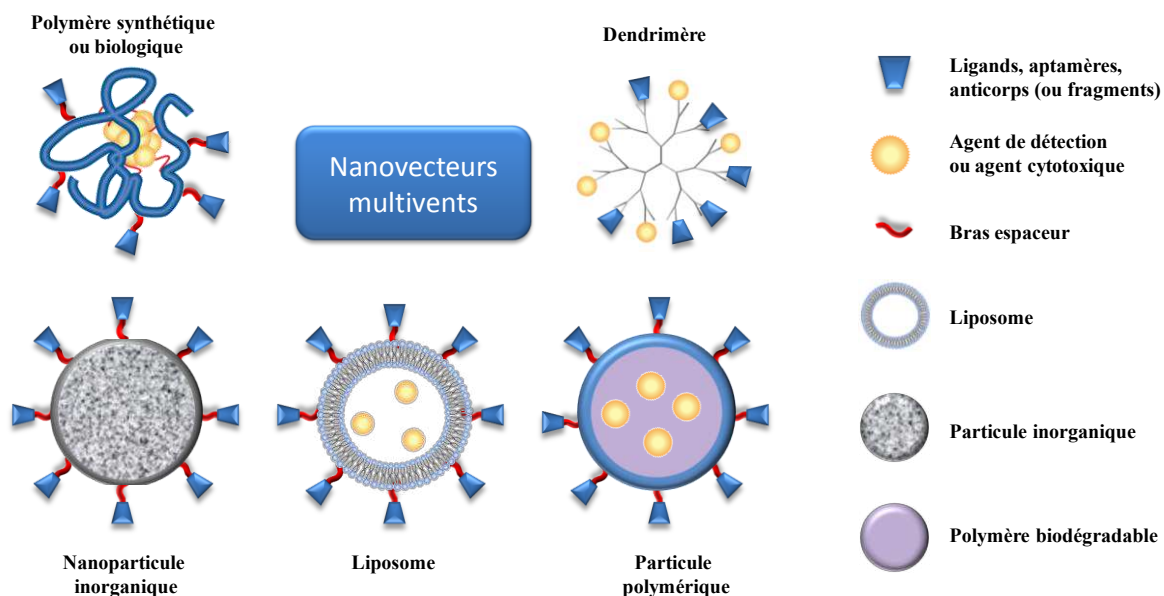
⁹² Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L., Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J Am Chem Soc* **2002**, 124 (50), 14922-14933.

⁹³ Simons, K.; Ikonen, E., Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, 387 (6633), 569-572.

effet est propre au ligand multivalent et permet parfois l'internalisation du couple ligand-récepteur.⁹⁴

II.2.2. Les nano-vecteurs comme supports de haute valence

Ce concept est utilisé dans la recherche médicale pour construire des architectures complexes pouvant améliorer les propriétés du composé. La présentation multivalente d'un ligand permet ainsi d'augmenter l'affinité et la spécificité envers une cible et parfois d'induire une réponse biologique spécifique comme l'endocytose.^{94,95}



Comme il a été montré précédemment, l'efficacité des nanovecteurs est régie par une vectorisation passive. Malheureusement, cette stratégie présente quelques limitations car certaines tumeurs ne présentent pas les caractéristiques nécessaires à la pénétration et la rétention des nanovecteurs (Effet EPR). Sans cet effet, les nanovecteurs ont difficilement accès à la tumeur à cause de leur taille volumineuse. Pour compenser certains de ces inconvénients, les nano-vecteurs doivent être modifiés afin qu'ils interagissent spécifiquement avec les cellules tumorales. Ce ciblage actif peut être obtenu en greffant des agents de ciblage à la surface des nanovecteurs par diverses ligations chimiques. Ainsi de nombreuses études se sont portées sur la modification des surfaces des divers nanovecteurs (dendrimères, liposomes, polymères...) avec une grande variété de ligands (Figure 18).⁹⁶ La grande surface de ces composés permet le greffage d'un nombre considérable de ligands ce qui en fait un support de choix pour la multivalence. Par exemple, un dendrimère conjugué avec 15

⁹⁴ Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E., Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction. *Angew Chem Int Ed* **2006**, 45 (15), 2348-2368.

⁹⁵ Carlson, C. B.; Mowery, P.; Owen, R. M.; Dykhuizen, E. C.; Kiessling, L. L., Selective tumor cell targeting using low-affinity, multivalent interactions. *ACS Chemical Biology* **2007**, 2 (2), 119-127.

⁹⁶ Sinha, R.; Kim, G. J.; Nie, S. M.; Shin, D. M., Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther* **2006**, 5 (8), 1909-1917.

molécules d'acide folique montre une affinité 170 000 fois supérieure par rapport à l'acide folique libre.⁹⁷

Les liposomes et les nanoparticules polymériques sont souvent utilisés pour encapsuler des éléments thérapeutiques. Pour être actif, le composé doit être libéré à l'intérieur de la cellule-cible. La présentation multivalente d'un ligand permet dans certains cas l'internalisation du nano-vecteur et la libération du composé actif dans le cytoplasme par endocytose. Parmi les ligands utilisés, on peut citer le peptide portant le motif -RGD- qui a été utilisé pour modifier la surface de ce type de nanoparticules. Cette stratégie permet de véhiculer les molécules encapsulées à l'intérieur de la tumeur comme des agents cytotoxiques⁹⁸ ou des SiRNA.⁹⁹ Les anticorps monoclonaux ainsi que leurs fragments sont très largement utilisés pour décorer la surface des liposomes. Ces immunoliposomes encapsulant des composés actifs offrent ainsi une meilleure rétention au niveau des tumeurs et une efficacité accrue.¹⁰⁰

Les nanoparticules inorganiques étant limitées par leur solubilité et leur spécificité de ciblage, la modification de leur surface permet une utilisation plus vaste. Ces systèmes présentent diverses propriétés spécifiques (magnétisme, fluorescence) liées à leur composition (or, silice, fer, Cadmium). Par exemple, les nanoparticules d'or modifiées par un agent de ciblage sont particulièrement intéressantes car elles présentent des propriétés thérapeutiques (photothérapie) et peuvent être localisées par imagerie.¹⁰¹ D'autres particules inorganiques fluorescentes « quantum dot » présentant sur leur surface des ligands multivalents ont montré leur efficacité dans le domaine de l'imagerie médicale.¹⁰²

Bien qu'elles permettent d'obtenir des systèmes de haute valence, l'utilisation des nanovecteurs comme support présente quelques limites. Certains paramètres sont difficiles à contrôler comme l'homogénéité, l'orientation, la densité ou le nombre de ligands greffés. Des études se sont aussi dirigées vers des supports de valence plus faible mais possédant une plus grande modularité d'un point de vue chimique.

II.2.3. Les supports à faible valence

Les supports de faible valence sont des châssis moléculaires n'excédant pas le kDa et pouvant présenter un nombre contrôlé de ligands pouvant aller jusqu'à une dizaine. Leur taille, plus restreinte par rapport aux nano-vecteurs, permet de les manipuler et de les moduler

⁹⁷ Hong, S.; Leroueil, P. R.; Majoros, I. J.; Orr, B. G.; Baker, J. R.; Holl, M. M. B., The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform. *Chem Biol* **2007**, 14 (1), 107-115.

⁹⁸ Zhang, Y. F.; Wang, J. C.; Bian, D. Y.; Zhang, X.; Zhang, Q., Targeted delivery of RGD-modified liposomes encapsulating both combretastatin A-4 and doxorubicin for tumor therapy: In vitro and in vivo studies. *Eur J Pharm Biopharm* **2010**, 74 (3), 467-473.

⁹⁹ Schiffelers, R. M.; Ansari, A.; Xu, J.; Zhou, Q.; Tang, Q. 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 (19).

¹⁰⁰ Sofou, S.; Sgouros, G., Anti body-targeted liposomes in cancer therapy and imaging. *Expert Opin Drug Deliv* **2008**, 5 (2), 189-204.

¹⁰¹ Li, Z. M.; Huang, P.; Zhang, X. J.; Lin, J.; Yang, S.; Liu, B.; Gao, F.; Xi, P.; Ren, Q. S.; Cui, D. X., RGD-Conjugated Dendrimer-Modified Gold Nanorods for in Vivo Tumor Targeting and Photothermal Therapy. *Mol Pharmaceut* **2010**, 7 (1), 94-104.

¹⁰² Gao, J. H.; Chen, K.; Xie, R. G.; Xie, J.; Yan, Y. J.; Cheng, Z.; Peng, X. G.; Chen, X. Y., In Vivo Tumor-Targeted Fluorescence Imaging Using Near-Infrared Non-Cadmium Quantum Dots. *Bioconj Chem* **2010**, 21 (4), 604-609.

plus aisément. Ces molécules peuvent présenter différentes topologies : les châssis flexibles, les châssis plans et les châssis tridimensionnels.

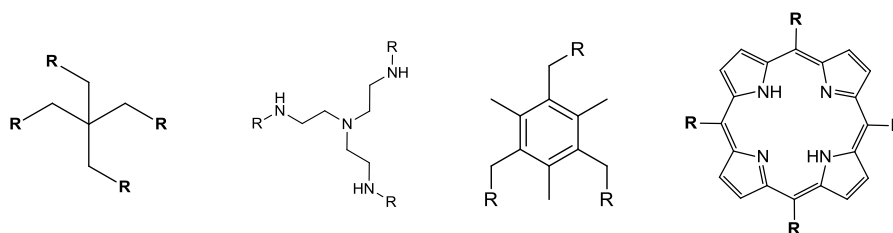


Figure 19 : Structures des différents châssis flexibles et plan

Les châssis flexibles sont des dendrimères de petite taille possédant un noyau à 3 ou à 4 branches. Ces systèmes sont notamment très utilisés pour la présentation multitopique d'un antigène pour la création de vaccins synthétiques (MAP).¹⁰³ Ces composés possèdent une grande modularité au niveau de la taille et la présentation du nombre de ligands. Par contre, certains paramètres comme l'orientation ou la rigidité ne peuvent pas être contrôlés.

D'autres châssis sont basés sur des noyaux aromatiques ou polyaromatiques induisant une certaine rigidité et une orientation plane. Les châssis plans les plus utilisés sont généralement les dérivés de benzènes et les porphyrines. Ces dernières sont particulièrement intéressantes car elles présentent quatre points d'ancrage et l'intérieur du noyau est capable de chélater divers métaux de transition. Les conjugués porphyrines-agents de ciblage ont montré diverses activités thérapeutiques. Selon la nature du métal, le composé peut à la fois induire la mort cellulaire par irradiation¹⁰⁴ (photothérapie) et être utilisé pour imagerie médicale.¹⁰⁵

La dernière topologie de châssis est représentée par des composés polymériques cycliques comme les cyclodextrines, les calixarènes et les peptides ou peptoides cycliques. Ces composés rigides ont la particularité de présenter différentes faces d'accroche permettant une orientation spatiale des ligands.

★ Les cyclodextrines

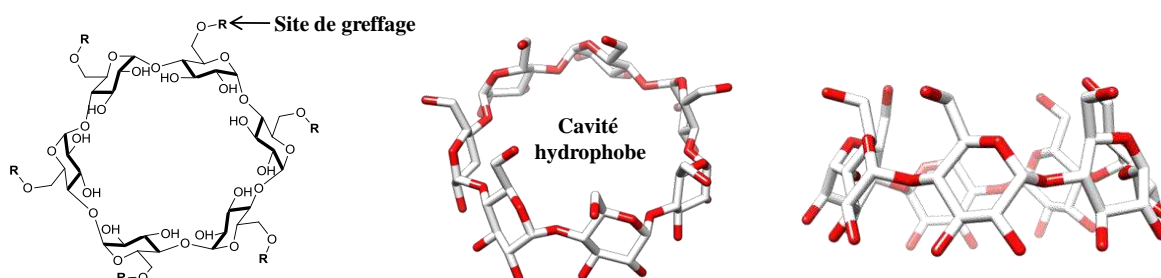


Figure 20 : Schéma et structure cristalline des cyclodextrines

¹⁰³ Tam, J. P., Synthetic Peptide Vaccine Design - Synthesis and Properties of a High-Density Multiple Antigenic Peptide System. *Proc Natl Acad Sci USA* **1988**, 85 (15), 5409-5413.

¹⁰⁴ Chen, X.; Hui, L.; Foster, D. A.; Drain, C. M., Efficient synthesis and photodynamic activity of porphyrin-saccharide conjugates: Targeting and incapacitating cancer cells. *Biochemistry* **2004**, 43 (34), 10918-10929.

¹⁰⁵ Kralova, J.; Koivukorpi, J.; Kejik, Z.; Pouckova, P.; Sievanen, E.; Kolehmainen, E.; Kral, V., Porphyrin-bile acid conjugates: from saccharide recognition in the solution to the selective cancer cell fluorescence detection. *Org Biomol Chem* **2008**, 6 (9), 1548-1552.

Les cyclodextrines sont des macromolécules cycliques extraites de l'amidon composées de 6 à 8 unités de glucose. La particularité de cette molécule est sa cavité hydrophobe modulable en taille capable d'interagir avec de petites molécules organiques. Dans le domaine thérapeutique cette molécule est généralement utilisée pour encapsuler les principes actifs et les vectoriser de manière passive.¹⁰⁶ Afin de la rendre plus sélective, des agents de ciblage peuvent être greffés via les fonctions hydroxyles de la cyclodextrine. Le grand nombre de fonctions hydroxyles, présent sur les deux faces, permet une présentation multivalente de ligands. Hattori et coll. ont montré que ce châssis pouvait être utilisé en tant que vecteur ciblé pour la thérapie anticancéreuse.¹⁰⁷ Dans ces études, la cyclodextrine permet à la fois une présentation multivalente d'oligosaccharide et l'encapsulation de la doxorubicine à l'intérieur de la cavité hydrophobe.¹⁰⁸ Cependant, la modification chimique de ces composés est problématique d'un point de vue régiosélectif. Les hydroxyles présents sur chacune des faces étant équivalents, il est très difficile de les différencier. Malgré quelques avantages comme sa non-toxicité (complément alimentaire) et son prix peu élevé, ce châssis peine par son manque de modularité chimique.

★ Les calixarènes

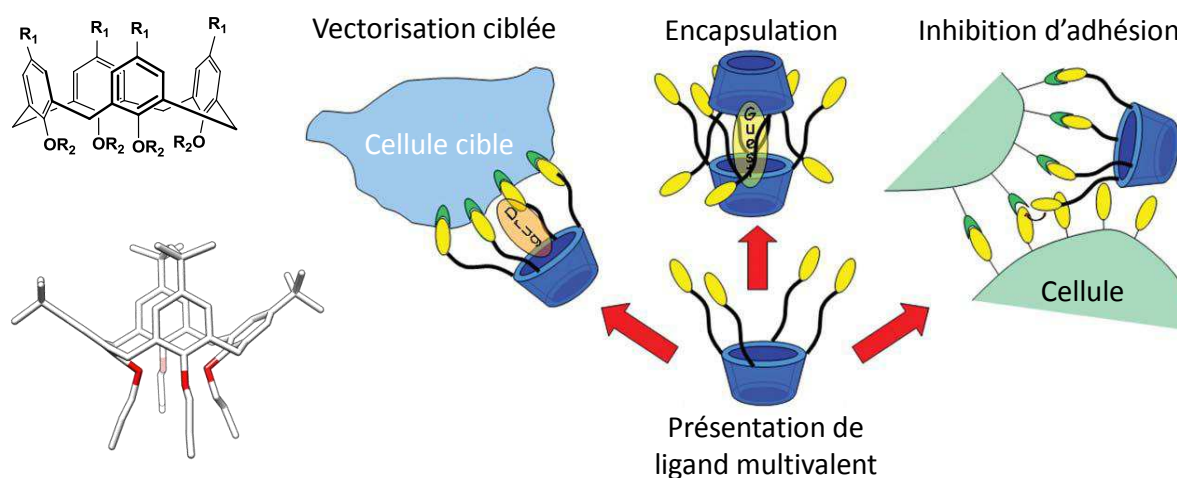


Figure 21 : Structure et utilisation du calixarène ¹¹⁰

¹⁰⁶ Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T., Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem. Rev.* **1998**, 98 (5), 2045-2076.

¹⁰⁷ Hattori, K.; Kenmoku, A.; Mizuguchi, T.; Ikeda, D.; Mizuno, M.; Inazu, T., Saccharide-branched cyclodextrins as targeting drug carriers. *J Incl Phenom Macro* **2006**, 56 (1-2), 9-16.

¹⁰⁸ (a) Oda, Y.; Kobayashi, N.; Yamanoi, T.; Katsuraya, K.; Takahashi, K.; Hattori, K., beta-cyclodextrin conjugates with glucose moieties designed as drug carriers: Their syntheses, evaluations using concanavalin A and doxorubicin, and structural analyses by NMR spectroscopy. *Med Chem* **2008**, 4 (3), 244-255; (b) Oda, Y.; Miura, M.; Hattori, K.; Yamanoi, T., Syntheses and Doxorubicin-Inclusion Abilities of beta-Cyclodextrin Derivatives with a Hydroquinone alpha-Glycoside Residue Attached at the Primary Side. *Chem Pharm Bull* **2009**, 57 (1), 74-78.

Les calixarènes sont des composés cycliques de 4 à 8 unités résultant de la polymérisation du phénol et du formaldéhyde. Ces châssis sont largement utilisés comme support multivalent de ligands et offrent plusieurs avantages (Figure 21). Comme la cyclodextrine, ce composé présente deux faces distinctes facilement fonctionnalisables de manière régiosélective. Ces châssis étant purement synthétiques, il est plus facile de modifier chimiquement et de manière indépendante les différentes unités. Il est donc possible de contrôler à la fois le nombre de ligands greffés et leurs positions sur le châssis. Les études menées par Vidal et coll. ont montré que l'orientation des sucres supportés par le calixarène influence de manière significative l'interaction avec les lectines.¹⁰⁹ Contrairement aux cyclodextrines, les propriétés d'encapsulation de ces composés se limitent à des petites molécules inférieures à 1kDa. Les calixarènes sont utilisés dans de nombreuses approches telles que la reconnaissance de surface, l'inhibition de récepteur membranaire ou les mimes structuraux.¹¹⁰

★ Les peptides et peptoides cycliques

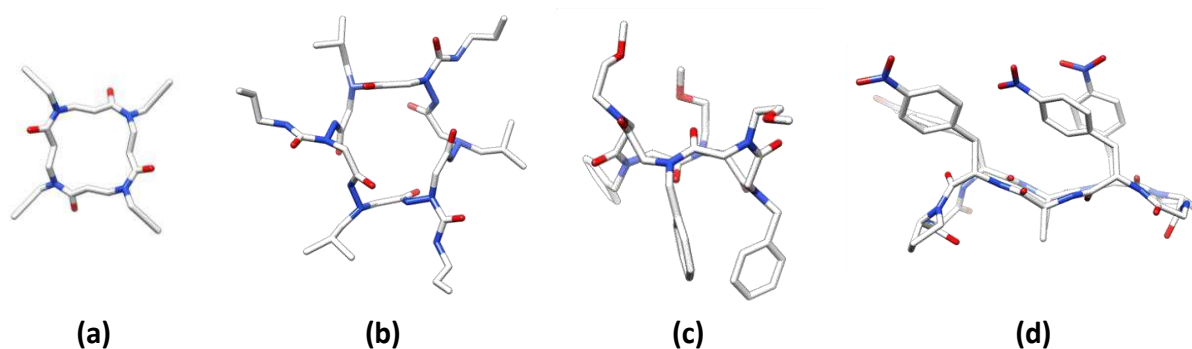


Figure 22 : Structures cristallographiques de différents peptides et peptoides cycliques (a) β -cyclotetrapeptide¹¹¹ (b) aza- β^3 -cyclohexapeptide¹¹² (c) β -cyclohexapeptide¹¹³ (d) cyclodecapeptide (TASP)¹¹⁴

Les peptides et les peptoides cycliques peuvent aussi être utilisés comme support multivalent de ligands. La cyclisation de ces oligomères permet de bloquer leur conformation et offre ainsi des propriétés structurales intéressantes.¹¹⁵ Selon les cas, cette rigidité est favorisée par la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires ou par les interactions

¹⁰⁹ Cecioni, S.; Lalor, R.; Blanchard, B.; Praly, J. P.; Imberty, A.; Matthews, S. E.; Vidal, S., Achieving High Affinity towards a Bacterial Lectin through Multivalent Topological Isomers of Calix 4 arene Glycoconjugates. *Chem-Eur J* **2009**, 15 (47), 13232-13240.

¹¹⁰ Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R., Calixarene-based multivalent ligands. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36 (2), 254-266.

¹¹¹ Roy, O.; Faure, S.; They, V.; Didierjean, C.; Taillefumier, C., Cyclic beta-peptoids. *Org. Lett.* **2008**, 10 (5), 921-924.

¹¹² Le Grel, P.; Salaun, A.; Mocquet, C.; Le Grel, B.; Roisnel, T.; Potel, M., Postsynthetic modification of C-3-symmetric aza-beta(3)-cyclohexapeptides. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (4), 1306-1310.

¹¹³ Shin, S. B. Y.; Yoo, B.; Todaro, L. J.; Kirshenbaum, K., Cyclic peptoids. *J Am Chem Soc* **2007**, 129 (11), 3218-3225.

¹¹⁴ 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 (6), 432-437.

¹¹⁵ (a) Mutter, M., Nature's rules and chemists tools- a way for creating novel proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **1988**, 13 (7), 260-265; (b) Yoo, B.; Shin, S. B. Y.; Huang, M. L.; Kirshenbaum, K., Peptoid Macrocycles: Making the Rounds with Peptidomimetic Oligomers. *Chem-Eur J* **2010**, 16 (19), 5528-5537.

hydrophobes entre les différentes chaînes latérales. L'étude des aza- β^3 -cyclohexapeptide montre que l'introduction de carbone asymétrique permet de contrôler la chiralité des azotes bloquant ainsi la conformation du cycle.¹¹⁶ Certains cyclopeptides peuvent adopter une conformation contrainte comme les feuillets β . Cette structure est favorisée par l'introduction, dans le macrocycle, d'un coude β pouvant être induit par différents motifs (hétéroaromatique, dicetopiperazine, dipeptides L -Pro- D -Pro).¹¹⁷ Cette structure secondaire rigide influence l'orientation des chaînes latérales des différents résidus. Certains macrocycles montrent une orientation alternée des chaînes latérales par rapport au plan moyen du squelette peptidique. Ces cyclopeptides sont facilement modulables et rendent possible l'accroche de différents composés pour la présentation multivalente de ligands. La modularité de ce genre de composé permet de contrôler l'orientation, la position et le nombre de ligands.¹¹⁸

Pour conclure, il existe une multitude de supports pour la présentation multivalence de ligands. Ces différents châssis offrent des caractéristiques et des propriétés très différentes. Le choix de ces composés doit donc tenir compte de plusieurs paramètres comme la flexibilité, la modulation, le contrôle de l'orientation et la biocompatibilité.

¹¹⁶ Mocquet, C.; Salaun, A.; Claudon, P.; Le Grel, B.; Potel, M.; Guichard, G.; Jamart-Gregoire, B.; Le Grel, P., Aza-beta(3)-cyclopeptides: A New Way of Controlling Nitrogen Chirality. *J Am Chem Soc* **2009**, 131 (40), 14521-14525.

¹¹⁷ Robinson, J. A., beta-Hairpin Peptidomimetics: Design, Structures and Biological Activities. *Accounts Chem Res* **2008**, 41 (10), 1278-1288.

¹¹⁸ Trouche, N.; Wieckowski, S.; Sun, W.; Chaloin, O.; Hoebeke, J.; Fournel, S.; Guichard, G., Small multivalent architectures mimicking homotrimers of the TNF superfamily member CD40L: delineating the relationship between structure and effector function. *J Am Chem Soc* **2007**, 129 (44), 13480-92.

III. Stratégies pour préparer de nouveaux vecteurs pour des applications anticancéreuses

III.1. Châssis moléculaire RAFT

Comme il a été mentionné précédemment, l'utilisation de macrocycle peptidique en tant que châssis moléculaire offre différents avantages en termes de modulation, d'orientation et de biocompatibilité. Dans notre laboratoire, de nombreuses études se sont portées sur l'utilisation d'un cyclodecapeptide développé dans le laboratoire du Pr. Mutter sous l'acronyme TASP (Template-Assemble-Synthetic Protein).¹¹⁹

III.1.1. Structure

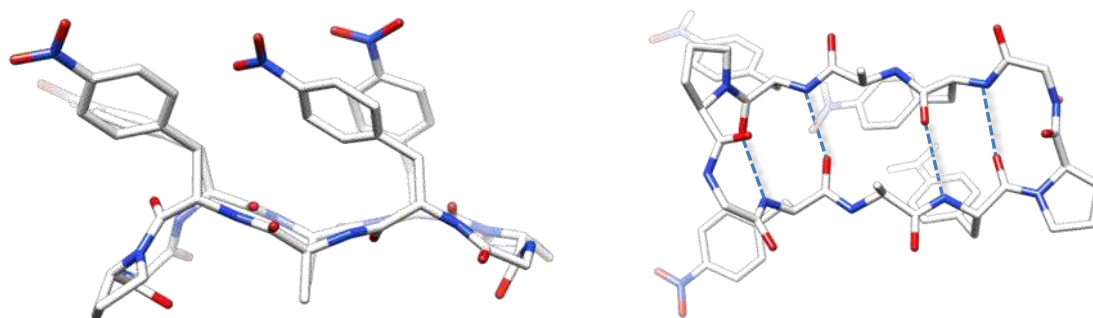


Figure 23 : Structure cristallographique cyclo(L-pNF-D-Pro-Gly-L-pNF-L-Ala)₂ « TASP »¹¹⁴

Les caractéristiques structurales de ce peptide cyclique sont dues à la présence de deux coudes dus à l'enchaînement Proline-Glycine. Ce coude β de type II induit une contrainte conformationnelle du squelette en feuillet β antiparallèle. Les études de RMN et de modélisations moléculaires dynamiques réalisées sur ce produit ont permis de révéler cette structure secondaire.^{120,121} Peluso et al. ont déterminé cette structure par diffraction aux rayons X (Figure 23).¹¹⁴ Ces travaux montrent que les liaisons peptidiques sont de conformation trans avec un repliement du peptide en feuillet β stabilisé par des liaisons hydrogènes intramoléculaires. Dans cette structure, les chaînes latérales des six résidus de la partie centrale se trouvent orientées de part et d'autre du plan moyen du cycle. Ces résidus peuvent être modulés sans affecter les caractéristiques structurales du macrocycle. Pour

¹¹⁹ (a) Mutter, M.; Vuilleumier, S., A chemical approach to protein design - Template-Assembled Synthetic Proteins (TASP). *Angew Chem Int Ed* **1989**, 28 (5), 535-554; (b) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G., Template assembled synthetic proteins (TASP) as functional mimetics of proteins. *Angew Chem Int Ed* **1996**, 35 (13-14), 1482-1485.

¹²⁰ 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 (3), 297-308.

¹²¹ Peng, Z. H., Solid phase synthesis and NMR conformational studies on cyclic decapeptide template molecule. *Biopolymers* **1999**, 49 (7), 565-74.

l'étude cristallographique, l'introduction de dérivés p-nitrophénylalanine ont permis de stabiliser l'état cristallin du composé grâce aux interactions entre les noyaux aromatiques. L'introduction de résidus lysines dans la structure primaire permet l'adressage chimique via leur fonction amine. Ces résidus peuvent comporter des groupements protecteurs orthogonaux permettant une fonctionnalisation régiosélective.¹²² Ce type de châssis dénommé RAFT (Regioselectively Adressable Functionalized Template) permet de contrôler la position et l'orientation des composés greffés (Figure 24).

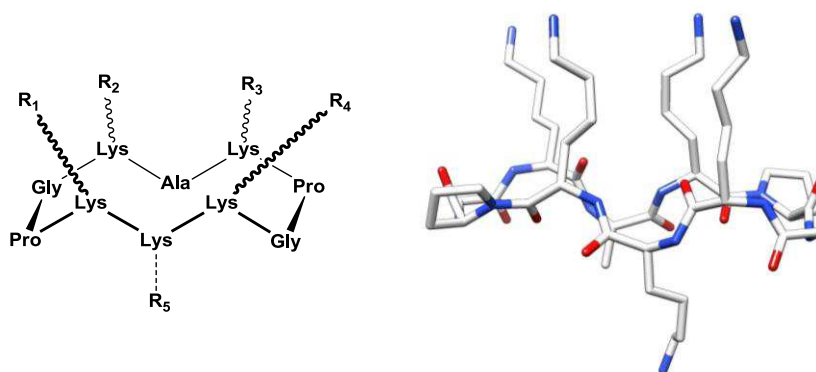


Figure 24 : Structure du châssis RAFT

III.1.2. Application

A la fin des années 80, Mutter et al. ont proposé une approche de stabilisation des structures secondaires basée sur l'utilisation de la topologie de ce châssis. Ce support peut être perçu comme un outil synthétique capable de diriger la structure dans une orientation spatiale bien définie. Cette approche a permis la construction de molécules complexes mimant les structures et les propriétés particulières de certaines biomolécules. Cette stratégie a été utilisée dans divers domaines comme la conception de mimes de surface^{123,124} (4 Hélix Bundle), de canal ionique¹²⁵, la stabilisation de G-quadruplexe¹²⁶ ou la formation de mimes de fibres amyloïdes.¹²⁷

¹²² 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 (8), 1255-1258.

¹²³ Mutter, M.; Tuchscherer, G. G.; Miller, C.; Altmann, K. H.; Carey, R. I.; Wyss, D. F.; Labhardt, A. M.; Rivier, J. E., Template-Assembled Synthetic proteins with 4-helix-bundle topology - total chemical synthesis and conformational studies. *J Am Chem Soc* **1992**, 114 (4), 1463-1470.

¹²⁴ Rau, H. K.; Haehnel, W., Design, synthesis, and properties of a novel cytochrome b model. *J Am Chem Soc* **1998**, 120 (3), 468-476.

¹²⁵ Futaki, S., Peptide ion channels: Design and creation of function. *Biopolymers* **1998**, 47 (1), 75-81.

¹²⁶ Murat, P.; Cressend, D.; Spinelli, N.; Van der Heyden, A.; Labbe, P.; Dumy, P.; Defrancq, E., A novel conformationally constrained parallel g quadruplex. *ChemBioChem* **2008**, 9 (16), 2588-91.

¹²⁷ Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J., Control of amyloid beta-peptide protoribril formation by a designed template assembly. *Angew Chem Int Ed* **2006**, 45 (17), 2699-2702.

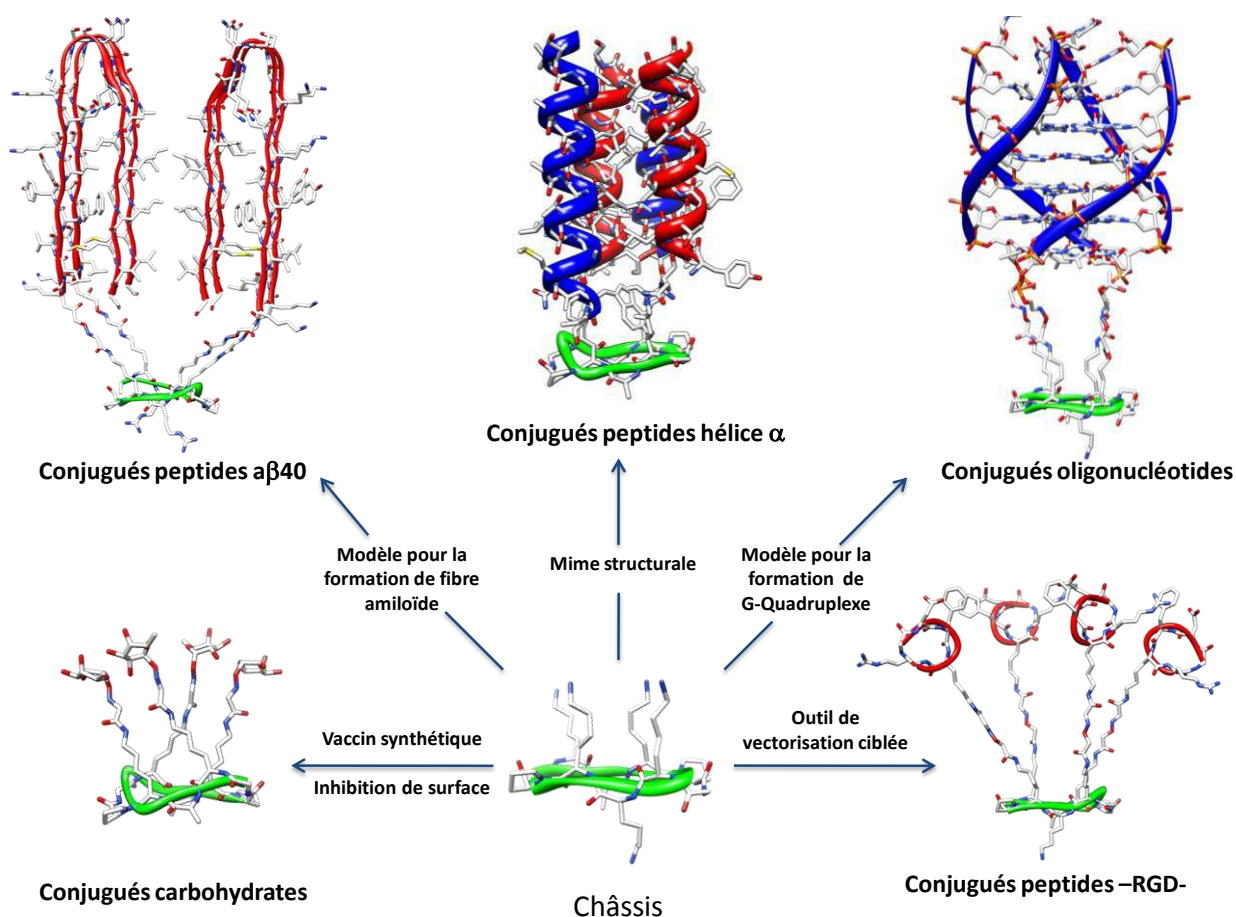


Figure 25 : Schéma représentant les différentes approches basées sur l'utilisation du châssis

Outre l'approche structurale, ce châssis peut tout aussi bien être utilisé en tant que support multivalent de ligand. Le RAFT peut comporter jusqu'à six sites d'accroches suivant une orientation spatiale bien déterminée. En se référant au plan moyen du cycle, on remarque que 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, tandis que les deux résidus lysines centraux ont leurs chaînes latérales qui s'orientent vers le côté opposé. Les différents sites de greffage peuvent accueillir divers ligands et les présenter de manière multivalente. Renaudet et al. utilisent les deux faces du châssis pour combiner des sucres de type GalNAc et un peptide immunoactif.¹²⁸ La combinaison et la multivalence de ces deux biomolécules permet l'activation des cellules NK sans induire d'effet indésirable comme l'apoptose. D'autres composés présentant un cluster d'oligosaccharides ont été conçus à partir de ce « scaffold ». La présentation multivalente de sucre intervient dans la conception de vaccins synthétiques¹²⁹ ou la reconnaissance de récepteurs membranaires comme les lectines.¹³⁰

¹²⁸ Renaudet, O.; Krenek, K.; Bossu, I.; Dumy, P.; Kadek, A.; Adamek, D.; Vanek, O.; Kavan, D.; Gazak, R.; Sulc, M., et al., Synthesis of Multivalent Glycoconjugates Containing the Immunoactive LELTE Peptide: Effect of Glycosylation on Cellular Activation and Natural Killing by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Am Chem Soc* **2010**, 132 (19), 6800-6808.

¹²⁹ 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. *Bioconj Chem* **2005**, 16 (5), 1149-1159.

¹³⁰ Renaudet, O.; Dumy, P., Chemoselectively template-assembled glycoconjugates as mimics for multivalent presentation of carbohydrates. *Org. Lett.* **2003**, 5 (3), 243-246.

III.1.3. Conception de vecteurs ciblés pour la cancérologie

★ Principe

Une dernière approche consiste à utiliser les propriétés structurales de ce châssis pour concevoir des vecteurs pour la thérapie et le diagnostic. Sa structure cyclique est un avantage dans le cadre d'une utilisation *in vivo*. En effet, les peptides cycliques sont décrits pour conférer une plus grande résistance aux protéases.¹³¹ L'une des particularités du RAFT réside dans la présentation de deux faces fonctionnalisables de manière indépendante avec jusqu'à six sites de fixation de motifs structuraux. Ces sites sont adressables chimiquement via la fonction amine des chaînes latérales des Lysines et permettent 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 lysines par des résidus alanines. Les propriétés du RAFT en font un outil particulièrement versatile dans la construction d'architectures multivalentes.

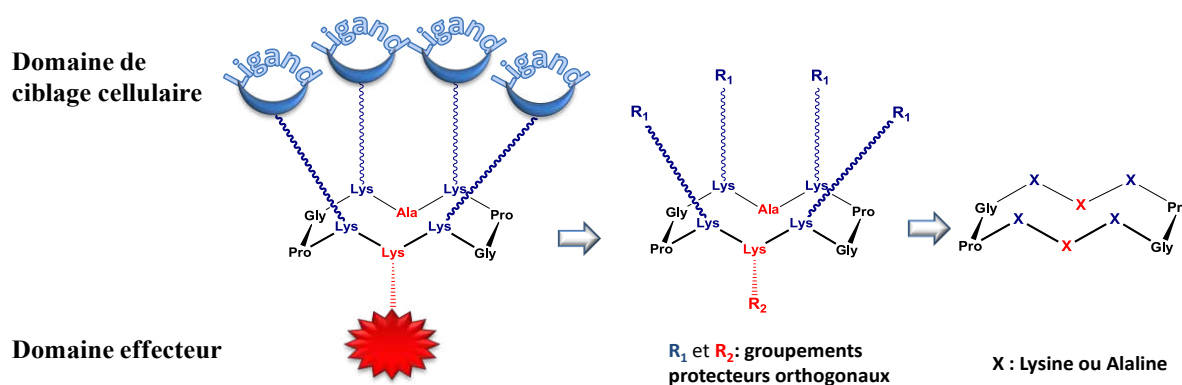


Figure 26 : Schéma du châssis RAFT utilisé pour la vectorisation ciblée en cancérologie

La présentation de quatre sites de greffage sur la face supérieure permet de construire une architecture multivalente de ligands ciblant les récepteurs tumoraux tandis que les sites de fixations sur la face inférieure permettent la conjugaison avec d'un à plusieurs éléments effecteurs. Le système RAFT permet une séparation spatiale des modules de ciblage et effecteur, évitant leur interférence (Figure 26). Par ailleurs, il n'est pas immunogène et sa métabolisation cellulaire ne génère pas de produits de dégradation toxiques.¹²⁹

★ Propriétés du RAFT(c[-RGDfK-]₄) pour la vectorisation ciblée en cancérologie

Des études antérieures menées dans notre laboratoire ont permis de concevoir un vecteur ciblé utilisable en cancérologie. Ce composé est conçu à partir du châssis moléculaire RAFT conjugué via les chaînes latérales de lysines par quatre motifs c[-RGDfK-]. L'intégration du motif -RGD- permet de cibler l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ surexprimée par les cellules

¹³¹ 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 (19), 2221-2232.

endothéliales des vaisseaux néo-angiogéniques et par de nombreuses lignées tumorales humaines.¹³²

L'étude de l'effet de multivalence de différents montages sur le châssis 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-.^{133,134} Le composé tétravalent est 10 fois plus affiné pour l'intégrine que le composé monovalent (Figure 27). Compte tenu des propriétés structurales du RAFT4(c[-RGDfK-]), 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. Cependant, il a été montré que cette molécule était capable d'interagir avec deux intégrines en solution, on peut donc supposer qu'un effet « cluster » intervient lors de la reconnaissance entre les deux entités.¹³⁵ Lors de tests *in vitro* et *in vivo*, le RAFT4(c[-RGDfK-]) est un inhibiteur efficace de l'adhésion cellulaire. Chez la souris Nude, des injections intra-tumorales répétées de faibles doses de RAFT4(c[-RGDFK-]) ont montré une réduction de la croissance tumorale et confère à ce composé une activité anti-angiogénique et antitumorale.¹³⁶

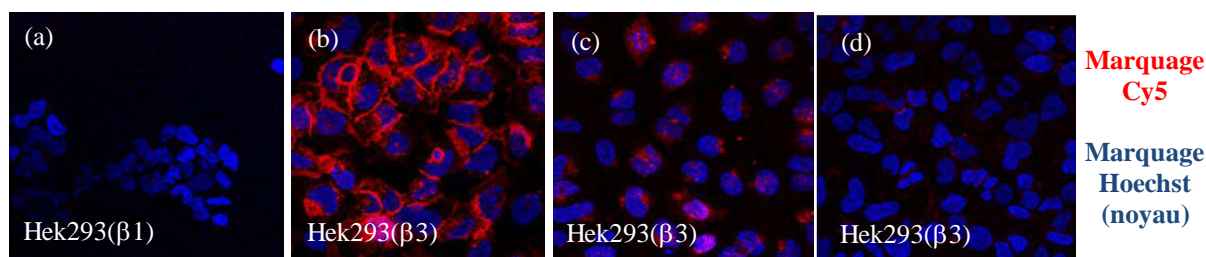


Figure 27 : Clichés d'imagerie de fluorescence de l'étude d'adhésion cellulaire du ligand marqué à la cyanine 5 (a-b) RAFT4(c[-RGDfK-]) (c) c[-RGDfK-] et (d) RAFT4(c[-RβADfK-]) sur la lignée cellulaire KEK293(β3) ou KEK293(β3)

Des études *in vitro* ont montré que le RAFT4(c[-RGDfK-]) présente des propriétés d'internalisation dans les cellules de statut $\alpha_V\beta_3$ positif.¹³² L'entrée cellulaire de ce composé multivalent se fait par une endocytose récepteur-dépendante,¹³⁶ contrairement au cyclopentapeptide -RGD- qui semble être internalisé par une endocytose en phase fluide. Par ailleurs, le RAFT4(c[-RGDfK-]) biotinylé au niveau de sa face inférieure s'est avéré capable d'internaliser une protéine de taille importante, la streptavidine (60 kDa).¹³² La très bonne affinité et spécificité du RAFT4(c[-RGDfK-]) pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ et ses propriétés

¹³² 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 (18), 5730-5739.

¹³³ 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 (10), 1958-1965.

¹³⁴ Foillard, S.; Dumy, P.; Boturyn, D., Highly efficient cell adhesion on beads functionalized with clustered peptide ligands. *Org Biomol Chem* **2009**, 7 (20), 4159-4162.

¹³⁵ Sancey, L.; Garanger, E.; Foillard, S.; Schoehn, G.; Hurbin, A.; Albiges-Rizo, C.; Boturyn, D.; Souchier, C.; Grichine, A.; Dumy, P., et al., Clustering and Internalization of Integrin alpha(v)beta(3) With a Tetrameric RGD-synthetic Peptide. *Mol Ther* **2009**, 17 (5), 837-843.

¹³⁶ Garanger, E.; Boturyn, D.; Jin, Z. H.; Dumy, P.; Favrot, M. C.; Coll, J. L., New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol Ther* **2005**, 12 (6), 1168-1175.

d'internalisation récepteur-dépendante ont permis d'envisager l'utilisation de ce système pour la vectorisation de molécules effectrices.

★ Vectorisation d'agents pour la détection de tumeurs

Pour des applications d'imagerie non invasive de tumeurs chez le petit animal, des chromophores émettant dans le proche infrarouge (Cyanine 5⁵⁸, l'Alexa-Fluor[®] 700¹³⁷) et divers radiotraceurs (¹²⁵I-Tyr, ^{99m}Tc)¹³⁸ ont été couplés au RAFT4(c[-RGDfK-]). Les résultats préliminaires obtenus en imagerie optique avec le conjugué marqué au fluorophore sur des modèles murins montrent que le RAFT4(c[-RGDfK-]) cible efficacement la neovascularisation tumorale ainsi que les métastases de statut $\alpha_v\beta_3$ positif (Figure 28a).¹³⁶ A ce jour, une molécule analogue est utilisée en phase pré-clinique pour l'aide à la chirurgie de l'ostéosarcome (Figure 28b-c).

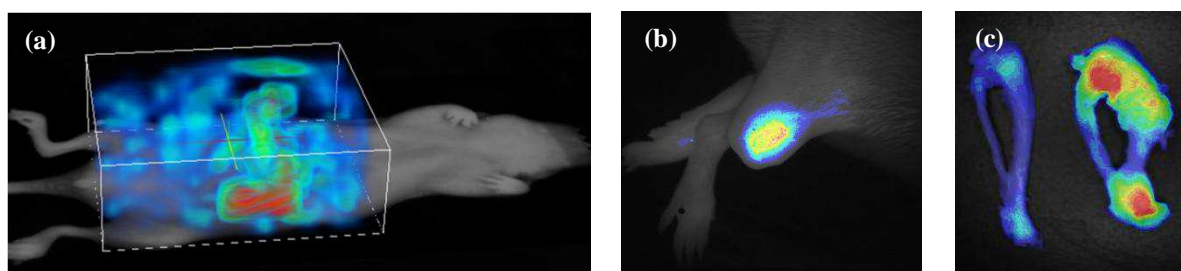


Figure 28 : (a) Clichés d'imagerie optique non invasive (a) de métastases et (b-c) de tumeurs (ostéosarcome) chez la souris (injections i.v. 10 nmol de conjugués/souris)

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. Ces molécules sont composées du vecteur multivalent cyanilé auquel est conjugué par pont disulfure un « quencher » (QSY21) capable d'absorber l'émission de fluorescence de la Cyanine 5. Ce système de type FRET (Förster Resonance Energy Transfer) permet la visualisation de la fluorescence après réduction du pont disulfure à l'intérieur des cellules cancéreuses.¹³⁹ Ce système permet d'augmenter le contraste lumineux améliorant ainsi la détection tumorale (Figure 29).¹⁴⁰

¹³⁷ Keramidas, M.; Josserand, V.; Righini, C. A.; Wenk, C.; Faure, C.; Coll, J. L., Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model. *Br J Surg* **2010**, 97 (5), 737-43.

¹³⁸ (a) 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 Tc-99m-RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2007**, 34 (12), 2037-2047; (b) Dimastromatteo, J.; Riou, L. M.; Ahmadi, M.; Pons, G.; Pellegrini, E.; Broisat, A.; Sancey, L.; Gavriline, T.; Boturyn, D.; Dumy, P., et al., In vivo molecular imaging of myocardial angiogenesis using the $\alpha_v\beta_3$ integrin-targeted tracer Tc-99m-RAFT-RGD. *J Nucl Cardiol* **2010**, 17 (3), 435-443.

¹³⁹ 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 (10), 1069-+.

¹⁴⁰ 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 (1), 43-55.

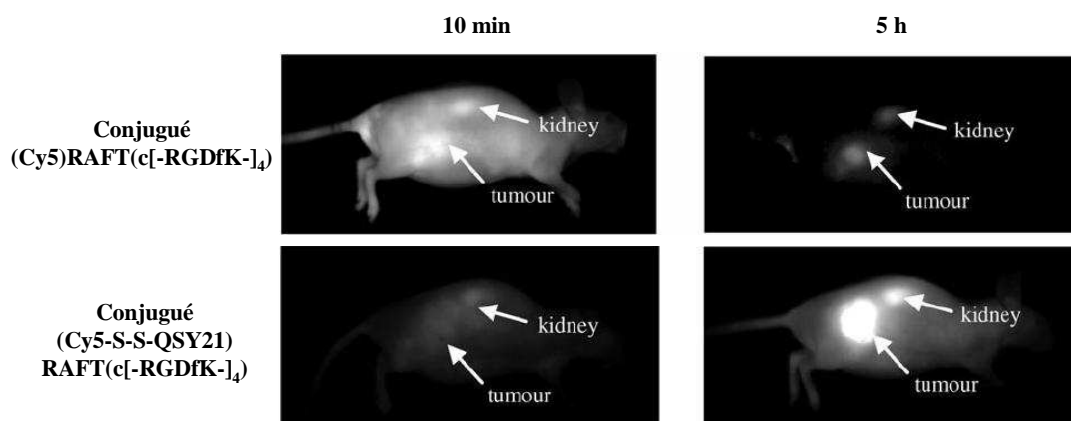


Figure 29 : Clichés d'imagerie de fluorescence de tumeurs sous cutanées (IGROV-1) chez la souris (injections i.v. 10 nmol de conjugués/souris).¹⁴⁰

★ Vectorisation d'agents thérapeutiques

En ce qui concerne la thérapie antitumorale, ces vecteurs multivalents ont été conjugués à la doxorubicine, des siRNA ou un peptide pro apoptotique KLA.¹⁴¹ Ce peptide pro-apoptotique ne présente aucune toxicité en dehors de la cellule mais une fois internalisé dans la cellule-cible, il induit l'apoptose en perturbant la membrane mitochondriale. Le conjugué RAFT(c[-RGDfK-]₄)-KLA a montré un effet biologique spécifique envers les cellules exprimant l'intégrine.¹⁴² En couplant ce conjugué à un système FRET, il a été possible de visualiser le cheminement et la libération du composé actif jusqu'à sa cible : la mitochondrie.¹⁴³

¹⁴¹ Foillard, S. Synthèse de nouveaux vecteurs peptidiques pour la thérapie anti-cancéreuse et l'imagerie tumorale. Thèse : Chimie-Biologie, Université Joseph Fourier, 2008.

¹⁴² Foillard, S.; Jin, Z. H.; Garanger, E.; Boturny, D.; Favrot, M. C.; Coll, J. L.; Dumy, P., Synthesis and Biological Characterisation of Targeted Pro-Apoptotic Peptide. *ChemBioChem* **2008**, 9 (14), 2326-2332.

¹⁴³ Foillard, S.; Sancey, L.; Coll, J. L.; Boturny, D.; Dumy, P., Targeted delivery of activatable fluorescent pro-apoptotic peptide into live cells. *Org Biomol Chem* **2009**, 7 (2), 221-224.

III.2. Méthode de conjugaison pour l'assemblage de biomolécules

Afin de concevoir des macromolécules complexes, le chimiste doit disposer d'un grand nombre de méthodes chimiques permettant l'assemblage de différents éléments.

III.2.1. Couplages chimiques traditionnels

Plusieurs stratégies de couplages chimiques peuvent être utilisées pour assembler les biomolécules. Par exemple, le couplage amide faisant intervenir un acide et une amine est couramment utilisé pour l'assemblage de peptides. Dans cette stratégie, les fonctions mises en jeu pour la conjugaison doivent être les seules à réagir. C'est pourquoi, les fonctions potentiellement réactives que comportent les biomolécules doivent être protégées. Une fois le couplage effectué, une étape de déprotection est nécessaire pour obtenir le composé désiré. Pour contrôler les différents sites de fixation, de nombreux groupements protecteurs orthogonaux ont été développés.¹⁴⁴

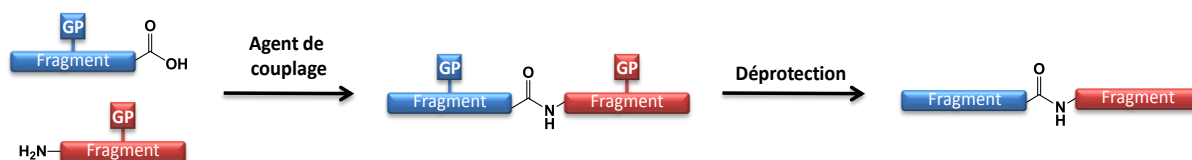


Figure 30 : Principe de couplage de deux fragments protégés par lien amide

Cependant, ces méthodes comportent de nombreuses limitations. Un agent de couplage est nécessaire à la réactivité et peut parfois causer l'épimérisation du composé. L'utilisation de nombreux groupements protecteurs cause parfois des problèmes de solubilités et d'agrégations. Enfin, la conjugaison de biomolécules de natures différentes peut s'avérer problématique. En effet, la chimie standard des différentes biomolécules n'est pas entièrement compatible et ne permet pas l'utilisation de ce type de stratégie. Par exemple, dans le cas d'un couplage peptide-oligonucléotide, les fragments peptidiques se déprotègent par un traitement en milieu acide, conditions dans lesquelles les oligonucléotides sont instables.

III.2.2. Ligations chimiosélectives

L'utilisation de réactions chimiosélectives est une approche alternative aux méthodes de couplages traditionnelles pour l'assemblage de biomolécules. Cette stratégie de couplage met en jeu des fragments comportant des fonctions chimiques présentant une réactivité réciproque et spécifique.¹⁴⁵ Elle permet ainsi l'utilisation de biomolécules totalement déprotégées de natures différentes comme les oligonucléotides, les oligosaccharides et les peptides. L'utilisation de composés sans groupement protecteur permet de limiter les

¹⁴⁴ Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F., Amino acid-protecting groups. *Chem Rev* **2009**, 109 (6), 2455-504.

¹⁴⁵ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed* **2001**, 40 (11), 2004-+.

problèmes de solubilité et certains phénomènes d'agrégation. Par ailleurs, ces méthodes chimiosélectives donnent généralement de bons rendements sans réactif de couplage et peuvent s'opérer en milieu aqueux. Les stratégies de synthèses sont souvent simplifiées et les manipulations chimiques diminuées.

Les ligations chimiosélectives peuvent se classer en deux catégories : celles permettant d'obtenir un lien natif (comme le lien amide) et d'autres donnant un lien non-naturel.¹⁴⁶

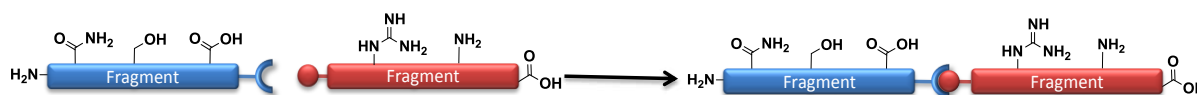


Figure 31 : Principe de la ligation chimiosélective

★ Ligation par Lien natif

La formation d'un lien natif peut être obtenue par une stratégie mise au point par Kent et al. appelée « Native Chemical Ligation » (NCL).¹⁴⁷ La NCL est généralement utilisée pour coupler différents fragments de peptides afin d'obtenir une protéine. Cette ligation fait intervenir des segments déprotégés comportant une fonction thioester et un résidu cystéine en N-Terminal du peptide. La formation du lien amide est rendue possible grâce à une étape de capture du thioester suivie d'une étape de réarrangement intramoléculaire appelé S→N shift. En se basant sur ce concept de « capture/réarrangement », Raines et coll. ont développé une ligation chimiosélective menant à un lien natif en s'inspirant de la réaction de Staudinger.¹⁴⁸ Cette méthode appelée « Traceless Staudinger Ligation » fait intervenir un azoture et un ester de phosphinothiol qui réagissent pour former un iminophosphorane suivi du réarrangement S→N shift pour donner un lien natif. D'autres réactions moins utilisées permettent l'obtention d'un lien amide comme celle faisant intervenir un azoture et un thioacide,¹⁴⁹ un azoture et un selenocarboxyle¹⁵⁰ ou un cétoacide et une hydroxylamine.¹⁵¹

¹⁴⁶ Hackenberger, C. P. R.; Schwarzer, D., Chemoselective Ligation and Modification Strategies for Peptides and Proteins. *Angew Chem Int Ed* **2008**, 47 (52), 10030-10074.

¹⁴⁷ (a) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B., Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **1994**, 266 (5186), 776-9; (b) Dawson, P. E.; Kent, S. B. H., Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu Rev Biochem* **2000**, 69, 923-960; (c) Muir, T. W.; Sondhi, D.; Cole, P. A., Expressed protein ligation: A general method for protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**, 95 (12), 6705-6710.

¹⁴⁸ (a) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T., Staudinger ligation: A peptide from a thioester and azide. *Org. Lett.* **2000**, 2 (13), 1939-1941; (b) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T., High-yielding Staudinger ligation of a phosphinothioester and azide to form a peptide. *Org Lett* **2001**, 3 (1), 9-12.

¹⁴⁹ Shangguan, N.; Katukojvala, S.; Greenberg, R.; Williams, L. J., The reaction of thio acids with azides: a new mechanism and new synthetic applications. *J Am Chem Soc* **2003**, 125 (26), 7754-5.

¹⁵⁰ Knapp, S.; Darout, E., New reactions of selenocarboxylates. *Org Lett* **2005**, 7 (2), 203-6.

¹⁵¹ Bode, J. W.; Fox, R. M.; Baucom, K. D., Chemoselective amide ligations by decarboxylative condensations of N-alkylhydroxylamines and alpha-ketoacids. *Angew Chem Int Ed* **2006**, 45 (8), 1248-1252.

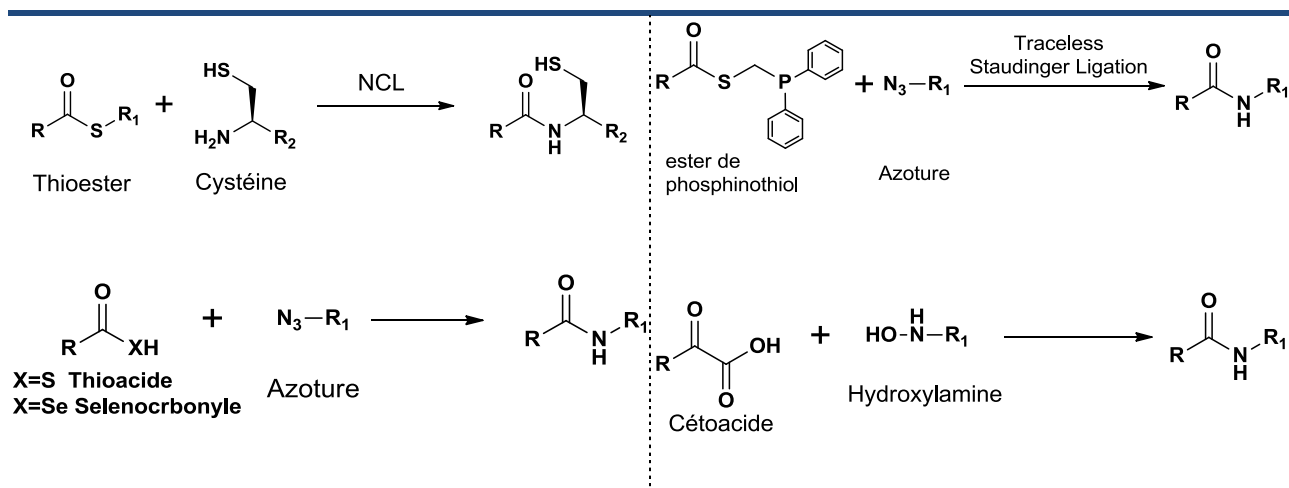


Figure 32 : Schéma des différentes ligations chimiosélectives formant un lien natif

* Ligation par lien non-naturel

Les réactions qui suivent mettent en jeu deux groupes fonctionnels orthogonaux qui réagissent sélectivement pour donner un lien non naturel. La ligation la plus étudiée est sans doute la cycloaddition 1-3 dipolaire catalysée par le Cuivre I entre un alcyne et un azoture. Cette réaction développée par Meldal¹⁵² et Sharpless¹⁵³ souvent référencée sous le nom de « click »¹⁴⁵ donne le lien triazole 1,4 disubstitué comparé à la version non-catalysée qui délivre l'isomère 1,4 et 1,5 dans des proportions équivalentes. Cette réaction chimiosélective envers un grand nombre de groupes fonctionnels, donne d'excellents rendements et peut s'effectuer dans des conditions douces.

La condensation de carbonyles sur des amines primaires nucléophiles est très utilisée pour la bioconjugaison et s'effectue généralement en milieu acide pour donner un lien imine réversible. Cette imine peut être réduite in-situ pour former un lien amine non-hydrolysable. La présence d'un groupe donneur d'électron en position α de l'amine est utilisé pour former des liens hydrazones et oximes montrant une plus grande stabilité à l'hydrolyse. Ces deux liens présentent une grande stabilité à pH physiologique et sont couramment utilisés pour la ligation de biomolécules.¹⁵⁴

Les propriétés réactionnelles des thiols offrent la possibilité de former différents liens chimiosélectifs dans des conditions bien précises (pH, irradiation, oxydation). Le lien thioéther peut être formé par addition de types Michael sur un maléimide, par réaction

¹⁵² Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem* **2002**, 67 (9), 3057-64.

¹⁵³ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed* **2002**, 41 (14), 2596-9.

¹⁵⁴ (a) Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P., Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates: Chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Chem-Eur J* **2001**, 7 (18), 3976-3984; (b) Shao, J.; Tam, J. P., Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with Oxime, Hydrazone, and Thiazolidine linkages. *J Am Chem Soc* **1995**, 117 (14), 3893-3899; (c) Melnyk, O.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J.; Gras-Masse, H., Functionalization of peptides and proteins by aldehyde or keto groups. *Biopolymers* **2000**, 55 (2), 165-186.

radicalaire entre un thiol et un alcène ¹⁵⁵ ou par substitution nucléophile d'un dérivé Halogéné. Un autre lien possible est le pont disulfure qui résulte de la condensation de deux unités thiols en milieu oxydant.

D'autres ligations sont référencées dans la littérature mais leur utilisation est plus rare. Par exemple, les réactions de cycloaddition de Diels Alder ¹⁵⁶ ont montré de bons rendements et une bonne sélectivité mais sont très peu utilisées pour la conjugaison de biomolécules. La grande majorité des liaisons obtenues sont stables dans des conditions physiologiques mais certaines présentent des stabilités dépendantes du milieu environnant (pH, milieu réducteur). Par exemple à l'intérieur du cytoplasme, la liaison disulfure peut être réduite et coupée. Cette rupture est souvent utilisée dans des stratégies « prodrogues » avec libération intracellulaire du composé conjugué

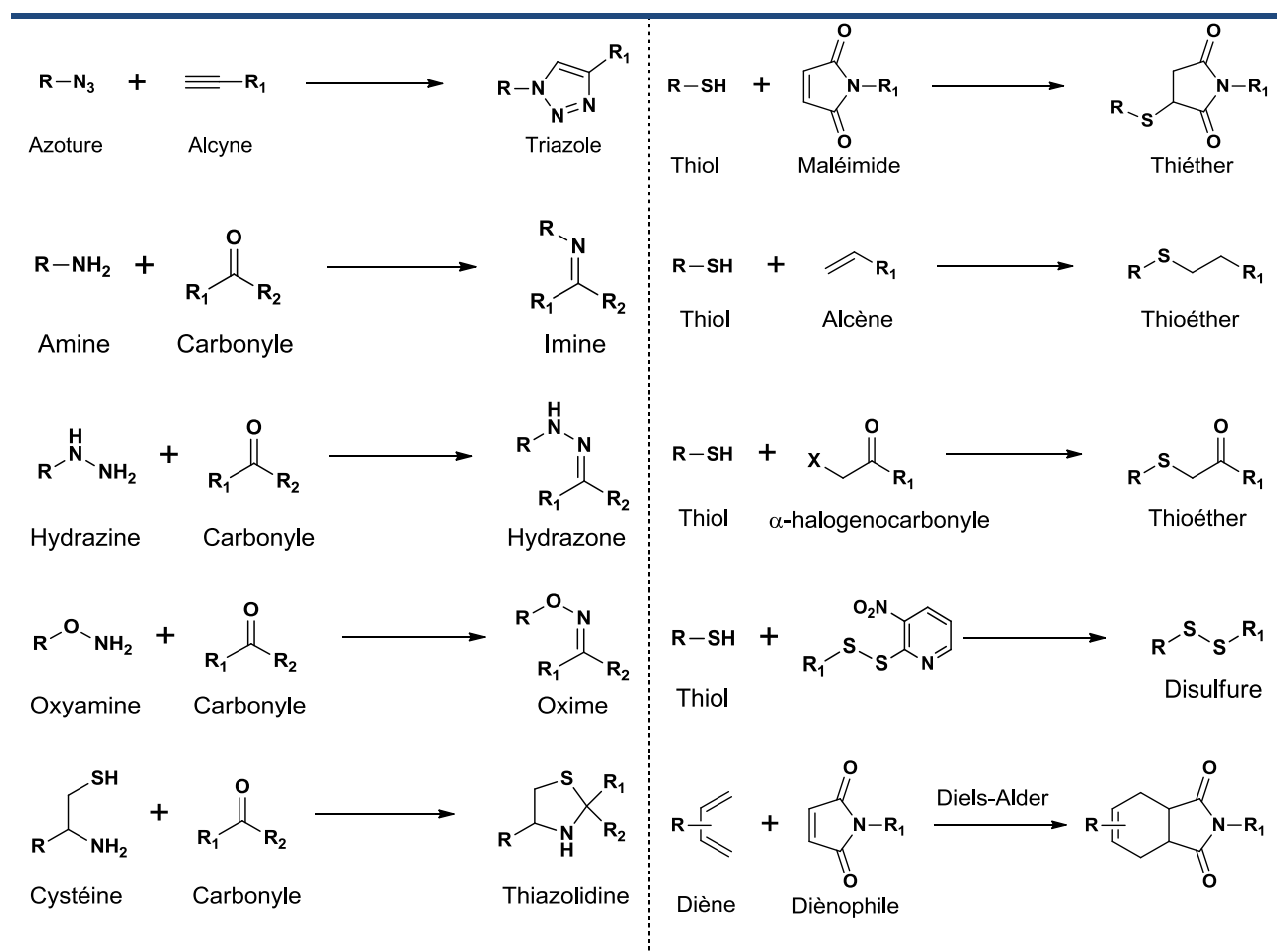


Figure 33 : Schéma des différentes ligations chimiosélectives formant un lien non-naturel

¹⁵⁵ Wittrock, S.; Becker, T.; Kunz, H., Synthetic vaccines of tumor-associated glycopeptide antigens by immune-compatible thioether linkage to bovine serum albumin. *Angew Chem Int Ed* **2007**, 46 (27), 5226-30.

¹⁵⁶ de Araujo, A. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Seitz, O.; Alexandrov, K.; Waldmann, H., Diels-Alder ligation of peptides and proteins. *Chemistry* **2006**, 12 (23), 6095-109.

III.3. Objectifs des travaux réalisés

Dans l'optique de développer de nouveaux vecteurs peptidiques pour des applications anticancéreuses, nos travaux se sont focalisés sur la recherche de nouveaux ligands de récepteurs tumoraux en s'inspirant de modèles biologiques. Les anticorps monoclonaux constituent une classe prometteuse d'agent thérapeutique ciblé en pleine évolution. Cependant, de nombreux inconvénients limitent leur exploitation optimale comme leur biodisponibilité au niveau des tumeurs solides, la stabilité des lignées productrices, leur fonctionnalisation chimique souvent difficile, et le coût excessif de leur production. Dans ce contexte, la conception de composés synthétiques reproduisant les fonctions de reconnaissance des mAbs représente une approche alternative avantageuse. Les boucles CDR des mAbs impliquées dans la reconnaissance de l'antigène peuvent être mimées par des peptides qui conservent une excellente affinité. Par une approche d'ingénierie moléculaire, ce projet a pour objectif de réaliser des mimes synthétiques de mAbs présentant une haute spécificité pour leur cible et pouvant être conjugués à un élément de détection et/ou de cytotoxicité. De part leur nature entièrement synthétique, la fonctionnalisation et la production de ces composés seront plus aisées. Par ailleurs, leur taille plus réduite permettrait une meilleure pénétration des tumeurs solides.

Les travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire ont démontré que les propriétés conformationnelles du cyclodécapeptidique RAFT lui confèrent de multiples applications. En outre, ce châssis moléculaire peut être utilisé en tant que support multivalent pour présenter des éléments de ciblage (ligands « RGD ») et délivrer spécifiquement des éléments de détection et/ou cytotoxique dans des cellules tumorales exprimant le récepteur cible (intégrine $\alpha_v\beta_3$) in vitro et in vivo. Dans cette approche, nous proposons la conception de mime d'un anticorps monoclonal thérapeutique : le Rituximab ciblant l'antigène CD20 utilisé dans le traitement des lymphomes Non-Hodkinien. Ce mime de mAb sera composé d'un domaine de reconnaissance issu de l'analyse structurale du mAb, et d'un module effecteur composé d'un élément de détection et/ou cytotoxique, le tout assemblé sur le châssis moléculaire RAFT.

L'un des paramètres importants dans la conception de structures complexes, basée sur ce châssis peptidique, réside dans le contrôle des différents sites de greffage. Les domaines de ciblage et de reconnaissance doivent être fonctionnalisés indépendamment de manière chimiosélective. Par ailleurs, le module de reconnaissance peut être fonctionnalisé selon différentes approches structurales : présentation multivalente de ligands ou présentation de sites discontinus. Nous nous sommes donc intéressés à développer des procédures d'assemblages biomoléculaires permettant de moduler les sites d'accrochages du châssis. Pour cela, nous avons mis au point des méthodologies de synthèse combinant plusieurs ligations chimiosélectives orthogonales. On démontrera que cette stratégie offre de multiples avantages et permet un assemblage en « One pot » sans étapes de déprotection ni purification intermédiaire.

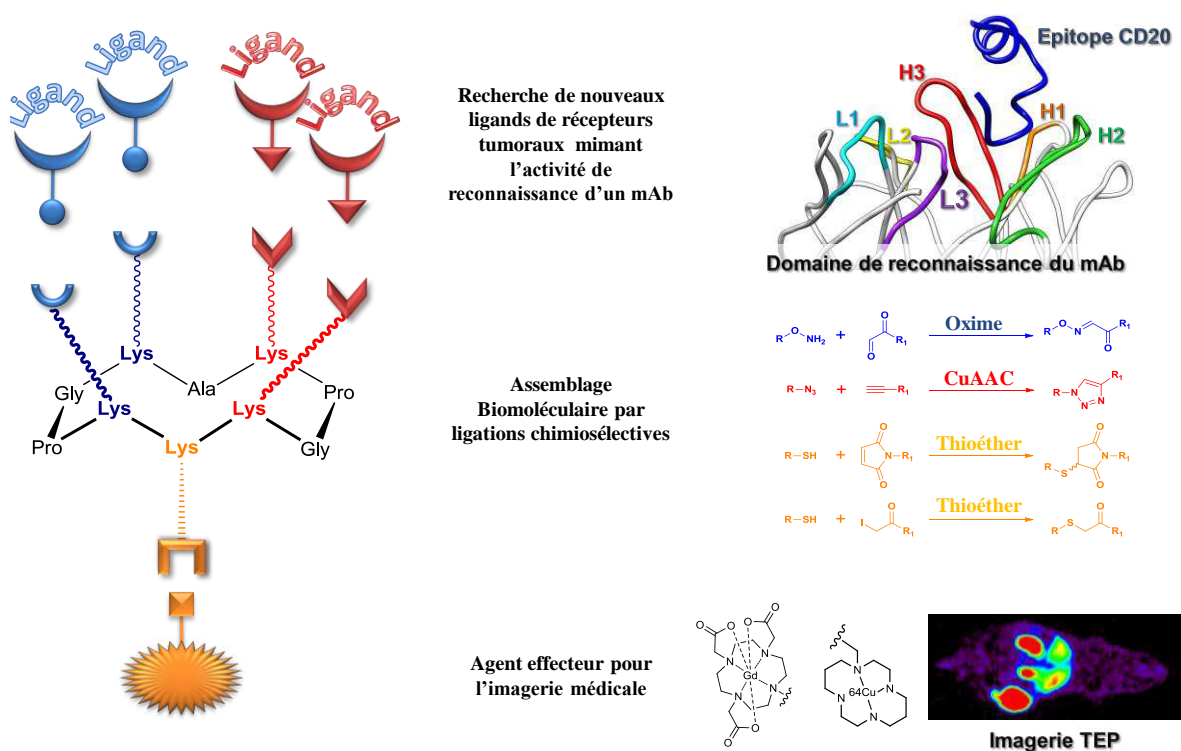


Figure 34 : Objectifs des travaux

La première partie du manuscrit est consacrée aux différentes stratégies de synthèse. Ce chapitre regroupe les méthodologies de synthèses des différents précurseurs (acides aminés modifiés, châssis moléculaires, ligands peptidiques) ainsi que leur procédure d'assemblages chimiosélectifs (**PARTIE A**). La seconde partie de mes travaux est dédiée à la recherche de nouveaux ligands de récepteurs tumoraux s'inspirant du mAb Rituximab. Dans cette approche, nous présenterons la conception, la synthèse et l'évaluation biologique d'assemblages peptidiques mimant l'activité de reconnaissance de cet anticorps (**PARTIE B**). La dernière partie du manuscrit sera consacrée à la préparation et l'évaluation biologique de vecteurs multivalents destinés à des applications d'imagerie tumorale. Nos châssis multivalents présentant des ligands RGD ont été conjugués avec différents agents de détection puis évalués par techniques d'imagerie TEP, IRM et imagerie optique (**PARTIE C**).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

A. Procédures de synthèse

A.1. Stratégie de synthèse

Durant mes travaux de thèse, différentes stratégies d'assemblages biomoléculaires ont été développées afin de concevoir des structures complexes (Figure 35). Comme il a été démontré auparavant, le châssis RAFT possède deux faces distinctes auxquelles on attribue deux rôles différents. La face supérieure du châssis permet la reconnaissance cellulaire grâce à la présentation de ligands ciblant les récepteurs tumoraux. Ce domaine de ciblage a été fonctionnalisé selon différentes approches structurales. La première approche consiste à présenter quatre copies d'un même ligand afin d'augmenter l'affinité envers sa cible par effet de multivalence. La seconde approche permet de concevoir un site discontinu en greffant deux ou trois ligands différents selon une disposition bien précise. Cette dernière sera utilisée pour concevoir des mimés d'un paratope d'anticorps décrit dans la seconde partie du manuscrit. Une fois le domaine de reconnaissance défini, la face inférieure sera fonctionnalisée par un ou deux éléments dont les propriétés seront utilisées pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques.

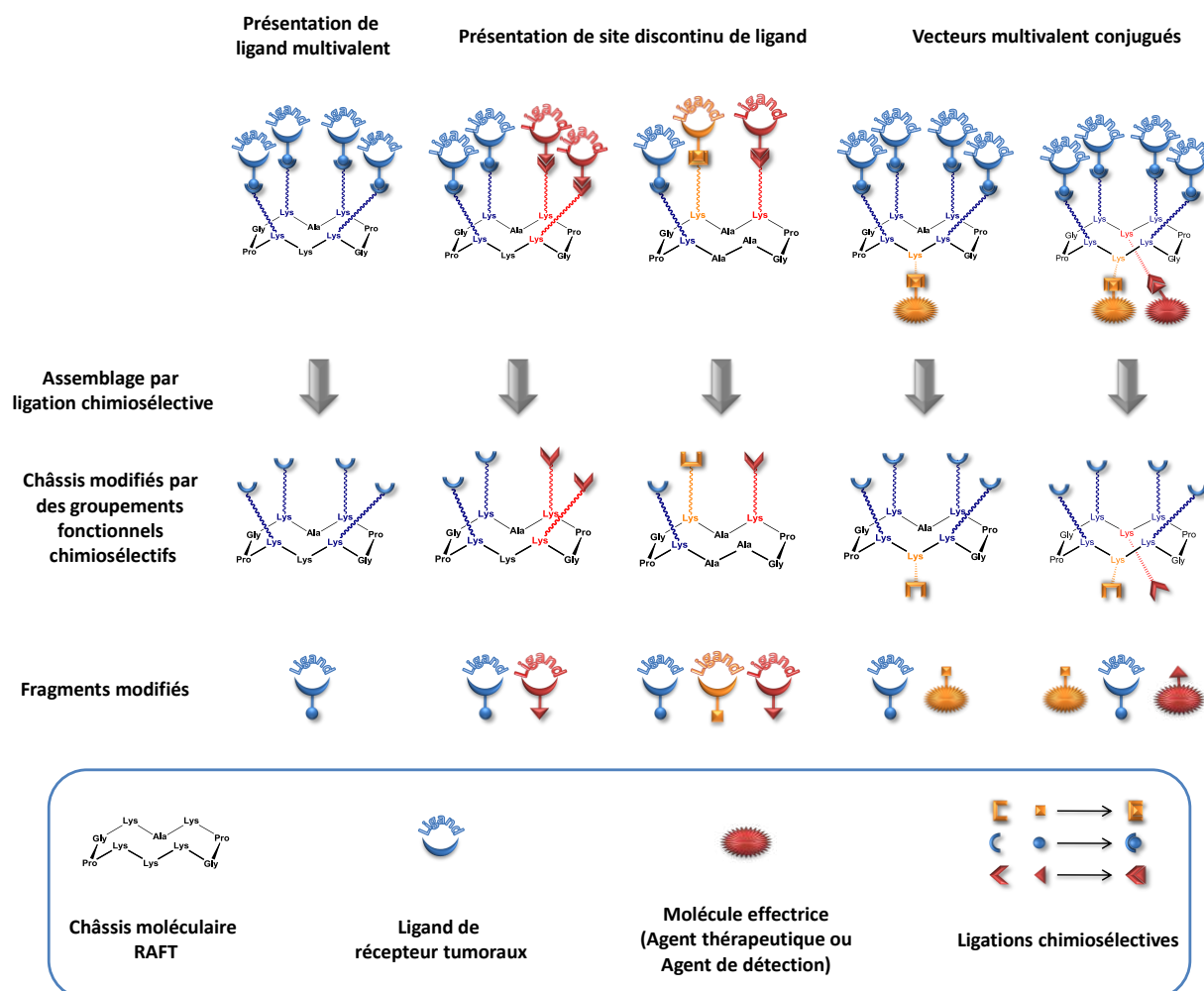


Figure 35 : Stratégies rétro-synthétique d'assemblage biomoléculaire

La stratégie d'assemblage utilisée consiste à synthétiser indépendamment les différents fragments et de les assembler pour former les composés désirés. Pour concevoir de telles architectures, il est nécessaire de contrôler spécifiquement les différents sites de greffage du châssis. Pour cela, différentes stratégies ont été envisagées. La première approche consiste à utiliser des groupements protecteurs orthogonaux sur les différents sites d'accrochage du châssis. Les différents fragments seraient ainsi assemblés sur le châssis après déprotection successive des groupements orthogonaux. Pour coupler les fragments entre eux il est préférable d'utiliser des ligations chimiosélectives plutôt qu'un couplage conventionnel par lien amide (cf. p44). La littérature référence de nombreux exemples utilisant cette stratégie de déprotections et de couplages successifs pour concevoir des molécules à haut poids moléculaire. Cette stratégie est très utilisée notamment pour la synthèse totale de protéines.¹⁵⁷ La procédure d'assemblage la plus courante consiste à greffer plusieurs fragments peptidiques par ligations natives et déprotections successives de résidus cystéine en N-terminal.^{158,159} En 2008, Carell et coll. procèdent au couplage successif de trois composés différents par ligation CuAAC sur un oligonucléotide modifié par des alcynes protégés par des groupes orthogonaux.¹⁶⁰ Bien qu'efficaces, ces stratégies comportent quelques limites. Les nombreuses étapes de déprotections et de couplages successifs augmentent le nombre de manipulations chimiques. De plus, les conditions de déprotection étant parfois incompatibles avec les procédures de ligation, il est nécessaire d'isoler le produit par purification. Afin d'éviter l'utilisation de groupements protecteurs, une dernière stratégie basée sur l'utilisation de ligations chimiosélectives orthogonales a été retenue. Cette procédure d'assemblage nécessite l'emploi de différentes réactions chimiosélectives ne présentant aucune interaction l'une envers l'autre. De ce fait, les étapes de déprotections seront éliminées et le nombre de manipulations se verra, par conséquent, diminué. Pour réaliser cette stratégie, trois types de ligation ont été sélectionnés : la ligation oxime, la ligation CuAAC et la ligation thioéther.

La suite du manuscrit portera sur la synthèse de différents fragments et châssis moléculaires ainsi que leur assemblage par ligations chimiosélectives. On démontrera que la combinaison de ligations chimiosélectives orthogonales offre de multiples avantages comme l'assemblage en « One pot » sans étapes de déprotection ni purification intermédiaire.

A.2. Les ligations utilisées

A.2.1. Ether d'oxime

La formation du lien éther d'oxime résultant de la condensation entre une fonction oxyamine et un carbonyle a été étudiée la première fois en 1959.¹⁶¹ Cependant, son utilisation en tant que ligation a été référencée bien plus tard par Rose et al. pour la conception de

¹⁵⁷ Kent, S. B. H., Total chemical synthesis of proteins. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (2), 338-351.

¹⁵⁸ ¹⁵⁸ Bang, D.; Kent, S. B. H., A one-pot total synthesis of crambin. *Angew Chem Int Ed* **2004**, 43 (19), 2534-2538.

¹⁵⁹ Torbeev, V. Y.; Kent, S. B. H., Convergent chemical synthesis and crystal structure of a 203 amino acid "covalent dimer" HIV-1 protease enzyme molecule. *Angew Chem Int Ed* **2007**, 46 (10), 1667-1670.

¹⁶⁰ Gramlich, P. M. E.; Warncke, S.; Gierlich, J.; Carell, T., Click-click-click: Single to triple modification of DNA. *Angew Chem Int Ed* **2008**, 47 (18), 3442-3444.

¹⁶¹ Jencks, W. P., Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation1. *J Am Chem Soc* **1959**, 81 (2), 475-481.

protéines à haut poids moléculaire.¹⁶² Grâce à l'effet inductif donneur de l'oxygène en α , le lien oxime possède une plus grande stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse, par rapport à d'autres liens similaires comme le lien hydrazone.¹⁶³ Ce lien est particulièrement stable dans une gamme de pH allant de 2 à 9 et son hydrolyse à pH physiologique est extrêmement faible.

Dans le cas d'un aldéhyde et d'une oxyamine aliphatique, les conditions optimales de couplages se situent entre pH 4 et 5. En milieu acide la formation de ce lien est quantitative et rapide mais extrêmement faible à pH 7 ce qui a pour effet de limiter son utilisation in vitro et in vivo. Cependant, les études menées par Dawson et coll ont montré qu'à pH physiologique, l'ajout d'aniline catalyse la réaction¹⁶⁴ ouvrant la voie aux ligations oxime in vivo.^{165,166} Par ailleurs, ce lien offre une excellente chimiosélectivité et la conjugaison par ligation oxime est couramment utilisée pour l'assemblage de biomolécules comme des glycopeptides,¹³⁰ les conjugués peptides-oligonucléotides¹²⁶ ou les conjugués glycopeptides-oligonucléotides.¹⁶⁷

A.2.2. Lien Triazole

La formation d'un triazole, mettant en jeu une fonction alcyne terminale et un azoture, a été mise au point par Huisgen en 1963.¹⁶⁸ A l'origine, cette cycloaddition 1,3 dipolaire nécessitait un apport énergétique important et délivrait deux regioisomères 1,4 et 1,5 dans des proportions équivalentes. En 2002, Sharpless et Meldal remettent cette réaction au goût du jour en rendant cette réaction régiosélective et en augmentant sa cinétique de formation grâce à l'utilisation du Cu^I comme catalyseur. Cette réaction, présentant de nombreux avantages, fut rapidement utilisée en tant que ligation chimiosélective dans une multitude de domaines (conjugaison de biomolécules, dendrimères, ligation sur surface, librairie combinatoire ...). En effet, les fonctions azoture et alcyne sont particulièrement inertes envers une large variété de produits chimiques et stables dans les conditions de synthèse de biomolécules ce qui rend leur utilisation plus aisée. Par ailleurs les caractéristiques spatiales et électroniques du triazole font de ce dernier un excellent bioisostère du lien amide à la différence près qu'il est stable à l'hydrolyse et aux protéases.¹⁶⁹

Cette ligation, communément appelée CuAAC (Copper catalyzed Azide alkyne Cycloaddition), est une réaction particulièrement robuste pouvant s'effectuer dans une large variété de solvants dans une zone de pH allant de 7 à 9. Le facteur le plus important est de maintenir le cuivre à un degré d'oxydation I tout au long de la réaction. C'est pourquoi, il existe de nombreuses conditions opératoires, plus ou moins efficaces, employant diverses

¹⁶² Rose, K., Facile Synthesis of Homogeneous Artificial Proteins. *J Am Chem Soc* **1994**, 116 (1), 30-33.

¹⁶³ Kalia, J.; Raines, R. T., Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew Chem Int Ed* **2008**, 47 (39), 7523-7526.

¹⁶⁴ Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E., Nucleophilic catalysis of oxime ligation. *Angew Chem Int Ed* **2006**, 45 (45), 7581-7584.

¹⁶⁵ Zeng, Y.; Ranya, T. N. C.; Dirksen, A.; Dawson, P. E.; Paulson, J. C., High-efficiency labeling of sialylated glycoproteins on living cells. *Nat Meth* **2009**, 6 (3), 207-209.

¹⁶⁶ Baskin, J. M.; Dehnert, K. W.; Laughlin, S. T.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R., Visualizing enveloping layer glycans during zebrafish early embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **2010**, 107 (23), 10360-10365.

¹⁶⁷ Singh, Y.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P., Preparation of a multitopic glycopeptide-oligonucleotide conjugate. *Org. Lett.* **2005**, 7 (7), 1359-1362.

¹⁶⁸ Huisgen, R., 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew Chem Int Ed* **1963**, 2 (10), 565-632.

¹⁶⁹ Kolb, H. C.; Sharpless, K. B., The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today* **2003**, 8 (24), 1128-37.

sources de cuivre pour la formation de Cu^I (CuSO₄/ Ascobate de sodium, CuBr, CuI, nanopoudre de cuivre...).¹⁷⁰ La procédure la plus utilisée pour la formation de Cu^I est obtenue par réduction du sulfate de Cu^{II} par l'ascorbate de sodium. Bien qu'efficace, cette méthode présente quelques inconvénients comme la production de peroxyde d'hydrogène in situ pouvant oxyder certains résidus peptidiques (Histidine, Cystéine, Méthionine) ou induire des coupures des biomolécules. De nombreuses études se sont penchées sur l'optimisation de cette ligation et ont montré que l'utilisation d'un ligand stabilisant le Cu^I permet d'augmenter la cinétique, le rendement de la réaction et limite les oxydations néfastes.¹⁷¹ Néanmoins, cette ligation n'est pas réduite à l'utilisation du Cu^I comme catalyseur.¹⁷² En 2007, Bertozzi and coll ont développé une méthode originale permettant la formation du lien triazole in vivo en l'absence de catalyseur.¹⁷³ Cette réaction non-catalysée est rendue possible grâce à l'utilisation d'une cyclooctyne présentant un alcyne contraint qui abaisse le ΔG de l'état transition de formation du triazole. Malgré l'absence de régiosélectivité, cette réaction présente une chimiosélectivité et biocompatibilité idéale pour des ligations chimiques in vivo.¹⁷⁴

A.2.3. Ligation Thioéther

La ligation thioéther est une technique très utilisée dans le domaine de la biochimie pour la fonctionnalisation des protéines via leurs résidus cystéines. Cette ligation chimiosélective permet d'obtenir un lien stable dans différentes conditions (pH, oxydation). Ils existent plusieurs types de réactions permettant l'obtention d'un lien thioéther à partir d'un dérivé thiol. Ce lien peut être formé par addition de type Michael sur un maléimide, par réaction radicalaire entre un thiol et un alcène ou par addition nucléophile sur un dérivé halogéné. La chimiosélectivité des fonctions thiol réside dans leur réactivité particulière (Nucléophile mou) comparée aux autres groupements fonctionnels des biomolécules. En 1995, Mutter et coll. ont réalisé l'assemblage de plusieurs fragments peptidiques sur un châssis présentant quatre fonctions maléimide par ligation thioéther.¹⁷⁵ Cette ligation se réalise dans des conditions douces en milieu aqueux et offre d'excellents rendements. Un autre exemple réalisé par Englebretsen et al. montre que les dérivés thiols réagissent spécifiquement sur les dérivés α -halogénocarbonyles selon une substitution nucléophile d'ordre 2.¹⁷⁶ Cette stratégie a été utilisée avec succès pour concevoir un analogue de la protéase HIV. Cependant, la fonction thiol étant une espèce très réactive, son utilisation présente quelques inconvénients. Ces derniers sont très sensibles à l'oxydation de l'air et

¹⁷⁰ Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (8), 2952-3015.

¹⁷¹ Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G., Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angew Chem Int Ed* **2009**, 48 (52), 9879-83.

¹⁷² Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R., Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (4), 1272-1279.

¹⁷³ Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R., A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J Am Chem Soc* **2004**, 126 (46), 15046-15047.

¹⁷⁴ Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R., In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish. *Science* **2008**, 320 (5876), 664-667.

¹⁷⁵ Nefzi, A.; Sun, X. C.; Mutter, M., Chemoselective ligation of multifunctional peptides to topological templates via thioether formation for TASP synthesis. *Tetrahedron Lett* **1995**, 36 (2), 229-230.

¹⁷⁶ Englebretsen, D. R.; Garnham, B. G.; Bergman, D. A.; Alewood, P. F., A Novel Thioether Linker: Chemical Synthesis of a HIV-1 Protease Analogue by Thioether Ligation. *Tetrahedron Lett* **1995**, 36 (48), 8871-8874.

peuvent former des dimères via un pont disulfure ce qui a pour effet de limiter les rendements de la ligation. Afin d'optimiser la réaction, il est souvent nécessaire de dégazer les solutions ou d'introduire un agent réducteur dans le milieu.

A.3. Synthèse sur phase solide

La technique de Synthèse Peptidique sur Phase Solide (SPPS) a été utilisée pour préparer les différents peptides linéaires impliqués dans la préparation des différentes molécules. Cette procédure, mise au point par Merrifield dans les années 1960,¹⁷⁷ consiste en l'addition successive d'acides aminés protégés sur un support insoluble à partir de l'extrémité C-terminale. Les supports solides sont généralement des billes de polymères réticulés de différentes natures (PEG, Polystyrène ...) possédant des bras espaceurs fonctionnalisés pour la liaison du premier acide aminé. Sur le marché, il existe un grand nombre de résines commerciales possédant différentes propriétés de solvation (solvants aqueux/organiques) et diverses fonctions chimiques. Le choix du bras espaceur permet le décrochage d'un peptide protégé et permet la modification de l'extrémité C-terminale (acide, amide, hydrazide, ester méthylique, aldéhyde).

En SPPS, l'addition de chaque acide aminé s'effectue selon un cycle de deux étapes : le couplage d'un acide aminé protégé et l'élimination du groupement protecteur N α -terminal. La synthèse sur support offre de nombreux avantages par rapport à la synthèse en solution. La résine étant séparée de la phase liquide par simple filtration, les étapes d'isolations et de purifications des produits sont de ce fait simplifiées. Afin d'optimiser les rendements de couplages, il est possible d'utiliser un excès de réactifs. L'excédent de réactif restant dans la phase liquide est facilement éliminable par filtration.

Il existe plusieurs stratégies pour réaliser une synthèse peptidique qui diffèrent par le choix du groupe protecteur N α -terminal et les groupements protecteurs orthogonaux utilisés pour protéger les chaînes latérales des acides aminés. La stratégie la plus couramment utilisée reste la stratégie Fmoc/tBu. Cette dernière utilise un groupement alcalino-labile Fmoc (fluorénylméthoxycarbonyle) en tant que groupe protecteur de l'amine en α facilement éliminable en présence de pipéridine. Pour des raisons d'orthogonalité, les protections des chaînes latérales sont stables en milieu basique et s'enlèvent en conditions acides par un traitement à l'acide trifluoroacétique. Par ailleurs, la modularité de la SPPS permet l'incorporation d'acides aminés modifiés.

A.4. Introduction des groupes fonctionnels chimiosélectifs

Comme il a été précisé auparavant, l'assemblage des différents fragments sur le châssis RAFT est réalisé par l'intermédiaire de liens chimiosélectifs orthogonaux. De manière générale, les différentes unités peptidiques sont synthétisées en SPPS puis rassemblées en solution afin d'effectuer les différents montages. Les fragments et les sites d'accrochages du châssis doivent présenter les différents groupes fonctionnels impliqués dans la ligation chimiosélective. Dans ce contexte, plusieurs procédures ont été mises au point pour

¹⁷⁷ Merrifield, R. B., Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **1963**, 85 (14), 2149-54.

l'introduction de ces fonctions. En général, la modification d'un peptide s'effectue grâce à la déprotection orthogonale d'un site d'accroche suivie du couplage d'un composé comportant la fonction désirée. Dans ces travaux, nous avons choisi une approche alternative en incorporant, directement lors de la SPPS, des acides aminés modifiés comportant les fonctions chimiosélectives.

A.4.1. Synthèse d'acides aminés modifiés

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à optimiser les voies de synthèses des châssis moléculaires en diminuant le nombre d'étapes et en augmentant les rendements. L'un des paramètres importants dans la conception des différents châssis réside dans le contrôle des différents sites de greffage. Classiquement, les fonctions impliquées dans les ligations chimiosélectives sont introduites après synthèse peptidique sur support solide sur les cyclopeptides en solution. Cette stratégie nécessite l'élimination de différents groupes protecteurs orthogonaux (supportés pas les chaînes latérales des lysines) suivie du couplage d'un ester activé portant le groupe fonctionnel désiré (Figure 36). Afin de nous affranchir de ces étapes de fonctionnalisation et de déprotection successives, nous avons décidé d'incorporer, lors de la SPPS, des acides aminés modifiés présentant les fonctions impliquées au cours des différentes ligations chimiosélectives. Grâce à cette stratégie, il est possible de synthétiser un châssis moléculaire présentant plusieurs sites chimiosélectifs orthogonaux.

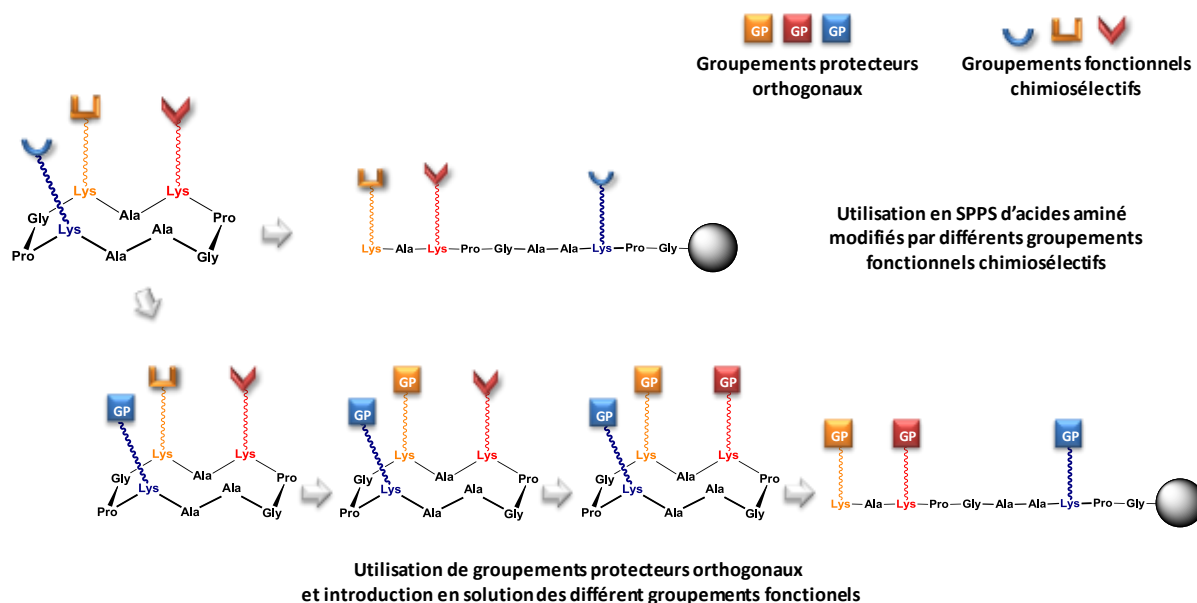


Figure 36 : Schéma rétro-synthétique des deux voies de synthèse d'un châssis moléculaire présentant plusieurs sites chimiosélectifs orthogonaux

L'utilisation de ces acides aminés modifiés diminue considérablement le nombre d'étapes en solution permettant ainsi un gain en termes de rendement et de temps de synthèse. Les acides aminés **2**, **5**, **7**, **9** et **11** ont été synthétisés à partir de la Fmoc-lysine et présentent, sur leurs chaînes latérales, les fonctions impliquées dans la ligation oxime, CuAAC et thioéther (Figure 37). Les fonctions aldéhyde, oxyamine ou thiol sont des groupes très réactifs et doivent subir des modifications pour demeurer intacts durant la synthèse peptidique. Les

fonctions thiol et oxyamine seront protégées par des groupements acido-labiles tandis que la fonction aldéhyde sera masquée par un résidu sérine. Les fonctions alcynes et azoture étant inertes dans les conditions de SPPS, aucune protection n'est nécessaire.

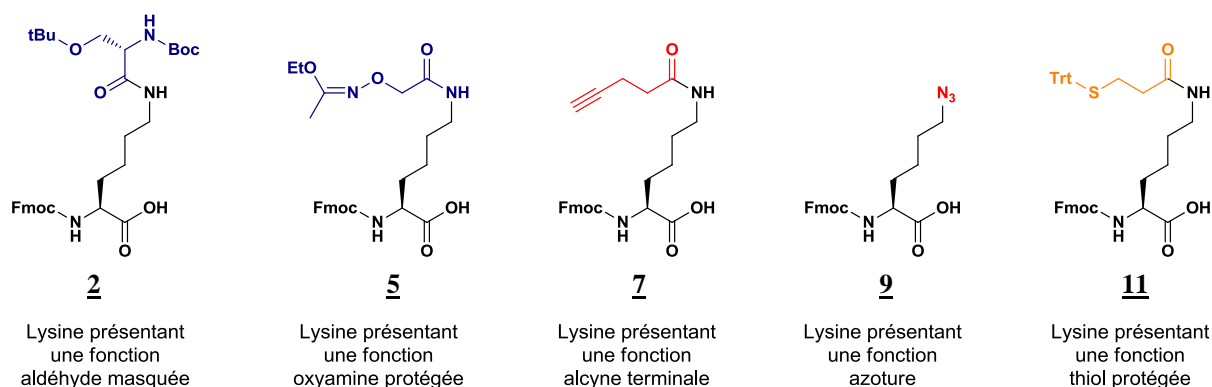
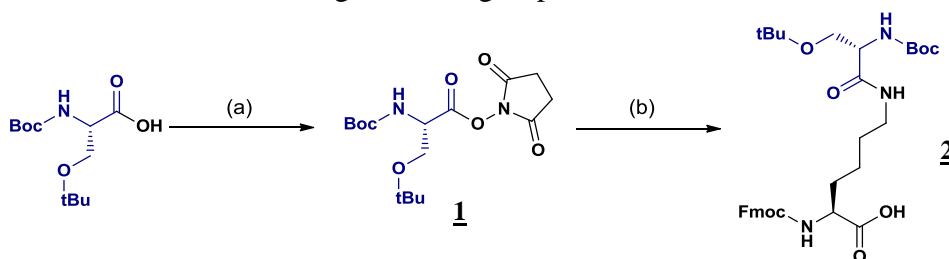


Figure 37 : Schéma des acides aminés modifiés

★ Synthèse de dérivés de Lysine présentant un aldéhyde masqué

De nombreuses stratégies de synthèse, référencées dans la littérature, ont été mises au point pour la fonctionnalisation de peptides par un aldéhyde. La stratégie la plus courante pour l'obtention d'un peptide aldéhydique met en jeu la coupure oxydante d'un diol^{178,179} ou d'un α -aminoalcool.¹⁸⁰ Pour cette étude, nous avons décidé d'introduire une sérine qui après déprotection et oxydation au périodate de sodium offre l'aldéhyde glyoxylique.¹⁸¹ Pour des raisons de stabilité dans les conditions de SPPS en stratégie Fmoc/tBu, la sérine est protégée par des fonctions acido-labiles orthogonales au groupement Fmoc.



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

Figure 38 : Schéma de synthèse de l'acide aminé modifié présentant une fonction aldéhyde masquée

Pour effectuer la synthèse du dérivé **2**, on prépare l'ester activé d'une Boc-Ser(tBu)-OH en utilisant le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et le N-hydroxysuccinimide (NHS). Le produit **1** obtenu est ensuite couplé par lien amide sur l'amine ϵ d'une Fmoc-Lys-OH pour

¹⁷⁸ 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 (12), 4153-4160.

¹⁷⁹ Spetzler, J. C.; Hoeg-Jensen, T., Masked side-chain aldehyde amino acids for solid-phase synthesis and ligation. *Tetrahedron Lett* **2002**, 43 (12), 2303-2306.

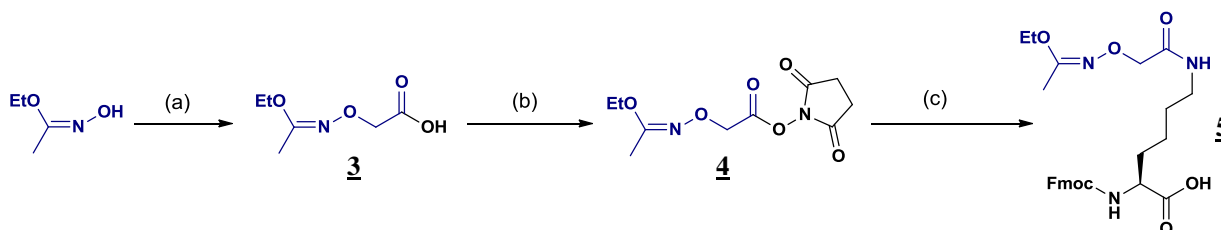
¹⁸⁰ (a) Gaertner, H. F.; Rose, K.; Cotton, R.; Timms, D.; Camble, R.; Offord, R. E., Construction of protein analogues by site-specific condensation of unprotected fragments. *Bioconj Chem* **1992**, 3 (3), 262-8; (b) Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G., Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconj Chem* **1992**, 3 (2), 138-146.

¹⁸¹ Wahl, F.; Mutter, M., Analogues of oxytocin with an oxime bridge using chemoselectively addressable building blocks. *Tetrahedron Lett* **1996**, 37 (38), 6861-6864.

donner le composé **2** avec une pureté supérieure à 96 % et un excellent rendement (Figure 38). Les études précédentes réalisées avec ce composé ont prouvé que ce dernier était stable dans les conditions de SPPS et permettait d'obtenir des peptides aldéhydes avec d'excellents rendements.¹⁸²

★ **Synthèse de dérivés de Lysine présentant une oxyamine protégée**

Comme pour la fonction aldéhyde, diverses procédures peuvent être employées pour incorporer un motif oxyamine sur un peptide via un dérivé d'acide aminé.^{183,184} Ce groupement est généralement introduit sous forme d'acide 2-aminoxyacétique (Aoa-OH) protégé par un groupement Boc. Les études précédentes menées au laboratoire ont montré que, même protégée, la fonction oxyamine garde une certaine réactivité. L'azote de l'oxyamine peut subir une seconde acylation entraînant la formation de produits secondaires lors de la synthèse peptidique. Afin de contourner ce problème, notre équipe a développé un groupement protecteur alternatif : le groupement 1-éthoxyéthylidène.¹⁸² Ce groupement s'est révélé être stable durant les conditions de la SPPS et peut facilement être éliminé dans des conditions acides relativement douces.



Réactifs : (a) ICH₂COOH, NaOH, H₂O ; (b) DCC, NHS, AcOEt/dioxane ; (c) Fmoc-Lys-OH, DIPEA, DMF

Figure 39 : Schéma de synthèse de l'acide aminé modifié **5** présentant une fonction oxyamine protégée par un groupement 1-éthoxyéthylidène

Pour préparer le composé **5**, on fait tout d'abord réagir l'éthyle N-hydroxyacétimide par substitution nucléophile sur l'acide iodoacétique offrant l'acide 2-(1-éthoxyéthylidèneaminoxy)acétique **3** avec un rendement de l'ordre de 80 %. L'acide carboxylique du composé **3** est ensuite activé sous forme d'ester N-hydroxysuccinimide selon le même protocole que le composé **1**. L'ester activé **4** est finalement additionné sur la Fmoc-Lys-OH pour donner le dérivé **5** avec un rendement global de 75 % et une excellente pureté. Les études de stabilité réalisées sur ce groupement protecteur ont montré que ce dernier est stable dans les différentes conditions utilisées en SPPS (piperidine, milieu basique) et permet d'obtenir des peptides avec une très bonne pureté sans obtention de produits secondaires.¹⁸² Par ailleurs, ce groupement est résistant aux conditions de décrochage d'un peptide sur résine chlorotrytle en milieu faiblement acide (AcOH) mais présente une grande sensibilité au TFA dilué en solution aqueuse. La déprotection de l'oxyamine est totale au bout de 30 min en utilisant une solution à 3 % de TFA. Ces conditions rendent cette protection orthogonale à d'autres groupements acido-labiles comme Boc et tBu.

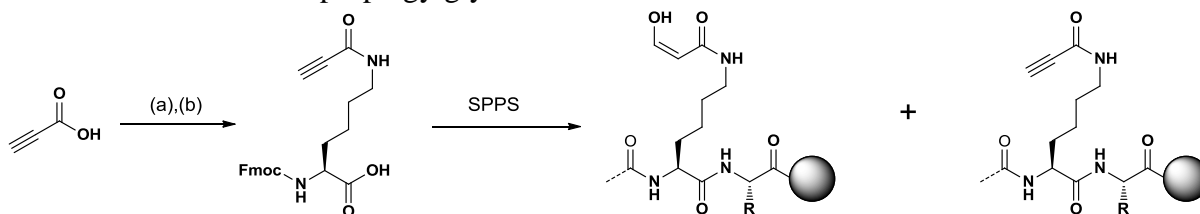
¹⁸² Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturny, D.; Dumy, P., 1-ethoxyethylidene, a new group for the stepwise SPPS of aminoxyacetic acid containing peptides. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (3), 983-991.

¹⁸³ Spetzler, J. C.; Hoeg-Jensen, T., Preparation and application of O-amino-serine, Ams, a new building block in chemoselective ligation chemistry. *Journal of Peptide Science* **1999**, 5 (12), 582-592.

¹⁸⁴ Peluso, S.; Imperiali, B., Asparagine surrogates for the assembly of N-linked glycopeptide mimetics by chemoselective ligation. *Tetrahedron Lett* **2001**, 42 (11), 2085-2087.

★ Synthèse de dérivés de lysine présentant un alcyne

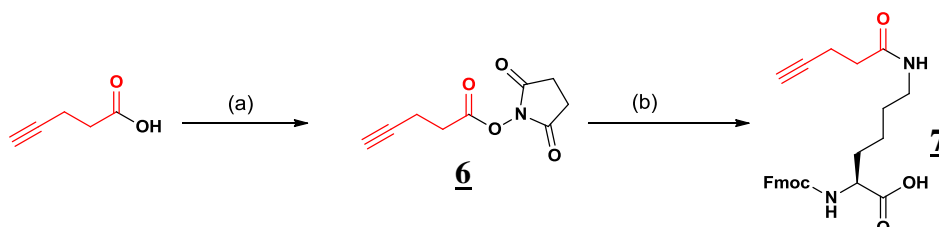
Les alcynes terminaux présentent une très bonne stabilité envers une large gamme de produits chimiques. De ce fait, ils peuvent être directement introduits pendant la synthèse peptidique sans subir de dégradation. Ces dernières années, une multitude d'acides aminés fonctionnalisés par des alcynes ont été développés¹⁸⁵ et certains sont maintenant commerciaux comme la propargylglycine.



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

Figure 40 : Schéma de synthèse de l'acide aminé modifié présentant une fonction propiolamide

Les premiers essais de fonctionnalisation de la lysine, ont été effectués avec l'acide propiolique. Après formation de l'ester activé et couplage sur une Fmoc-Lysine, on obtient le dérivé alcyne avec d'excellent rendement. Malheureusement, ce composé s'est révélé instable dans les conditions de déprotections du Fmoc. En effet, la fonction propiolamide possède une forte réactivité en raison d'une conjugaison entre l'alcyne et l'amide.¹⁸⁶ En milieu basique, l'eau résiduelle contenue dans les solvants peut s'additionner sur le composé par réaction de type Michael et former un produit secondaire (Figure 40). Ces résultats ont été confirmés par les analyses RMN et spectrométrie de masse. Les réactifs utilisés en SPPS n'étant généralement pas anhydres, nous avons décidé d'utiliser un autre dérivé d'alcyne non conjugué donc moins réactif.



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

Figure 41 : Schéma de synthèse de l'acide aminé modifié 7 présentant une fonction alcyne

Notre second essai s'est porté sur l'utilisation de l'acide pentynoïque (Figure 41). Après activation de ce produit sous forme d'ester activé suivie du greffage sur une Fmoc-Lys-OH, on obtient le composé 7 avec des rendements quantitatifs et une excellente pureté (>96%). Ce composé a été testé dans les conditions utilisées en SPPS et n'a révélé aucune dégradation du motif alcyne.¹⁸⁷

¹⁸⁵ Isaad, A. L.; Barbetti, F.; Rovero, P.; D'Ursi, A. M.; Chelli, M.; Chorev, M.; Papini, A. M., N-alpha-Fmoc-Protected omega-Azido- and omega-Alkynyl-L-amino Acids as Building Blocks for the Synthesis of "Clickable" Peptides. *Eur J Org Chem* **2008**, (31), 5308-5314.

¹⁸⁶ Tejedor, D.; Lopez-Tosco, S.; Cruz-Acosta, F.; Mendez-Abt, G.; Garcia-Tellado, F., Acetylides from Alkyl Propiolates as Building Blocks for C-3 Homologation. *Angew Chem Int Ed* **2009**, 48 (12), 2090-2098.

¹⁸⁷ Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D., One-Pot Approach to Well-Defined Biomolecular Assemblies by Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew Chem Int Ed* **2009**, 48 (14), 2576-2579.

★ Synthèse de dérivés de Lysine présentant un azoture

La fonction azoture offre également une bonne résistance aux réactifs employés durant la synthèse peptidique. Il existe différentes procédures pour incorporer une fonction azoture sur un acide aminé comme les substitutions nucléophiles d'un dérivé halogéné,¹⁸⁵ le greffage d'un linker ou le transfert d'un diazo sur un composé aminé. Cette dernière stratégie est particulièrement intéressante car elle permet de transformer de manière sélective les amines primaires en azoture avec de hauts rendements sans affecter la stéréochimie de la molécule. Cette technique, utilisée dans des conditions douces, est souvent employée pour modifier l'amine en N-Terminal d'un peptide afin de procéder à la ligation CuAAC. Généralement, ce transfert de diazo est opéré par l'azoture de triflate catalysé par un métal de transition bivalent.^{188,189} Cependant, ce réactif est limité par son manque de stabilité durant le stockage, son coût, son caractère explosif et sa faible solubilité en milieu aqueux. En 2007, Goddard-Borger et al. ont mis au point un réactif alternatif moins coûteux, plus stable et plus facile à produire : l'azoture d'imidazole-1-sulfonyle.¹⁹⁰ L'utilisation de ce réactif nous a permis de synthétiser, en une seule étape, un dérivé de lysine présentant un azoture en modifiant directement l'amine de la chaîne latérale.

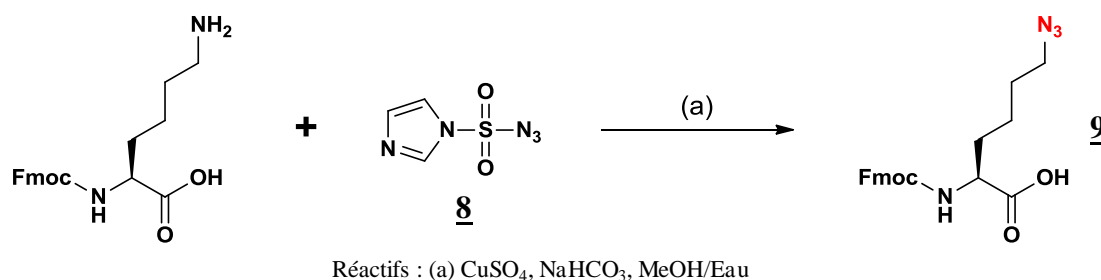


Figure 42 : Schéma de synthèse de l'acide aminé modifié présentant une fonction azoture

Différentes voies de synthèse du produit **9** sont référencées dans la littérature.¹⁹¹ Pour réaliser ce composé, une nouvelle méthode de synthèse a été envisagée grâce à l'utilisation de l'azoture d'imidazole-1-sulfonyle **8** (Figure 42). En premier lieu, nous avons préparé, en grande quantité, le réactif de diazo-transfert en suivant la procédure décrite dans la littérature.¹⁹⁰ Ce réactif est ensuite ajouté dans une solution légèrement basique contenant la Fmoc-Lys-OH et du sulfate de cuivre en quantité catalytique. Une fois la réaction complète, le produit **9** est isolé avec une excellente pureté (> 95%) et un rendement quantitatif. Ce composé a été testé dans les conditions classiques utilisées en SPPS (piperidine, TFA, DIPEA, TIS...) et n'a révélé aucune dégradation de la fonction azoture. Cependant, certains réactifs comme l'éthanedithiol, les phosphines, les complexes de palladium et certains sels métalliques doivent être évités car ils peuvent réduire la fonction azoture en amine.

¹⁸⁸ Alper, P. B.; Hung, S. C.; Wong, C. H., Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines. *Tetrahedron Lett* **1996**, 37 (34), 6029-6032.

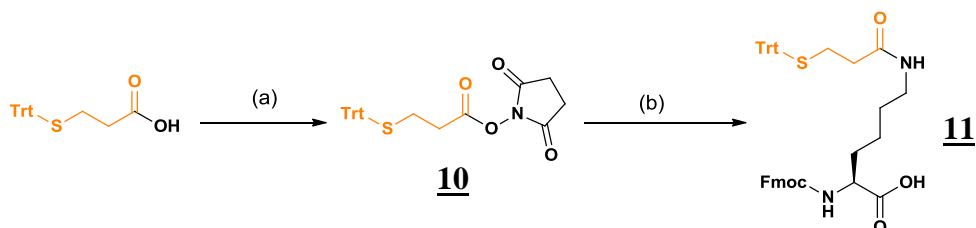
¹⁸⁹ Nyffeler, P. T.; Liang, C. H.; Koeller, K. M.; Wong, C. H., The chemistry of amine-azide interconversion: Catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction. *J Am Chem Soc* **2002**, 124 (36), 10773-10778.

¹⁹⁰ Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V., An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: Imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. *Org. Lett.* **2007**, 9, 3797-3800.

¹⁹¹ Katayama, H.; Hojo, H.; Ohira, T.; Nakahara, Y., An efficient peptide ligation using azido-protected peptides via the thioester method. *Tetrahedron Lett* **2008**, 49 (38), 5492-5494.

★ Synthèse de dérivés de Lysine présentant un thiol protégé

Pour introduire une fonction thiol dans un peptide, la stratégie la plus courante consiste à incorporer un résidu cystéine dans la séquence peptidique. Dans notre cas où l'on souhaite réaliser les ligations thioéther et oximes de manières orthogonales, l'utilisation d'une cystéine en N-Terminale serait problématique. En milieu acide, un dérivé aldéhyde peut réagir à la fois sur une oxyamine et un aminothiols pour former une thiazolidine.¹⁵⁴ Afin d'éviter cette réaction non désirée, le dérivé thiol ne devra pas posséder d'amine en position β .



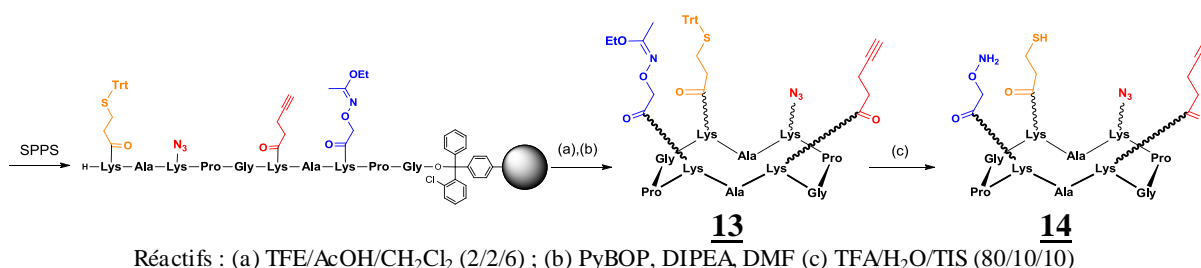
Réactifs : (a) DCC, NHS, Acétate d'éthyle/dioxane ; (b) Fmoc-Lys-OH, DIPEA, DMF.

Figure 43 : Schéma de synthèse de l'acide aminé modifié présentant une fonction thiol protégée par un trityle

Pour des raisons d'homogénéité avec les autres acides aminés synthétisés, nous avons décidé d'utiliser la même stratégie qu'auparavant en modifiant une lysine sur sa chaîne latérale. La fonction thiol est introduite sur une Fmoc-Lys-OH par greffage amide de l'acide 3-(tritylthio)propanoïque préalablement activé (Figure 43). Comme pour les synthèses précédentes, le composé **11** est obtenu avec un rendement quantitatif et une bonne pureté.

Les différentes synthèses réalisées avec cet acide aminé modifié montrent que ce dernier est stable dans les conditions de synthèse utilisées en SPPS. Par ailleurs, le groupement trityle est résistant aux conditions de décrochage d'un peptide sur résine 2-chlorotrityle[®] en milieu faiblement acide (AcOH).

★ Synthèse d'un châssis moléculaire comportant différents acides aminés modifiés



Réactifs : (a) TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/2/6) ; (b) PyBOP, DIPEA, DMF (c) TFA/H₂O/TIS (80/10/10)

Figure 44 : Schéma de synthèse du châssis moléculaire présentant une fonction oxyamine, une fonction thiol, une fonction azoture et une fonction alcynes

La conception des différents châssis moléculaires requiert une stratégie de synthèse mixte en phase solide et en solution. Afin de démontrer la stabilité et la bonne réactivité des différents acides aminés modifiés, nous avons décidé de synthétiser un modèle de châssis moléculaire présentant quatre fonctions chimiosélectives différentes. Les composés **5**, **7**, **9** et **11** ont été incorporés lors de la SPPS en stratégie Fmoc/tBu sur une résine acido-labile : la 2-chlorotrityle[®]. Cette résine présente l'avantage de récupérer les peptides dans des conditions très douces (acide acétique/Trifluoroéthanol/Dichlorométhane). L'accrochage du premier

résidu ne nécessite pas d'activation, ce qui limite les risques de racémisation. La synthèse débute par l'attaque nucléophile du carboxylate du premier acide aminé sur la résine 2-chlorotrityle[®] en condition basique. La synthèse d'un peptide cyclique débute généralement par un résidu achiral comme la glycine permettant de limiter les phénomènes d'épimérisation qui peuvent apparaître lors de l'étape de cyclisation. Les cycles de déprotection des amines N-terminales sont effectués avec une solution de pipéridine à 20 %. Les couplages peptidiques sont réalisés au moyen d'agents de couplage comme le PyBOP ou HOBt en présence d'un excès de réactifs (2 équiv. d'acides aminés et d'agents de couplage). En fin de synthèse, le peptide protégé est libéré du support dans des conditions acides (TFE/AcOH/CH₂Cl₂) compatibles avec les différents groupements protecteurs (Trityle et éthoxyéthylidène). La cyclisation du peptide **12** est réalisée entre les extrémités acide et amine en présence d'agent de couplage, en milieu très dilué ($5 \cdot 10^{-4}$ M). Ces conditions de hautes dilutions permettent de limiter les phénomènes de polymérisation et donc de favoriser la réaction de cyclisation intramoléculaire. Pour finir, la déprotection totale du cyclopeptide **13** est réalisée au moyen d'une solution de TFA/TIS/H₂O. L'utilisation de l'eau est nécessaire à l'élimination du groupement éthoxyéthylidène tandis que le triisopropylsilane est utilisé comme piègeur pour réduire les carbocations formés. Les analyses HPLC réalisées sur le produit brut montrent que cette procédure n'induit aucune dégradation des différentes fonctions présentes sur le châssis (Figure 45). Après purification par chromatographie liquide, le châssis pur **14** est obtenu avec un rendement global de 61 %.

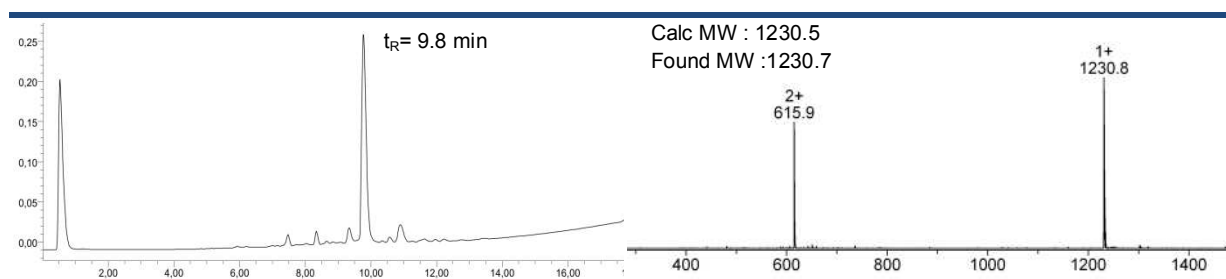


Figure 45 : Chromatogramme et spectre ESI du composé **14** brut

Cette procédure de synthèse offre un gain considérable en termes de rendement et de nombre d'étapes de synthèse. Dans le cas de ce châssis particulier, une stratégie de synthèse dite classique (déprotection orthogonale des lysines suivie de l'introduction des différentes fonctions) aurait été extrêmement délicate. En effet, les fonctions azoture et alcyne ne sont pas compatibles avec les conditions d'élimination de certains groupes protecteurs orthogonaux (Hydrogénation catalytique, Complexes de palladium, ZnCl₂, SnCl₂, éthanedithiol ...). Dans cette approche, les conditions de déprotections utilisées sont totalement compatibles avec les différentes fonctions présentes. Cette méthodologie de synthèse permet de concevoir une large variété de châssis moléculaires parfaitement contrôlés en combinant les différents acides aminés modifiés.

A.5. Assemblage biomoléculaire par ligation chimiosélective

Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont montré que le cyclopeptide RAFT peut être utilisé efficacement pour améliorer l'affinité d'un ligand envers sa cible. Dans ce contexte, différentes méthodologies de synthèse ont été développées afin de réaliser des ligands multivalents supportés par ce type de châssis (Figure 46). La stratégie de synthèse la plus efficace consiste à préparer séparément les différents fragments peptidiques puis de les assembler en solution en utilisant un lien chimiosélectif. Pour cela, les ligands et les sites d'accrochages du châssis doivent être fonctionnalisés par des groupes fonctionnels impliqués dans la ligation. Deux types de ligations ont été utilisés pour réaliser ces structures multivalentes : la ligation oxime et la ligation CuAAC. Pour illustrer les différentes procédures de synthèses, nous avons procédé à la ligation multiple sur le châssis moléculaire d'un cyclopentapeptide présentant le motif RGD ciblant spécifiquement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

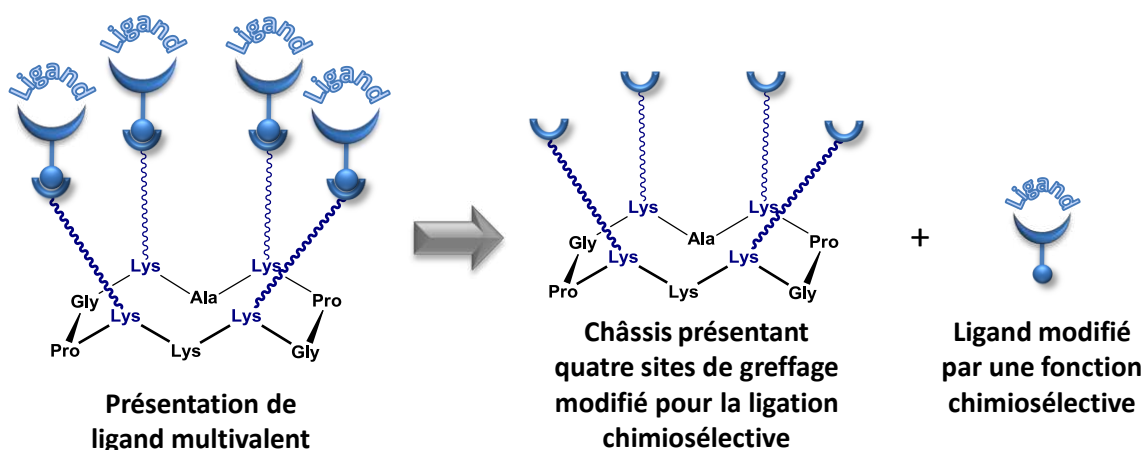
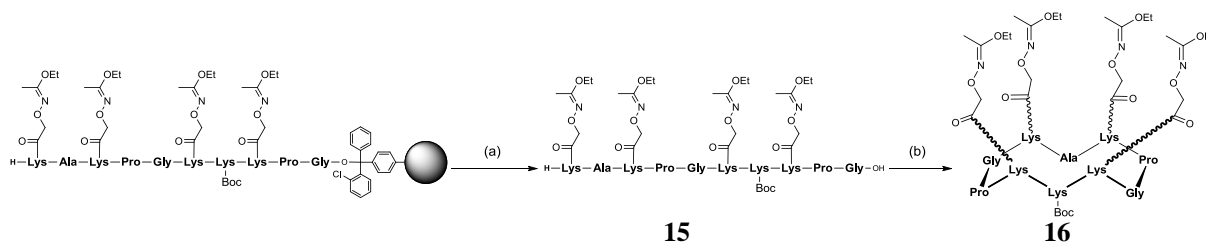


Figure 46 : Schéma rétro-synthétique d'assemblage biomoléculaire par ligation chimiosélective

A.5.1. Assemblage biomoléculaire par ligation Oxime

Pour réaliser le lien éther d'oxime, le châssis est fonctionnalisé de manière contrôlée sur sa face supérieure avec quatre fonctions oxyamine protégées. Les ligands peptidiques sont fonctionnalisés avec une fonction aldéhyde masquée introduite grâce à un résidu sérine protégé. La coupure oxydante de la fonction 1,2-aminoéthanol de la sérine par le périodate de sodium produit un aldéhyde glyoxylique. L'assemblage de ces peptides aldéhydiques sur le châssis par ligation oxime permet d'accéder à des structures multivalentes.

★ Synthèse du châssis fonctionnalisé par quatre oxyamines protégées



Réactifs : (a) TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/2/6) ; (b) PyBOP, DIPEA, DMF

Figure 47 : Schéma de synthèse du châssis moléculaire présentant quatre fonctions oxyamine protégées par des groupements 1-éthoxyéthylidène

Pour effectuer la synthèse du châssis **16**, on procède à l'assemblage du peptide linéaire sur une résine 2-chlorotrityle[®] en incorporant, durant la SPPS, l'acide aminé modifié **5** porteur du groupement oxyamine. Afin de conserver les groupements 1-éthoxyéthylidène sur les fonctions oxyamine, le peptide est libéré de la résine dans des conditions douces AcOH/TFE/CH₂Cl₂ (1/1/8). La cyclisation intramoléculaire du peptide **15** est réalisée en solution, en présence d'agent de couplage, dans des conditions de haute dilution. Après précipitation à l'éther éthylique, le peptide brut **16** est récupéré avec un excellent rendement et une pureté suffisante pour son utilisation ultérieure (Figure 48).

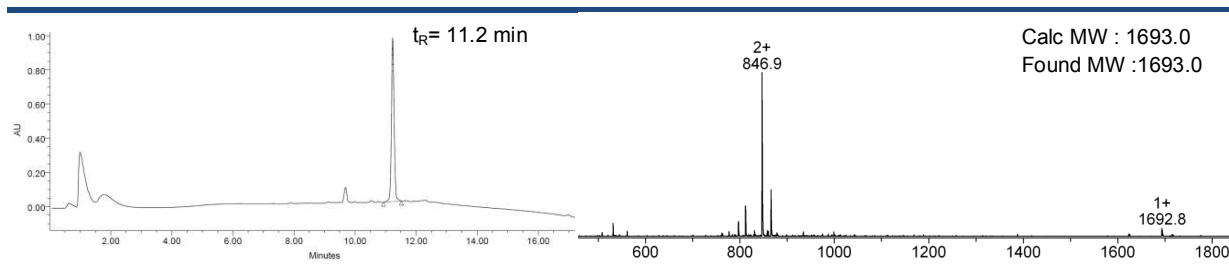


Figure 48 : Chromatogramme et spectre ESI du composé **16** brut

★ Synthèse des ligands c[-RXDfK-] aldéhydiques

La préparation du cyclopeptide c[-RGDfK-] fonctionnalisé sur le résidu lysine par un aldéhyde glyoxylique a été développée dans les travaux précédents.¹³² La mutation du résidu glycine au sein 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 (cf. p.134). Les cyclopentapeptides contenant les motifs -RGD- et -RβAD- sont préparés selon la même stratégie.

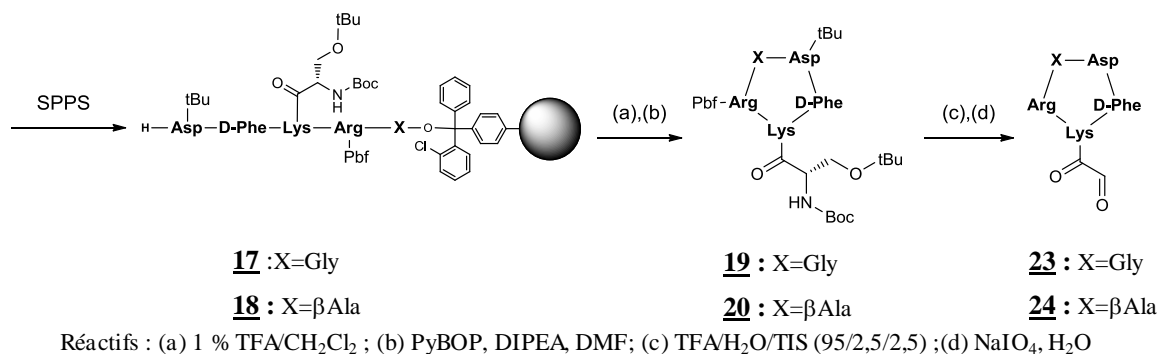
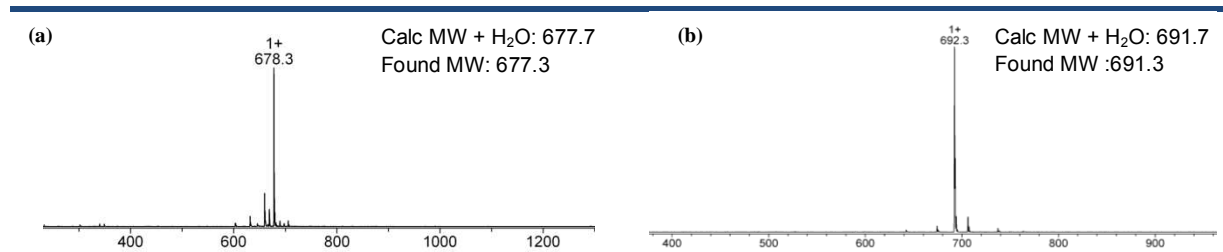


Figure 49 : Schéma de synthèse du c[-RXDfK-] fonctionnalisé par un aldéhyde

Le peptide linéaire est synthétisé sur une résine 2-chlorotrityle[®] en utilisant les différents acides aminés protégés et le composé **2** présentant la fonction aldéhyde masquée. La séquence de ce peptide débute par un résidu achiral (glycine ou β-alanine) en C-Terminal afin de s'affranchir des problèmes d'épimérisation pouvant survenir durant l'étape de cyclisation. Après élongation du peptide, celui-ci est décroché de la résine dans une solution faiblement acide (1% de TFA) compatible avec les différents groupements protecteurs (Pbf, tBu, Boc). Les peptides protégés sont ensuite cyclisés en solution puis totalement déprotégés en milieu acide au moyen d'une solution de TFA (95%) en présence d'agents piégeant les différents carbocations libérés. L'oxydation de la fonction 1,2-aminoalcool du résidu sérine est effectuée en milieu aqueux en présence d'un excès de périodate de sodium (10 équiv.). A l'issue de la réaction, les composés sont directement purifiés par HPLC préparative afin d'éliminer les sels présents ainsi que le formaldéhyde libéré lors de la coupure oxydante. Les composés **23** et **24** sont obtenus avec un rendement global de l'ordre de 55 % et une excellente pureté (Figure 50).

Figure 50 : Spectre ESI du composé (a) **23** et (b) **24**

★ Procédure de ligation oxime

Le lien éther d'oxime résultant de la réaction entre une oxyamine et un aldéhyde s'effectue généralement en milieu acide dans une gamme de pH compris entre 4 et 5. Dans notre stratégie, l'aldéhyde glyoxylique permet la formation d'un lien oxime présentant une meilleure stabilité à bas pH comparé aux oximes aliphatiques. Cette stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse acide est due à la présence d'un carbonyle en α offrant plusieurs formes de résonances (Figure 51).

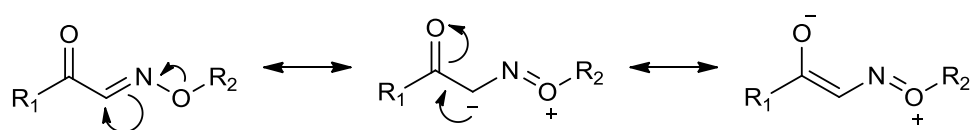


Figure 51 : Formes de résonances d'un éther d'oxime glyoxylique

Grâce à ses propriétés particulières, il est possible de procéder à la formation de l'oxime à bas pH sans affecter l'efficacité de la réaction en termes de cinétique et de rendement. Par ailleurs, les fonctions oxyamine étant extrêmement réactives, il est nécessaire de prendre certaines précautions lors de leurs déprotections. Les manipulations doivent être réalisées dans des milieux libres de tous composés carbonylés comme l'acétone ou le formaldéhyde. C'est pourquoi, il est souvent préférable de réaliser la déprotection des fonctions oxyamine et les couplages avec les composés aldéhydes en une seule étape.

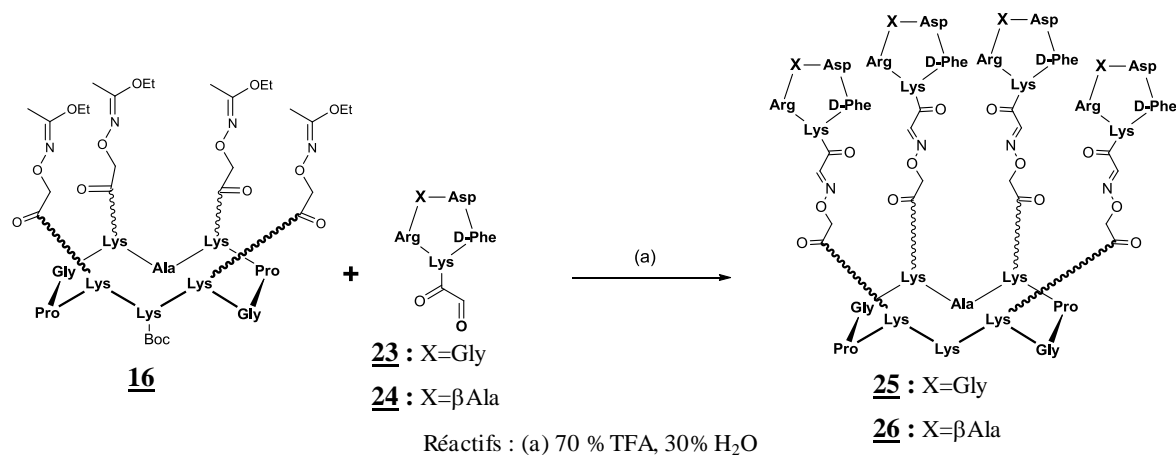


Figure 52 : Schéma d'assemblage de c[-RXDfK-] sur le châssis 16 par ligation oxime

Le couplage par lien oxime des peptides aldéhydes 23 ou 24 sur le châssis 16 protégé est réalisé dans une solution contenant 70% de TFA et 30 % d'eau (Figure 52). Cette réaction est généralement effectuée en utilisant un excès de composés aldéhydes (1,5 équiv. par site oxyamine). La forte concentration en TFA utilisée est nécessaire pour une déprotection rapide des groupements Boc et permet de réduire la formation d'agrégats. Dans le cas où l'on souhaite garder ce groupe protecteur, il est possible d'effectuer cette réaction avec un pourcentage de TFA plus faible de l'ordre de 5%. Dans ces conditions, les groupements 1-éthoxyéthylidène sont rapidement enlevés tandis que les groupements Boc restent stables tout au long de la réaction. Au bout de 30 minutes de réaction, la ligation est complète et les produits sont directement purifiés par HPLC préparative. Les conjugués 25 et 26 sont obtenus avec des rendements de l'ordre de 60-70 % et une excellente pureté (Figure 53).

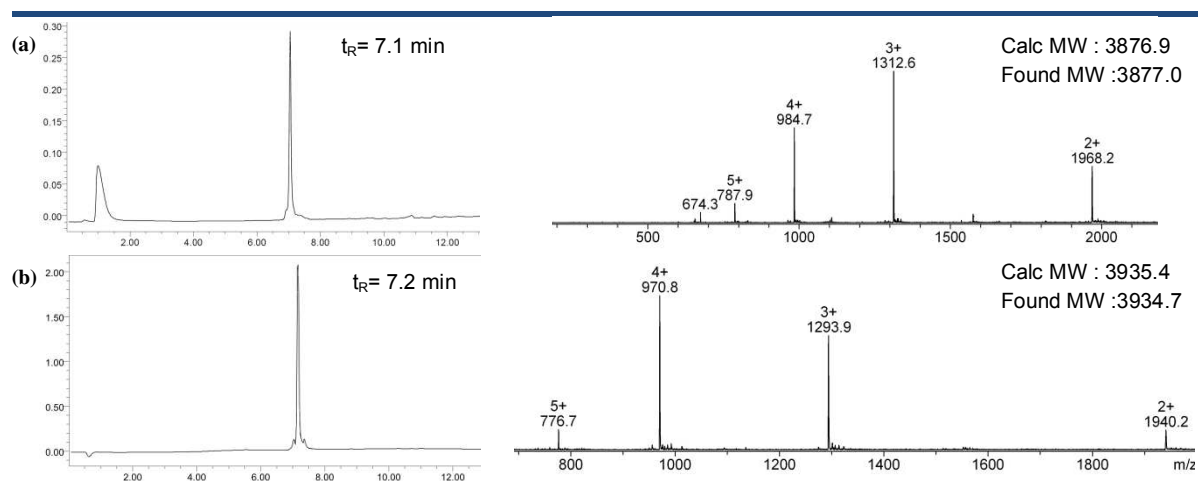


Figure 53 : Chromatogramme et spectre ESI des composés (a) 25 et (b) 26

Cette voie de synthèse permet de diminuer le temps de réaction au cours duquel les fonctions oxyamine sont libres, limitant ainsi les réactions secondaires que peuvent subir ces fonctions.

A.5.2. Assemblage biomoléculaire par ligation CuAAC

Pour réaliser le greffage de quatre ligands sur le châssis via un lien triazole, les différents fragments doivent être fonctionnalisés par les deux fonctions requises pour la ligation. Dans cette approche, le châssis a été modifié sur sa face supérieure par quatre fonctions alcyne tandis que les ligands peptidiques ont été fonctionnalisés par une fonction azoture introduite via l'acide azidoacétique.

★ Synthèse du châssis fonctionnalisé par quatre fonctions alcyne

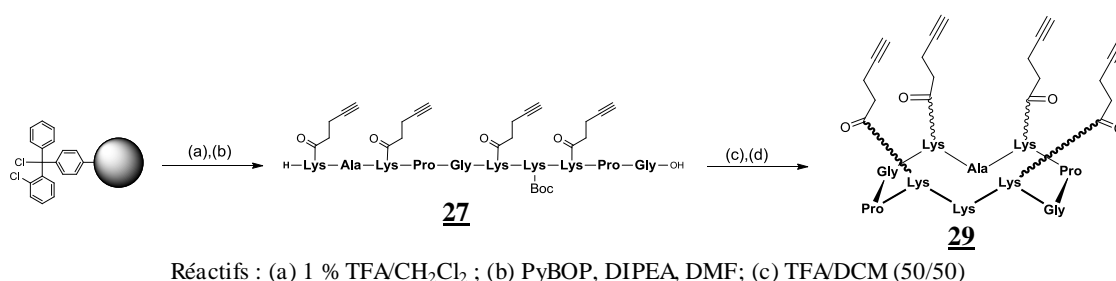


Figure 54 : Schéma de synthèse du châssis moléculaire présentant quatre fonctions alcyne

Pour effectuer la synthèse du châssis **29**, on procède à l'assemblage du peptide linéaire sur une résine 2-chlorotrityle[®] en introduisant, durant la SPPS, la lysine modifiée par une fonction alcyne **7**. A l'inverse du composé **16**, ce peptide ne possède pas de groupements sensibles au TFA et peut donc être décroché plus rapidement de la résine au moyen d'une solution à 1% de TFA. Après cyclisation et déprotection en milieu acide (50% TFA dans le DCM), le peptide brut **29** est récupéré avec un bon rendement et une pureté satisfaisante (Figure 55). Cependant, les premiers essais de ligations réalisés avec un peptide brut n'ont pas été très concluants. Le produit brut comporte de nombreux sels et autres impuretés qui peuvent interférer avec le bon déroulement de la ligation. Il est donc parfois préférable de purifier le composé par HPLC préparative même si cette technique engendre la perte de composé.

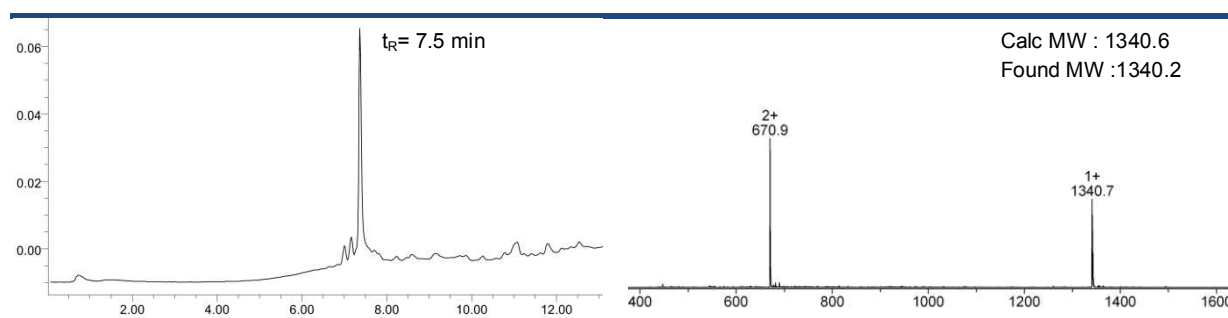
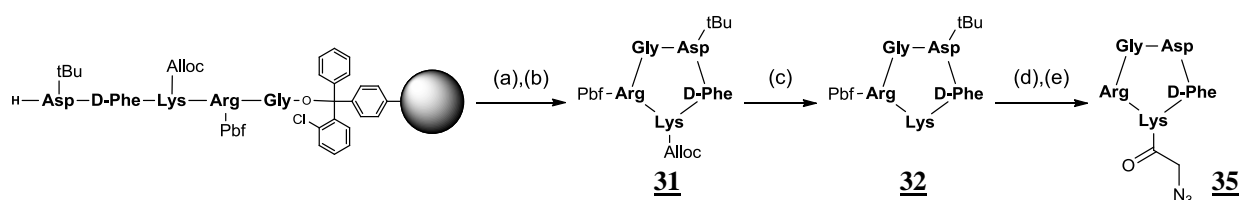


Figure 55 : Chromatogramme et spectre ESI du composé **29** brut

★ Synthèse de ligand c[-RGDFK-] fonctionnalisé par une fonction azoture



Réactifs : (a) 1 % TFA/CH₂Cl₂ ; (b) PyBOP, DIPEA, DMF ; (c) Pd⁰(PPh₃)₄, PhSiH₃, CH₂Cl₂ /DMF ; (d) acide azidoacétique, DIPEA, DMF ; (e) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5)

Figure 56 : Schéma de synthèse du c[-RGDFK-] fonctionnalisé par un azoture

Le peptide linéaire est synthétisé dans les mêmes conditions que le composé **23** à la différence que l'on introduit une lysine dont l'amine ε est protégée par un groupe orthogonal Alloc. Après décrochage du support et cyclisation du peptide protégé, on procède à la déprotection orthogonale de la chaîne latérale du résidu lysine. Le groupement Alloc est éliminé par une catalyse au palladium (0) en présence d'un large excès de phénylsilane (PhSiH₃) en milieu anhydre. Après 30 minutes de réaction, le peptide **32** est précipité dans l'éther éthylique permettant d'éliminer les réactifs restant dans le surnageant. Ensuite, la fonction azoture est apportée par couplage amide de l'acide azidoacétique **33** sur le résidu lysine en présence d'agent de couplage. Le peptide obtenu **34** est enfin totalement déprotégé dans une solution concentrée en TFA pendant deux heures. Après précipitation du peptide à l'éther et purification par HPLC préparative, on obtient le peptide azoture pur **35** avec un rendement global de 55% (Figure 57).

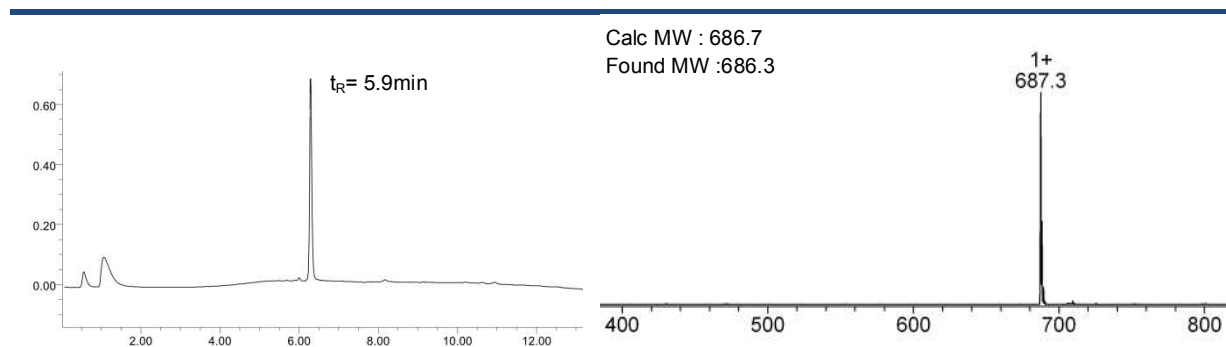


Figure 57 : Chromatogramme et spectre ESI du composé **35**

★ Procédure de ligation chimiosélective CuAAC

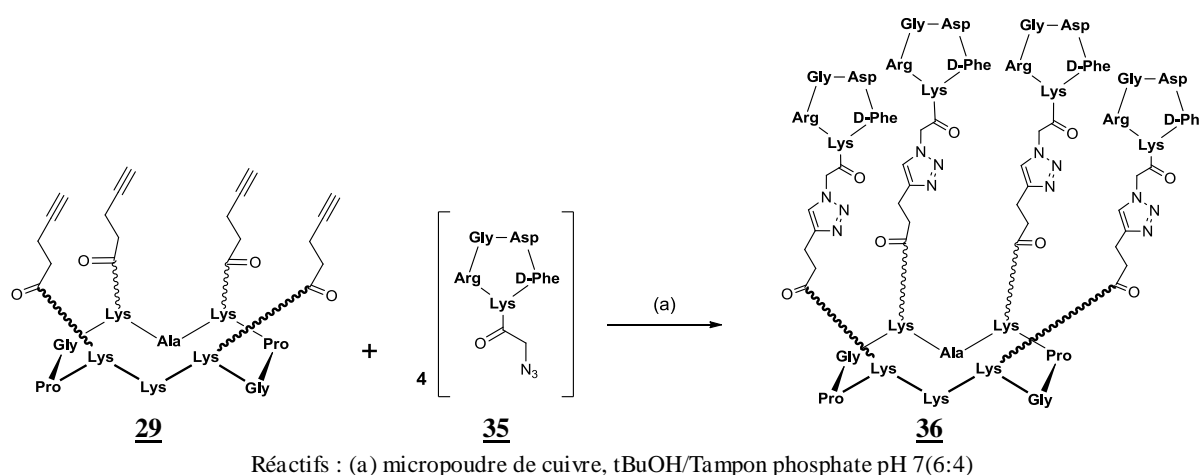


Figure 58 : Schéma d'assemblage de *c*[-RGDfK-] **35** sur le châssis **29** par ligation CuAAC

La réalisation du lien triazole entre le châssis **29** et les quatre unités de ligand **35** a nécessité de nombreuses optimisations (Figure 58). Différents paramètres doivent être rigoureusement contrôlés pour effectuer cette ligation de manière efficace : la température, le pH, le solvant, la concentration et la source de Cu^I. Nous avons donc procédé à différents essais de ligation entre le châssis **29** et le ligand azoture **35** en excès (1,2 équiv. par alcyne). En variant certaines conditions opératoires et en suivant l'avancement de la réaction par HPLC analytiques, nous avons pu déterminer les conditions optimales de synthèse du composé **36** (Tableau 6).

Solvant	Réactifs	Température (°C)	Temps	Conversion HPLC
<i>t</i> BuOH/Eau (6:4)	CuSO ₄ (0.1 équiv.) AscNa (0.2 équiv.)	40°C	48 h	0%
<i>t</i> BuOH/Tampon phosphate pH 7 (6:4)	CuSO ₄ (0.1 équiv.) AscNa (0.2 équiv.)	40°C	48 h	10%
<i>t</i> BuOH/Tampon phosphate pH 7 (6:4)	CuSO ₄ (10 équiv.) AscNa (20 équiv.)	40°C	48 h	26%
<i>t</i> BuOH/Tampon phosphate pH 7 (6:4)	Micropoudre de cuivre (10 équiv.)	TA	18 h	Quantitative
<i>t</i> BuOH/Tampon phosphate pH 7 (6:4)	Micropoudre de cuivre (10 équiv.) AscNa (0.2 équiv.)	TA	18 h	Quantitative
CH ₃ CN/Eau (6:4)	Micropoudre de cuivre (10 équiv.) DIPEA (pH 8)	TA	18 h	Quantitative

Tableau 6 : Conditions utilisées pour l'assemblage de *c*[-RGDfK-] sur le châssis **29** par ligation CuAAC

Dans cette étude, on remarque que la source de Cu^I est un paramètre critique pour l'efficacité de la réaction. Les conditions classiques utilisant CuSO₄ en présence d'ascorbate de sodium comme agent réducteur ont donné des résultats plutôt médiocres. En revanche, l'utilisation de micropoudre de cuivre, permettant de catalyser la réaction à la surface de la

particule en générant du Cu^{I} , s'est révélée particulièrement efficace.¹⁹² De plus, ces conditions sont très simples à mettre en œuvre et l'élimination du cuivre solide par filtration facilite la purification du produit. Afin d'éliminer l'excès de réactif, la mixture est purifiée par HPLC préparative offrant le composé **36** pur avec un bon rendement de 70 % (Figure 59).

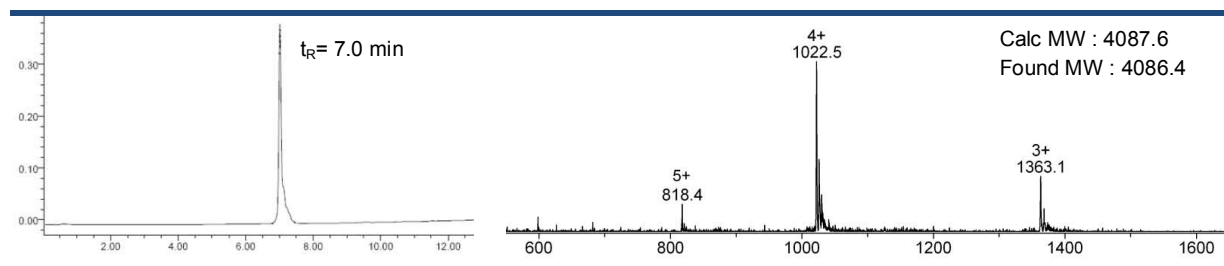


Figure 59: Chromatogramme et spectre ESI du composé **36**

A.6. Assemblage biomoléculaire via deux ligations chimiosélectives orthogonales

La formation successive de ligations chimiosélectives permet d'accéder à une large variété de structures complexes parfaitement contrôlées. Deux grandes stratégies peuvent être utilisées pour réaliser cette approche. La première consiste à assembler plusieurs fragments par formation successive d'un même type de lien. Bien qu'efficace, cette stratégie nécessite la déprotection du groupe fonctionnel requis pour procéder à la ligation suivante.^{157,160,193} En revanche, la combinaison de différentes réactions chimiosélectives orthogonales permet de s'affranchir des étapes de déprotection et permet dans certains cas une synthèse en « One-pot ». Cette stratégie faisant intervenir deux types de ligations orthogonales est peu référencée dans la littérature. Différentes combinaisons de lien ont été étudiées comme hydrazone/thioéther,¹⁹⁴ oxime/thioéther,¹⁹⁵ oxime/thioester,¹⁹⁶ CuAAC/Diels-Alder,¹⁹⁷ CuAAC/Ligation native¹⁹⁸ et CuAAC/oxime.^{187,199}

¹⁹² (a) Wan, Q.; Chen, J. H.; Chen, G.; Danishefsky, S. J., A potentially valuable advance in the synthesis of carbohydrate-based anticancer vaccines through extended cycloaddition chemistry. *J. Org. Chem.* **2006**, 71 (21), 8244-8249; (b) Pachon, L. D.; van Maarseveen, J. H.; Rothenberg, G., Click chemistry: Copper clusters catalyze the cycloaddition of azides with terminal alkynes. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347 (6), 811-815.

¹⁹³ Aucagne, V.; Leigh, D. A., Chemoselective formation of successive triazole linkages in one pot: "Click-click" chemistry. *Org. Lett.* **2006**, 8 (20), 4505-4507.

¹⁹⁴ Grandjean, C.; Rommens, C.; Gras-Masse, H.; Melnyk, O., One-pot synthesis of antigen-bearing, lysine-based cluster mannosides using two orthogonal chemoselective ligation reactions. *Angew Chem Int Ed* **2000**, 39 (6), 1068-+.

¹⁹⁵ Clave, G.; Boutal, H.; Hoang, A.; Perraut, F.; Volland, H.; Renard, P. Y.; Romieu, A., A novel heterotrifunctional peptide-based cross-linking reagent for facile access to bioconjugates. Applications to peptide fluorescent labelling and immobilisation. *Org Biomol Chem* **2008**, 6 (17), 3065-3078.

¹⁹⁶ Canne, L. E.; Ferredamare, A. R.; Burley, S. K.; Kent, S. B. H., Total chemical synthesis of a unique transcription factor-related protein: cMycMax. *J Am Chem Soc* **1995**, 117 (11), 2998-3007.

¹⁹⁷ Vieyres, A.; Lam, T.; Gillet, R.; Franc, G.; Castonguay, A.; Kakkar, A., Combined Cu-I-catalysed alkyne-azide cycloaddition and furan-maleimide Diels-Alder "click" chemistry approach to thermoresponsive dendrimers. *Chem Commun* **2010**, 46 (11), 1875-1877.

¹⁹⁸ (a) Xiao, J. P.; Tolbert, T. J., Synthesis of N-Terminally Linked Protein Dimers and Trimers by a Combined Native Chemical Ligation-CuAAC Click Chemistry Strategy. *Org. Lett.* **2009**, 11 (18), 4144-4147; (b) Lee, D. J.;

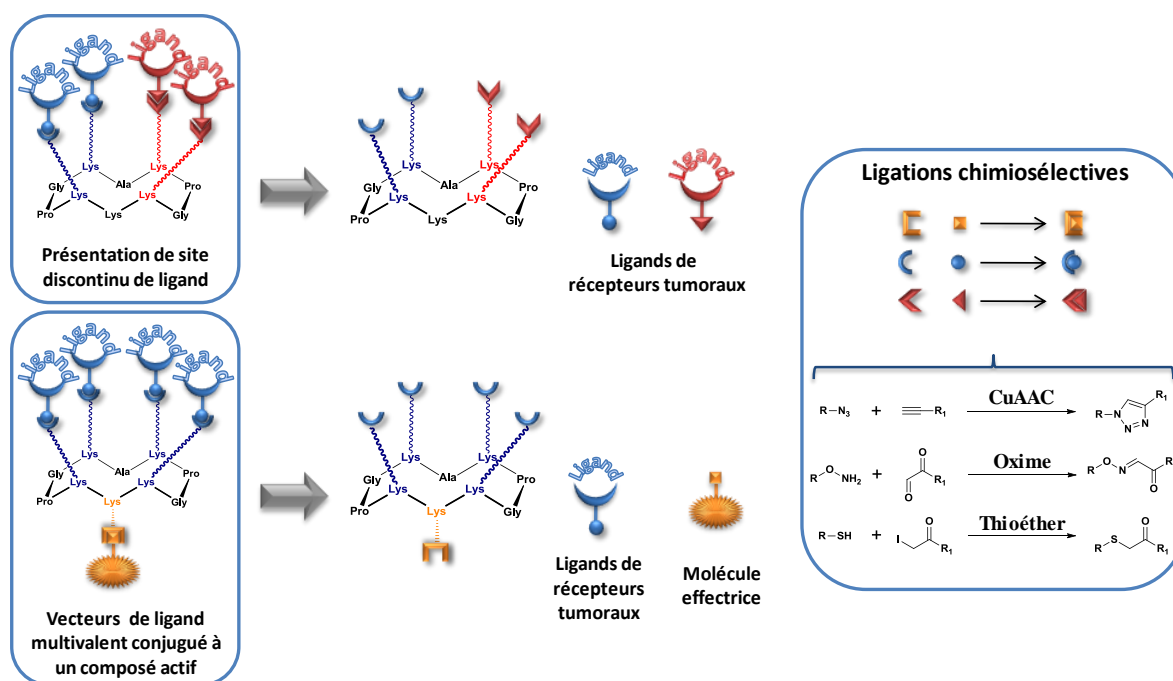


Figure 60 : Stratégie d'assemblage en combinant deux ligations chimiosélectives orthogonales

Dans ces travaux de thèses, différentes procédures combinant la ligation CuAAC, la ligation oxime et la ligation thioéther ont été développées. Cette approche nous permet de contrôler les différents sites de greffage du châssis afin de concevoir des structures bien déterminées (Figure 60). Cette méthodologie permet d'accéder à des modèles structuraux présentant un site discontinu en greffant deux ligands sur la face supérieure du châssis. Par ailleurs, l'introduction d'un second lien chimiosélectif sur les vecteurs multivalents facilite la conjugaison avec une molécule effectrice.

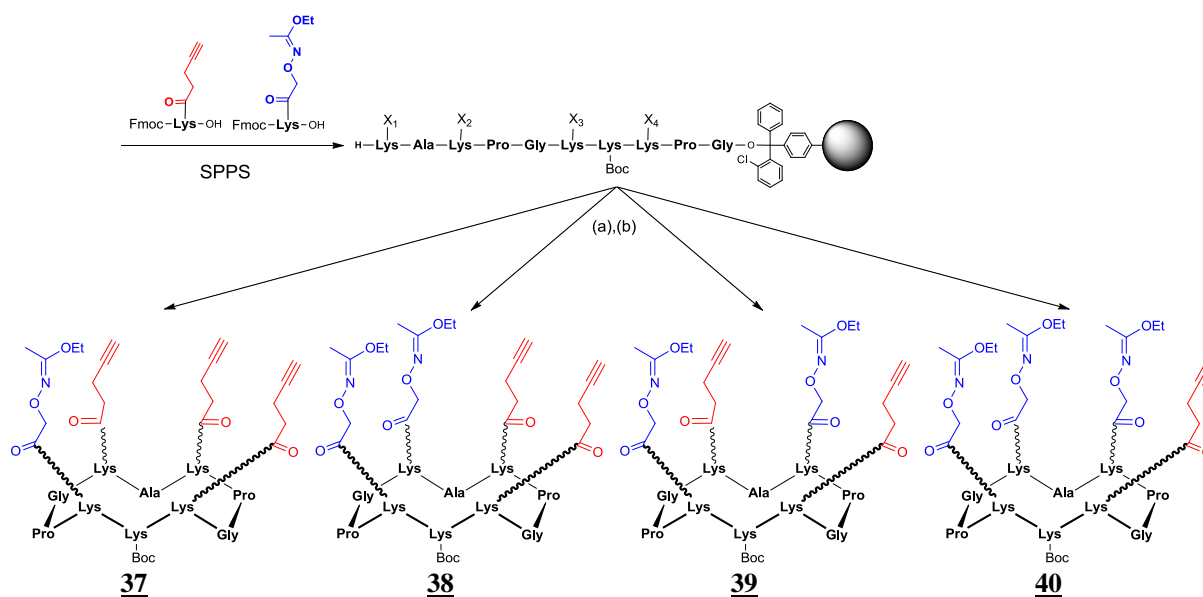
A.6.1. Procédure de synthèse de sites discontinus par ligation Oxime-CuAAC

En premier lieu, nous avons mis au point des procédures de synthèse combinant la ligation CuAAC et la ligation oxime (cf Annexe I).¹⁸⁷ Pour illustrer cette stratégie, nous avons procédé au greffage orthogonal sur le châssis moléculaire des deux cyclopentapeptides **24** et **35** décrit auparavant. Le ligand -RGD- ciblant spécifiquement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est greffé via un lien triazole tandis que le peptide contrôle -RAD- est greffé par l'intermédiaire d'un lien éther d'oxime. Cette méthodologie nous permettra d'étudier la contribution biologique de chaque motif -RGD- en faisant varier le nombre de ligands supportés par le châssis (cf. p134). Pour cela, différents châssis présentant un nombre variable de fonctions alcyne et oxyamine ont été préparés.

Mandal, K.; Harris, P. W. R.; Brimble, M. A.; Kent, S. B. H., A One-Pot Approach to Neoglycopeptides using Orthogonal Native Chemical Ligation and Click Chemistry. *Org. Lett.* **2009**, 11 (22), 5270-5273.

¹⁹⁹ (a) Karskela, M.; Helkearo, M.; Virta, P.; Lonnberg, H., Synthesis of Oligonucleotide Glycoconjugates Using Sequential Click and Oximation Ligations. *Bioconj Chem* **2010**, 21 (4), 748-755; (b) Meyer, A.; Spinelli, N.; Dumy, P.; Vasseur, J. J.; Morvan, F.; Defrancq, E., Oligonucleotide sequential bis-conjugation via click-oxime and click-Huisgen procedures. *J Org Chem* **2010**, 75 (11), 3927-30.

★ Synthèse de châssis combinant les fonctions alcyne et oxyamine



Réactifs : (a) TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/2/6) ; (b) PyBOP, DIPEA, DMF

Figure 61 : Schéma de synthèse du châssis **37**, **38**, **39** et **40**

Les peptides linéaires sont synthétisés sur résine 2-chlorotrityle[®] en incorporant de manière contrôlée les dérivés de lysines **5** et **7** comportant les fonctions alcyne et oxyamine protégées. Après décrochage et cyclisation intramoléculaire des peptides, on obtient quatre châssis présentant des combinaisons différentes de groupes alcyne et oxyamine. Ces peptides sont obtenus avec d'excellents rendements et une pureté satisfaisante pour leurs utilisations ultérieures (Figure 62).

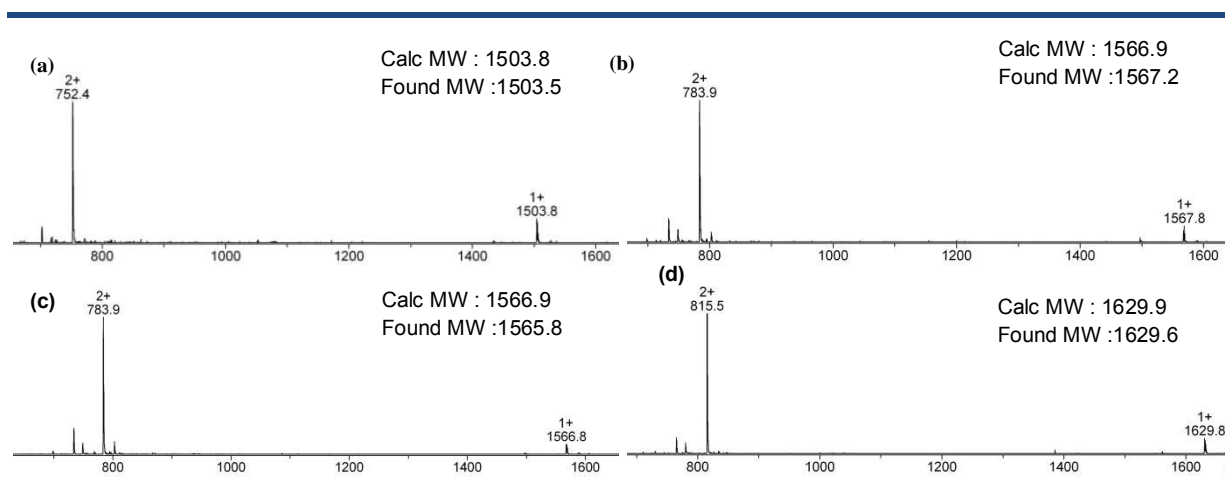
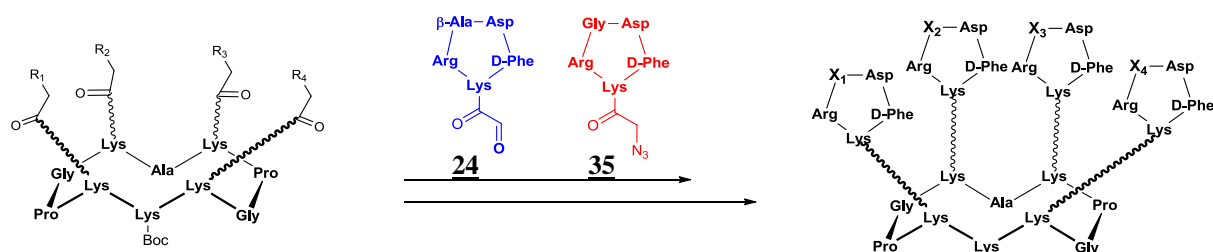


Figure 62: Spectre ESI des composés (a) **37**, (b) **38**, (c) **39** et (d) **40**

★ Procédure d'assemblage biomoléculaire, étape par étape, combinant ligation oxime et CuAAC

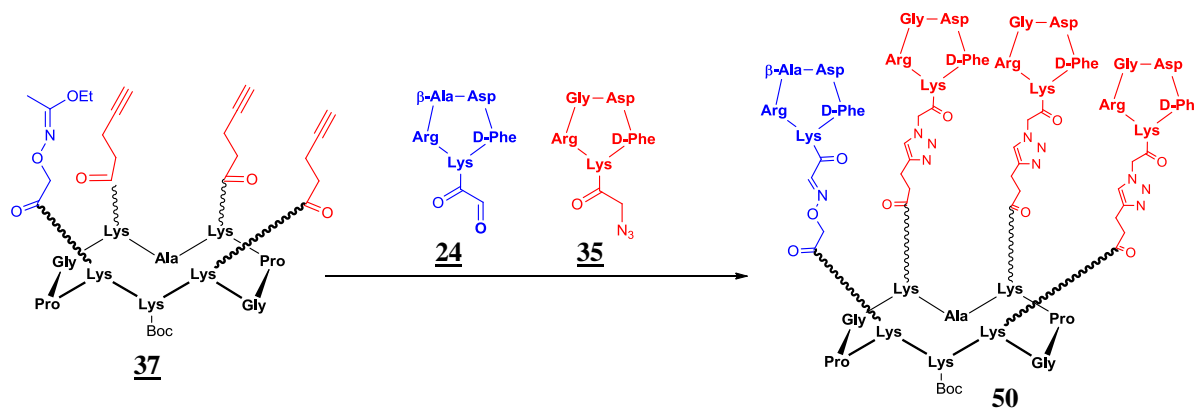


Procédure	Châssis	Intermédiaire	Produit	Rendement
(a),(b)	 37	 41	 42	45%
(a),(b)	 38	 43	 44	50%
(a),(b)	 39	 45	 46	48%
(a),(b)	 40	 47	 49	51%
(b),(a)	 40	 48	 49	45%

Procédures : (a) produit **35**, Cu⁰, tBuOH/Tampon phosphate pH 7(6:4) (b) produit **24**, TFA/H₂O (7:3)

Figure 63 : Schéma d'assemblage de c[-RGDFK-] et c[-RβADfK-] sur le châssis par ligation oxime et CuAAC

Pour assembler les peptides **24** et **35** sur les différents châssis, nous avons développé des procédures permettant la synthèse des produits en deux étapes ou en « One-pot » séquentielle. Les premiers essais de ligation ont été réalisés en deux étapes. Dans un premier temps, nous avons procédé à la ligation CuAAC du peptide azoture **35** dans les conditions décrites pour l'obtention du composé **36**. Après conversion totale du peptide, les produits obtenus sont purifiés par HPLC préparative. Il est important de noter que le groupement Eei est stable durant les conditions de cycloaddition en présence de Cu^0 . La ligation oxime du peptide aldéhyde **24** est ensuite effectuée dans une solution à 70 % de TFA. Ces conditions permettent d'enlever simultanément les groupements Eei et Boc sans affecter la formation du lien. Au bout d'une heure de réaction, l'analyse HPLC montre que la conversion est quantitative et qu'aucun produit de dégradation n'a été généré. Après purification, les différents montages sont obtenus avec des rendements globaux compris entre 40 et 50 %. La versatilité de cette stratégie de synthèse est ensuite vérifiée en réalisant la procédure inverse débutant par la ligation oxime. Après formation du lien oxime exécutée dans les mêmes conditions que précédemment et purification du produit, on procède à la formation du lien triazole. En présence de cuivre, le lien oxime ne subit aucune dégradation et l'efficacité de la ligation CuAAC reste inchangée. Après purification, cette procédure inverse offre des rendements quasi-similaires. Malgré une méthode de ligation efficace, les purifications HPLC successives font chuter le rendement des réactions.



Procédure : $\text{tBuOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (50:45:5) Cu^0 , 2h à TA puis ajout de DIPEA jusqu'à pH7

Figure 64 : Schéma d'assemblage « One-pot » de c[-RGDfK-] et c[-RβADfK-] sur le châssis X par ligation oxime et CuAAC

Afin d'éviter les procédures de séparation et de purification du peptide intermédiaire, nous avons décidé de réaliser les deux ligations chimiosélectives selon une stratégie « one-pot » (Figure 64). Etant donné que la ligation CuAAC s'opère dans des conditions neutres et la ligation oxime en milieu acide, il est nécessaire d'ajuster le pH pour finaliser l'assemblage de la biomolécule. Durant les études préliminaires, nous avons remarqué que le peptide aldéhyde montrait une certaine instabilité dans les conditions de cycloaddition. Pour illustrer cette procédure, le châssis **37** et les deux peptides **24** et **35** sont dissous dans une solution acide contenant 5% de TFA et de la micropoudre de cuivre. La conversion rapide du peptide **37** est observée et cela en présence de cuivre (Figure 65a). La formation exclusive de l'intermédiaire contenant une unité -RAD- et trois groupes alcynes a été obtenue. La neutralisation du pH par ajout de DIPEA permet la disparition complète de l'intermédiaire et la formation spécifique du peptide **50** (Figure 65b). Après purification par chromatographie

liquide préparative, on obtient le produit **50** avec un rendement supérieur à la méthodologie précédente de 68 %. Cette procédure a ensuite été réalisée avec les autres châssis **38** et **40** pour donner des résultats similaires avec des rendements compris entre 60 et 65%.

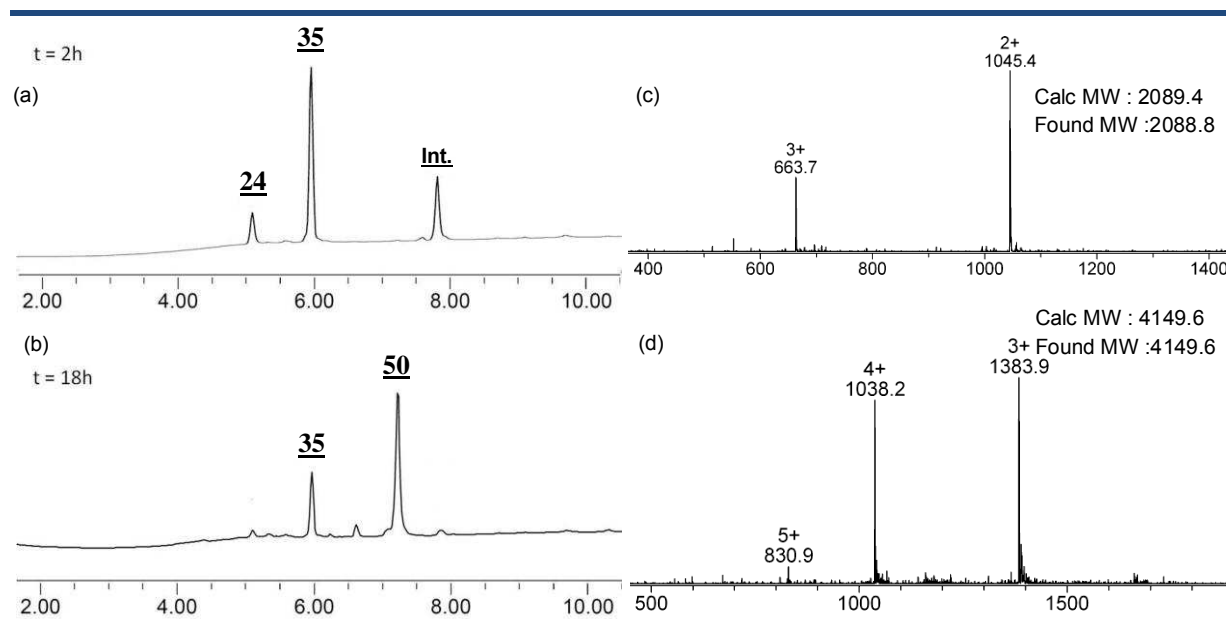


Figure 65: Suivi HPLC de l'assemblage « One-Pot » du composé **50** et spectre ESI de l'Intermédiaire (c) et du composé **50** (d)

A.6.2. Procédure de synthèse de vecteurs multivalents conjugués par ligation Oxime-CuAAC

La stratégie de double ligation orthogonale offre de multiples possibilités pour l'assemblage de biomolécule. En outre, elle nous a permis d'optimiser la synthèse de vecteur multivalent conjugué à une molécule effectrice. Dans ce contexte, nous avons développé une méthodologie de synthèse permettant la fonctionnalisation orthogonale des deux domaines du châssis. Cette approche nous a permis de réaliser une macromolécule présentant des ligands RGD multivalents conjugués à un sucre. L'incorporation d'un sucre permet d'augmenter la solubilité et la clairance du composé *in vivo* (cf. p135).²⁰⁰

* Synthèse du châssis fonctionnalisé par quatre alcyne et un aldéhyde

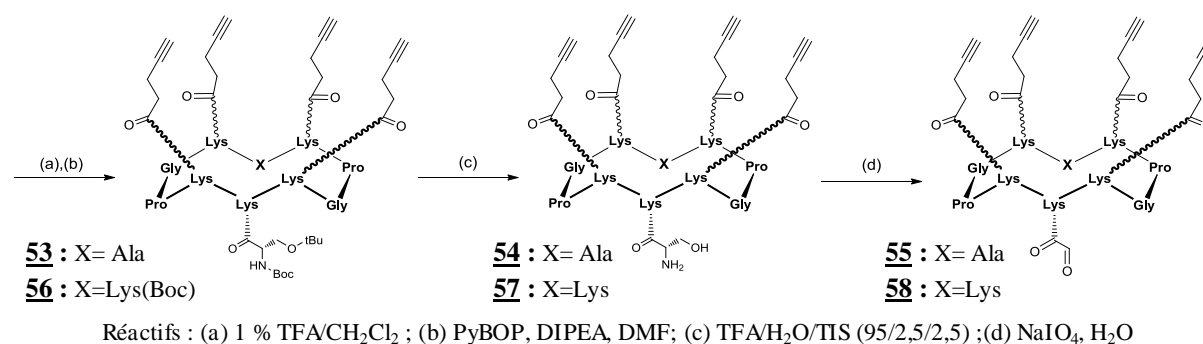


Figure 66 : Schéma de synthèse du châssis **58** présentant quatre fonctions alcyne et un aldéhyde

²⁰⁰ Galibert, M.; Sancey, L.; Renaudet, O.; Coll, J.-L.; Dumy, P.; Boturnyn, D., Application of click-click chemistry to the synthesis of new multivalent RGD conjugates. *Org Biomol Chem* **2010**, 8 (22), 5133-5138.

Dans cette synthèse les peptides -RGD- et l'unité glucose ont été greffés sur un cyclodécapeptide présentant quatre fonctions alcyne sur la face supérieure et une fonction aldéhyde sur la face inférieure. La synthèse du châssis est réalisée sur résine en introduisant dans un ordre bien déterminé les lysines modifiées **7** et **2** porteuses des fonctions chimiosélectives. Après décrochage du support et cyclisation intramoléculaire, on procède à la déprotection totale du peptide en milieu acide libérant ainsi le résidu sérine. La coupure oxydante de la fonction 1,2-aminoalcool par le périodate de sodium génère la fonction aldéhyde sans altérer les fonctions alcyne. Après purification du peptide, on obtient le châssis prêt pour l'assemblage chimiosélectif avec un rendement moyen de l'ordre de 48 % pour **55** et 43% pour **58** (Figure 67).

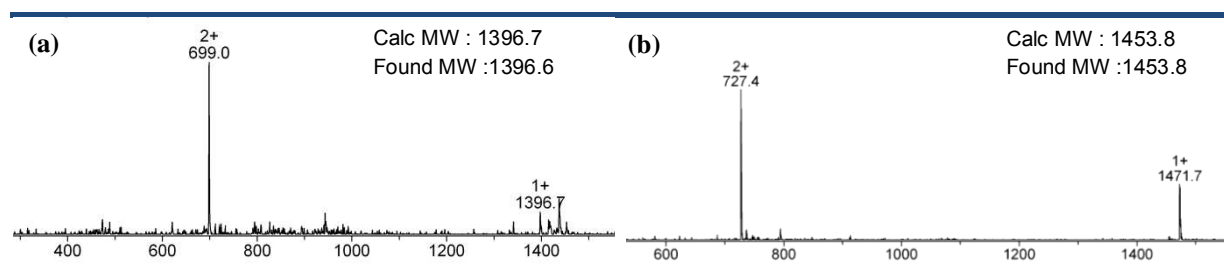


Figure 67: Spectre ESI du composé (a) **55** et (b) **58**

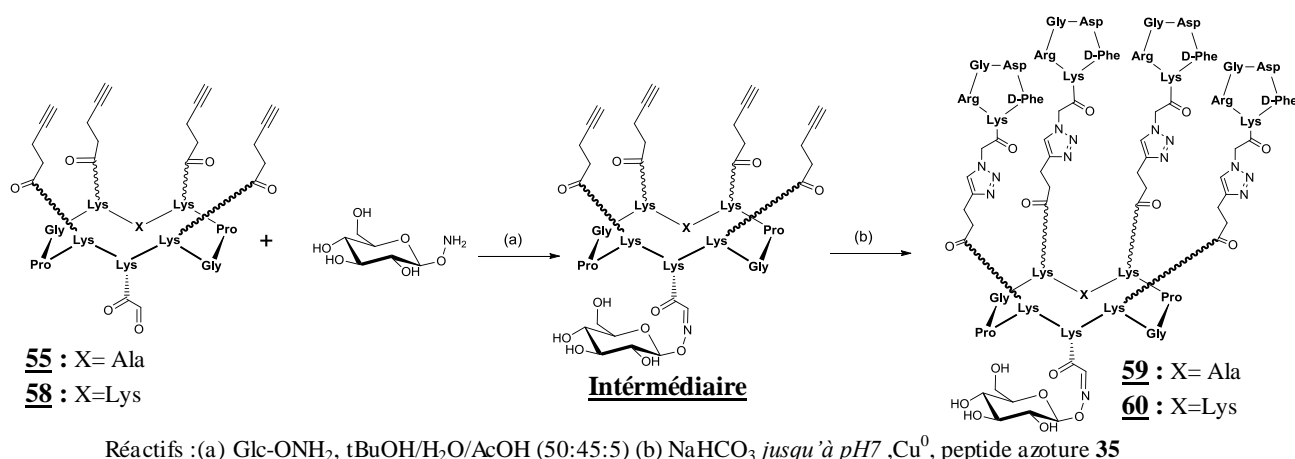


Figure 68 : Schéma d'assemblage « One-pot » séquentiel de c[-RGDfK-] X et Glc-OH₂ **35** sur le châssis par liaison oxime et CuAAC

Pour procéder à l'assemblage biomoléculaire du peptide azoture **35** et d'un glucose oxyamine²⁰¹ sur les châssis **55** ou **58**, on choisit de procéder selon une stratégie « One-pot » séquentielle (Figure 68). Glc-OH₂ et le châssis **55** ou **58** sont dissous dans une solution acide contenant 5 % d'acide acétique. Ici, l'utilisation de TFA n'est pas requise étant donné que l'oxyamine présent sur le sucre est libre. Dans ces conditions, la formation du lien oxime est rapide et quantitative (Figure 69a). Après neutralisation du pH par ajout de bicarbonate de sodium, on additionne directement dans le milieu le peptide azoture et le Cu⁰ pour procéder à la liaison CuAAC. Au bout de 18 heures, on observe la disparition complète de

²⁰¹ Renaudet, O.; Dumy, P., Expedient synthesis of aminoxyated-carbohydrates for chemoselective access of glycoconjugates. *Tetrahedron Lett* **2001**, 42 (43), 7575-7578.

l'intermédiaire et la formation exclusive des produits attendus avec un rendement après purification de 64% pour **59** et 58% pour **60**.

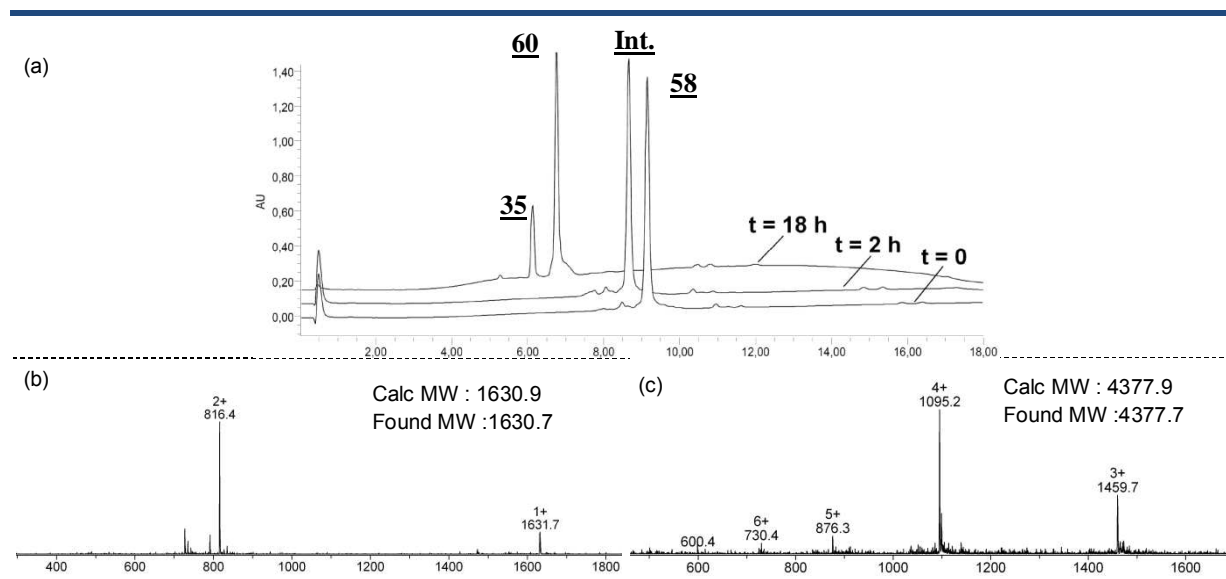
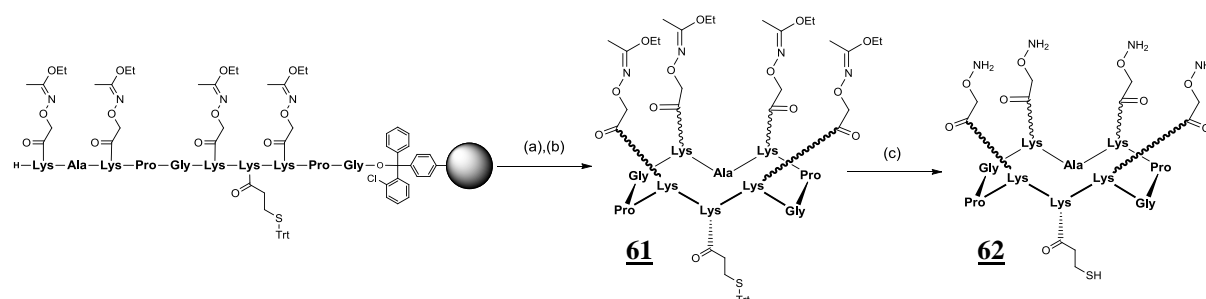


Figure 69: Suivi HPLC de l'assemblage « One-Pot » du composé **60** et spectre ESI de l'intermédiaire (b) et du composé **60** (c)

A.6.3. Assemblage biomoléculaire combinant ligation oxime et thioéther

Généralement, nos vecteurs multivalents possèdent un site d'accrochage sur la face inférieure du châssis permettant l'introduction d'un composé actif via un lien amide. Cette conjugaison fait intervenir un ester activé qui réagit préférentiellement sur les amines. Cependant, cette stratégie ne peut être utilisée si le vecteur possède plusieurs fonctions amine provenant de résidus lysine ou de l'extrémité N-terminale du peptide. C'est pourquoi, il est parfois nécessaire d'introduire une seconde ligation chimiosélective sur l'un des résidus Lysine du châssis. Pour illustrer cette stratégie, nous détaillerons la synthèse d'un vecteur multivalent présentant quatre unités peptidiques greffées par lien oxime et un fluorophore couplé par l'intermédiaire d'un lien thioéther.

* Synthèse du châssis fonctionnalisé par quatre oxyamines et un thiol



Réactifs : (a) TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/2/6) ; (b) PyBOP, DIPEA, DMF; (c) TFA/H₂O/TIS/NH₂OMe (94/2/2/2)

Figure 70 : Schéma de synthèse du châssis **62** présentant quatre fonctions oxyamine et un thiol

Afin de greffer les ligands aldéhydes et le fluorophore, nous avons préparé un châssis fonctionnalisé par quatre fonctions oxyamine et une fonction thiol. La synthèse du châssis est

réalisée sur une résine 2-chlorotrityle[®] en introduisant de manière contrôlée les lysines modifiées **5** et **11**. Après décrochage du support en milieu faiblement acide, on effectue la cyclisation du peptide dans des conditions de hautes dilutions. La déprotection totale de ce type de composé présente parfois des difficultés dues à la forte réactivité des oxyamines. Le TFA utilisé peut comporter des traces de formaldéhyde et il n'est pas rare de constater la formation d'adduit sur les oxyamines durant la déprotection. Cette réaction non désirée peut être évitée en ajoutant, dans la solution acide, un faible pourcentage de méthoxyamine permettant de piéger toutes traces de carbonyle présent dans le milieu. Après purification du peptide déprotégé par HPLC préparative, on obtient le produit **62** pur avec un rendement moyen de l'ordre de 55 % (Figure 71). Ce composé étant peu stable dû au nombre important de fonctions oxyamine, il est préférable de l'utiliser rapidement.

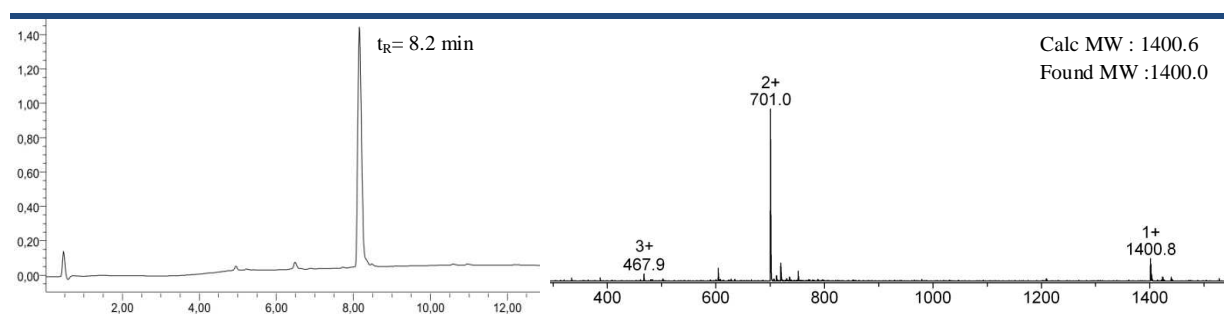
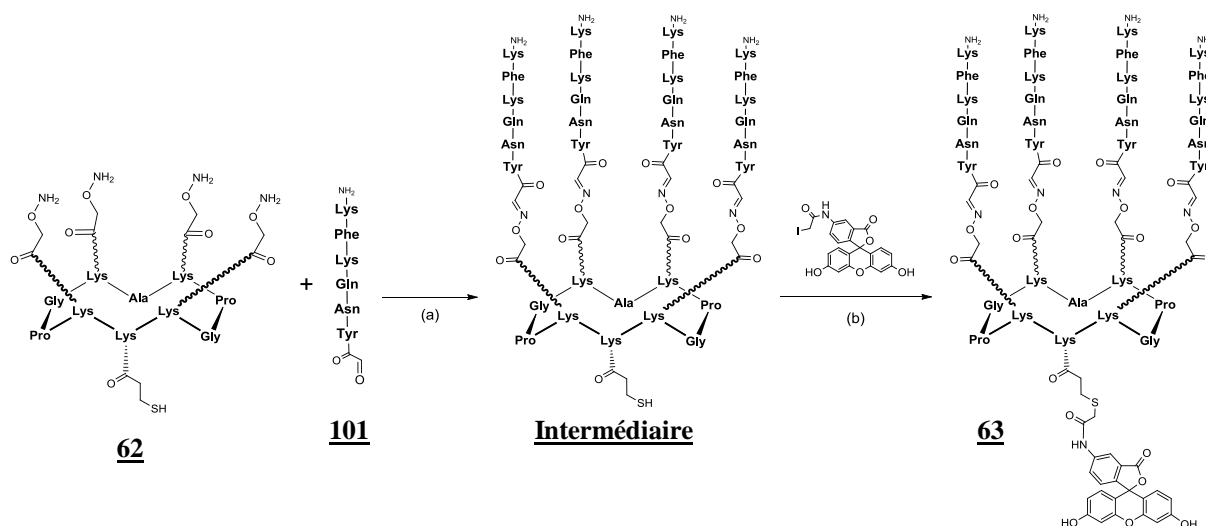


Figure 71 : Chromatogramme et spectre ESI du composé **62**

★ Procédure d'assemblage biomoléculaire combinant ligation oxime et thioéther



Réactifs : (a) peptide aldéhyde **101**, H₂O/CH₃CN/AcOH/ (50:45:5) (b) NaHCO₃ jusqu'à pH7, TCEP, 5-(Iodoacétamido)fluorescéine

Figure 72 : Schéma d'assemblage « One-pot » séquentiel de **103** et de la Fluorescéine sur le châssis **62** par ligation oxime et thioéther

L'assemblage biomoléculaire du peptide aldéhyde et du fluorophore sur le châssis est réalisé selon une stratégie « One-pot » séquentielle. Pour minimiser la formation de pont

disulfure intermoléculaire, les manipulations sont effectuées sous atmosphère inerte avec des solvants préalablement dégazés. Pour des raisons de stabilité des fonctions oxyamine, on débute par la formation des liens oximes. Le châssis **62** et le peptide aldéhyde **103** en léger excès sont dissous dans une solution acide contenant 5 % d'acide acétique. La formation des liens oxime est suivie par chromatographie analytique et devient complète au bout de 2 heures à température ambiante (Figure 73a). Malgré nos efforts pour éliminer l'oxygène du milieu, la formation d'un dimère est observée mais reste relativement faible (< 5%). Pour remédier à la formation de ce produit secondaire, 20 équiv. de Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) sont ajoutés dans le milieu permettant de réduire le pont disulfure sans affecter les liaisons oxime. Après ajustement du pH à 7 par ajout de bicarbonate de sodium, on additionne directement dans le milieu le fluorophore 5-(iodoacetamido)fluorescéine pour procéder à la ligation thioéther. Au bout d'une heure, on observe la disparition complète de l'intermédiaire et la formation exclusive du produit attendu **63** avec un rendement après purification de 58% (Figure 73b).

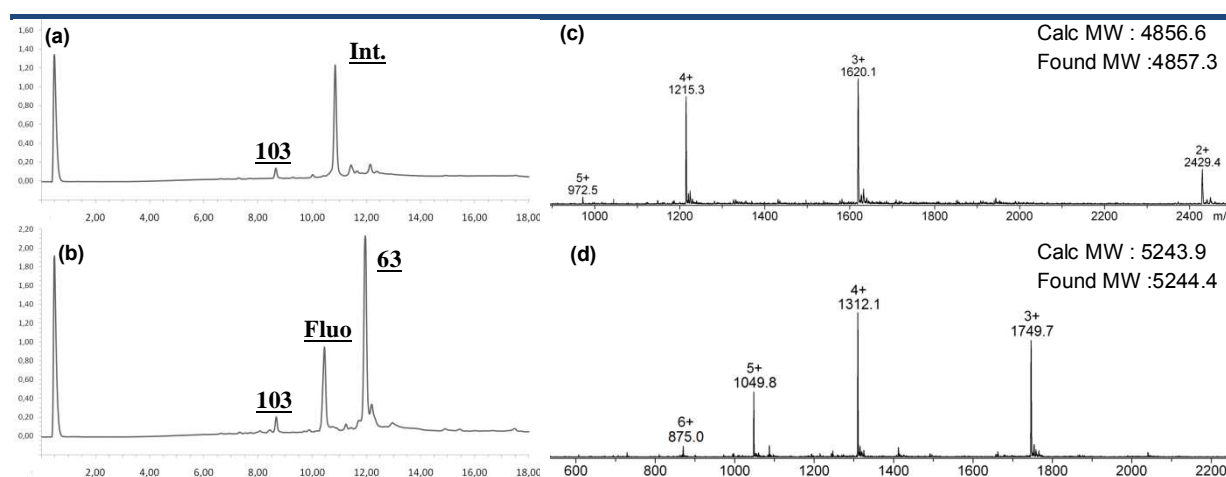
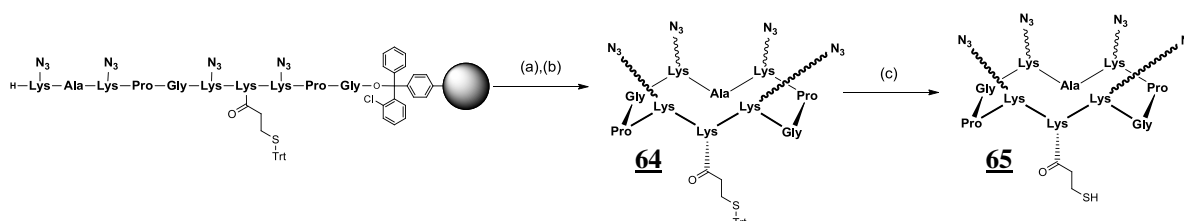


Figure 73 : Suivi HPLC de l'assemblage « One-Pot » du composé **63** et spectre ESI de l'Intermédiaire (c) et du composé **63** (d)

A.6.4. Assemblage biomoléculaire combinant ligation CuAAC et thioéther

★ Synthèse du châssis fonctionnalisé par quatre azotures et un thiol



Réactifs : (a) TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/2/6) ; (b) PyBOP, DIPEA, DMF; (c) TFA/H₂O/TIS (90/5/5)

Figure 74 : Schéma de synthèse du châssis **65** présentant quatre fonctions azoture et un thiol

Pour réaliser l'assemblage biomoléculaire par ligation CuAAC et thioéther, nous avons préparé un cyclodecapeptide fonctionnalisé par quatre fonctions azoture sur la face supérieure et une fonction thiol sur la face inférieure. La synthèse du châssis est réalisée sur une résine 2-chlorotrytle[®] en introduisant de manière contrôlée les lysines modifiées **9** et **11**.

Après décrochage du support par traitement à l'acide acétique, on procède à la cyclisation intramoléculaire du peptide dans des conditions de hautes dilutions. Le groupement trityle est ensuite éliminé en présence d'un mélange TFA/TIS/H₂O. Dans ce cas précis, l'éthanedithiol n'est pas utilisé comme agent piégeant les carbocations car il peut réduire les fonctions azoture du peptide. Après précipitation à l'éther éthylique et purification par HPLC préparative, on obtient le produit **65** pur avec un rendement moyen de l'ordre de 51 %.

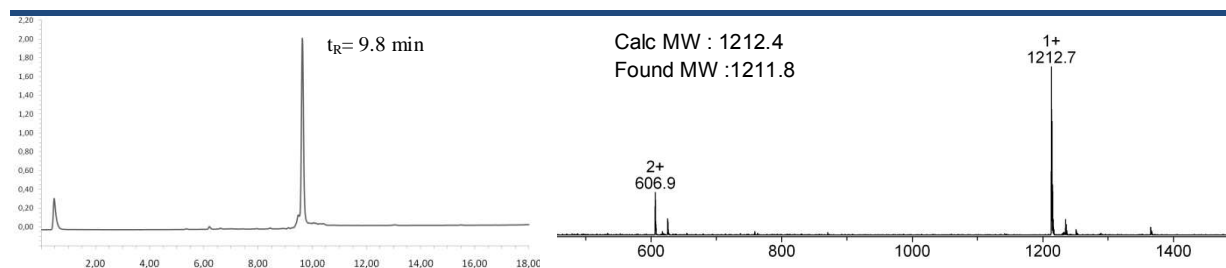
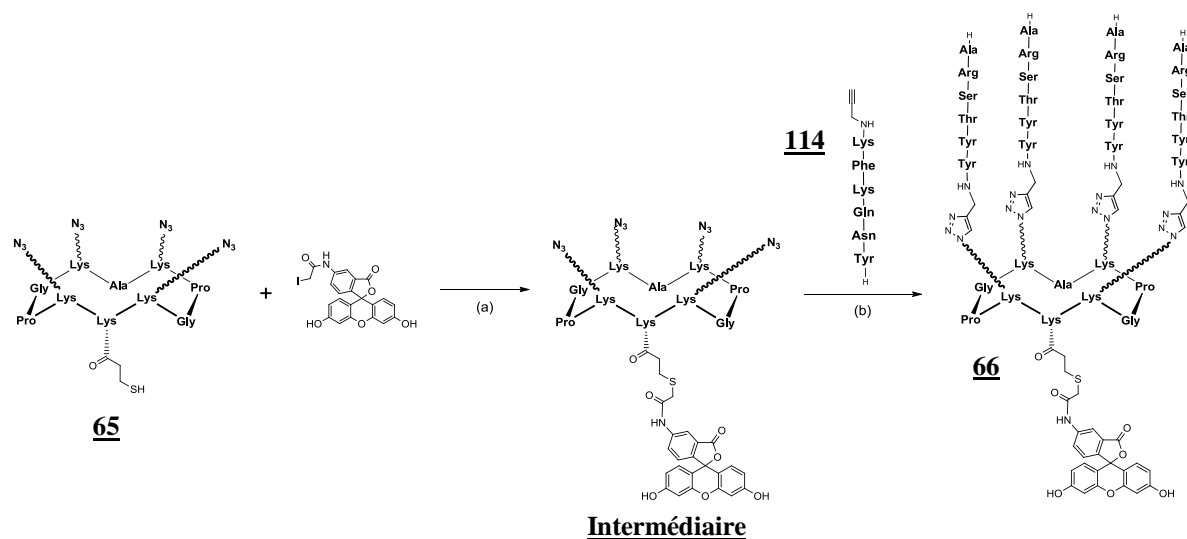


Figure 75 : Chromatogramme et spectre ESI du composé **65**

★ Procédure d'assemblage biomoléculaire combinant ligation CuAAC et thioéther



Réactifs : (a) 5-(Iodoacetamido)fluorescéine, CH₃CN/H₂O (40:60, 100mM Acétate d'ammonium pH 4,5) (b) tBuOH, Cu⁰

Figure 76 : Schéma d'assemblage « One-pot » séquentiel de **116** et de la fluorescéine sur le châssis **65** par ligation CuAAC et thioéther

L'assemblage biomoléculaire du peptide alcyne et du fluorophore sur le châssis a été effectué selon une stratégie « One-pot » séquentielle. Comme précédemment, les solvants ont été préalablement dégazés et les manipulations ont été réalisées sous atmosphère inerte. La formation de disulfure pouvant être engendrée par l'oxydation des sels de cuivre, on commence par la formation du lien thioéther. Le châssis **65** et le fluorophore 5-(Iodoacetamido)fluorescéine en léger excès sont dissous dans une solution aqueuse tamponnée avec de l'acétate d'ammonium à pH 7. La formation du lien thioéther est suivie par HPLC analytique et devient complète au bout d'une heure à température ambiante (Figure 77a). Dans le cas présent, le TCEP ne peut pas être utilisé pour prévenir l'oxydation des thiols car ce dernier pourrait réduire les fonctions azoture par réaction de Staudinger. Néanmoins, la formation d'un dimère n'a pas été observée. Ensuite, on additionne directement dans le milieu

le peptide-alcyne **116** (cf. p) et le Cu^0 pour procéder à la ligation CuAAC. Au bout de 5 heures à 50°C , on observe la disparition complète de l'intermédiaire et la formation exclusive du produit attendu **66** avec un rendement moyen après purification de 39% (Figure 77b).

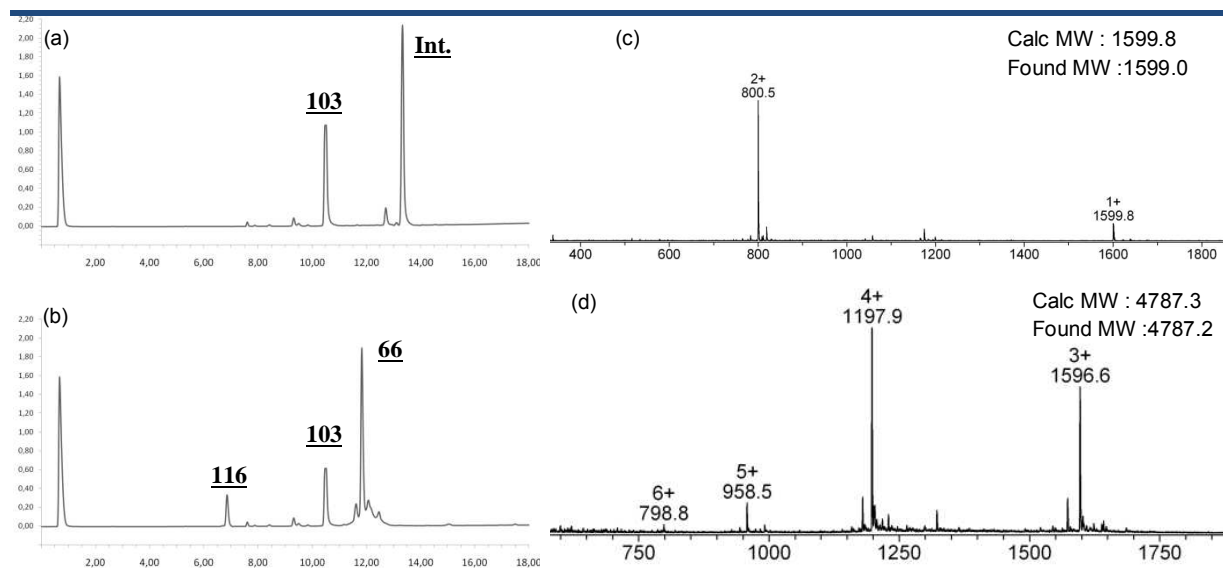


Figure 77 : Suivi HPLC de l'assemblage « One-Pot » du composé **66** et spectre ESI de l'Intermédiaire (c) et du composé **66** (d)

A.7. Assemblage biomoléculaire via trois ligations chimiosélectives orthogonales

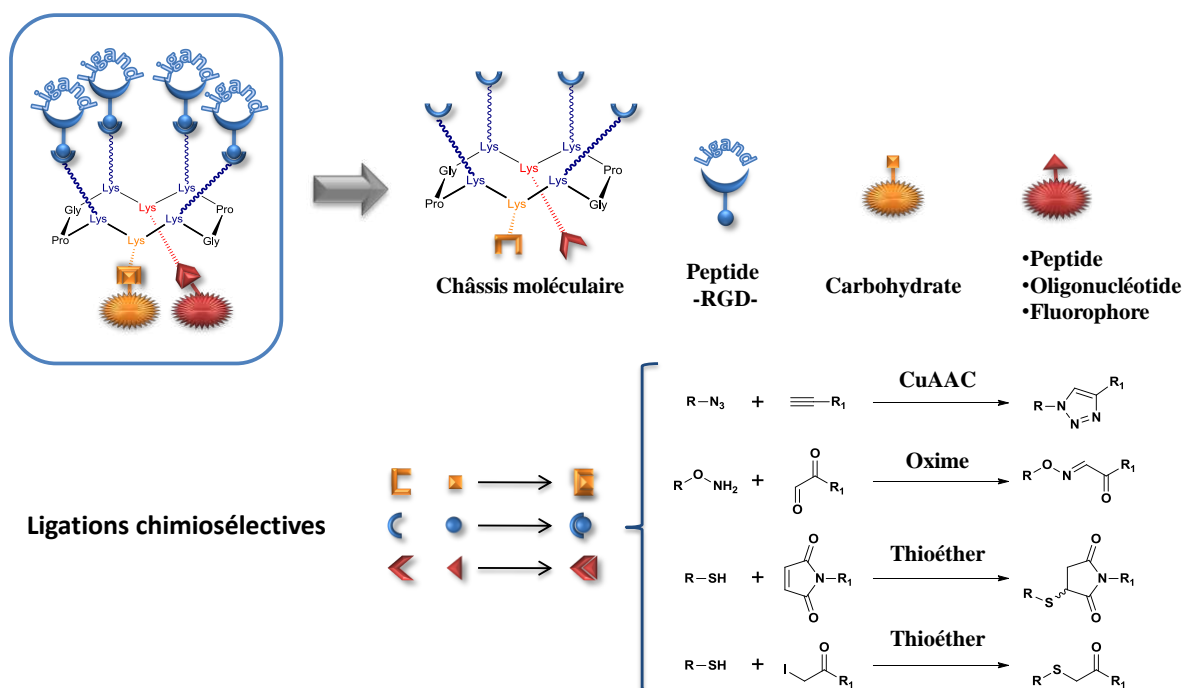


Figure 78 : Stratégie d'assemblage combinant trois ligations chimiosélectives orthogonales

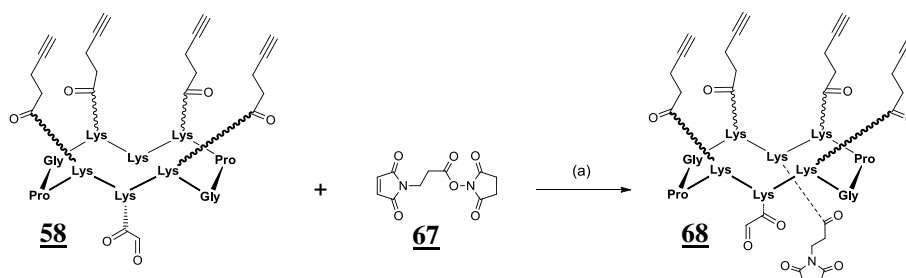
Dans la partie précédente, nous avons démontré que la combinaison de deux ligations orthogonales offre de multiples avantages. La formation successive de liens chimiosélectifs permet d'accéder à une large variété d'assemblages biomoléculaires. Par ailleurs, cette stratégie présente l'avantage d'être effectuée en « One pot » sans étape de déprotection ni purification intermédiaire. Les résultats précédents montrent que les différentes combinaisons de ligation Oxime/CuAAC, Oxime/Thioéther et CuAAC/Thioéther sont parfaitement compatibles entre elles et donnent d'excellents rendements.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à développer une procédure originale combinant les trois ligations chimiosélectives utilisées auparavant. Cette méthodologie permet l'assemblage « One Pot » séquentiel de quatre unités différentes dans des conditions réactionnelles simples. La versatilité de la méthodologie est vérifiée en préparant trois modèles de châssis cyclodécapeptidiques. Ces châssis présenteront différentes combinaisons de groupements fonctionnels impliqués dans les trois ligations. Pour illustrer cette stratégie, nous avons conçu plusieurs assemblages en combinant une grande variété de molécules : peptides, sucres, oligonucléotide et fluorophore.

A.7.1. Premier modèle d'assemblage

Pour réaliser le premier modèle, nous avons procédé au greffage orthogonal sur le châssis moléculaire de trois biomolécules différentes : le ligand -RGD- ciblant spécifiquement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, une unité glucose et un peptide pro-apoptotique KLA. Ce dernier a été utilisé avec succès l'apoptose de cellules cancéreuses.¹⁴³ Dans cette stratégie de synthèse, le cyclodécapeptide, utilisé comme support, présente à la fois les fonctions alcyne, aldéhyde glyoxylique et maléimide. Les trois biomolécules ont donc été préalablement modifiées permettant leur accroche contrôlée sur le support. Le ligand RGD modifié par un azoture sera greffé via un lien triazole, le sucre Glucose-oxyamine via un lien éther d'oxime et le peptide KLA modifié par une Cystéine en N-Terminal via un lien thioéther.

★ Synthèse du châssis **cRAFT4(Alcyne)-(COCHO)-(Maléimide)**



Réactifs : (a) CH₃CN/H₂O (40:60, phosphate 100mM pH 7.2)

Figure 79 : Schéma de synthèse du châssis **68** présentant quatre fonctions alcyne, un aldéhyde et un maléimide

Pour réaliser l'assemblage biomoléculaire des différentes unités sur le châssis, nous avons préparé un cyclodécapeptide fonctionnalisé par des fonctions alcyne, aldéhyde et maléimide. Les fonctions alcyne et aldéhyde peuvent être directement introduites sous forme d'acides aminés modifiés pendant la synthèse peptidique. Par contre, la fonction maléimide

est très sensible aux nucléophiles et ne résiste pas aux conditions utilisées en SPPS. Nous avons donc choisi d'intégrer le maléimide en le greffant sur le châssis via un lien amide, lors de la dernière étape en solution. Pour concevoir ce châssis **68**, nous avons, au préalable, synthétisé le cyclopeptide intermédiaire **58** ainsi que le réactif Succinimido 3-maleimido-propionate **67** selon un protocole mis au point par Song et al.²⁰² Ensuite, le châssis **58** et l'ester activé **67** en excès sont dissous dans une solution aqueuse tamponnée à pH 7. Pour procéder exclusivement au couplage amide du « linker-maléimide » **67** sur l'amine libre du cyclopeptide **58**, il est préférable de rester dans une zone de pH compris entre 7 et 8 pour garder intact le maléimide. A pH supérieur à 8-9, le maléimide peut subir des dégradations par l'attaque nucléophile de l'amine ou par hydrolyse. Au bout d'une heure de réaction à température ambiante, on observe la formation complète du produit **68** désiré sans apparition de produit secondaire. Après purification par HPLC préparative, on obtient le châssis **68** pur avec un très bon rendement de l'ordre de 72 % (Figure 80).

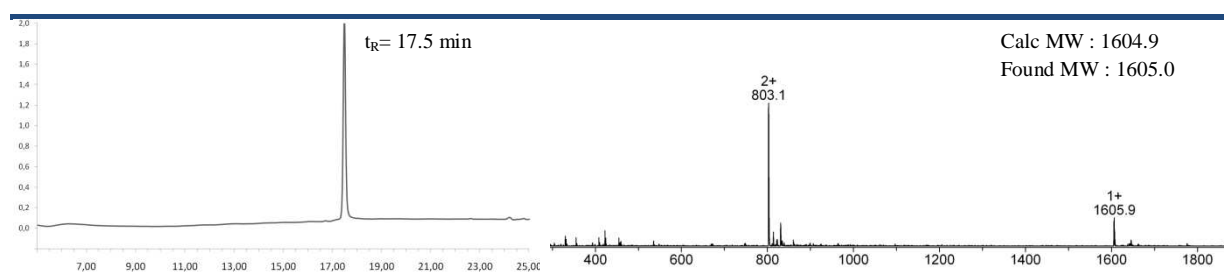
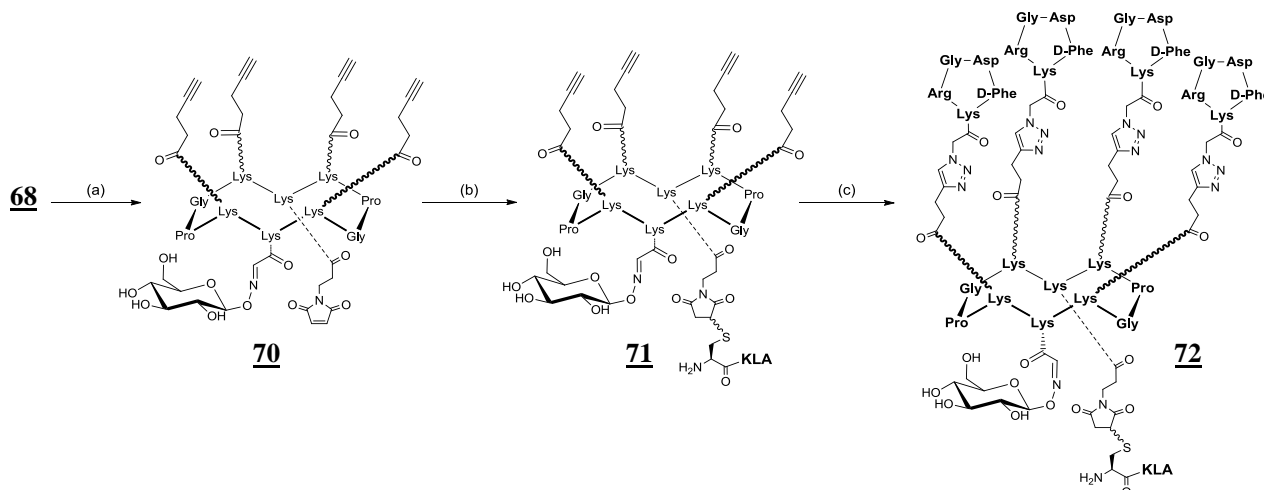


Figure 80 : Chromatogramme HPLC et spectre ESI du composé **68**

★ **Assemblage du cRAFT4(c[-RGDFK-])₄triazole-(β-D-Glucose)₄oxime-(KLA)₄thioether**



Réactifs : (a) Glc-β-ONH₂, CH₃CN/H₂O (40:60, 100 mM phosphate pH 2,2) (b) NaHCO₃ jusqu'à pH 7, peptide KLA **69** (c) **35**, tBuOH, Cu⁰

Figure 81 : Schéma d'assemblage « One-pot » séquentiel de Glc-β-ONH₂, **69** et **35** sur le châssis **68** par ligation oxime, thioéther et CuAAC

L'assemblage biomoléculaire du premier modèle **72** a été réalisé selon une stratégie « One-pot » séquentielle. Pour minimiser la formation de pont disulfure intermoléculaire, les

²⁰² Song, H. Y.; Ngai, M. H.; Song, Z. Y.; MacAry, P. A.; Hobley, J.; Lear, M. J., Practical synthesis of maleimides and coumarin-linked probes for protein and antibody labelling via reduction of native disulfides. *Org Biomol Chem* **2009**, 7 (17), 3400-3406.

manipulations ont été effectuées sous atmosphère inerte avec des solvants préalablement dégazés. Pour des raisons de stabilité des fonctions oxyamine, on débute par la formation des liens oxime. Le châssis **68** et le Glc-ONH₂ en excès sont dissous dans une solution aqueuse tamponnée à pH 2,2. La formation du lien oxime est suivie par HPLC analytique et devient complète après une heure à température ambiante (Figure 82a). Après ajustement du pH à 7,0 par ajout de NaHCO₃, on additionne directement dans le milieu le thio-peptide KLA **69** en léger excès pour procéder à la ligation thioéther sur la fonction maléimide. Au bout de 30 minutes, on observe la disparition complète de l'intermédiaire **70** et la formation exclusive du second intermédiaire **71** (Figure 82b). Il est important de noter que l'excès de composé oxyamine X présent dans le milieu ne réagit absolument pas avec le maléimide. Néanmoins, le pH du mélange réactionnel ne doit pas dépasser pH 8 afin d'empêcher l'hydrolyse du maléimide. Pour effectuer la dernière ligation, on additionne dans le milieu un large excès de peptide alcyne **35** préalablement dissous dans une solution tBuOH/PBS contenant de la micropoudre de cuivre. Après une nuit d'agitation, la ligation des quatre unités peptidiques par lien triazole sur le châssis est complète (Figure 82c). Par ailleurs, on note la formation d'un dimère du peptide KLA probablement dû à l'oxydation des sels de cuivre en solution. Pour terminer, le milieu réactionnel est filtré puis purifié par HPLC-préparative pour offrir le composé **72** avec une excellente pureté et un rendement de 54%.

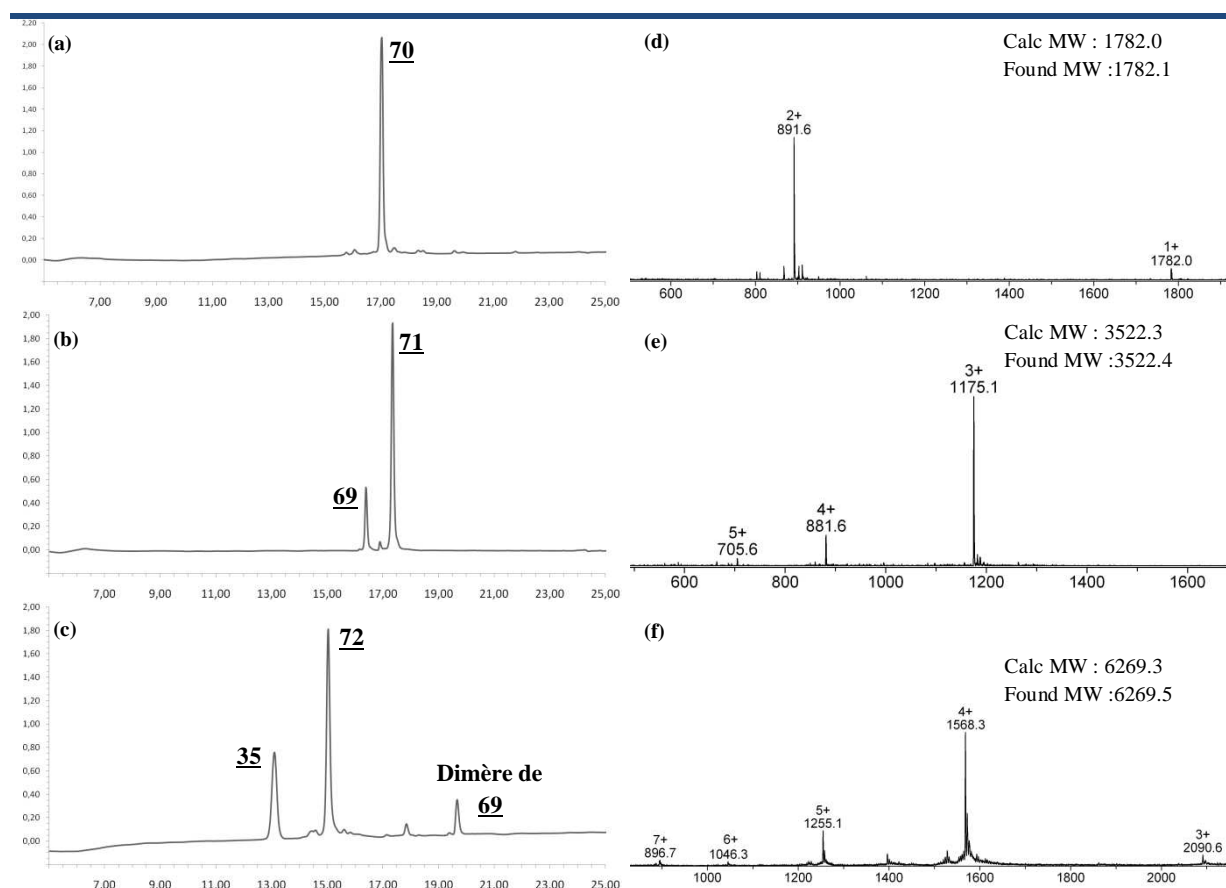
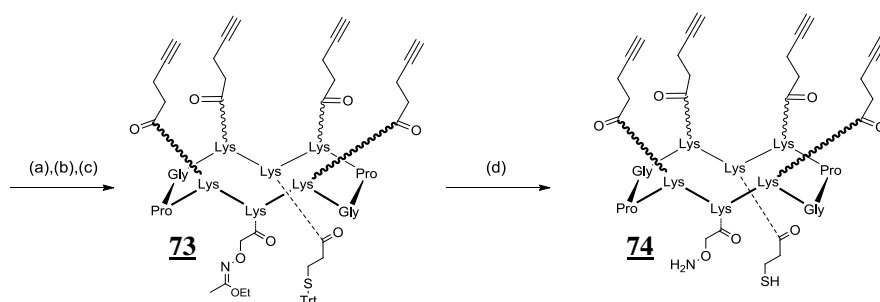


Figure 82 : Suivi HPLC de l'assemblage « One-Pot » du composé **72** et spectre ESI de l'intermédiaire **70** (d), de l'intermédiaire **71** (e) et du composé **72** (f)

A.7.2. Second modèle d'assemblage

Pour le second modèle, nous avons fait varier les groupes fonctionnels du châssis pour qu'il comporte à la fois les fonctions alcyne, oxyamine et thiol. Les unités que nous avons sélectionnées pour illustrer l'assemblage sont le ligand -RGD-, une unité lactose et un fluorophore de type Alexa 647. En ce qui concerne la stratégie d'assemblage, le ligand RGD modifié par un azoture sera greffé via un lien triazole, le disaccharide Lactose via un lien éther d'oxime et le fluorophore modifié par un maléimide via un lien thioéther

★ Synthèse du châssis cRAFT4(Alcyne)-(ONH₂)-(SH)



Réactifs : (a) SPPS (b) TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/2/6) ; (c) PyBOP, DIPEA, DMF; (d) TFA/H₂O/TIS/NH₂OMe (94/2/2/2)

Figure 83 : Schéma de synthèse du châssis **74** présentant quatre fonctions alcyne, un oxyamine et un thiol

Pour réaliser le second modèle d'assemblage, nous avons synthétisé un cyclodécapeptide présentant quatre fonctions alcyne, une fonction oxyamine et une fonction thiol. Le peptide est assemblé sur une résine 2-chlorotrityle[®] en incorporant, durant la SPPS, les trois acides aminés modifiés **5**, **7** et **11** porteurs des différents groupements impliqués dans les ligations chimiosélectives. Après libération du support en milieu faiblement acide, le peptide linéaire est cyclisé en milieu dilué. Les groupements trityle et 1-éthoxyéthylidène sont ensuite éliminés par traitement d'un mélange TFA/TIS/H₂O/NH₂OMe. Après précipitation à l'éther éthylique et purification par HPLC préparative, on obtient le produit **74** pur avec un rendement relativement faible de l'ordre de 36 %. Ce faible rendement s'explique par la présence de formaldéhyde dans certains réactifs utilisés lors de la déprotection.

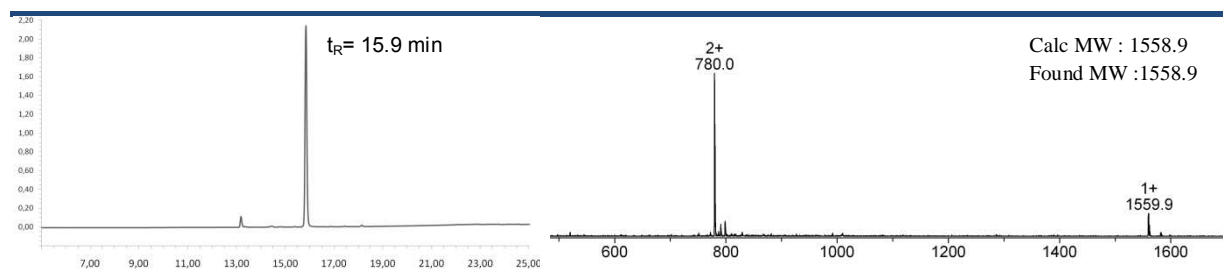
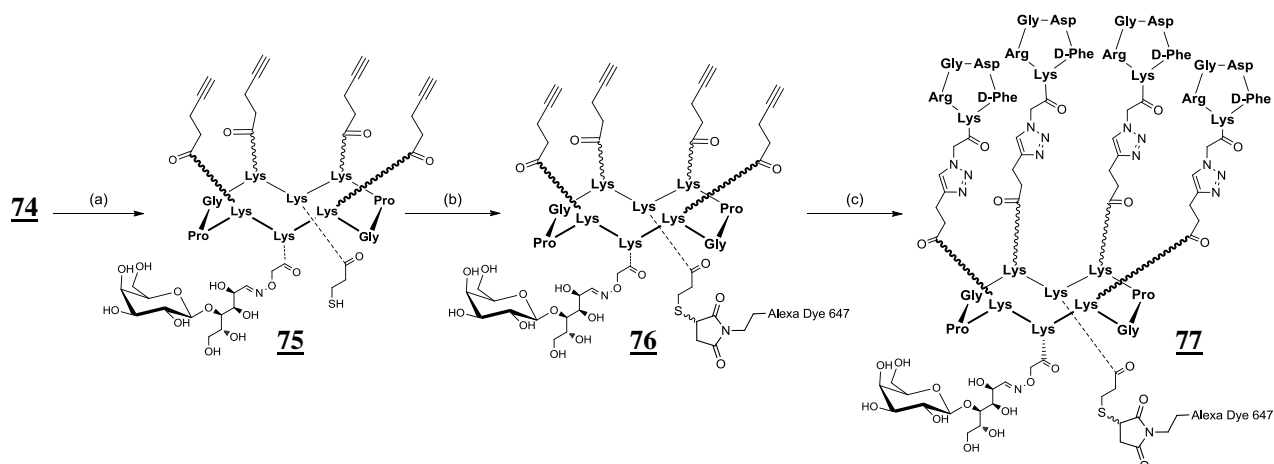


Figure 84 : Chromatogramme HPLC et spectre ESI du composé **74**

★ Procédure d'assemblage du **cRAFT4(c[-RGDfK-])triazole-(β-D-Lactose)_{oxime}-
(Alexa⁶⁴⁷)_{thioether}**



Réactifs : (a) α -D-lactose, CH₃CN/H₂O (40:60, 100mM Acétate d'ammonium pH 4,5) (b) NaHCO₃ jusqu'à pH 7,2, Alexa Fluor[®] 647 C₂-maléimide (c) **35**, tBuOH, Cu⁰

Figure 85 : Schéma d'assemblage « One-pot » séquentiel du lactose, d'Alexa Fluor[®] 647 C₂-maléimide et de **35** sur le châssis **74** par ligation oxime, thioéther et CuAAC

L'assemblage biomoléculaire du second modèle **77** a été réalisé selon une stratégie « One-pot » séquentielle. La formation de dimère est évitée en effectuant la réaction sous atmosphère inerte avec des solvants exempts d'oxygène. La première ligation consiste à former un lien oxime entre l'oxyamine du châssis et l'aldéhyde d'un disaccharide comme le lactose. Cette réaction, utilisée pour préparer des glyconjugés,²⁰³ est particulièrement lente dû à une faible constante d'équilibre entre la forme ouverte et fermée du sucre. La cinétique de formation peut être augmentée par chauffage ou par ajout d'un catalyseur comme l'aniline.²⁰⁴ Lors des premiers essais, nous avons procédé à la ligation oxime entre le lactose et le châssis **74** dans un milieu tamponné pH 4,5 en présence d'aniline à 50 mM. Bien qu'efficace pour la formation de l'oxime (complète en deux heures), la présence d'aniline dans le milieu s'est montrée problématique pour les ligations suivantes. En effet, l'aniline polymérise en présence de cuivre et présente une certaine réactivité en s'additionnant sur le composé maléimide. Pour améliorer la cinétique sans utiliser de catalyseur, le milieu réactionnel a été porté à 50°C en présence d'un large excès de lactose. Le couplage par lien oxime est suivi par HPLC analytique et devient total après cinq heures de réaction (Figure 86a). Après ajustement du pH à 7,0 par ajout de NaHCO₃, le fluorophore Alexa Fluor[®] 647 C₂-maléimide est additionné en excès dans le milieu afin d'effectuer la ligation thioéther. Après 30 minutes, l'intermédiaire **75** a totalement réagi avec le fluorophore pour former le second intermédiaire **76** sans obtention de produit secondaire (Figure 86b). Pour la ligation CuAAC, on procède comme précédemment en ajoutant dans le milieu le peptide alcyne **35** et le Cu⁰ et en laissant réagir pendant 18 heures (Figure 86c). A l'issue de la réaction, le produit

²⁰³ Cervigni, S. E.; Dumy, P.; Mutter, M., Synthesis of glycopeptides and lipopeptides by chemoselective ligation. *Angew Chem Int Ed* **1996**, 35 (11), 1230-1232.

²⁰⁴ Thygesen, M. B.; Munch, H.; Sauer, J.; Clo, E.; Jorgensen, M. R.; Hindsgaul, O.; Jensen, K. J., Nucleophilic Catalysis of Carbohydrate Oxime Formation by Anilines. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (5), 1752-1755.

77 est purifié offrant le composé pur avec un rendement relativement faible de 32%. Ce faible rendement peut s'expliquer par la formation d'agrégat durant la ligation CuAAC qui a engendré une grande perte de produit lors de la purification (Figure 86c).

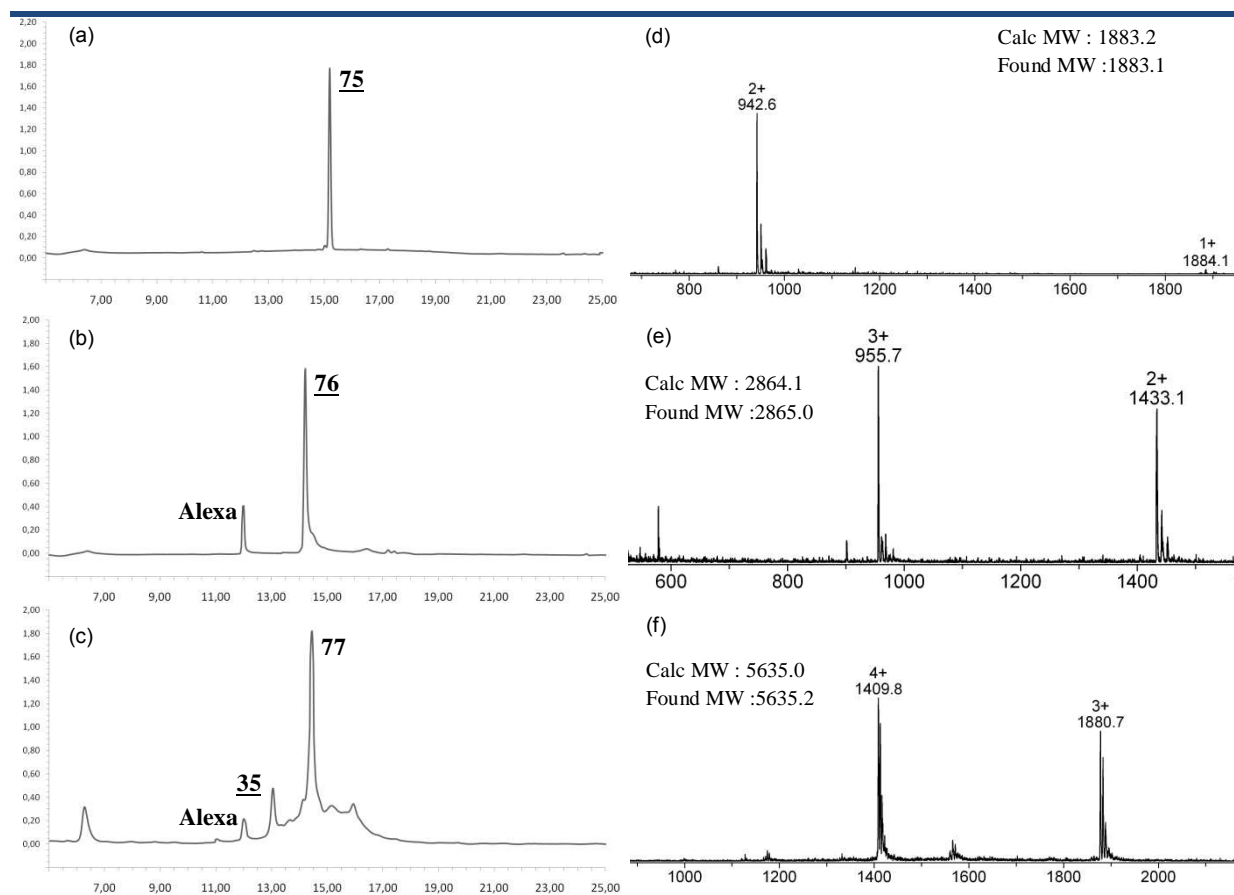
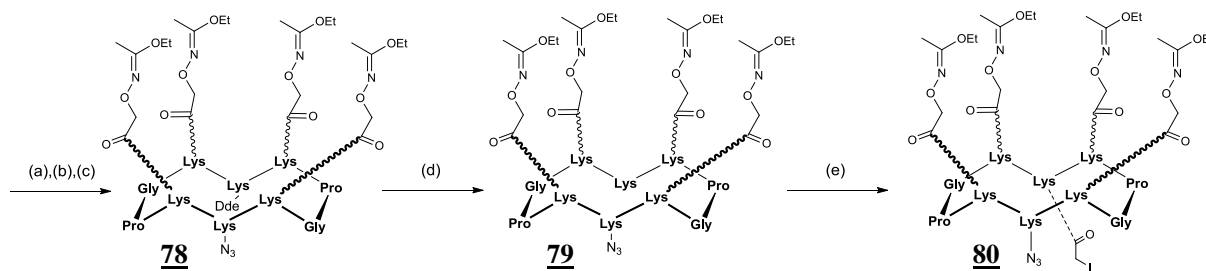


Figure 86 : Suivi HPLC de l'assemblage « One-Pot » du composé **77** et spectre ESI de l'intermédiaire **75** (d), de l'intermédiaire **76** (e) et du composé **77** (f)

A.7.3. Troisième modèle d'assemblage

Pour le troisième et dernier modèle, nous avons préparé un châssis présentant une autre combinaison de groupes fonctionnels : azoture, oxyamine et iodoacétamide. Les unités que nous avons sélectionnées pour illustrer l'assemblage sont le ligand RGD, un thioglucose et un oligonucléotide. En ce qui concerne la stratégie d'assemblage, le ligand RGD modifié par un aldéhyde sera introduit par ligation oxime, le thioglucose par ligation thioéther et l'oligonucléotide modifié par un alcyne par ligation CuAAC

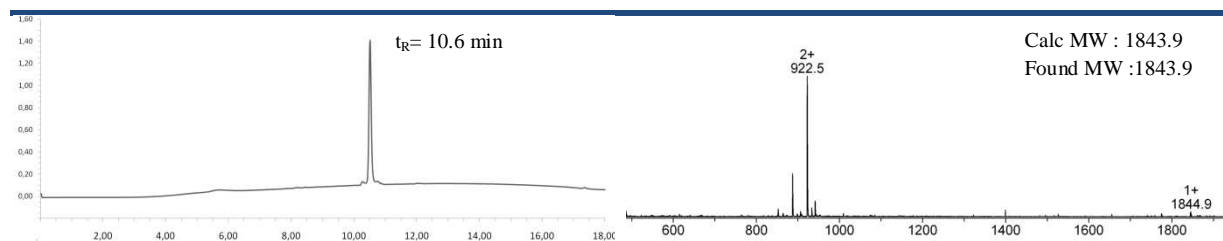
★ Synthèse du châssis cRAFT4(Acétimide)-(N₃)-(COCH₂I)



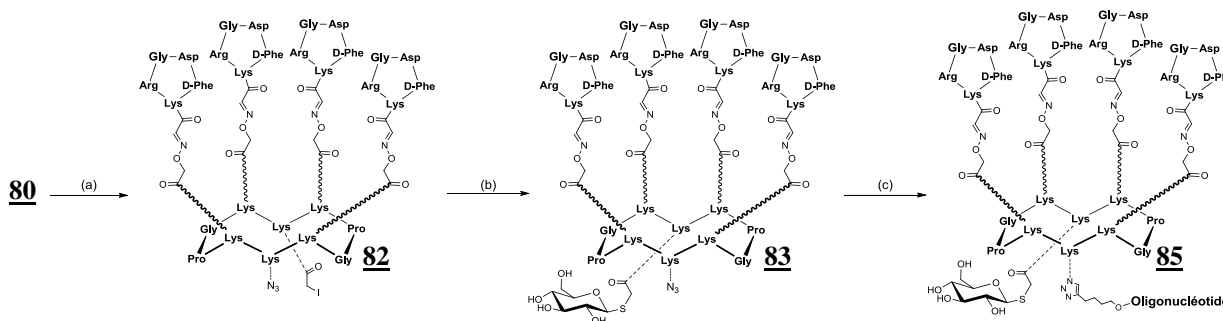
Réactifs : (a) SPPS (b) TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/2/6) ; (c) PyBOP, DIPEA, DMF; (d) NH₂-NH₂/DMF (2/98) (e) iodoacétate de N-hydroxysuccinimidyle, CH₃CN/H₂O (40:60, phosphate 100mM pH 7.2)

Figure 87 : Schéma de synthèse du châssis **80** présentant quatre fonctions oxyamine protégées, un azoture et un iodoacétamide

Pour réaliser le troisième modèle d'assemblage, nous avons synthétisé un cyclodecapeptide présentant quatre fonctions oxyamine protégées, une fonction azoture et une fonction iodoacétamide. Les fonctions azoture et oxyamine protégées peuvent être directement introduites sous forme d'acides aminés modifiés lors de synthèse peptidique. Par contre, le motif iodoacétamide est très sensible aux attaques nucléophiles et ne résiste pas aux conditions utilisées en SPPS. Nous avons donc décidé d'utiliser une lysine modifiée par un groupement protecteur orthogonal qui sera enlevé en solution pour permettre le couplage par lien amide de la fonction iodoacétamide. Notre choix s'est donc porté sur le groupement Dde qui présente des conditions de déprotection compatibles avec l'azoture, l'1-éthoxyéthylidène et la résine 2-chlorotrityle[®]. Le peptide est assemblé sur résine en incorporant, durant la SPPS, les acides aminés modifiés **5**, **9** et Fmoc-Lys(Dde)-OH. Après libération du support par traitement à l'acide acétique, on procède à la cyclisation intramoléculaire du peptide. Le groupement Dde est ensuite retiré par traitement à l'hydrazine dilué à 2% dans le DMF. Après 30 minutes de réaction, le peptide **79** est précipité et lavé à l'éther éthylique afin d'éliminer le maximum d'hydrazine. Le cyclopeptide **79** et l'iodoacétate de N-hydroxysuccinimidyle en excès sont dissous dans une solution aqueuse tamponnée à pH 7. Pour procéder exclusivement au couplage amide sur l'amine libre du cyclopeptide **79**, il est préférable de rester dans une zone de pH compris entre 7 et 8. En effet, à pH supérieur à 9, l'amine primaire du châssis est suffisamment réactive pour substituer l'iodure de l'iodoacétate. Au bout d'une heure de réaction à température ambiante, on observe la formation complète du produit **80** désiré sans apparition de produit secondaire. Après purification par HPLC préparative, on obtient le châssis **80** pur avec un bon rendement de l'ordre de 56 %. Les solvants utilisés n'étant pas exempt de formaldéhyde, la déprotection du châssis **80** a généré de nombreux produits secondaires. Après purification, on obtient le châssis déprotégé **81** avec un rendement relativement faible. C'est pourquoi, il est préférable de ne pas déprotéger les fonctions oxyamine avant l'assemblage biomoléculaire. Les fonctions oxyamine seront libérées pendant la procédure de ligation oxime limitant ainsi les réactions secondaires.

Figure 88 : Chromatogramme HPLC et spectre ESI du composé **80**

★ Procédure d'assemblage du **cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-(CpG)_{triazole}-(β-D-Thioglucose)_{thioether}**



(a) **23**, TFA/CH₃CN/H₂O (5/45/50) (b) NaHCO₃ jusqu'à pH 7, β-D-Thioglucose (c) **84**, tBuOH, Cu⁰

Figure 89 : Schéma d'assemblage « One-pot » séquentiel de **23**, β-D-Thioglucose et **84** sur le châssis **80** par ligation oxime, thioéther et CuAAC

L'assemblage des unités peptidique, saccharide et oligonucléotide sur le châssis a été effectué selon une stratégie en « One-pot » séquentielle. L'oligonucléotide étant instable en milieu très acide, il est préférable de commencer par la ligation oxime. Le châssis **80** et le composé -RGD- **23** en excès sont dissous dans une solution aqueuse à 5% de TFA nécessaire à la déprotection des groupements 1-éthoxyéthylidène. L'obtention de l'intermédiaire **82** est suivie par HPLC analytique et devient totale après une heure à température ambiante (Figure 90a). Après neutralisation du pH par ajout de NaHCO₃, deux équivalents de β-D-Thioglucose sont additionnés directement dans le milieu pour procéder à la ligation chimiosélective entre le thiol et l'iodoacétamide. La formation du lien thioéther est complète au bout de 30 minutes offrant le second intermédiaire **83** (Figure 90b). Pour effectuer la ligation CuAAC, on additionne, dans le milieu réactionnel, la micropoudre de cuivre suivie de l'oligonucléotide fonctionnalisé par un alcyne **84** en défaut. Après 5 heures d'agitation à 50°C, on observe la disparition complète de l'oligonucléotide de départ et la formation exclusive du conjugué **85** (Figure 90c). Pour terminer, le milieu réactionnel est filtré puis purifié par HPLC-préparative pour offrir le composé **85** avec une excellente pureté et un bon rendement de 59%.

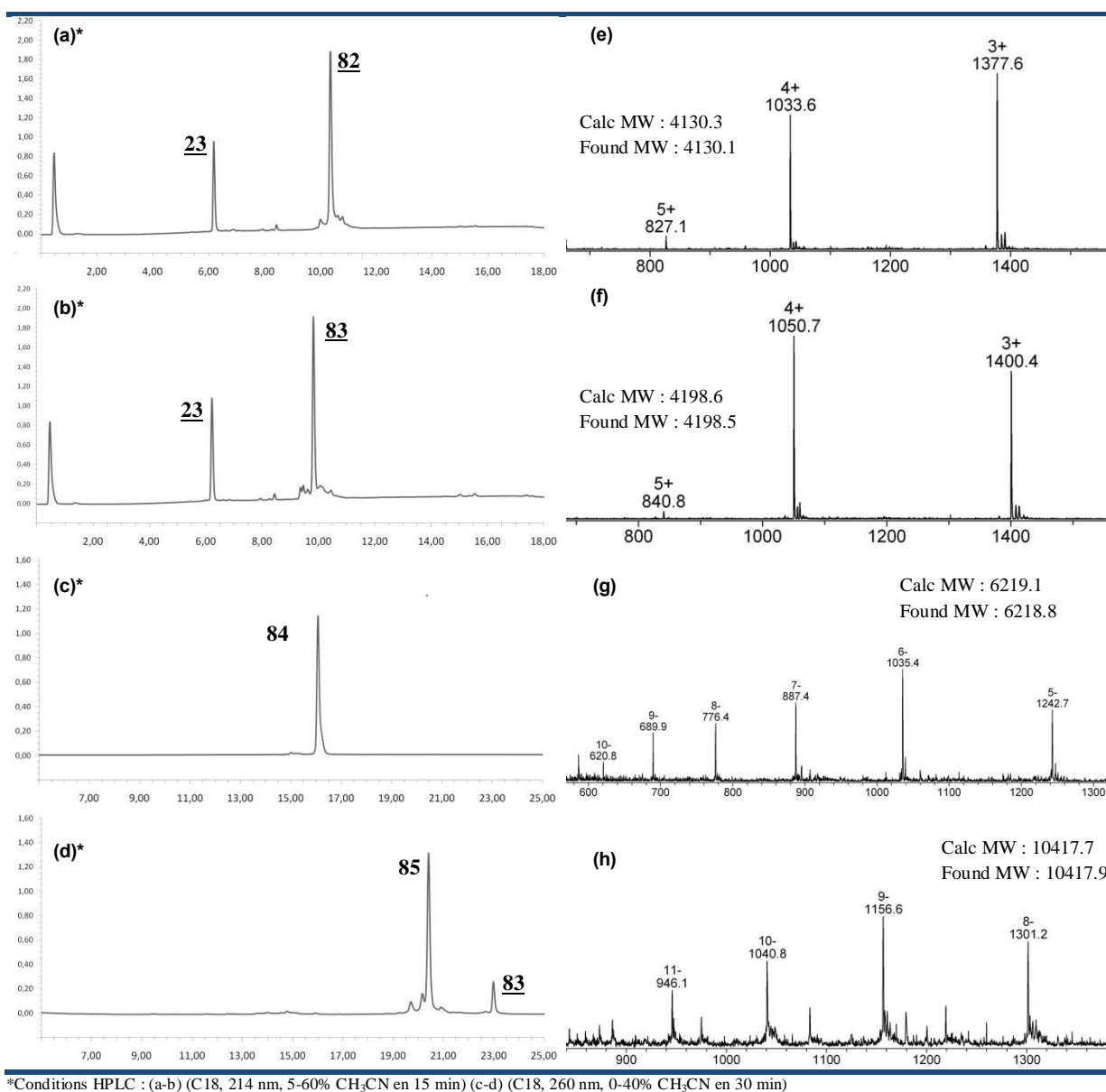


Figure 90 : Suivi HPLC de l'assemblage « One-Pot » du composé **85** et spectre ESI de l'intermédiaire **82** (a), de l'intermédiaire **83** (b), de l'oligonucléotide alcyne **84** (c) et du composé **85** (d)

A.8. Bilan des travaux

Dans ce chapitre, différentes procédures d'assemblage biomoléculaire ont été décrites. Ces dernières ont permis d'accéder à une grande variété de structures complexes. Au préalable, nous avons réalisé la synthèse de plusieurs acides aminés modifiés présentant les fonctions impliquées dans différentes ligations chimiosélectives. Ces différents synthons se sont révélés stables et complètement compatibles avec les conditions utilisées durant la SPPS. Cette stratégie a permis à la fois d'optimiser la voie de synthèse et de contrôler les différents sites de greffages du châssis. L'incorporation de ces acides aminés pendant la SPPS permet de concevoir des châssis moléculaires fonctionnalisés par plusieurs sites chimiosélectif orthogonaux. Nous avons ensuite mis au point des procédures d'assemblage biomoléculaire originales en combinant jusqu'à trois ligations chimiosélectives orthogonales. Les différentes combinaisons des ligations oxime, thioéther et CuAAC se sont révélées particulièrement efficaces et compatibles avec une grande variété de composés (peptide, sucre, acide nucléique et fluorophore). Par ailleurs, ces procédures d'assemblages ont été effectuées en « One pot » dans des conditions réactionnelles relativement simples, parfaitement reproductibles et sans aucune étape d'isolation de produits intermédiaires.

Cependant, ces trois ligations ne peuvent être réalisées simultanément. Les conditions de ligations oxime, thioéther et CuAAC ne sont pas compatibles entre elle. L'oxime doit nécessairement être formée à pH acide alors que les deux autres ligations doivent être réalisées à un pH supérieur à 7. De plus, la présence de cuivre, indispensable à la ligation CuAAC, perturbe la formation du lien thioéther en générant des dimères par ponts disulfures. Par ailleurs, la ligation thioéther n'est pas adaptée à des peptides possédant plusieurs résidus cystéines. Dans ce cas précis, la protection des autres fonctions thiols serait nécessaire pour contrôler le site de greffage par lien thioéther.

Pour palier à ces limitations, il est envisageable d'étendre cette stratégie à d'autres ligations chimiosélectives. L'idéale serait de combiner plusieurs ligations orthogonales s'opérant dans des conditions identiques, ne nécessitant pas de catalyseur et ne générant pas de sous produits nuisibles aux autres ligations. Par exemple, les ligations oxime et Diels-Alder peuvent tous deux s'effectuer à pH acide et sont théoriquement orthogonales. L'utilisation du couple azoture/cyclooctyne pour la formation du lien triazole permettrait de s'affranchir des désagréments liés à l'utilisation du cuivre (oxydation). Une telle stratégie d'assemblage pourrait être envisageable dans une approche combinatoire.

Dans notre approche de ligation successive « One-Pot » séquentielle, l'ajout de ligations supplémentaires ouvrirait la voie à des assemblages de plus en plus sophistiqués. Dans des conditions bien précises, les ligations de types « Staudinger », Diels-Alder ou thioacide/azoture seraient potentiellement orthogonales aux ligations oxime, thioéther et CuAAC.

B. Conception de mimes d'anticorps thérapeutiques

Cette partie est consacrée à la recherche de nouveaux ligands de récepteurs tumoraux en s'inspirant de l'anticorps monoclonal thérapeutique Rituximab dirigé contre l'antigène CD20. Ce projet a pour but de concevoir, synthétiser et évaluer des assemblages peptidiques mimant l'activité de reconnaissance de ce mAb.

B.1. Modèle choisi : Le Rituximab

B.1.1. La protéine CD20

L'antigène CD20 est une protéine transmembranaire de 33 à 37 kDa très spécifique des lymphocytes B.²⁰⁵ Il est exprimé par les pré-B et lymphocytes B matures²⁰⁶ responsables des lymphomes Non-Hodkinien et des leucémies chroniques lymphocytaires.²⁰⁷ Par contre, il n'est pas exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques, les précurseurs les plus précoces de la lignée B et les plasmocytes (Figure 91). Cela signifie que le ciblage des CD20 par des mAbs ne diminue pas la production d'immunoglobulines et n'affecte en rien le développement de nouveaux lymphocytes B. Le marqueur CD20 présente des caractéristiques idéales pour une thérapie ciblée basée sur la reconnaissance de mAb. Cette protéine ne circule pas dans le plasma, n'est pas internalisée après reconnaissance du mAb et présente deux boucles extracellulaires facilement accessibles. Toutefois, le rôle du CD20 est encore mal connu. On suppose que sa fonction principale est celle d'un régulateur des flux de calcium qui intervient dans la transduction d'un signal au cours de l'activation et de la différenciation du lymphocyte B. A ce jour, les seuls ligands reconnaissant les CD20 sont des anticorps monoclonaux synthétiques. Aucun ligand naturel n'a encore été découvert.²⁰⁹

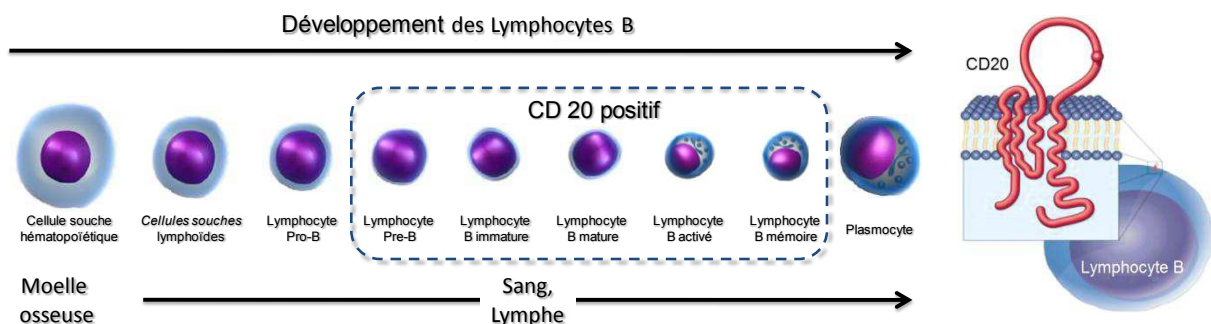


Figure 91 : Expression de la protéine CD20 durant le développement des lymphocytes B^{208,209}

²⁰⁵ Stashenko, P.; Nadler, L. M.; Hardy, R.; Schlossman, S. F., Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol* **1980**, 125 (4), 1678-1685.

²⁰⁶ Stashenko, P.; Nadler, L. M.; Hardy, R.; Schlossman, S. F., Expression of cell surface markers after human B lymphocyte activation. *P Natl Acad Sci-Biol* **1981**, 78 (6), 3848-3852.

²⁰⁷ Anderson, K. C.; Bates, M. P.; Slaughenhaupt, B. L.; Pinkus, G. S.; Schlossman, S. F.; Nadler, L. M., Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* **1984**, 63 (6), 1424-1433.

²⁰⁸ Pescovitz, M. D., Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: History and mechanism of action. *Am J Transplant* **2006**, 6 (5), 859-866.

²⁰⁹ van Meerten, T.; Hagenbeek, A., CD20-Targeted Therapy: The Next Generation of Antibodies. *Semin Hematol* **2010**, 47 (2), 199-210.

B.1.2. Caractéristique du Rituximab

(a) Induction directe d'apoptose (b) Activation du complément (c) cytotoxicité cellulaire anticorps dépendant

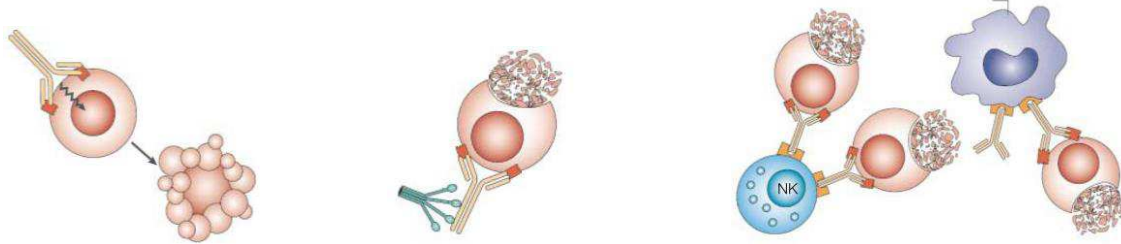


Figure 92 : Représentation schématique des différents modes d'action du Rituximab

Le Rituximab fut le premier anticorps à être approuvé en 1997 par la FDA pour le traitement d'un cancer. Cette IgG-1 chimérique dirigée contre CD20 présente une excellente affinité de l'ordre de 5 nM.^{210,211} L'action du Rituximab s'exerce par trois mécanismes principaux (Figure 92): (a) induction directe d'apoptose, (b) lyse par le complément et (c) cytotoxicité cellulaire anticorps dépendant.²¹² Ses indications ont initialement été limitées aux lymphomes Non-Hodkinien,²¹³ puis étendues aux préventions de rejet de greffe et aux maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde,²¹⁴ le lupus érythémateux systémique²¹⁵ et le syndrome de Gougerot-Sjögren. C'est toutefois en association avec la chimiothérapie que le Rituximab a montré, pour les lymphomes folliculaires, une augmentation de la survie des patients par rapport à la chimiothérapie seule. Cependant, l'efficacité du traitement reste variable à cause de certains mécanismes de résistance, aux polymorphismes des récepteurs FcγRIIIa²⁵ ou à la production d'anticorps anti-murine. L'engouement qu'a suscité le succès du Rituximab a poussé les firmes de biotechnologies à développer des mAb analogues plus performants. Ainsi, de nouveaux mAb anti-CD20 ont fait leur apparition sur le marché comme des mAbs complètement humanisés (ofatumumab)²¹⁶ et des immunoconjugués (Ibritumomab tiuxetan et ¹³¹I-Tositumomab).¹⁷

²¹⁰ Reff, M. E.; Carner, K.; Chambers, K. S.; Chinn, P. C.; Leonard, J. E.; Raab, R.; Newman, R. A.; Hanna, N.; Anderson, D. R., Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **1994**, 83 (2), 435-445.

²¹¹ Cardarelli, P. M.; Quinn, M.; Buckman, D.; Fang, Y.; Colcher, D.; King, D. J.; Bebbington, C.; Yarranton, G., Binding to CD20 by Anti-B1 Antibody or F(ab')(2) is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines. *Cancer Immunol Immun* **2002**, 51 (1), 15-24.

²¹² Smith, M. R., Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* **2003**, 22 (47), 7359-68.

²¹³ Fanale, M. A.; Younes, A., Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Drugs* **2007**, 67 (3), 333-350.

²¹⁴ Cohen, S. B.; Emery, P.; Greenwald, M. W.; Dougados, M.; Furie, R. A.; Genovese, M. C.; Keystone, E. C.; Loveless, J. E.; Burmester, G. R.; Cravets, M. W., et al., Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy - Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis and Rheumatism* **2006**, 54 (9), 2793-2806.

²¹⁵ Looney, R. J.; Anolik, J. H.; Campbell, D.; Felgar, R. E.; Young, F.; Arend, L. J.; Sloand, J. A.; Rosenblatt, J.; Sanz, I., B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus - A phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis and Rheumatism* **2004**, 50 (8), 2580-2589.

²¹⁶ Coiffier, B.; Lefrère, S.; Pedersen, L. M.; Gadeberg, O.; Fredriksen, H.; van Oers, M. H. J.; Wooldridge, J.; Kloczko, J.; Holowiecki, J.; Hellmann, A., et al., Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study. *Blood* **2008**, 111 (3), 1094-1100.

B.1.3. Etude de l'interaction Rituximab-CD20

Ces dix dernières années, de nombreuses études ont porté sur la compréhension des mécanismes de reconnaissance de l'épitope CD20 par le Rituximab ou d'autre mAb anti-CD20. Des études de mutations des résidus de la boucle extracellulaire du CD20 ont montré que les résidus Ala¹⁷⁰ et Pro¹⁷² sont essentiels pour la reconnaissance de l'épitope.²¹⁷ Grâce à la technologie Phage Display, Perosa et al. ont effectué des tests d'affinités sur une librairie d'heptapeptides cycliques et ont démontré que le motif ¹⁷¹NPS¹⁷³ était critique pour la reconnaissance du Rituximab.²¹⁸ Des études similaires ont ensuite montré l'existence d'un épitope discontinu compris entre les résidus ¹⁷⁰ANPS¹⁷³ et ¹⁸²YCYSI¹⁸⁵ reliés par un pont disulfure (Figure 93a).²¹⁹ Ce lien disulfure joue un rôle important dans le phénomène de reconnaissance car la destruction de cette liaison engendre une diminution importante de l'affinité du mAb.²²⁰

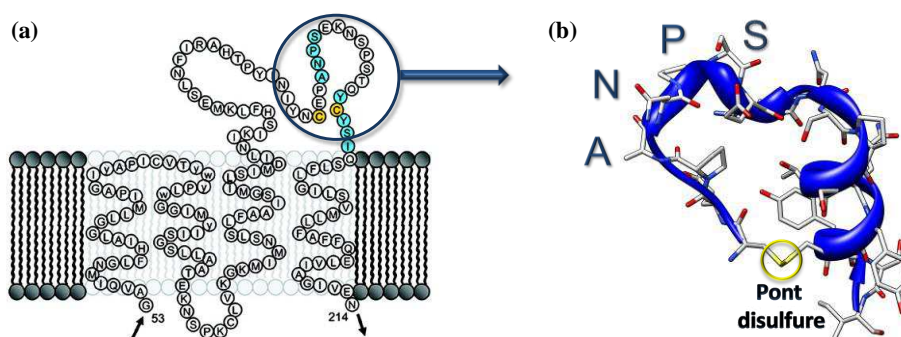


Figure 93 : (a) Représentation schématique des domaines transmembranaires et extracellulaires du CD20²¹⁹; (b) Structure du peptide mimant l'épitope de la boucle extracellulaire du CD20 (163-187)

Dans l'optique de mieux comprendre le mécanisme de reconnaissance du Rituximab avec le CD20, Du et al. ont déterminé la structure cristalline du domaine Fab du Rituximab associé à l'antigène CD20.²²¹ Pour réaliser cette étude, Du et al. ont synthétisé un peptide de 25 résidus mimant l'épitope de la boucle extracellulaire du CD20 (séquence comprise entre Asn¹⁶³ et Gln¹⁸⁷). Pour s'approcher au plus près de la conformation de l'épitope, un pont disulfure a été introduit entre les résidus Cys¹⁶⁷ and Cys¹⁸³ (Figure 93b). Après co-cristallisation de ce peptide complexé au fragment Fab du rituximab, les différentes boucles des régions hypervariables (CDR) interagissant avec l'épitope ont pu être déterminées. Dans cette structure, l'épitope est fixé à l'intérieur d'une large poche formée par les boucles CDR

²¹⁷ Polyak, M. J.; Deans, J. P., Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood* **2002**, 99 (9), 3256-3262.

²¹⁸ Perosa, F.; Favoino, E.; Caragnano, M. A.; Dammacco, F., Generation of biologically active linear and cyclic peptides has revealed a unique fine specificity of rituximab and its possible cross-reactivity with acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b precursor. *Blood* **2006**, 107 (3), 1070-1077.

²¹⁹ Binder, M.; Otto, F.; Mertelsmann, R.; Veelken, H.; Trepel, M., The epitope recognized by rituximab. *Blood* **2006**, 108 (6), 1975-1978.

²²⁰ Ernst, J. A.; Li, H.; Kim, H. S.; Nakamura, G. R.; Yansura, D. G.; Vandlen, R. L., Isolation and characterization of the B-cell marker CD20. *Biochemistry* **2005**, 44 (46), 15150-15158.

²²¹ Du, J. M.; Wang, H.; Zhong, C.; Peng, B. Z.; Zhang, M. L.; Li, B. H.; Huo, S.; Guo, Y. J.; Ding, J. P., Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody rituximab. *J Biol Chem* **2007**, 282 (20), 15073-15080.

L3, H1, H2 et H3 du domaine variable du mAb (Figure 94a). Ces boucles interagissent essentiellement avec quatre résidus, $^{170}\text{ANPS}^{173}$, de l'épitope connu comme étant le motif critique pour la reconnaissance du mAb.

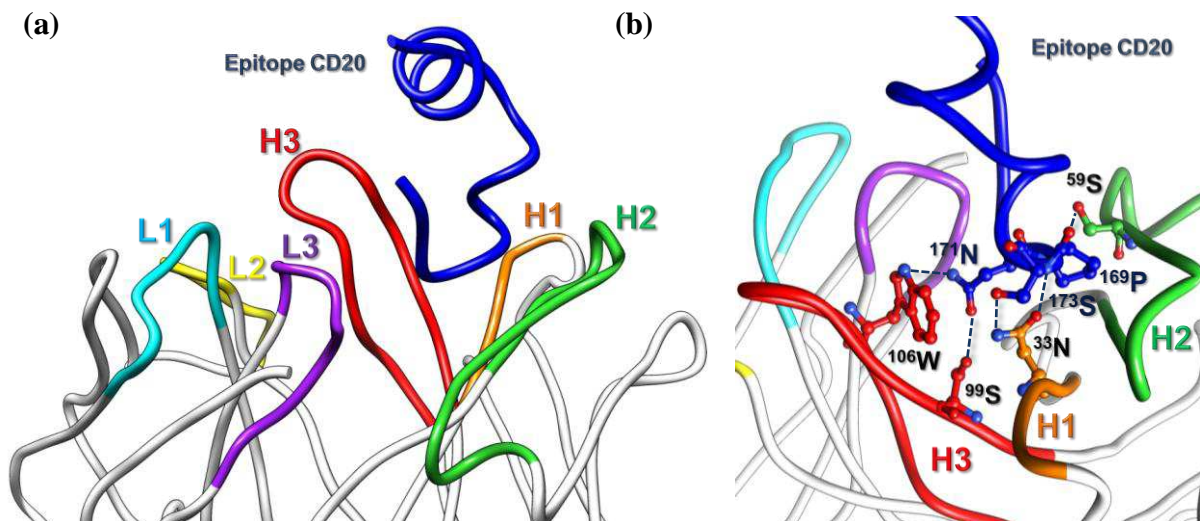


Figure 94 : (a) Représentation des différentes boucles CDR du Rituximab interagissant avec l'épitope (b) Représentation des liaisons hydrogènes entre l'épitope et les boucles CDRH1, H2 et H3

Les résidus de ce motif forment un réseau de sept liaisons hydrogène avec les résidus des différentes boucles CDR environnantes comme Asn^{L93}, Ser^{H59}, Ser^{H99}, Trp^{H106}, Asn^{H55}, Asn^{H33} et Thr^{H58} (Figure 94b). En plus de ces liaisons H, l'épitope interagit avec le Fab via de multiples interactions de type Van der Waals. Ces nombreuses interactions expliquent en partie la forte affinité du Rituximab pour l'épitope CD20 (Figure 95).

Domaine variable de la chaîne légère (VL)

```

10.      20.      30.      40.      50.      60.
QIVLSQSPA ILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVR
          CDR L1                                CDR L2
          CDR L3
70.      80.      90.      100.
FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
          CDR L3
  
```

Domaine variable de la chaîne lourde (VH)

```

10.      20.      30.      40.      50.      60.
QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSY
          CDR H1                                CDR H2
          CDR H3
70.      80.      90.      100.      110.      120.
NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS
          CDR H3
  
```

Figure 95 : Séquence du domaine variable de la chaîne légère et lourde du Rituximab (CDR souligné selon la nomenclature de Chothia²²², Résidu coloré en rouge : résidu impliqué dans une liaison hydrogène avec le CD20, Résidu coloré en bleu : résidu impliqué dans une interaction de type VDW avec le CD20)

²²² Al-Lazikani, B.; Lesk, A. M.; Chothia, C., Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* **1997**, 273 (4), 927-948.

B.2. Recherche de fragments de Rituximab interagissant avec l'épitope CD20

Pour mimer le domaine de reconnaissance du Rituximab, nous avons décidé de rechercher des fragments peptidiques issus du paratope impliqués dans la reconnaissance de l'antigène. Pour cela, nous avons effectué une étude complémentaire à l'étude cristallographie. Différentes techniques peuvent être envisagées comme le « Phage Display ». Dans cette étude, nous avons utilisé la méthode SPOT.

B.2.1. Principe de la méthode SPOT

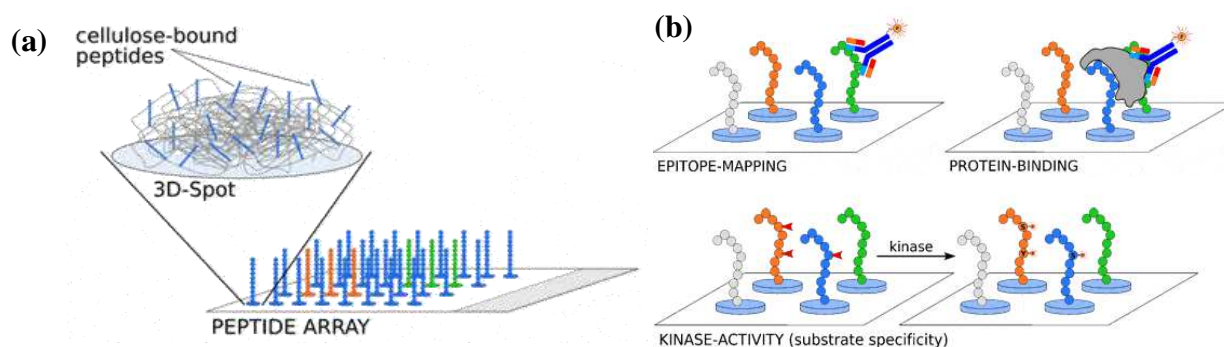


Figure 96 : (a) Représentation des peptides immobilisés sur la membrane (b) Applications de la technique SPOT

La méthode SPOT, développée par Ronald Frank en 1992,²²³ permet la synthèse parallèle d'un grand nombre de peptides supportés par une membrane. Les peptides sont synthétisés, selon une stratégie Fmoc/tBu, par des dépôts répétés de fines gouttelettes contenant les acides aminés activés sur une feuille de cellulose spécialement fonctionnalisée. Plusieurs centaines de peptides différents peuvent être préparés sur la membrane. Chaque spot contient une faible quantité de peptide mais avec une forte densité de l'ordre de 300 à 400 nm/cm² permettant ainsi une présentation multivalente (Figure 96a). Cette méthode est un excellent outil pour concevoir une librairie de peptides et les évaluer selon différentes stratégies. De nombreuses applications sont décrites dans la littérature allant du simple test d'affinités, aux tests plus élaborés comme les tests enzymologiques ou les études avec des organismes cellulaires.²²⁴ Cette méthode est utilisée dans des études d'interactions ligand-récepteur, peptide-ADN, peptide-protéine ou des études d'activité enzymatique (Figure 96b)²²⁵. Mais l'application la plus couramment utilisée demeure l'étude des interactions peptides-anticorps pour la recherche d'épitopes antigéniques (« antigenic epitope mapping »). Cette stratégie consiste à cartographier les épitopes d'un antigène le long de séquences

²²³ Frank, R., Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **1992**, 48 (42), 9217-9232.

²²⁴ Hilpert, K.; Elliott, M.; Jenssen, H.; Kindrachuk, J.; Fjell, C. D.; Körner, J.; Winkler, D. F. H.; Weaver, L. L.; Henklein, P.; Ulrich, A. S., et al., Screening and Characterization of Surface-Tethered Cationic Peptides for Antimicrobial Activity. *Chem Biol* **2009**, 16 (1), 58-69.

²²⁵ Reineke, U.; Volkmer-Engert, R.; Schneider-Mergener, J., Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. *Curr Opin Biotech* **2001**, 12 (1), 59-64.

protéiques.²²⁶ La procédure consiste à synthétiser de courts fragments peptidiques qui balaient la totalité de la séquence protéique avec un chevauchement d'un à plusieurs résidus. Après incubation des membranes en présence d'anticorps, on peut déterminer le site d'interaction d'un complexe antigène-anticorps. En 1997, Laune et al. ont employé une stratégie analogue pour identifier les fragments peptidiques d'un paratope de mAb présentant une affinité pour l'antigène.²²⁷ Grâce à la technique SPOT, Laune et al. ont identifié certains peptides dérivés d'un mAb anti-Lysosomes qui maintiennent une forte affinité pour les lysozymes ($K_D = 4,1 \cdot 10^{-7}$ à $6,7 \cdot 10^{-8}$ M). En se basant sur ces résultats, cette équipe a élaboré d'autres peptides dérivés de mAb comme des anti-CD4²²⁸ ou des anti-troponine.²²⁹ Toutes ces études ont montré que les peptides présentant une bonne affinité pour l'antigène étaient dérivés de séquences CDR du domaine variable du mAb (fréquemment H2 et H3).

B.2.2. Synthèse de peptide par méthode SPOT

Pour concevoir notre mime du Rituximab, nous avons décidé d'identifier les fragments peptidiques du paratope présentant une affinité pour l'antigène CD20. Nous avons utilisé la même stratégie mise au point par Laune et al. qui consiste à synthétiser, par méthode SPOT, de courts fragments peptidiques balayant l'ensemble du domaine variable avec un décalage d'un acide aminé.²²⁷ Nous avons donc procédé à la synthèse de 400 peptides de 6 et de 12 résidus issus de la séquence du domaine hypervariable de la chaîne lourde (VH) et la chaîne légère (VL) du Rituximab. Cette synthèse a été réalisée dans les laboratoires SysDiag de Montpellier (directeur Dr. F. Molina). Les peptides ont été assemblés selon une stratégie Fmoc/tBu sur une membrane de cellulose fonctionnalisée par des amino-PEG permettant l'accrochage du premier acide aminé par lien amide. Les différents acides aminés, préalablement activés par un mélange EDC/HOBt, sont prélevés puis déposés sur la membrane à l'aide d'un synthétiseur automatique. En fin de synthèse, la déprotection totale des peptides est réalisée en incubant la membrane dans une solution de TFA.

B.2.3. Synthèse de l'épitope et du peptide contrôle marqués

Afin d'étudier les interactions entre l'antigène CD20 et les fragments peptidiques fixés sur la membrane de cellulose, nous avons préalablement synthétisé une partie de l'antigène peptidique marqué par un fluorophore. Nous avons choisi d'utiliser l'épitope étudié par Du et al.²²¹ pour l'analyse structurale du complexe CD20-Rituximab. Ce peptide de 25

²²⁶ Reineke, U.; Sabat, R., Antibody epitope mapping using SPOT peptide arrays. *Methods Mol Biol* **2009**, 524, 145-67.

²²⁷ Laune, D.; Molina, F.; Ferrieres, G.; Mani, J. C.; Cohen, P.; Simon, D.; Bernardi, T.; Piechaczyk, M.; Pau, B.; Granier, C., Systematic exploration of the antigen binding-activity of synthetic peptides isolated from the variable regions of immunoglobulins. *J Biol Chem* **1997**, 272 (49), 30937-30944.

²²⁸ Monnet, C.; Laune, D.; Laroche-Traineau, J.; Biard-Piechaczyk, M.; Briant, L.; Bes, C.; Pugniere, M.; Mani, J. C.; Pau, B.; Cerutti, R., et al., Synthetic peptides derived from the variable regions of an anti-CD4 monoclonal antibody bind to CD4 and inhibit HIV-1 promoter activation in virus-infected cells. *J Biol Chem* **1999**, 274 (6), 3789-3796.

²²⁹ Laune, D.; Molina, F.; Ferrieres, G.; Villard, S.; Bes, C.; Rieunier, F.; Chardes, T.; Granier, C., Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J Immunol Methods* **2002**, 267 (1), 53-70.

résidus, cyclisé via un pont disulfure, mime l'épitope de la boucle extracellulaire du CD20 (séquence comprise entre Asn¹⁶³ to Gln¹⁸⁷). La spécificité des interactions est vérifiée par un peptide contrôle (« scramble ») marqué lui aussi avec un fluorophore. Ce dernier est composé des mêmes résidus que l'épitope CD20 mais dans un ordre différent.

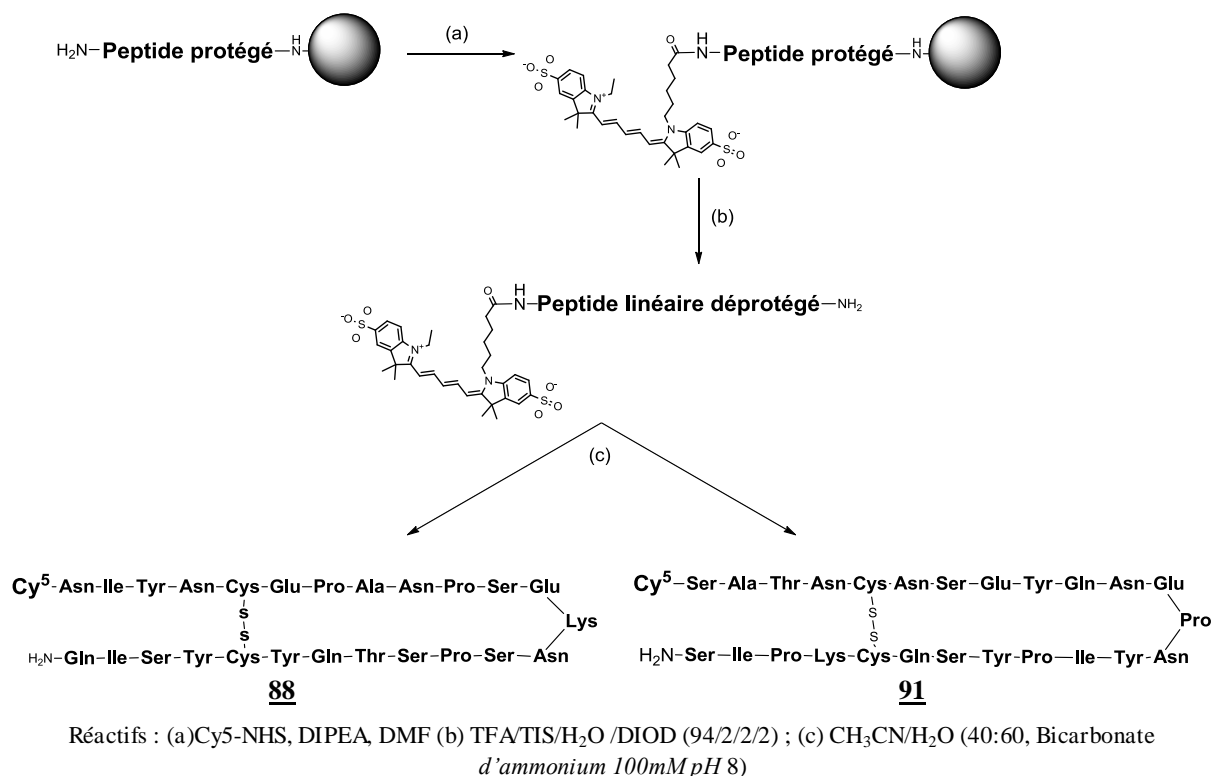


Figure 97 : Schéma de synthèse des peptides marqués **88** et **91**

La synthèse des deux peptides est réalisée sur une résine Rink amide selon la stratégie Fmoc/tBu. Après élongation des peptides, on effectue le couplage de la cyanine 5, activée sous forme de NHS, sur l'amine terminale des peptides supportés. Il est important de noter que le fluorophore est greffé sur une partie éloignée du motif ANPS qui est décrit comme étant critique pour la reconnaissance. Les peptides sont ensuite détachés de la résine et totalement déprotégés après incubation de la résine dans une solution de TFA. Après purification par HPLC préparative la cyclisation intramoléculaire des peptides est réalisée via un pont disulfure entre les deux cystéines. La formation de ce lien est réalisée par oxydation à l'air dans un milieu tamponné (pH 8) sous haute dilution (10^{-4} M). Après une nuit sous agitation, la formation du lien est vérifiée à l'aide du test d'Ellman. L'épitope CD20 **88** et le peptide contrôle **91** marqués à la cyanine 5 sont obtenus avec des rendements satisfaisants et une excellente pureté pour leur utilisation ultérieure.

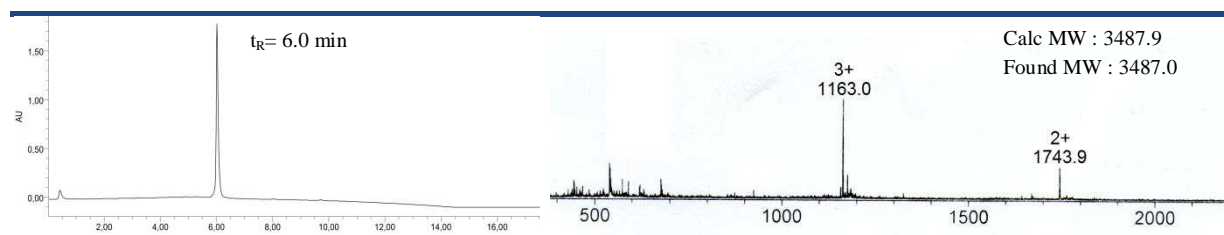


Figure 98 : Chromatogramme HPLC et spectre ESI du composé **88**

B.2.4. Révélation

Pour révéler les membranes, nous nous sommes basés sur une procédure mise au point dans le laboratoire SysDiag de Montpellier. Les membranes sont préalablement plongées dans un tampon de saturation à pH 7 toute une nuit. Après un rapide rinçage, les membranes sont incubées à 37°C pendant 2 heures dans un tampon de saturation contenant le peptide **88** ou **91** marqué au fluorophore à 10^{-8} M. Après un rapide lavage, les membranes sont scannées à l'aide d'un scanner à fluorescence (Typhoon™ 9400, GE Healthcare) réglé sur l'absorption et l'émission de la cyanine5 (Figure 99). Après enregistrement des images, les membranes peuvent être régénérées par une procédure de lavage et être réutilisées.

Durant mes travaux de thèse, deux membranes SPOT comportant les segments peptidiques du domaine variable du Rituximab ont été préparées. Malheureusement, la révélation de la première membrane a posé quelques problèmes à cause d'une trop grande concentration en épitopes marqués qui précipitaient. Même après plusieurs procédures de lavage, des marques résiduelles étaient toujours visibles et empêchaient la réalisation de l'étape de contrôle avec le peptide « scramble » **91**. La membrane a donc été synthétisée une nouvelle fois puis révélée avec de plus faibles concentrations en peptides marqués (Figure 99b-c).

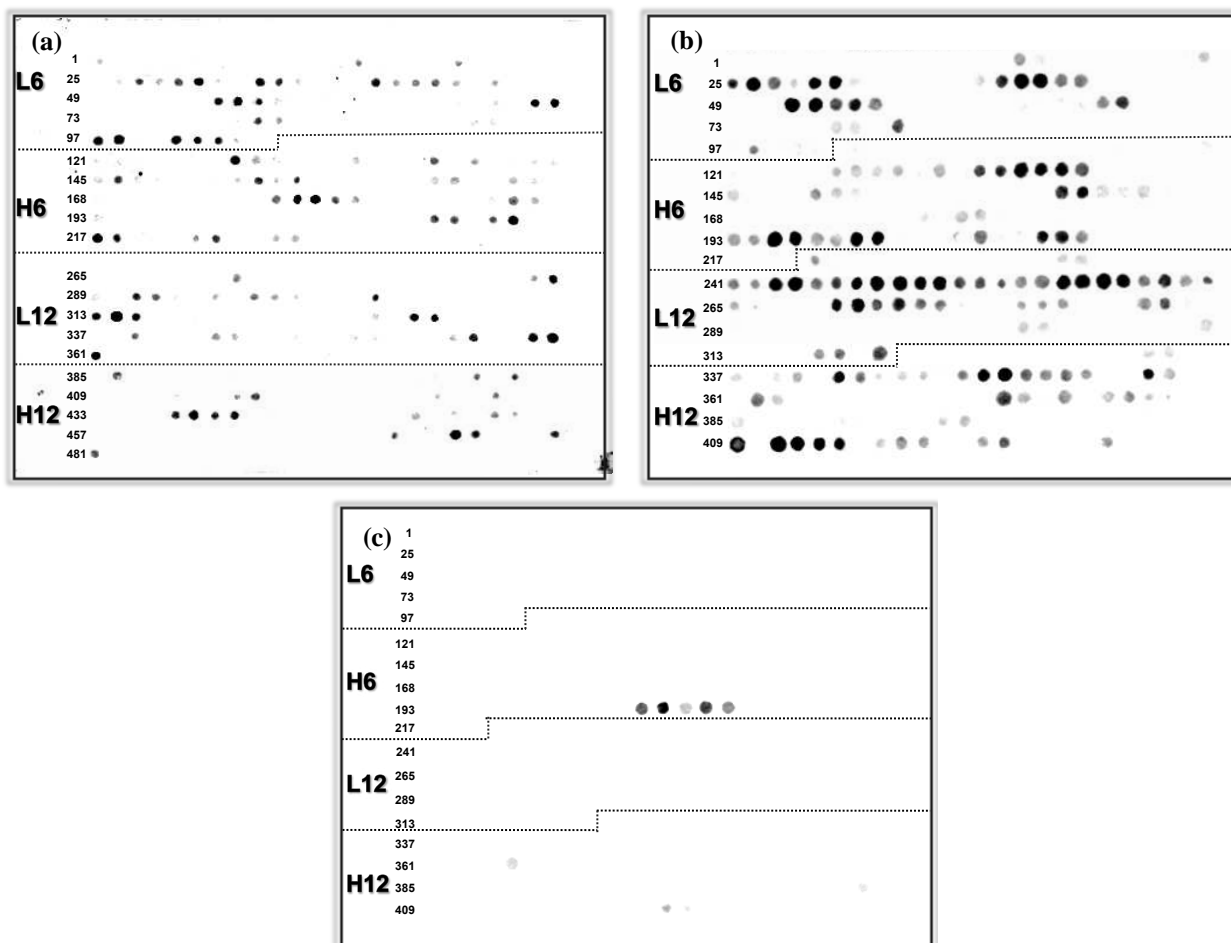


Figure 99 : Image de la 1^{ère} (A) et de la 2nd membrane (B) révélées avec l'épitope fluorescent **88** (A-B) et le peptide contrôle **91** (C)

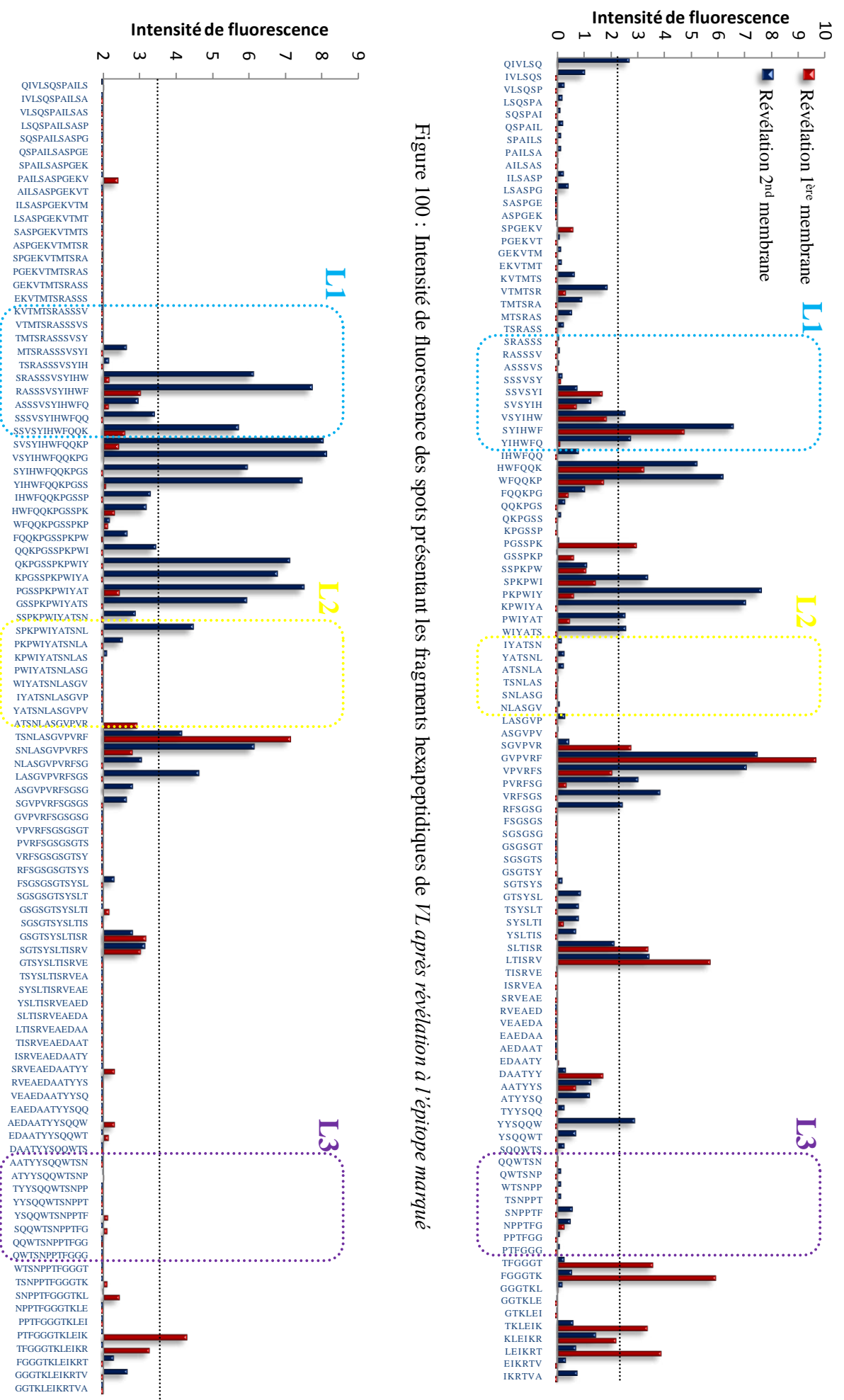


Figure 100 : Intensité de fluorescence des spots présentant les fragments hexapeptidiques de VL après révélation à l'épitope marqué

Figure 101 : Intensité de fluorescence des spots présentant les fragments dodécapeptidique de VL après révélation à l'épitope marqué

Figure 104 : Intensité de fluorescence des spots présentant les fragments dodécapeptidiques de VH après révélation à l'épitope marqué

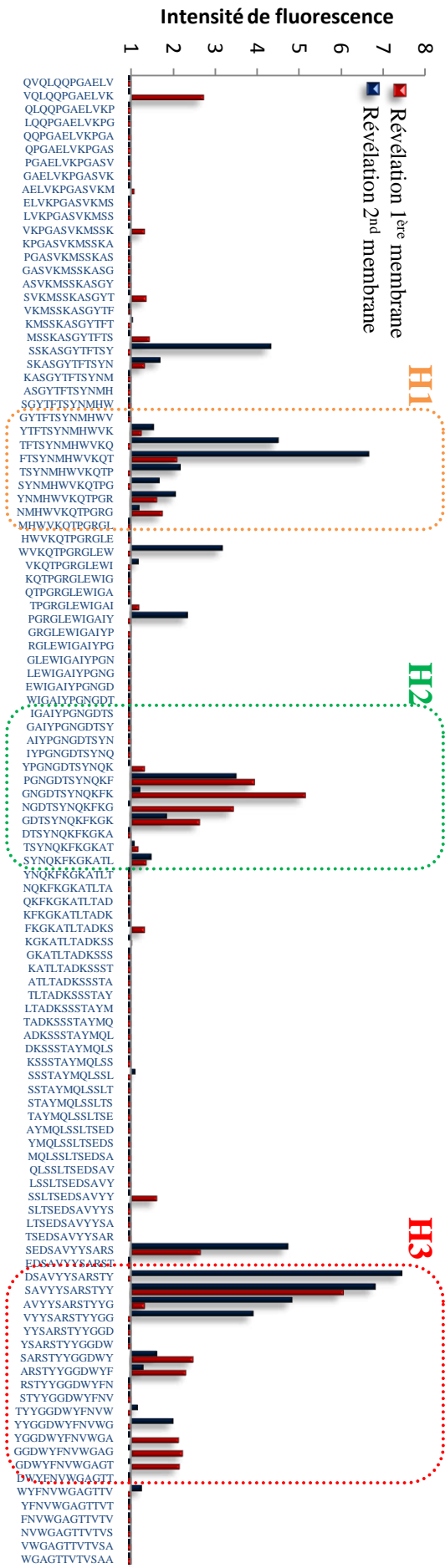
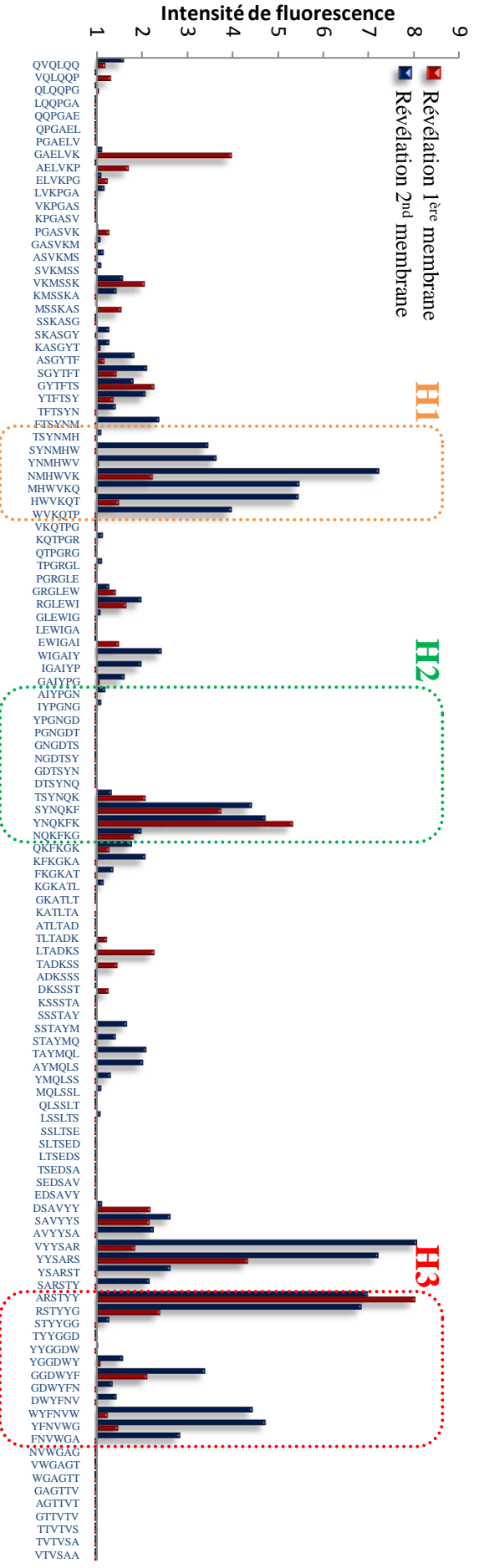


Figure 103 : Intensité de fluorescence des spots présentant les fragments hexapeptidiques de VH après révélation à l'épitope marqué



★ Etude des fragments peptidiques de 6 et de 12 résidus du domaine VH

L'analyse des fragments peptidiques du domaine VH a révélé trois zones d'interactions correspondant aux séquences des différentes boucles CDR (H1, H2 et H3). La première membrane a permis d'identifier deux segments de forte affinité ⁶⁰YNQKFK⁶⁵ et ⁹⁷ARSTYY¹⁰² provenant respectivement des CDR H2 et H3. La seconde membrane a révélé une zone d'interaction plus étendue et mieux définie. D'autres peptides de bonne affinité ont été déterminés comme le segment ³³NMHWVK³⁸ provenant du CDR H1 ou les segments ⁹⁴YYSARS⁹⁹ et ¹⁰⁶WYFNWV¹¹¹ provenant des deux extrémités de la boucle CDR H3 (Figure 105). Comme l'a montré l'analyse du domaine VL, les hexa- et dodécapeptides qui possèdent les mêmes résidus montrent des affinités comparables.

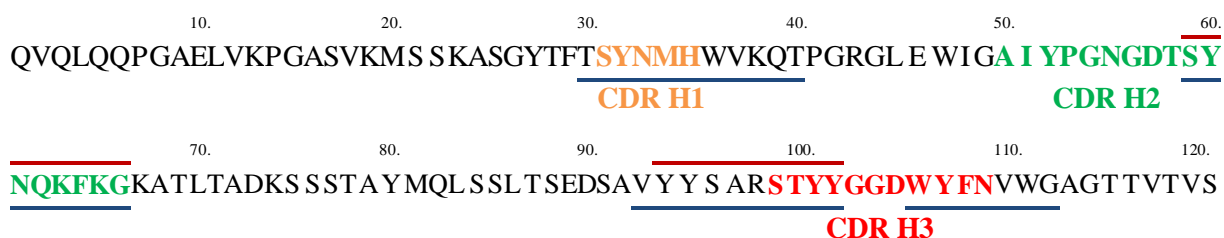


Figure 105 : Séquence du domaine variable de la chaîne lourde du Rituximab (Résidus colorés : résidus des boucles CDR déterminés par cristallographie, Résidus surlignés en rouge : résidus des *fragments interagissant avec l'épitope déterminés par la 1^{ère} membrane*, Résidus soulignés en bleu : résidus des *fragments interagissant avec l'épitope déterminés par la 2nd membrane*)

★ Comparaison des segments identifiés par l'étude cristallographique et la méthode SPOT

Grâce à la méthode SPOT, nous avons pu identifier plusieurs peptides présentant une affinité pour l'épitope CD20. A l'exception de la chaîne légère, l'analyse par méthode SPOT a permis de sélectionner des peptides provenant des boucles CDR du paratope à savoir H1, H2 et H3. D'après les intensités de fluorescence, les peptides présentant la meilleure affinité sont issus de la boucle H3. Selon la littérature, ce CDR est connu comme étant primordial pour la reconnaissance d'un antigène. On peut aussi remarquer que les peptides correspondant au «coude» de la boucle H3 n'ont montré aucune affinité. Il est important de noter que certains de ces segments ne coïncident pas complètement avec les données cristallographiques et présentent un léger décalage (Figure 105). Selon l'étude cristallographique, la boucle CDRH2 interagit avec l'épitope via le segment ⁴⁷WIGAIYPGNGDTS⁵⁹ alors que la méthode SPOT révèle un segment plus éloigné correspondant à la séquence ⁶⁰YNQKFK⁶⁵. Ceci est également observé pour le segment ⁹⁴YYSARS⁹⁹ qui est situé juste à l'extrémité de la boucle H3. Par contre, les peptides ³³NMHWVK³⁸, ⁹⁷ARSTYY¹⁰² et ¹⁰⁶WYFNWV¹¹¹ sont en parfait accord avec l'étude cristallographique (Figure 106).

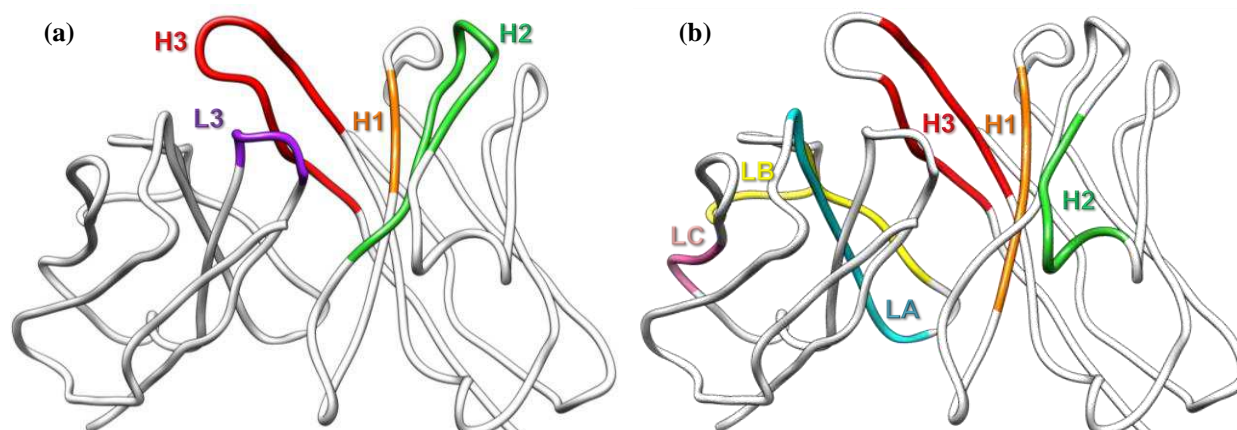


Figure 106 : Les segments colorés représentent les zones d'interaction entre le Rituximab et le CD20 identifié par (a) structure cristallographique (b) méthode SPOT

D'après la figure 106, on peut remarquer que les segments déterminés par la technique SPOT sont plus enfouis à l'intérieur de la structure paratope. Il arrive parfois que les études cristallographique ne reflète pas exactement les structures que peuvent adopter certains complexes de protéines en solution. Les analyses structurales de protéines déterminées par cristallographie et par RMN en solution sont parfois différentes.²³⁰ C'est pourquoi ces deux techniques sont complémentaires.²³¹ Dans notre cas, on peut supposer que lors de la cristallisation le complexe a légèrement changé de conformation vraisemblablement dû à une désolvation.

²³⁰ Snyder, D. A.; Chen, Y.; Denissova, N. G.; Acton, T.; Aramini, J. M.; Ciano, M.; Karlin, R.; Liu, J.; Manor, P.; Rajan, P. A., et al., Comparisons of NMR Spectral Quality and Success in Crystallization Demonstrate that NMR and X-ray Crystallography Are Complementary Methods for Small Protein Structure Determination. *J Am Chem Soc* **2005**, 127 (47), 16505-16511.

²³¹ Yee, A. A.; Savchenko, A.; Ignachenko, A.; Lukin, J.; Xu, X.; Skarina, T.; Evdokimova, E.; Liu, C. S.; Semesi, A.; Guido, V., et al., NMR and X-ray Crystallography, Complementary Tools in Structural Proteomics of Small Proteins. *J Am Chem Soc* **2005**, 127 (47), 16512-16517.

B.3. Quantification de l'affinité des fragments par SPR

La technique de résonance plasmonique de surface (SPR) a été utilisée pour déterminer l'affinité des fragments peptidiques avec l'épitope CD20. Cette technique nous permettra de mesurer les constantes de dissociation (K_D) des peptides identifiés par la méthode SPOT.

B.3.1. Principe de la SPR

La résonance plasmonique de surface est devenue ces dernières années une méthode couramment employée pour l'étude cinétique et thermodynamique des interactions intermoléculaires.²³² Introduit par H. Raether et K. Welford dans les années 1970, le phénomène de résonance plasmonique de surface a lieu lorsqu'une lumière polarisée, sous des conditions de réflexion interne totale, heurte une couche de métal électriquement conductrice à l'interface de deux milieux d'indices de réfraction différents.²³³ Le dispositif expérimental utilisé par la technologie Biacore® (Figure 107a) utilise une interface verre (surface du capteur – indice de réfraction élevé) et liquide (solution contenant les objets d'études – indice de réfraction bas). Lorsque le faisceau lumineux arrive sur cette interface, une partie de la lumière incidente est réfléchiée tandis que l'autre partie est réfractée à travers la surface. Dans les conditions de réflexions totales, une composante électromagnétique de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. L'onde évanescente entre en résonance avec les électrons délocalisés de la couche électronique périphérique de l'or (plasmon), phénomène qui se traduit par une chute d'intensité du rayon réfléchi. L'angle pour lequel l'intensité est minimale est appelé angle de SPR (Figure 107b). Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent.

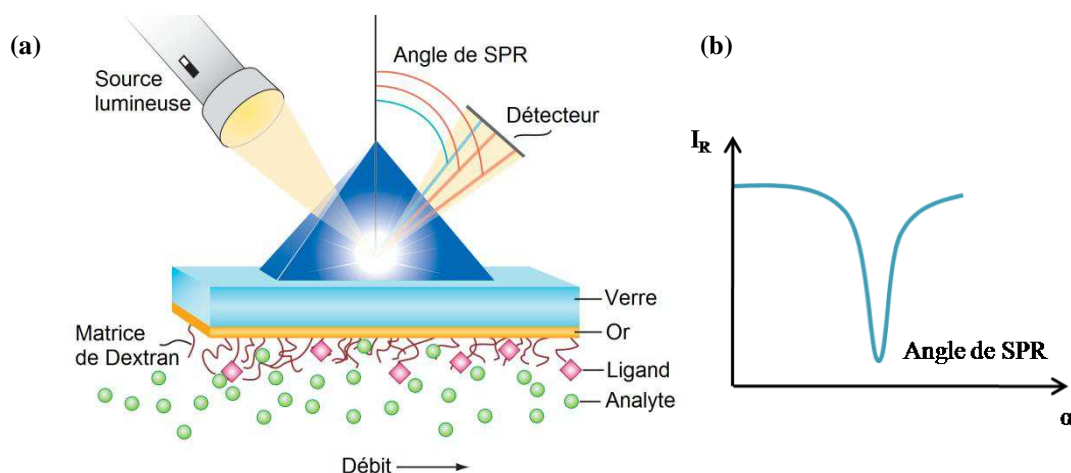


Figure 107 : (a) Dispositif expérimental utilisé par la technologie Biacore®²³⁴, (b) variation de l'intensité de la lumière réfléchiée en fonction de l'angle de SPR α

²³² Rich, R. L.; Myszka, D. G., Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008: 'The Mighty Binders'. *J Mol Recognit* **2010**, 23 (1), 1-64.

²³³ Pockrand, I.; Raether, H., Surface plasma oscillations at sinusoidal silver surfaces. *Appl Opt* **1977**, 16 (7), 1784-6.

²³⁴ Wilson, W. D., Analyzing biomolecular interactions. *Science* **2002**, 295 (5562), 2103-+.

Pour les études d'interactions, l'un des partenaires (le ligand) est immobilisé sur la surface tandis que le second (l'analyte) est dilué en solution et injecté sur la surface fonctionnalisée. Les changements de masse et les variations d'indice de réfraction induits par l'association ou la dissociation des complexes formés par les deux partenaires modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle α de SPR. Le suivi de la valeur de cet angle permet ainsi d'enregistrer en temps réel la fixation des molécules injectées sur la surface.

L'angle est communément exprimé en unité arbitraire de résonance RU (Resonance Units), pour lequel une variation d'angle de résonance de 0.1° est égale à 1000RU. La représentation graphique de la variation de RU en fonction du temps est appelée un sensorgramme. Les études d'interactions sont effectuées en flux continu selon la technologie BIAcore®. L'ensemble de l'étude s'effectue généralement dans un seul tampon de travail, noté WB (Working buffer). Le but est d'éviter la présence de fort saut de signal (effet tampon) dû aux changements de milieu. L'étude cinétique comporte trois étapes (Figure 108) : une étape de stabilisation du signal, une étape d'association où le ligand à étudier est injecté sur la surface et une dernière étape de dissociation du ligand. Afin de pouvoir effectuer plusieurs cycles d'association/dissociation successifs à des concentrations de ligands croissantes, une étape de régénération est souvent nécessaire pour récupérer à la fin d'un cycle la surface dans son état initial.

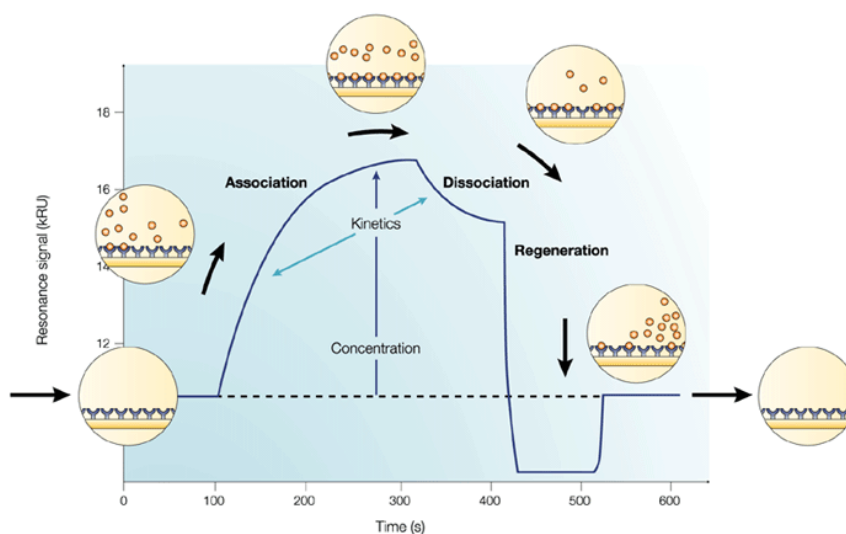


Figure 108 : Sensorgramme type obtenue lors de l'étude de l'interaction entre deux partenaires ²³⁵

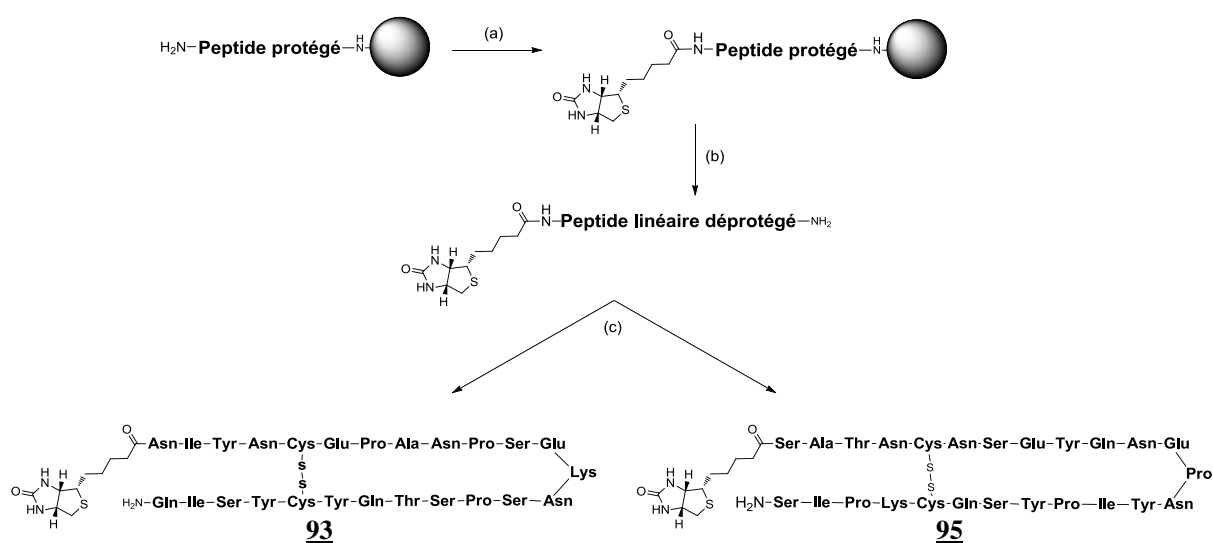
Les sensorgrammes peuvent être interprétés selon deux approches : une approche cinétique et une approche thermodynamique. Pour les cinétiques d'interactions, les phases d'association et de dissociation peuvent être modélisées en utilisant des modèles mathématiques adéquats. Ce traitement permet l'accès aux constantes cinétiques d'association et de dissociation, notées respectivement k_a (exprimées en $M^{-1}.s^{-1}$) et k_d (exprimées s^{-1}). La connaissance de ces paramètres permet l'obtention de la constante de dissociation K_D .

²³⁵ Cooper, M. A., Optical biosensors in drug discovery. Nat Rev Drug Discov **2002**, 1 (7), 515-528.

B.3.2. Mise en place du système CD20 pour l'étude SPR

Pour les études d'interactions, l'épitope CD20 est immobilisé sur la surface et les différents fragments peptidiques à analyser sont dilués en solution et injectés sur la surface fonctionnalisée. Le système Biacore utilisé permet de travailler sur quatre pistes dont les surfaces peuvent être fonctionnalisées de manière indépendante. Par défaut, la première piste sert de référence tandis que les autres pistes sont utilisées pour effectuer les mesures. Dans ce système, nous avons décidé de greffer le peptide contrôle sur la piste de référence et l'épitope CD20 sur la piste de mesure. Les peptides à immobiliser sont préalablement modifiés par une biotine permettant leur accrochage sur une surface fonctionnalisée par des Streptavidines.

★ Synthèse de l'épitope CD20 et du peptide contrôle pour l'immobilisation sur surface



Réactifs : (a) Biotine, PyBOP DIPEA, DMF (b) TFA/TIS/H₂O /DIOD (94/2/2/2) ; (c) CH₃CN/H₂O (40:60, Bicarbonate d'ammonium 100mM pH 8)

Figure 109 : Schéma de synthèse des peptides biotinylés **93** et **95**

Les deux peptides fonctionnalisés du côté N-terminal par une biotine ont été synthétisés selon la même voie de synthèse utilisée pour préparer les peptides marqués **88** et **91**. Après purification, l'épitope CD20 **93** et le peptide contrôle **95** biotinylés sont obtenus avec des rendements satisfaisants et une excellente pureté pour leur utilisation ultérieure (Figure 110).

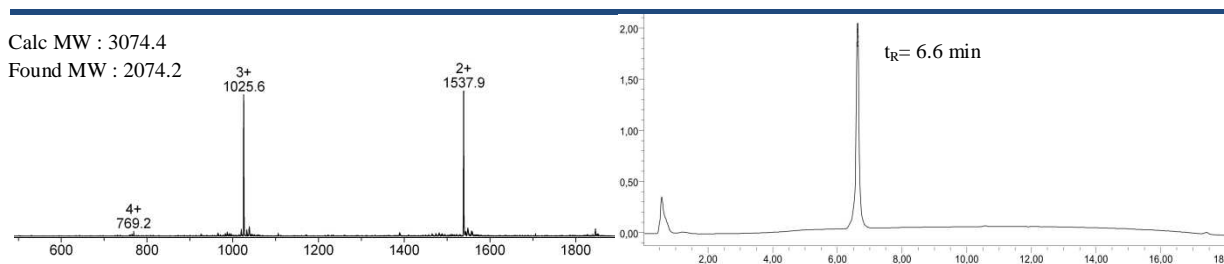


Figure 110 : Chromatogramme HPLC et spectre ESI du composé **93**

★ Immobilisation sur surface du peptide CD20 et du peptide contrôle

Dans le cadre des études en BIAcore[®], nous avons utilisé une sensor chips de type CM5 qui se compose d'une fine couche d'or fonctionnalisée par une couche hydrogel réticulé de dextran carboxyméthylé. La présence de fonctions carboxyle facilite l'immobilisation covalente sur la surface de la streptavidine par lien amide. La fonctionnalisation de la surface par la streptavidine s'effectue en trois étapes consécutives sous un flux continu. La première étape consiste à former les esters activés des groupes carboxyles par injection d'un mélange NHS/EDC. L'immobilisation de la streptavine s'effectue par injection d'une solution à 100 µg/mL diluée dans un tampon d'acétate de sodium à pH 4,5. Le pH de la solution de couplage confère à la protéine une charge nette positive, facilitant son adhésion sur la surface chargée négativement par attraction électrostatique. La streptavidine est greffée sur les deux pistes jusqu'à saturation de la surface mesurée à 3500 RU. Pour finir, la surface est neutralisée par injection d'une solution d'éthanolamine permettant de masquer les sites d'ester succinimide qui n'ont pas réagit.

La piste 1 qui sert de piste de référence est fonctionnalisée par le peptide contrôle **95** alors que la piste 2 est fonctionnalisée par l'antigène CD20 **93**. Afin d'avoir une bonne compensation des pistes, les peptides ont été immobilisés selon une procédure identique. Le greffage des deux peptides biotinylés a été réalisé par injection d'une solution à 5µM dans un tampon HEPES jusqu'à saturation des sites d'accrochage de la streptavidine observée à 200 RU.

B.3.3. Mesure de la constante de dissociation du Rituximab et des fragments identifiés par méthode SPOT

★ Mesure de la constante de dissociation du Rituximab

Pour commencer le système mis en place a été validé en procédant à la mesure de l'interaction entre le Rituximab et l'épitope CD20. Pour réaliser cette étude, nous nous sommes procurés une solution saline de Rituximab diluée à 69 µM fournie par la société Roche Pharma. Cette solution a été diluée dans pour donner plusieurs échantillons de concentrations croissantes, allant de 0,25 µM à 30 µM. Ces différents échantillons ont ensuite été injectés sur les deux pistes de la sensor chips présentant le peptide contrôle et l'épitope CD20 immobilisé. L'effet tampon est ensuite éliminé en soustrayant les données de la piste de mesure par les données de la piste de référence. A l'issue de l'expérience, on obtient le sensorgramme représenté Figure 111.

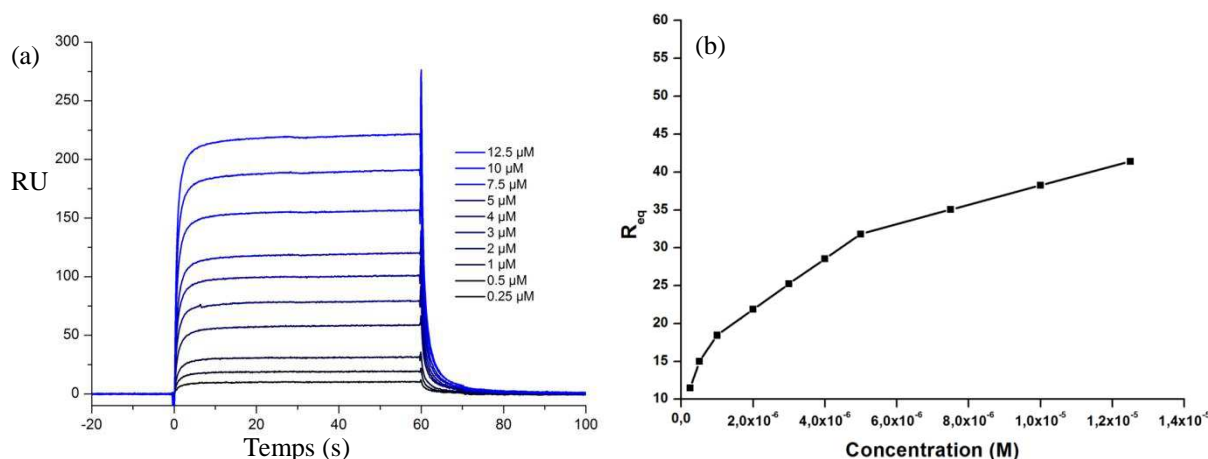


Figure 111 : (a) Sensorgramme de l'analyse SPR (b) isotherme d'adsorption de l'interaction entre le Rituximab et l'épitope CD20

Les différentes constantes d'affinités et cinétiques caractérisant ces interactions ont été extraites en utilisant le logiciel « Bia evaluation » et un modèle de Langmuir. Les constantes de dissociation déterminés sont de l'ordre de 10^{-6} M avec un $K_D^{eq} = 4,5 \cdot 10^{-6}$ M et un $K_D^{cin} = 9 \cdot 10^{-6}$ M. Théoriquement, la constante de dissociation devrait être de l'ordre de 10^{-9} M. Cette faible affinité du Rituximab pour le peptide CD20 a également été observée par Le Guellec and coll. sur un système similaire au notre.²³⁶ Cette faible interaction peut être causée par plusieurs phénomènes comme l'accessibilité à l'antigène (gène stérique de la streptavidine ou du dextran) ou une très faible densité de peptides immobilisés. Cependant, nous avons décidé de poursuivre les analyses d'interactions. Ce résultat nous servira de témoin pour comparer les mesures d'affinités des différents peptides révélés par la méthode SPOT.

★ Synthèse des fragments peptidiques déterminés par méthode SPOT

En se basant sur les résultats de la première membrane, nous avons décidé de synthétiser et d'analyser les fragments présentant la meilleure affinité pour l'épitope CD20. Nous avons donc sélectionné les fragments hexapeptidiques ⁶⁰YNQKFK⁶⁵ (H2-6) et ⁹⁷ARSTYY¹⁰² (H3-6) provenant respectivement des boucles CDR H2 et H3 et les fragments ⁵⁶GVPVRF⁶¹ (LA-6) et ⁷²LTISR⁷⁷ (LB-6) provenant de la chaîne légère. Les dodécapeptides ⁵⁴GNGDTSYNQKFK⁶⁵ (H2-12) et ⁹¹SAVYY SARSTYY¹⁰² (H3-12) ont aussi été sélectionnés pour les comparer avec leurs homologues à 6 résidus.

La synthèse des peptides a été réalisée sur une résine Rink amide. Après élongation et déprotection, les peptides sont été purifiés pour donner les différents produits attendus avec une excellente pureté pour l'analyse SPR.

★ Mesure de la constante de dissociation des fragments

La mesure des constantes de dissociation des différents fragments peptidiques a été réalisée sur le même système décrit pour l'évaluation du Rituximab. Les différents peptides ont été dissous pour donner plusieurs échantillons de concentrations croissantes allant de

²³⁶ Blasco, H.; Lalmanach, G.; Godat, E.; Maurel, M. C.; Canepa, S.; Belghazi, A.; Paintaud, G.; Degenne, D.; Chatelut, E.; Cartron, G., et al., Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum. *J Immunol Methods* **2007**, 325 (1-2), 127-139.

1 μ M à 1 mM. Les solutions ont ensuite été injectées pour mesurer leur interaction avec l'épitope. Malgré de fortes concentrations en analyte, jusqu'à 1 mM, aucune réponse n'a pu être détectée (Tableau 7). En général, l'identification par la méthode SPOT, d'un peptide interagissant avec un antigène est confirmée par l'analyse du peptide soluble en SPR.²²⁷ Cependant, comme dans le cas présent, certains de ces peptides sous leurs formes solubles ne gardent pas une bonne affinité pour l'antigène. Ce phénomène peut être dû à plusieurs paramètres. Pour la méthode SPOT, les peptides immobilisés sur la membrane sont orientés du côté C-terminal ce qui peut avoir une influence sur l'interaction. Par ailleurs, les peptides sont présentés sur la feuille de cellulose sous très hautes densités ce qui a pour effet d'augmenter l'affinité par effet de multivalence. Si on part du principe que cet effet de multivalence joue un rôle prépondérant dans la reconnaissance de l'épitope CD20, on peut supposer qu'une fois assemblés sur un support multivalent, les fragments peptidiques présenteraient une bonne affinité mesurable en SPR.

Fragment	Produit	Séquence	K_D (M)
Rituximab			9.10^{-6}
H2-6	<u>96</u>	H-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Lys-NH ₂	ND*
H3-6	<u>97</u>	H-Ala-Arg-Ser-Thr-Tyr-Tyr-NH ₂	ND
LA-6	<u>98</u>	H-Gly-Val-Pro-Val-Arg-Phe-NH ₂	ND
LB-6	<u>99</u>	H-Leu-Thr-Ile-Ser-Arg-Val-NH ₂	ND
H2-12	<u>100</u>	H-Gly-Asn-Gly-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Lys-NH ₂	ND
H3-12	<u>101</u>	H-Ser-Ala-Val-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Arg-Ser-Thr-Tyr-Tyr-NH ₂	ND

*ND : Non-déterminée

Tableau 7 : Résultats de l'analyse SPR des interactions entre les différents peptides et l'épitope

B.4. Synthèse et évaluation en SPR des fragments de mAb sur le châssis multivalent

Dans l'optique d'augmenter l'affinité d'interaction des fragments peptidiques avec l'épitope CD20, nous avons décidé de les assembler sur le châssis moléculaire RAFT. Comme il a été démontré pour l'étude du RAFT4(c[-RGDfK-]), le châssis peut présenter jusqu'à quatre unités de ligand induisant une augmentation de la concentration locale et améliorant ainsi l'affinité pour le récepteur. Pour réaliser ces montages multivalents, nous avons sélectionné les fragments provenant des boucles CDRH2 et CDRH3 soit H2-6, H3-6, H2-12 et H3-12. Afin de vérifier la spécificité des interactions, nous avons préparé un peptide contrôle (« scramble ») présentant les mêmes résidus que le fragment H2-6 mais dans un ordre différent.

B.4.1. Montages des fragments côté N-terminal sur les châssis par ligations oxime

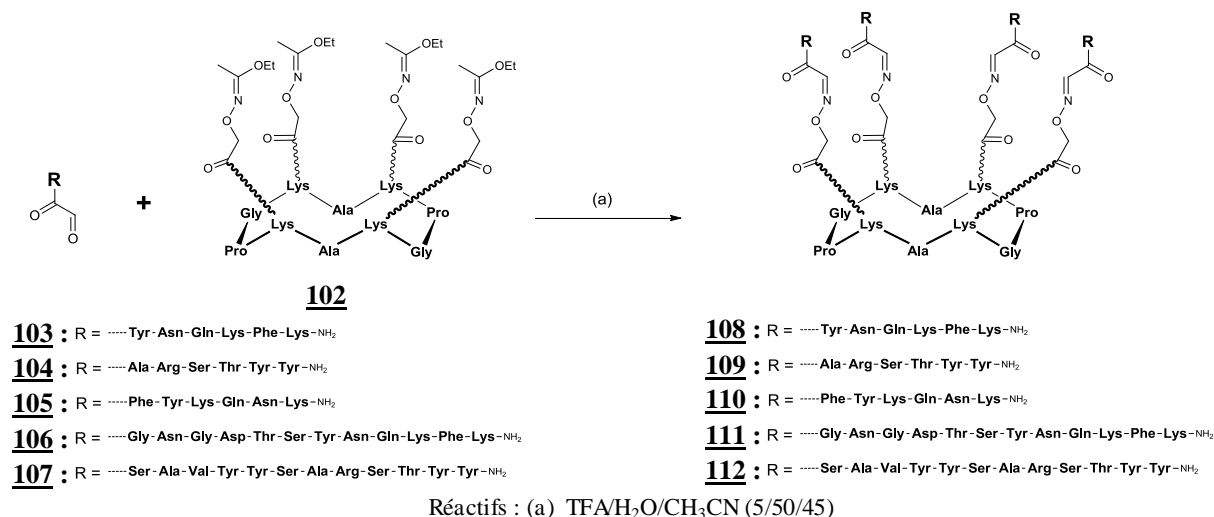
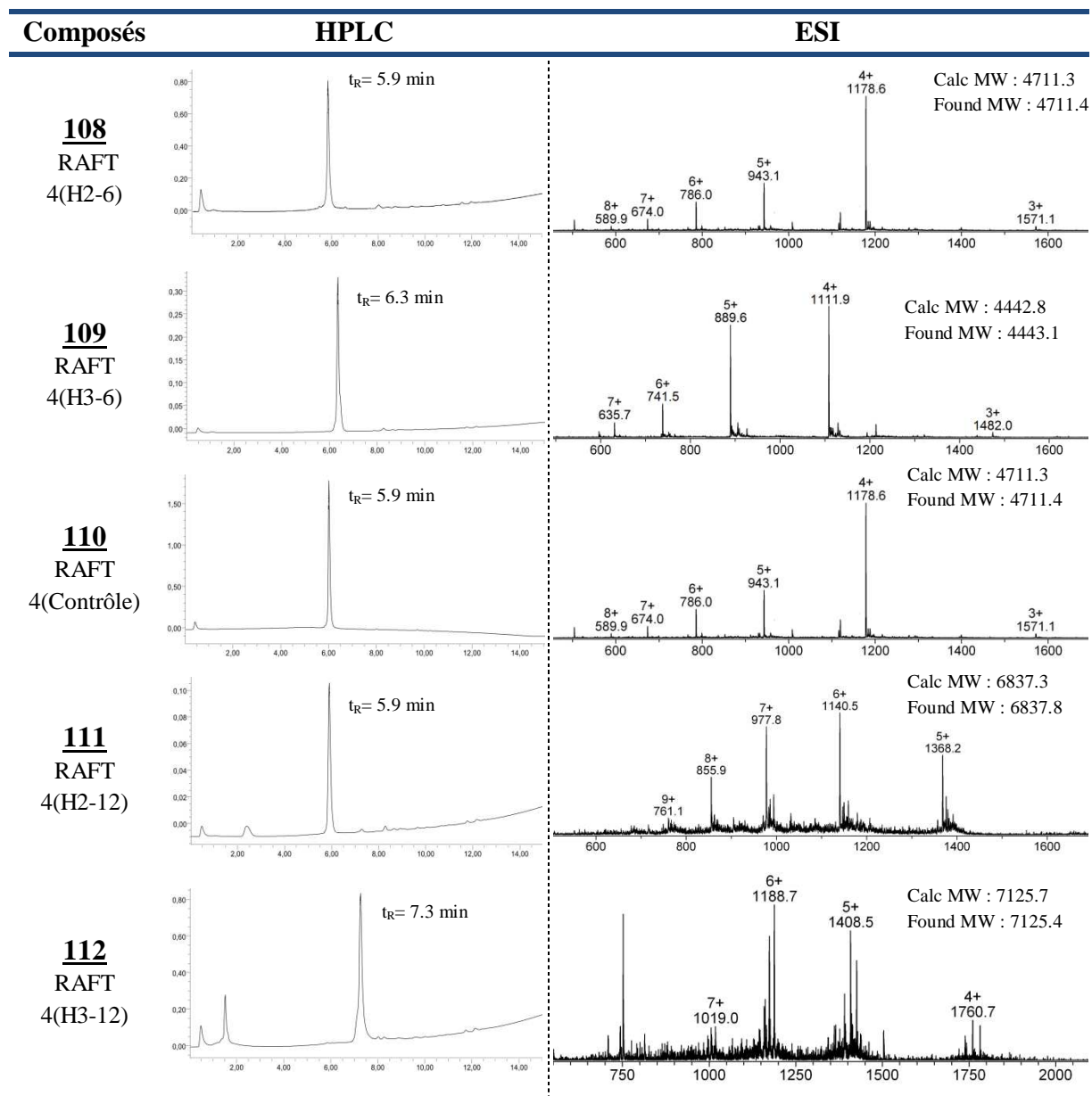


Figure 112 : Assemblage des peptides aldéhydes **103**, **104**, **105**, **106** et **107** sur le châssis **102** par ligation oxime

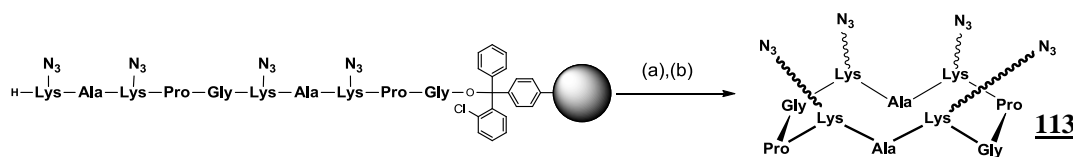
Le châssis **102** a été préparé selon la stratégie de synthèse utilisé pour la synthèse du châssis **16**. Les peptides aldéhydiques **103**, **104**, **105**, **106** et **107** ont été synthétisés sur résine Rink amide en introduisant un résidu sérine coté N-terminal permettant de générer l'aldéhyde glyoxylique.

Le couplage par lien oxime des fragments peptidiques sur le châssis **102** est réalisé en milieu acide en présence d'un excès de composé aldéhydique. Après 30 minutes de réaction, la ligation est complète et les produits sont directement purifiés. Les différents assemblages sont obtenus avec des rendements de l'ordre de 60-70 % et des assez bonnes puretés (Figure 113).

Figure 113 : Rendements et spectre ESI des composés 108, 109, 110, 111 et 112

B.4.2. Montages des fragments côté C-terminal sur les châssis par ligations CuAAC

★ Synthèse du châssis fonctionnalisé par quatre groupements azoture



Réactifs : (a) TFA/CH₂Cl₂ (1/99) ; (b) PyBOP, DIPEA, DMF

Figure 114 : Schéma de synthèse du châssis 113

La synthèse du peptide linéaire est réalisée en SPPS en introduisant de manière contrôlée la lysine modifiée **9**. Après décrochage de la résine en milieu faiblement acide, le peptide est cyclisé en solution puis précipité à l'éther pour donner le châssis **113** avec une pureté satisfaisante pour son utilisation (Figure 115).

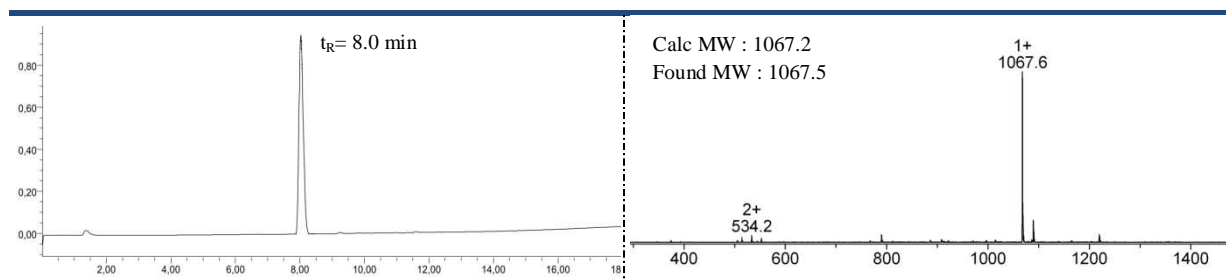
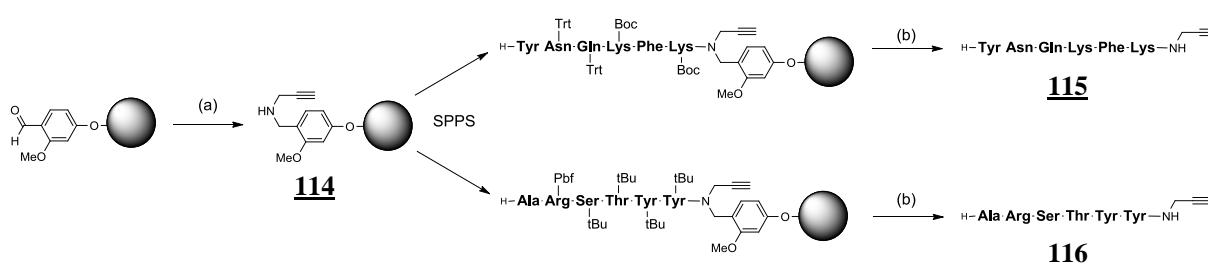


Figure 115 : Chromatogramme HPLC et spectre ESI du châssis **113**

★ Synthèse des fragments fonctionnalisés par un alcyne en C-terminal



Réactifs : (a) 10 équiv. propargylamine, 10 équiv NaBH₃CN, AcOH/DMF (1/99) ; (b) TFA/TIS/H₂O (94/3/3)

Figure 116 : Schéma de synthèse des peptides **115** et **116** fonctionnalisés par un alcyne en C-terminal

La fonctionnalisation par un alcyne du côté C-terminal des peptides a été effectuée via l'introduction d'une propargylamine. Pour éviter les problèmes d'épimérisation qui surviennent lors de l'activation d'un carboxyle en solution, nous avons choisi d'utiliser une résine modifiée permettant l'incorporation de la propargylamine pendant la synthèse supportée. Cette résine est préparée en faisant réagir la propargylamine sur une résine aldéhyde de type 4-(4-Formyl-3-methoxyphenoxy)butyryle en milieu légèrement acide. L'imine formée est réduite in situ après ajout d'un réducteur comme NaBH₃CN pour donner l'amine secondaire permettant l'accroche du premier acide aminé. Cette résine **114** est directement utilisée en SPPS pour synthétiser les deux peptides issus des boucles CDRH2 et CDRH3. En fin de synthèse, les peptides sont totalement déprotégés puis purifiés pour donner les composés **115** et **116** avec de bons rendements et une bonne pureté (Figure 117).

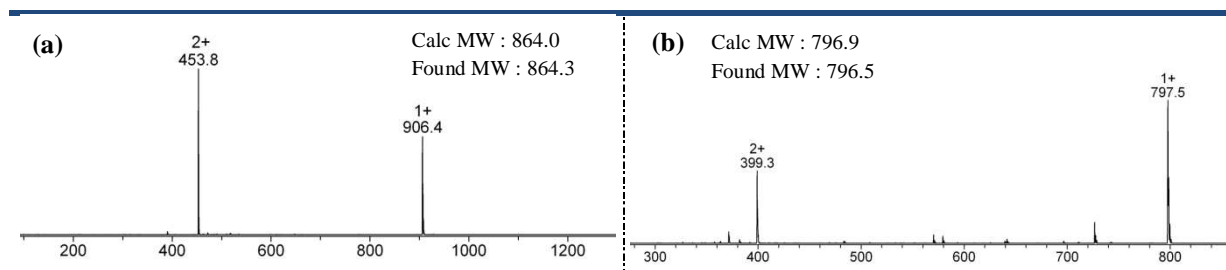
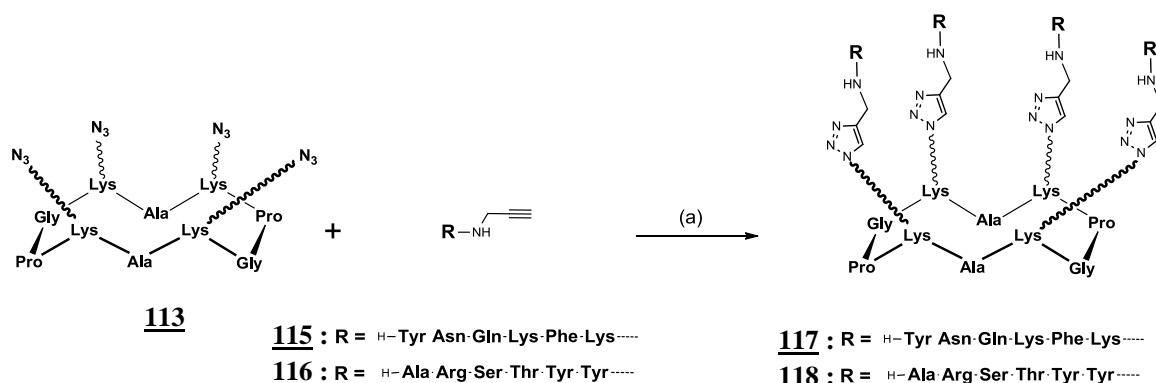


Figure 117 : Spectre ESI des composés (a) **115** et (b) **116**

★ **Assemblage des fragments côté C-terminal sur les châssis par ligations CuAAC**



Réactifs : (a) CuSO₄ AscNa, tBuOH/Tampon phosphate 100mM pH 7,3 (6:4) μ-ondes ,70°C, 30min

Figure 118 : Assemblage des peptides alcynes **115** et **116** sur le châssis **113** par ligation triazole

Le couplage côté C-terminal des hexapeptides H2-6 et H3-6 par lien triazole sur le châssis **113** a nécessité plusieurs mises au point. Les premiers essais d'assemblages effectués en présence de micropoudre de cuivre ont donné de mauvais résultats avec des rendements inférieurs à 10%. Dans le cas présent, il semblerait que cette méthode ne soit pas adaptée à cette molécule. Après une multitude de tests, l'utilisation du couple CuSO₄/AscNa suivie d'une irradiation aux micro-ondes s'est révélée être la condition de couplages la plus efficace. Cet assemblage a été effectué en utilisant un excès de peptide-alkyne **115** ou **116** (1,2 équiv. par site oxyamine) dans un milieu aqueux tamponné. Après 30 min à 70°C sous micro-ondes, la ligation est complète et les produits obtenus sont directement purifiés par HPLC préparative. Les différents assemblages **118** et **117** sont obtenus avec des rendements moyens compris entre 40 et 50% (Figure 119).

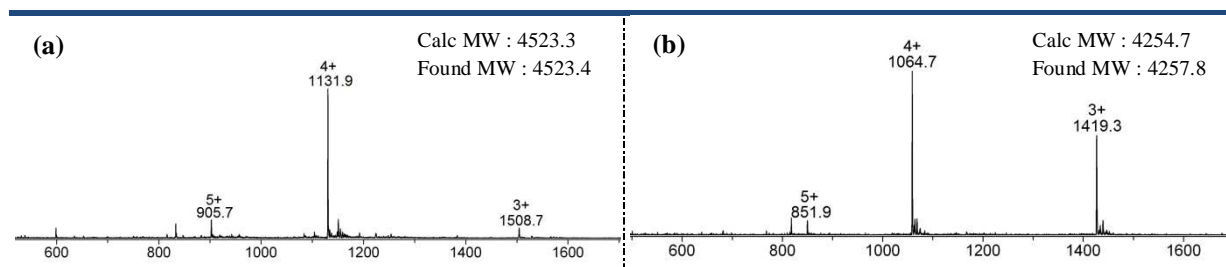
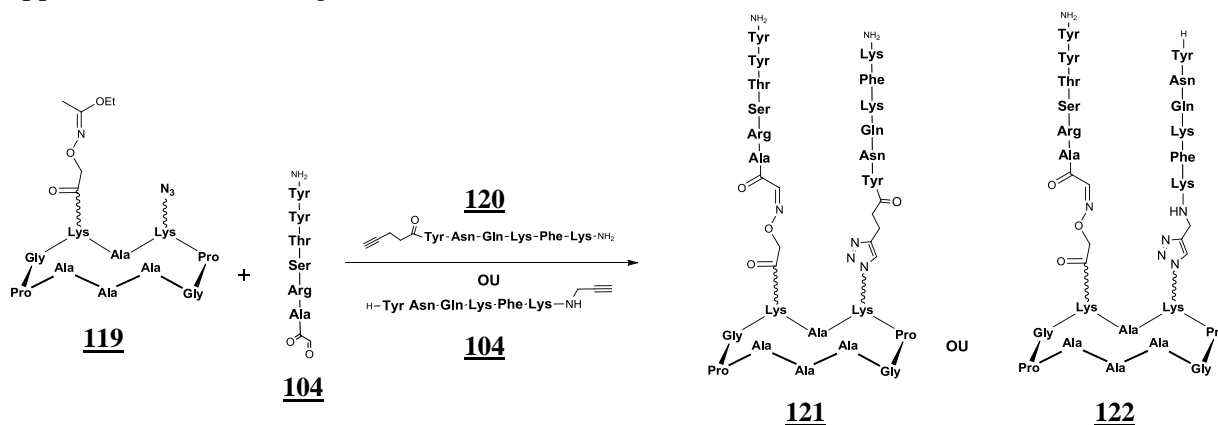


Figure 119 : Spectre ESI des composés (a) **118** et (b) **117**

B.4.3. Synthèse de montages bitopiques

Comme il a été démontré auparavant, le site de fixation d'un anticorps est composé de plusieurs segments discontinus qui interagissent avec l'antigène. Selon les données cristallographiques, le paratope du Rituximab se fixe au CD20 par le biais d'un site discontinu formé des boucles CDR L3, H1, H2 et H3. Par méthode SPOT, nous avons pu identifier plusieurs de ces fragments provenant entre autres des CDR H2 et H3. Grâce aux procédures de ligations développées précédemment, nous avons décidé de greffer sur le châssis deux fragments peptidiques provenant de boucles CDR différentes. Cette démarche a pour but de se rapprocher au plus près de la conformation du paratope. Notre stratégie consiste à synthétiser deux modèles. Le premier modèle présente les hexapeptides H2-6 et H3-6 greffés du coté N-

terminal sur le châssis. Le second modèle présente les deux hexapeptides dans des directions opposées à savoir H3-6 greffé du côté N-terminal et H2-6 du côté C-terminal.



Réactifs : (a) tBuOH/H₂O/TFA (50:45:5) puis ajout de NaHCO₃ jusqu'à pH 7, Cu⁰

Figure 120 : Assemblage ditopique des peptides **104** et **120** sur le châssis **119**

Le châssis **119** et le peptide **120** fonctionnalisé par un alcyne en N-terminal ont été réalisés en suivant les procédures de synthèses décrites précédemment. Les assemblages biomoléculaires des fragments H3-6 et H2-6 ont été effectués selon une stratégie « One-pot » développée dans le chapitre précédent. Le peptide H3-6 **104** modifié en N-terminal par un aldéhyde et le châssis **119** sont dissous dans une solution acide permettant une rapide formation du lien oxime. Après neutralisation du pH, les peptides **120** ou **115** issus de CDRH2 (fonctionnalisé par un alcyne soit du côté N-term ou du côté C-term) sont additionnés directement dans le milieu en présence de Cu⁰. Après 5 heures à 50°C, on observe la disparition complète de l'intermédiaire et la formation exclusive des produits attendus **121** ou **122** avec des rendements après purification de l'ordre de 50% (Figure 121).

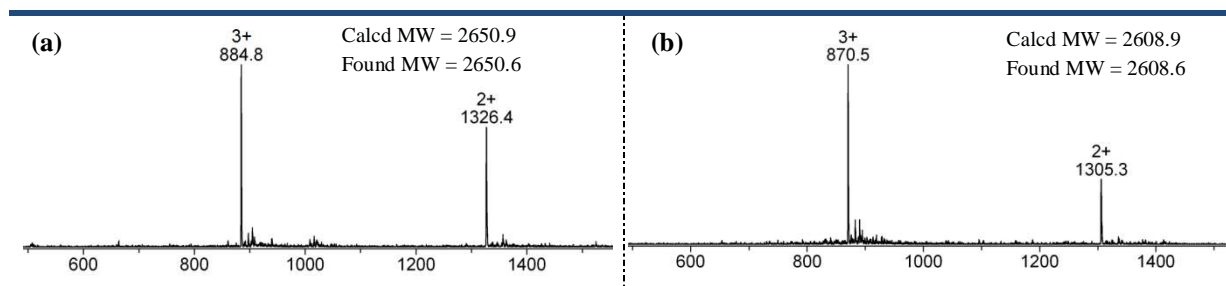


Figure 121 : Spectre ESI des composés (a) **121** et (b) **122**

B.4.4. Evaluation en SPR des différents montages

Les constantes de dissociations des différents montages pour le CD20 ont été mesurées en utilisant le système décrit précédemment. Les différents montages ont été dissous pour donner plusieurs échantillons de concentrations croissantes allant de 0.1 μM à 1 mM. Les premiers essais réalisés avec le montage cRAFT4(H2-6) **108** ont révélé d'importantes interactions non-spécifiques avec la surface rendant les réponses mesurées inexploitable. Cette non-spécificité est probablement due à une forte attraction électrostatique entre la surface chargée négativement et le montage **108** possédant huit fonctions amine protonnées. Cependant, cette adhésion électrostatique indésirable peut être diminuée en augmentant la

force ionique du tampon de travail. L'augmentation de la concentration en NaCl du tampon de travail de 150 mM à 500 mM a montré une nette amélioration des données mesurées avec le produit **108**. En utilisant ce tampon de travail, les différents montages synthétisés ont ainsi pu être analysés et les réponses mesurées ont pu être exploitées. Les différentes constantes d'affinités et cinétiques caractérisant ces interactions ont été extraites en utilisant une modélisation mathématique (isotherme de Langmuir) (Tableau 8).

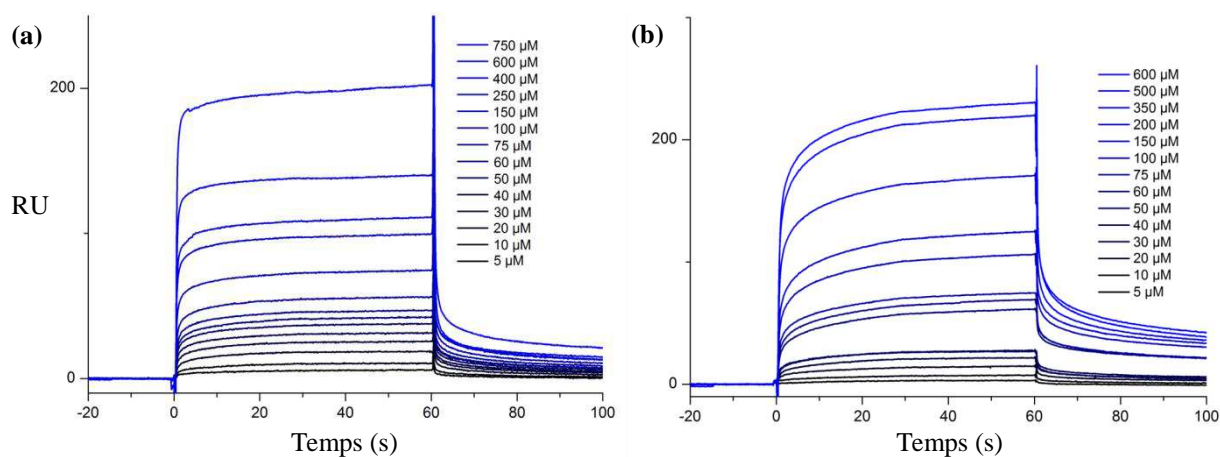


Figure 122 : Sensorgramme de l'analyse SPR de l'interaction entre l'épitope et le peptide **108** (a) ou **118** (b)

Montages	K_D^{eq}	K_a ($M^{-1}.s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D^{cin} (M)
Rituximab	$4,5.10^{-6}$			9.10^{-6}
cRAFT4(H2-6)_N 108	$3,8.10^{-5}$	6994	0.1737	$2,48.10^{-5}$
cRAFT4(H3-6)_N 109		Insoluble		
cRAFT4(H2-12)_N 111		ND		
cRAFT4(H3-12)_N 112		Insoluble		
cRAFT4(H3-6)_C 118	$5,3.10^{-5}$	134,9	$0,4358.10^{-3}$	$3,23.10^{-5}$
cRAFT(H3-6)_N-(H2-6)_N 121		ND		
cRAFT(H3-6)_N-(H2-6)_C 122		ND		
cRAFT4(control)_N 110		ND		

Tableau 8 : Résultats de l'analyse SPR des interactions entre les différents peptides et l'épitope

Parmi les différents montages analysés, seulement deux constantes de dissociation ont pu être déterminées. Le composé **108** et **118** présentant quatre segments provenant respectivement des boucles CDRH2 et CDRH3 ont montré un K_D pour l'épitope de l'ordre de 10^{-5} M. Les affinités de ces deux montages et du Rituximab vis-à-vis de l'antigène sont relativement proches. Les K_D mesurés avec ces deux produits sont 3 à 4 fois supérieures au K_D du Rituximab. Les autres composés étudiés n'ont donné aucun résultat. Les produits **109** et **112** n'ont pas pu être analysés à cause de leur insolubilité dans le tampon. Étonnamment, le K_D du peptide **111** comportant les segments de H2 en 12 résidus n'a pas pu être déterminé alors que son homologue **108** présente une affinité mesurable en Biacore. Quant aux montages ditopiques **121** et **122**, leur affinité pour l'épitope s'est révélée être médiocre et les

solutions injectées jusqu'à une concentration de 1mM n'ont pas été suffisantes pour observer une association. Ce résultat n'est pas très étonnant, étant donné que les fragments ont été positionnés naïvement sur le châssis. Une étude bioinformatique sera nécessaire pour ajuster la conformation de ces assemblages ditopiques. Pour vérifier la spécificité des interactions, le peptide contrôle **110** a été analysé et aucune interaction avec le CD20 n'a été constatée jusqu'à une concentration de 1 mM.

B.5. Identification des résidus des différents fragments intervenant dans la reconnaissance de l'épitope

Afin d'identifier les résidus primordiaux pour la reconnaissance de l'antigène, nous avons effectué une mutagenèse dirigée des fragments identifiés précédemment en remplaçant chaque acide aminé en Alanine. Cette technique nommée « Ala-Scan » a été réalisée avec les hexa et dodécapeptides provenant des domaines VH et VL à savoir LA-6, LB-6, H2-6, H3-6, LA-12, LB-12, H2-12 et H3-12. Chacun de ces fragments ainsi que leurs analogues mutés ont été synthétisés par méthode SPOT puis révélés avec l'épitope fluorescent **88**. L'histogramme ci-dessous (Figure 123) représente l'intensité de fluorescence de chaque SPOT en fonction des résidus mutés.

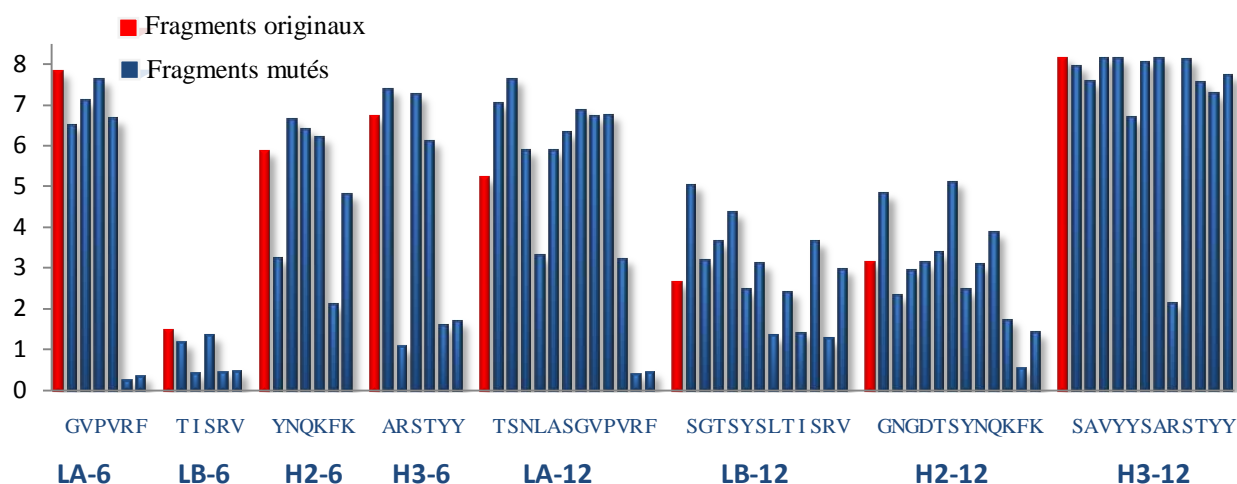


Figure 123 : Intensité de fluorescence des spots présentant les différents fragments mutés après révélation à l'épitope marqué **88**

On peut remarquer que les peptides LB-6, LB-12 et H2-12, identifiés lors de l'étude avec la première membrane, ne présentent pas une bonne affinité pour l'épitope. Ceci est probablement dû à la plus faible concentration en épitope marqué utilisée pour réaliser ce test. Par contre, cette expérience a permis de confirmer l'affinité de certains fragments et de déterminer les résidus critiques à la reconnaissance de l'antigène. Pour les peptides LA-6 et LA-12, la mutation en Alanine des deux derniers résidus ⁶⁰Arg et ⁶¹Phe induit une disparition complète de l'affinité pour l'épitope. En ce qui concerne l'analyse des fragments de la chaîne lourde, les résidus ⁶⁰Tyr et ⁶⁴Phe du peptide H2-6 et les résidus ⁹⁶Arg, ¹⁰¹Tyr et ¹⁰²Tyr du peptide H3-6 jouent un rôle critique dans la reconnaissance de l'antigène. Le dodécapeptide H3-12 ne présente qu'un seul résidu important (⁹⁶Arg), alors que son homologue à 6 résidus

en possède trois. Ce résultat peut s'expliquer par la séquence de H3-12 qui forme un palindrome YY_ _R_ _YY. Cet effet traduit l'importance de l'enchaînement des deux tyrosines.

Cette étude montre que les résidus Tyrosine et Phénylalanine sont très importants pour la reconnaissance de l'antigène. Ceci nous amène à penser que les interactions entre les fragments peptidiques et l'épitope sont majoritairement de type Van der Waals. Par contre, l'importance du résidu Arginine dans l'étude des fragments LA-6, La-12, H3-6 et H3-12 révèle également une forte interaction probablement de types ioniques. Ce type d'interaction peut parfois générer des adhésions non-spécifiques ce qui serait problématique pour une évaluation biologique.

B.6. Synthèse et évaluation in vitro des fragments de mAb sur le châssis multivalent

Pour confirmer les résultats obtenus par analyses SPR, nous avons décidé d'étudier l'adhésion de nos montages positifs sur des cellules exprimant la protéine CD20. Pour cette étude biologique, les composés devront être marqués au préalable par un fluorophore. Les produits que nous avons retenus pour cette analyse in vitro sont les peptides multivalents **108** et **118**, leurs homologues monovalents **96** et **97** et le peptide contrôle **110**. La synthèse des peptides conjugués au fluorophore a été réalisée via le couplage par lien amide de la Cy₅-NHS.

B.6.1. Synthèse des différents montages

* Synthèse Fragment H2-6 et H3-6 marqué à la Cyanine5

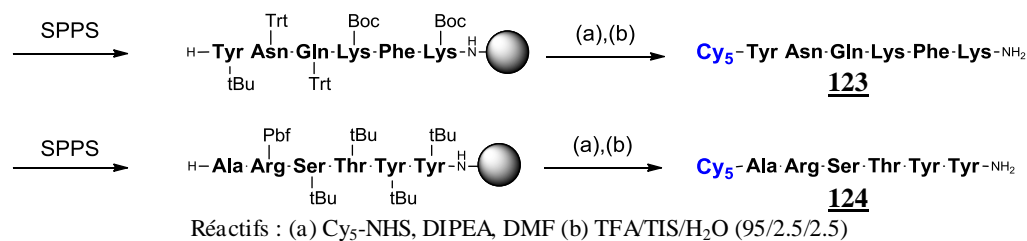
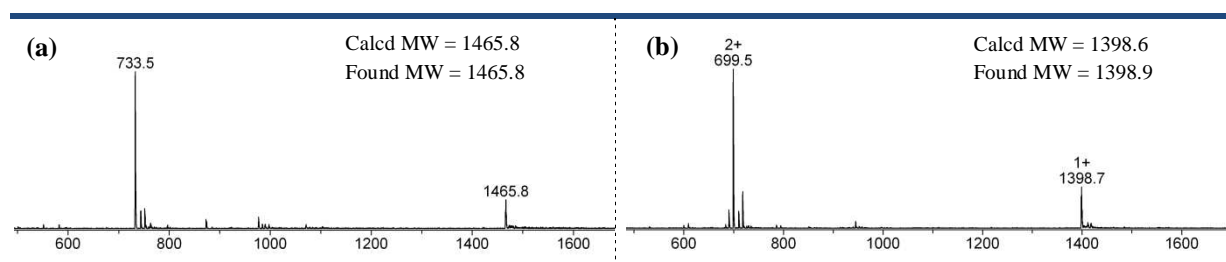


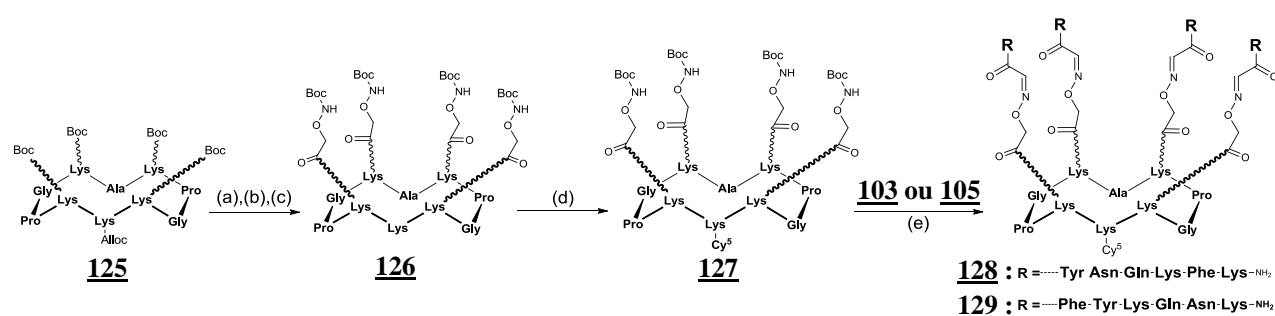
Figure 124 : Schéma de synthèse des peptides **123** et **124** marqués à la Cyanine5

La synthèse de ces deux peptides est réalisée à de la même façon sur une résine Rink amide. Après élongation des peptides, la cyanine5, activée sous forme de NHS, est couplée sur l'amine terminale des peptides supportés. Après déprotection et purification, les peptides **123** et **124** issus des boucles H2 et H3 sont obtenus avec des rendements satisfaisants et une excellente pureté pour les tests in vitro (Figure 125).

Figure 125 : Spectre ESI des composés (a) **123** et (b) **124**

★ Synthèse de **cRAFT4(H2-6)_{oxime}** et **cRAFT4(contrôle)_{oxime}** marqué à la **Cyanine5**

La synthèse des montages multivalents conjugués au fluorophore est réalisée via le couplage par lien amide de la **Cy₅-NHS**. Cet agent de détection est greffé sur la face inférieure du châssis évitant tout phénomène d'interférence entre les deux domaines. Le fluorophore étant un produit particulièrement onéreux, il est préférable de l'introduire durant la dernière étape de synthèse. Généralement, le fluorophore est couplé sur un résidu lysine du châssis après assemblage des peptides sur la face supérieure. Dans le cas présent, le fragment peptidique H2-6 et le peptide contrôle possèdent chacun deux amines libres sur les chaînes latérales des lysines. Pour contrôler l'insertion du fluorophore sur la face inférieure du châssis, le couplage doit être réalisé avant la ligation des biomolécules.



Réactifs : (a) TFA/TIS/H₂O (b) Boc-NH₂OCH₂COOH, PyBOP, DIPEA, DMF (c) Pd⁰(PPh₃)₄, PhSiH₃, CH₂Cl₂/DMF (d) Cy₅-NHS, DIPEA, DMF (e) TFA/H₂O (7/3)

Figure 126 : Assemblage des peptides aldéhydes **103** et **105** sur le châssis **127** marqué à la cyanine5

Pour préparer le châssis **125**, nous avons choisi une stratégie classique utilisée pour préparer le RAFT à grande échelle (Figure 126). L'utilisation de groupes protecteurs orthogonaux Boc et Alloc, nous permet de fonctionnaliser indépendamment la face supérieure et inférieure du cyclopeptide. Après décrochage du peptide en milieu faiblement acide, celui-ci est cyclisé en solution puis précipité dans l'éther pour donner le châssis **125**. Après élimination des groupements Boc par traitement au TFA, les lysines sont fonctionnalisées par quatre fonctions oxyamine protégées. L'élimination orthogonale du groupement Alloc permet de libérer l'amine de la lysine de la face inférieure. Après couplage de la Cyanine5, sous forme d'ester activé, le milieu réactionnel est directement purifié par HPLC préparative pour donner le châssis **127** pur marqué par Cy₅.

Le greffage par lien oxime des fragments peptidiques **103** et **105** sur le châssis **127** est réalisé dans un mélange TFA/H₂O (70/30) selon la procédure décrite dans la première partie. Après purification, les différents assemblages **128** et **129** sont obtenus avec une excellente pureté et des rendements respectifs de 76 % et 25% (Figure 127). Le faible rendement de

synthèse obtenue pour le composé **129** est dû à la formation d'agrégat durant la réaction. Ce problème a souvent été observé avec des composés marqués à la Cyanine5.

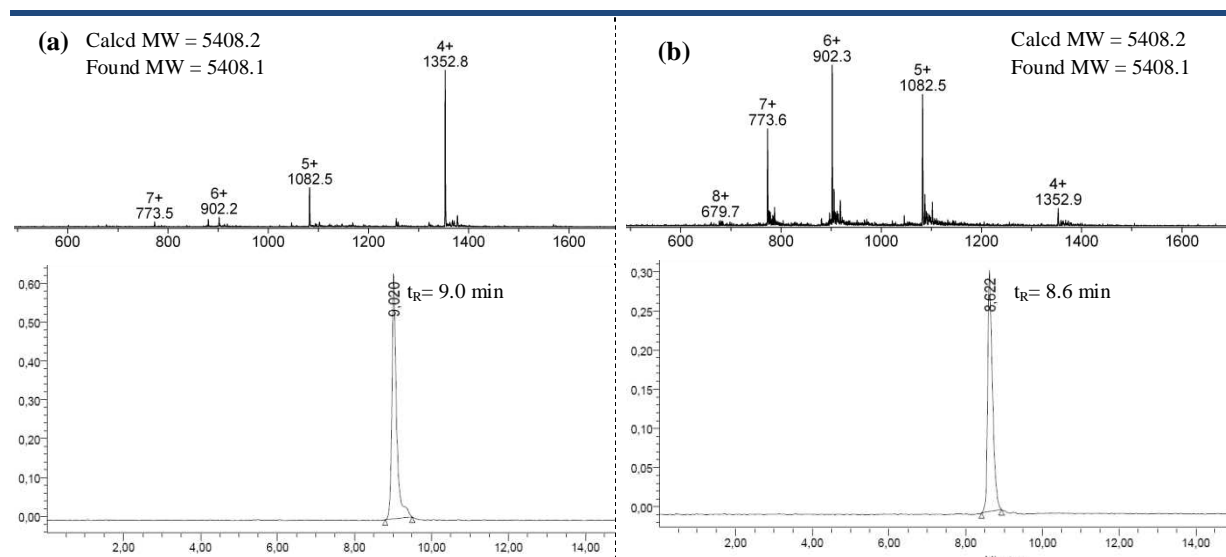
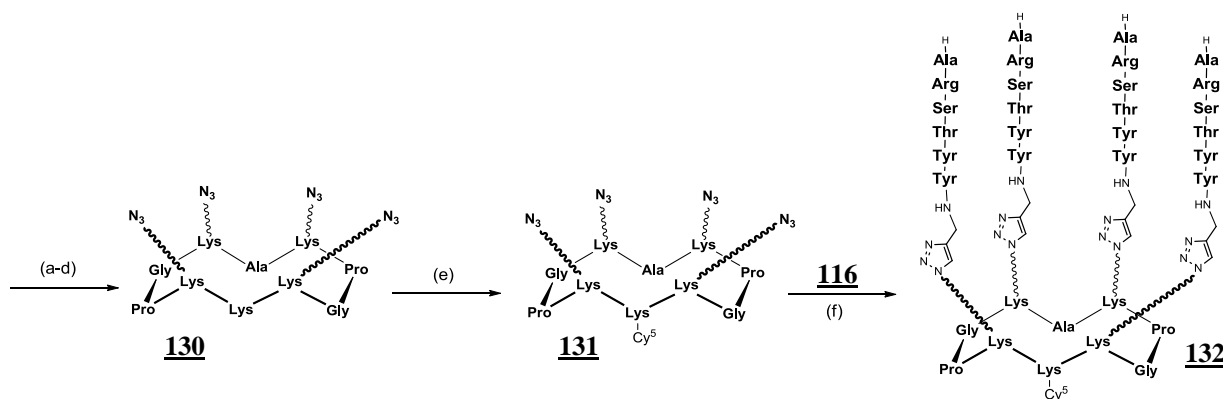


Figure 127 : Chromatogramme HPLC et spectre ESI des composés (a) **128** et (b) **129**

★ Synthèse de **cRAFT4(H3-6)_{C-Triazole}** marqué à la Cyanine5



Réactifs : (a) SPPS (b) TFA/CH₂Cl₂ (1/99) ; (c) PyBOP, DIPEA, DMF (d) TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) (e) Cy₅-NHS, DIPEA, DMF (f) CuSO₄, AscNa, tBuOH/PBS, μ-ondes, 30 min 70°C

Figure 128 : Assemblage du peptide alcyne **116** sur le châssis **131** marqué à la cyanine5

Le châssis **130** a été préparé selon la même voie de synthèse que le châssis **114**. Après couplage de la Cy₅-NHS sur l'amine libre du châssis, le produit est purifié pour donner le composé marqué **131** pur. Le couplage coté C-Terminal du fragment H3-6 par lien triazole sur le châssis a été réalisé en suivant la procédure décrite pour les composés **118** et **117**. Après purification, l'assemblage **132** est obtenu avec un très faible rendement à cause d'une forte agrégation du composé pendant le couplage CuAAC. Vu le prix relativement excessif de la Cyanine5, la mise au point de cette synthèse n'a pas pu être réalisée. Cependant les quantités de produits ont été suffisantes pour effectuer les évaluations biologiques (Figure 129).

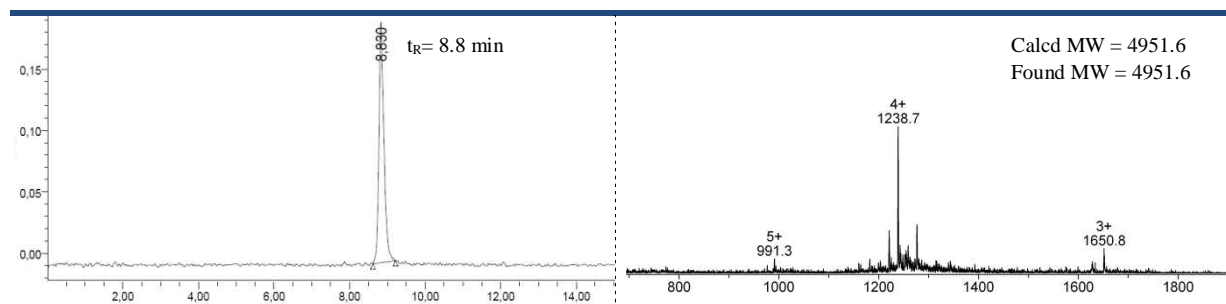


Figure 129 : Chromatogramme HPLC et spectre ESI du composé **132**

Etant donné les faibles rendements de ces assemblages, nous avons décidé d'optimiser les voies de synthèse. Pour cela, une seconde ligation a été introduite dans le châssis, permettant le greffage chimiosélectif du fluorophore. Notre choix s'est porté sur la ligation thioéther car de nombreux fluorophores fonctionnalisés par des groupements maléimide ou iodoacétamide sont commerciaux. Pour des raisons de coût et de disponibilité, nous avons choisi d'utiliser comme fluorophore la fluorescéine qui est classiquement utilisée dans les tests biologiques. Cette voie de synthèse est détaillée dans le premier chapitre de ce manuscrit (cf. p.79)

B.6.2. Evaluation des différents montages

L'évaluation biologique des produits **123**, **124**, **128**, **129** et **132** a été réalisée par l'équipe du Docteur Fournié spécialisée dans l'immunité innée et les hémopathies malignes (INSERM U563, Toulouse). La capacité d'adhésion des composés cyanilés a été déterminée sur deux modèles de cellules : les cellules DOHH exprimant CD20 et les cellules NK92 dépourvues de CD20. Pour effectuer ce test, les cellules DOHH ou NK92 ont été incubées avec les différents peptides **123**, **124**, **128**, **129**, **132** et un anticorps anti-CD20 utilisé comme contrôle. Après rinçage, la fluorescence des cellules immobilisées est quantifiée par cytométrie de flux. Les résultats obtenus avec les montages **128**, **129** et **132** sont répertoriés dans les graphes suivants (Figure 130)

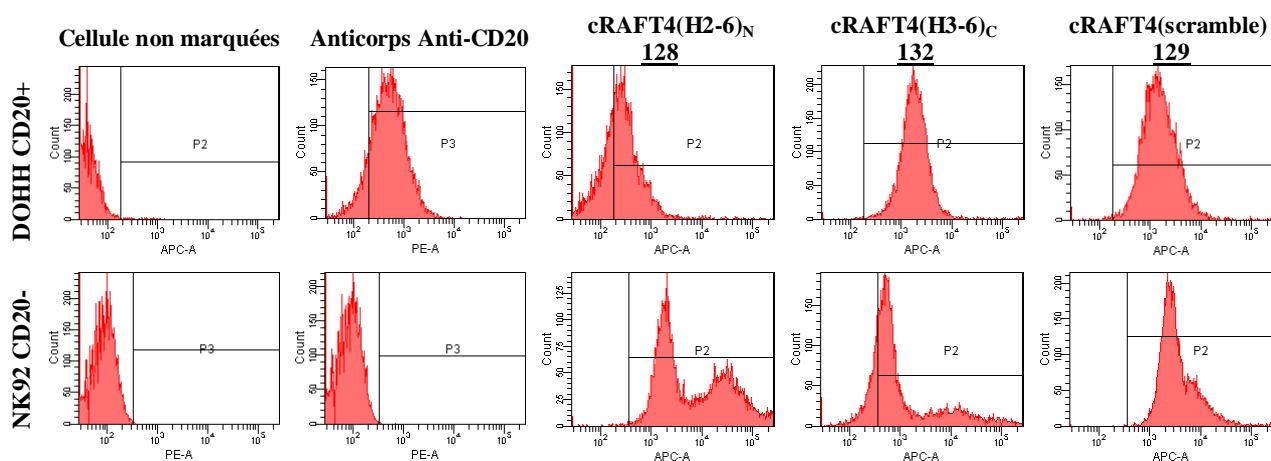


Figure 130 : Analyses FACS

En comparaison avec l'anticorps, les peptides analysés sont peu spécifiques vis-à-vis des cellules exprimant CD20. Étonnamment, le peptide **128** adhère préférentiellement sur les

cellules n'exprimant pas l'antigène. Seul le composé **132** s'est révélé efficace et montre une meilleure spécificité pour les cellules CD20+. Le peptide contrôle **129** ne révèle aucune spécificité et interagit avec les deux cellules sans distinctions. Cette forte adhésion non-spécifique de nos composés est probablement causée par une forte charge positive. En effet, ces peptides présentent de nombreux résidus chargés (lysine et arginine) qui sont connus pour interagir avec la membrane cellulaire par interaction ionique.

Ces tests ont permis de confirmer l'activité d'un seul des deux peptides retenus par l'étude SPR. Comparé à la SPR, ces évaluations biologiques sont plus adaptées et plus simples à mettre en œuvre pour l'analyse de nos composés. L'évaluation des produits par SPR nécessite encore plusieurs mises au point. D'autres assemblages de fragments peptidiques sont en cours de réalisation et seront directement évalués sur les cellules.

B.7. Bilan des travaux

La seconde partie de mes travaux a été dédiée à la recherche de nouveaux ligands tumoraux en s'inspirant du mAb Rituximab. Dans cette approche, nous avons présenté la conception, la synthèse et l'évaluation biologique d'assemblages peptidiques mimant l'activité de reconnaissance de cet anticorps. Pour sélectionner les éléments responsables de la reconnaissance de l'antigène, nous avons synthétisé des petits fragments peptidiques de 6 et 12 résidus issus de la séquence du domaine variable du mAb. Cette synthèse est rendue possible grâce à la technique SPOT qui permet de préparer simultanément différents peptides immobilisés sur membrane de cellulose. Après avoir effectué un test d'affinité avec l'antigène marqué à la cyanine5, plusieurs peptides interagissant avec la cible ont pu être identifiés. La plupart des fragments peptidiques sélectionnés appartiennent aux boucles CDR H1, H2 et H3. Or d'après la structure cristalline du complexe Rituximab-CD20, ces CDRs sont directement impliqués dans la reconnaissance avec le mAb. Comme l'avait décrit Laune et al²²⁹, cette technique est un bon outil pour déterminer des fragments peptidiques issus de mAbs impliqués dans la reconnaissance d'un antigène. En se basant sur les procédures mises au point au cours de ma thèse, les fragments peptidiques sélectionnés ont ensuite été assemblés sur le châssis moléculaire RAFT. Ces peptides ont été greffés sur le châssis soit de façon multivalente, soit en créant un site ditopique par incorporation de fragments issus de CDRs différents. Les différents montages ont ensuite été évalués en SPR avec l'épitope CD20 immobilisé sur surface. Deux assemblages multivalents de peptides provenant des boucles CDRH2 et CDRH3 ont montré une bonne affinité pour l'épitope avec des K_D de l'ordre de 10^{-5} M. Cependant, l'étude biologique réalisée sur différentes souches de cellules a démontré que ces composés ne présentent aucune spécificité envers les cellules exprimant CD20.

Nos molécules étant composées de plusieurs fonctions amines protonnées à pH physiologique, il est probable que ces derniers adhèrent à la membrane cellulaire par interaction ionique. Pour supprimer cette charge positive sans affecter l'affinité pour la cible, nous avons décidé de modifier les fragments peptidiques en mutant certains résidus. Seuls les résidus identifiés par Ala-Scan comme étant critiques pour l'interaction seront maintenus. Pour cela, nous envisageons d'utiliser la technique SPOT pour synthétiser et évaluer ces différents peptides mutés. Eventuellement, cette stratégie permettra de trouver des peptides de plus

haute affinité pour la cible. Par ailleurs, certains fragments révélés par la seconde membrane SPOT n'ont pas encore été évalué pour déterminer leur affinité avec l'antigène.

La conception de montages comportant un site de reconnaissance discontinu demande une étude plus approfondie. En effet, l'étude SPR des deux composés ditopiques **121** et **122** positionnés de manière aléatoire sur le châssis n'a donné aucun résultat. Une analyse bioinformatique de la structure cristalline du Rituximab permettra de mieux positionner et orienter les différents fragments sur le châssis. L'objectif de cette méthode est de se rapprocher au maximum des propriétés du mAb en réalisant un domaine de reconnaissance à la fois très sélectif et affin envers la cible.

C. Synthèse et caractérisation de vecteurs multivalents de ligands RGD pour l'imagerie tumorale

C.1. Conception des vecteurs multivalents pour l'imagerie

Ces dernières années, de nombreuses approches basées sur le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont été étudiées pour l'imagerie tumorale non-invasive chez l'animal. Dans cette optique, différents agents de détection conjugués au peptide -RGD- ont été développés et testés en clinique avec succès. Différentes techniques d'imagerie ont été envisagées comme la tomographie à émission de positron (TEP), la tomographie d'émission monophotonique (TEMP ou SPECT), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou l'imagerie optique.

Cette partie est consacrée à la préparation et l'évaluation biologique de vecteurs multivalents destinés à des applications d'imagerie tumorale. Dans ce contexte, nos châssis multivalents ont été conjugués avec différents agents de détection utilisés dans les techniques d'imagerie TEP, IRM et imagerie optique.

C.1.1. Stratégie

Les résultats antérieurs réalisés en imagerie optique sur des modèles murins avec le RAFT(c[-RGDfK-]₄) associé à des fluorophores proche infrarouge montrent son efficacité pour le ciblage de l'angiogénèse et les métastases de statut $\alpha_v\beta_3$ positif.¹³⁶ Plus récemment, le RAFT(c[-RGDfK-]₄) marqué au radiotracteur ⁹⁹Tc a été étudié pour imager l'angiogénèse du myocarde par technique SPECT.^{138b} Ces résultats nous ont encouragés à concevoir de nouveaux conjugués similaires pouvant être utilisé dans des techniques d'imagerie plus performantes. Pour préparer ces conjugués, les éléments de détections ont été greffés par lien amide ou oxime sur la face inférieure du composé RAFT(c[-RGDfK-]₄) 25.

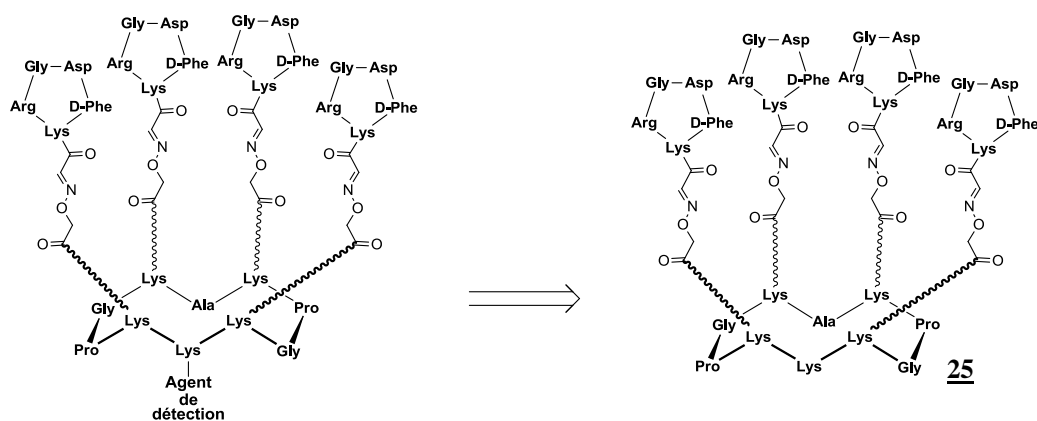


Figure 131 : Schéma rétro-synthétique de vecteurs conjugués pour l'imagerie médicale

C.1.2. Molécule de détection pour la Tomographie à fluorescence proche infrarouge

L'imagerie optique à fluorescence proche infrarouge est une technique basée sur l'utilisation d'une sonde fluorescente et présente l'avantage d'être hautement sensible, non invasive et relativement peu coûteuse à mettre en place. Les rayonnements infrarouges émis par la sonde sont peu absorbés par les tissus et les liquides biologiques comparés aux rayonnements émis dans le visible. Ces derniers permettent de détecter des couches plus profondes de l'organisme de l'ordre de quelques centimètres. De plus, comparés aux autres techniques d'imageries, les photons émis dans cette gamme de longueur d'onde sont non-ionisants.

La littérature référence de nombreux exemples de conjugués RGD utilisés pour la détection des tumeurs en imagerie optique. La stratégie la plus courante consiste à coupler un fluorophore avec le ligand RGD présenté de manière monovalente²³⁷ ou multivalente. Pour ces études biologiques, deux grandes familles de fluorophore ont été utilisées : les Cyanines²³⁸ et les Alexa Fluor. Ces composés commerciaux émettent dans un domaine spectral compris entre 650 et 800 nm et présentent plusieurs avantages comme leur solubilité dans l'eau, leur haut rendement quantique et leur facilité à être greffés (ester activé, maléimide, isothiocyanate..). Le principal inconvénient de ces fluorophores réside dans leur prix extrêmement élevé.

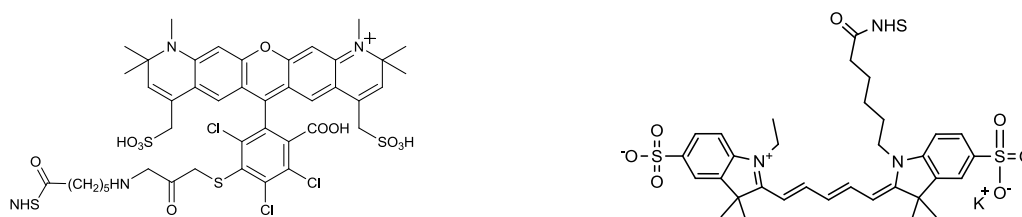


Figure 132 : (a) Schéma de l'AlexaFluor-NHS (b) Schéma de la Cyanine5-NHS

D'autres équipes de recherche ont développé une approche alternative basée sur l'utilisation de Quantum Dot qui possède des propriétés optiques idéales pour l'imagerie.²³⁹ Malgré une certaine toxicité et une forte taille qui leur confèrent certaines limitations, la fonctionnalisation de ces nanoparticules par des ligands RGD a montré d'excellents résultats *in vivo*.²⁴⁰

²³⁷ Chen, X. Y.; Conti, P. S.; Moats, R. A., *In vivo* near-infrared fluorescence imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ in brain tumor xenografts. *Cancer Res* **2004**, 64 (21), 8009-8014.

²³⁸ von Wallbrunn, A.; Holtke, C.; Zuhlsdorf, M.; Heindel, W.; Schafers, M.; Bremer, C., *In vivo* imaging of integrin $\alpha_n\beta_3$ expression using fluorescence-mediated tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2007**, 34 (5), 745-754.

²³⁹ Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S., Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science* **2005**, 307 (5709), 538-544.

²⁴⁰ Smith, B. R.; Cheng, Z.; De, A.; Koh, A. L.; Sinclair, R.; Gambhir, S. S., Real-time intravital imaging of RGD-quantum dot binding to luminal endothelium in mouse tumor neovasculature. *Nano Lett.* **2008**, 8 (9), 2599-2606.

C.1.3. *Molécules de détection pour l'IRM*

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est très largement utilisée en clinique pour détecter et suivre l'évolution des tumeurs solides. Contrairement aux techniques utilisant des radiotraceurs, cette technique est non ionisante et offre généralement une meilleure résolution spatiale.²⁴¹ Par ailleurs, les complexes de Gadolinium, couramment utilisés comme agent de contraste, présentent une faible toxicité. Cependant, cette technique possède un seuil de détection plus élevé comparé aux autres méthodes. C'est pourquoi, les agents de détection ciblés n'ont pas encore été étudiés en phase clinique.

Pour imager l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par IRM, l'approche la plus efficace consiste à utiliser les nanoparticules superparamagnétiques de fer fonctionnalisées sur leur surface par des ligands RGD.²⁴² Cette stratégie permet d'augmenter le signal permettant une détection des tumeurs avec une faible concentration de produit.²⁴³ La littérature référence quelques exemples de ligand RGD conjugué avec un complexe de Gadolinium. Ces conjugués offrent une meilleure rétention au niveau des tumeurs⁵⁷ et permettent aussi d'imager les plaques d'athérosclérose.²⁴⁴

C.1.4. *Molécule de détection pour la Tomographie à émission de positron*

La tomographie à émission de positron (TEP) et tomographie d'émission monophotonique sont des techniques d'imagerie médicale basées sur l'utilisation de radiotraceurs. Ces deux techniques possèdent un seuil de détection très bas et une pénétration illimitée. Bien qu'étant moins utilisée en clinique dû à des radiotraceurs d'une courte durée de vie, la TEP est approximativement dix fois plus sensible que la SPECT et peut détecter des concentrations de traceurs de l'ordre du picomolaire.

Les premières études d'imagerie TEP pour la détection de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont été réalisées par Haubner et al. par conjugaison d'un peptide RGD avec un Galactose marqué au ^{18}F .²⁴⁵ L'introduction d'un saccharide permet d'améliorer la pharmacocinétique du traceur en augmentant sa biodisponibilité et sa clairance rénale.²⁴⁶ Cependant, la durée de vie du ^{18}F étant relativement courte ($t_{1/2} = 110\text{min}$), d'autres approches alternatives furent développées. La stratégie la plus prometteuse est d'utiliser le radiotraceur ^{64}Cu qui présente un spectre

²⁴¹ Higuchi, T.; Wester, H. J.; Schwaiger, M., Imaging of angiogenesis in cardiology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2007**, 34, S9-S19.

²⁴² Zhang, C. F.; Jugold, M.; Woenne, E. C.; Lammers, T.; Morgenstern, B.; Mueller, M. M.; Zentgraf, H.; Bock, M.; Eisenhut, M.; Semmler, W., et al., Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer Res* **2007**, 67 (4), 1555-1562.

²⁴³ Sun, C.; Lee, J. S. H.; Zhang, M. Q., Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev* **2008**, 60 (11), 1252-1265.

²⁴⁴ Haukkala, J.; Laitinen, I.; Luoto, P.; Iveson, P.; Wilson, I.; Karlsen, H.; Cuthbertson, A.; Laine, J.; Leppanen, P.; Yla-Herttula, S., et al., Ga-68-DOTA-RGD peptide: biodistribution and binding into atherosclerotic plaques in mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2009**, 36 (12), 2058-2067.

²⁴⁵ 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 (2), 326-336.

²⁴⁶ Beer, A. J.; Haubner, R.; Goebel, M.; Luders Schmidt, S.; Spilker, M. E.; Wester, H. J.; Weber, W. A.; Schwaiger, M., Biodistribution and pharmacokinetics of the $\alpha(v)\beta(3)$ -Selective tracer F-18-Galacto-RGD in cancer patients. *J Nucl Med* **2005**, 46 (8), 1333-1341.

d'énergie comparable au ^{18}F avec une durée de vie supérieure ($t_{1/2} = 12.6$ h). Ces dernières années, Chen et al. ont réalisé de nombreux composés conjuguant ligands RGD mono- ou multimérique avec un complexe de ^{64}Cu .²⁴⁷ En imagerie tumorale, les conjugués multivalents ont montré une efficacité supérieure à celle des monovalents, avec une meilleure rétention au niveau des tumeurs et une pharmacocinétique améliorée.⁵⁶ L'attachement du radiométal à l'agent de ciblage nécessite l'utilisation d'un ligand bifonctionnel. Habituellement, le ^{64}Cu est délivré sous sa forme oxydée Cu^{2+} pouvant être fortement fixée par divers agents de complexation. Les ligands utilisés pour complexer le Cu^{2+} sont généralement des dérivés polyaminocarboxylates, des azamacrocycles ou des macrocycles de polyaminocarboxylates. Pour une efficacité optimale, le complexe ligand- ^{64}Cu doit respecter plusieurs critères comme la rapidité de formation, la spécificité et la stabilité dans les conditions physiologiques. C'est pourquoi, il est préférable d'utiliser des ligands présentant une bonne constante de complexation avec le radiométal (Figure 133).²⁴⁸

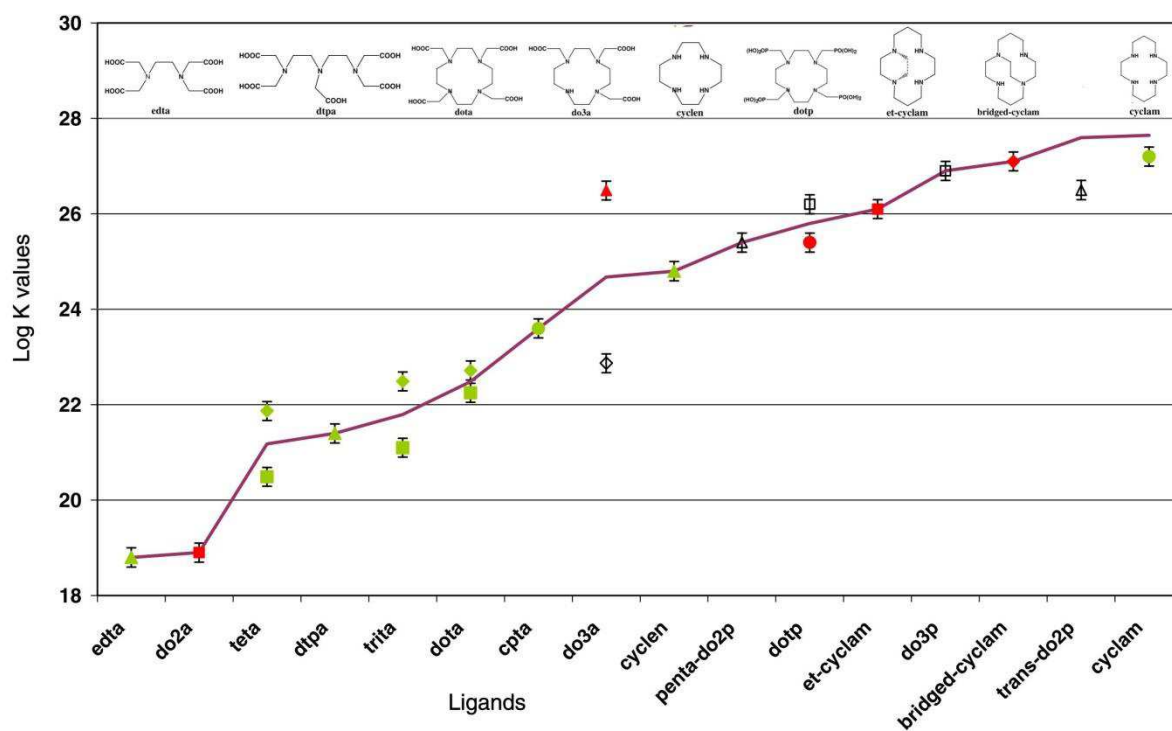


Figure 133 : Constantes de complexations de Cu^{II} complexé à différents ligands²⁴⁸

²⁴⁷ (a) Chen, X. Y.; Liu, S.; Hou, Y. P.; Tohme, M.; Park, R.; Bading, J. R.; Conti, P. S., MicroPET imaging of breast cancer alpha(v)-integrin expression with Cu-64-labeled dimeric RGD peptides. *Molecular Imaging and Biology* **2004**, 6 (5), 350-359; (b) Chen, X. Y.; Hou, Y. P.; Tohme, M.; Park, R.; Khankaldyyan, V.; Gonzales-Gomez, I.; Bading, J. R.; Laug, W. E.; Conti, P. S., Pegylated Arg-Gly-Asp peptide: Cu-64 labeling and PET imaging of brain tumor alpha(v)beta(3)-integrin expression. *J Nucl Med* **2004**, 45 (10), 1776-1783.

²⁴⁸ Smith, S. V., Molecular imaging with copper-64. *J Inorg Biochem* **2004**, 98 (11), 1874-1901.

C.2. Synthèses des vecteurs multivalents conjugués aux différents marqueurs

C.2.1. Synthèses des conjugués pour Tomographie à fluorescence proche infrarouge

Dans l'optique d'améliorer la biodisponibilité et la clairance de nos vecteurs peptidiques à l'instar du composé RGD-Galcto-¹⁸F, nous avons intégré sur la face inférieure du châssis un saccharide. L'intérêt du sucre sera ensuite évalué *in vivo* en imagerie optique proche infrarouge par comparaison des deux composés **133** et **134** marqués à la cyanine 5 (cf Annexe II).²⁰⁰

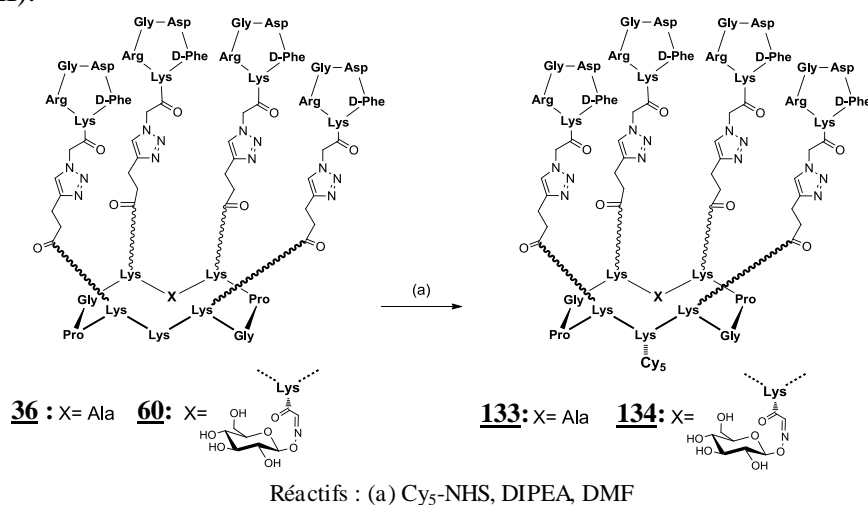


Figure 134 : Schéma de synthèse des peptides **133** et **134** conjugués au fluorophore Cyanine5

Les composés **133** et **134** conjugués au fluorophore Cyanine 5 ont été préparés à partir des intermédiaires **36** et **60**. Le greffage du chromophore par lien amide s'effectue via l'utilisation de l'ester activé commercial (Cy5-NHS) en quantité stœchiométrique et en condition légèrement basique. A l'issue de la réaction, les composés sont directement purifiés par HPLC préparative. Après lyophilisation, les produits **133** et **134** marqués sont obtenus avec des rendements satisfaisants et une excellente pureté pour réaliser les tests *in vitro*.

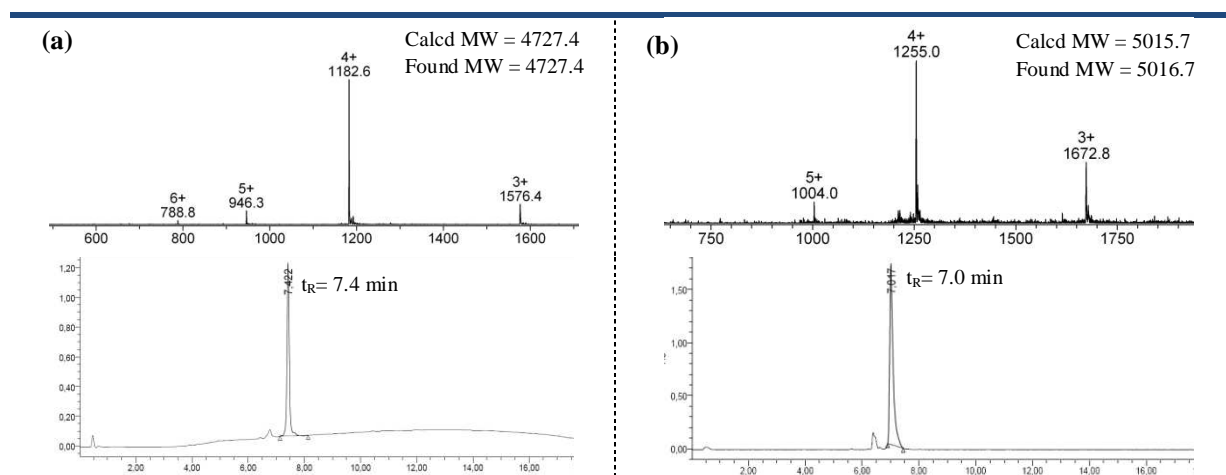
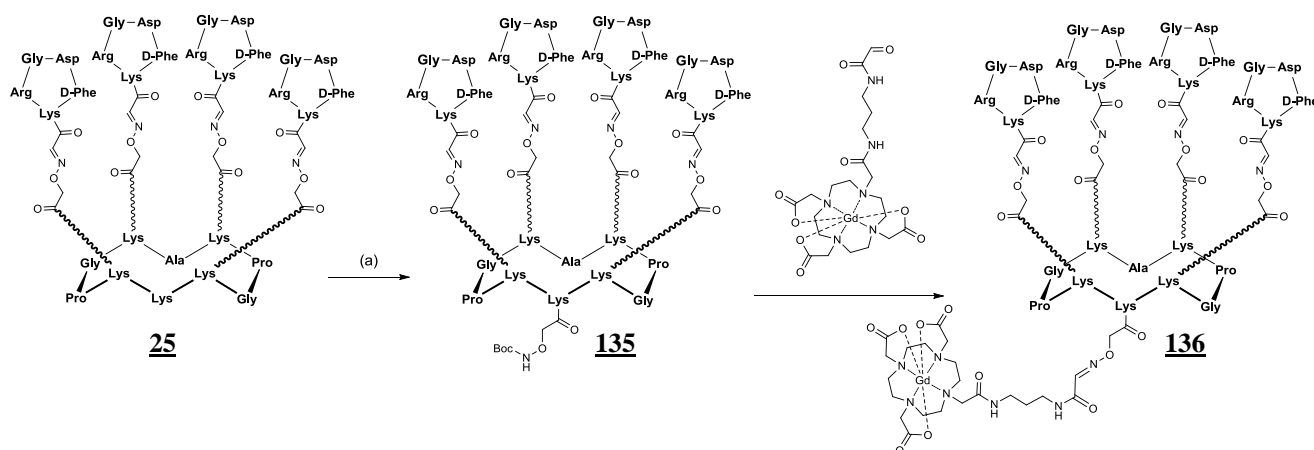


Figure 135 : Chromatogramme HPLC et spectre ESI des composés **133** et **134**

C.2.2. Synthèses des conjugués pour l'IRM

Pour concevoir un agent de contraste ciblé pour l'imagerie IRM, nous avons préparé un vecteur peptidique RAFT(c[-RGDfK-]₄) conjugué au Gadolinium complexé par le DOTA. Ce composé sera ensuite évalué *in vivo* pour détecter les tumeurs solides chez le petit animal.



Réactifs : (a) Boc-NHO-CH₂-CO-NHS, DIPEA, DMF ;(b) TFA/H₂O (70/30)

Figure 136 : Schéma de synthèse du peptide **136** conjugué au complexe de Gadolinium

La synthèse du peptide **136** conjugué au complexe de Gadolinium par lien oxime a été réalisée à partir du peptide **25**. La synthèse du complexe DOTA-Gd fonctionnalisé par un aldéhyde à été préalablement réalisée au laboratoire. Pour commencer, le peptide **25** est fonctionnalisé sur la face inférieure par une fonction oxyamine protégée après couplage de l'ester activé en excès. Après 2 heures de réaction, le milieu réactionnel est soumis à une purification par HPLC. Le composé **135** purifié et le complexe sont ensuite dissous en quantité stœchiométrique dans un mélange TFA/Eau (70/30). Au bout d'une heure de réaction, la ligation est complète et le produit est purifié par HPLC préparative pour donner le conjugué **136** avec un rendement de l'ordre de 74%.

Malheureusement, l'utilisation de ce composé comme agent de contraste pour l'IRM n'a pas été concluante. Le seuil de détection de cette technique d'imagerie étant relativement élevé, les concentrations en produit n'ont pas été suffisantes pour obtenir une image de qualité *in vivo*.

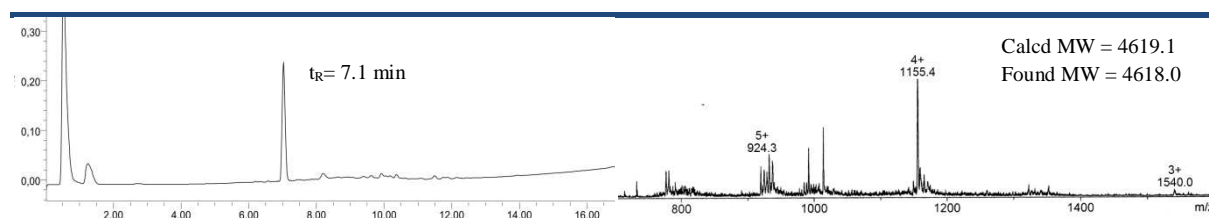


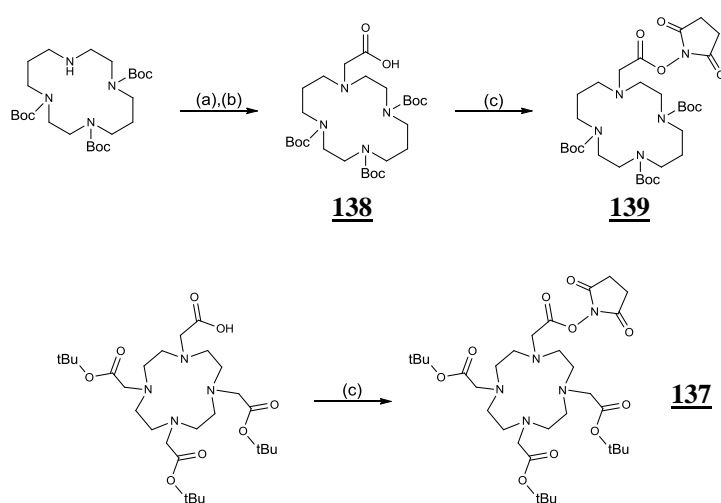
Figure 137 : Spectre ESI du composé **136**

C.2.3. Synthèses des conjugués pour la Tomographie à émission de positron

Pour préparer des agents de ciblage détectables en imagerie TEP, nous avons décidé d'utiliser le radiotracer ^{64}Cu . En raison de sa courte durée de vie, le radiométal doit être introduit dans le composé juste avant l'injection in vivo. Dans ce contexte, nous avons préparé deux vecteurs multivalents de ligand RGD fonctionnalisés par le motif DOTA ou Cyclam connus pour chélater rapidement et fortement Cu^{2+} (cf Annexe III).²⁴⁹

★ Préparation des ligands du Cuivre

Pour synthétiser nos conjugués, nous avons préalablement fonctionnalisé les ligands par un ester activé facilitant ainsi leur accroche sur le vecteur peptidique **25**.



Réactifs : (a) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, Na_2CO_3 , CH_3CN (b) NaOH , MeOH (c) DCC, NHS, AcOEt /dioxane

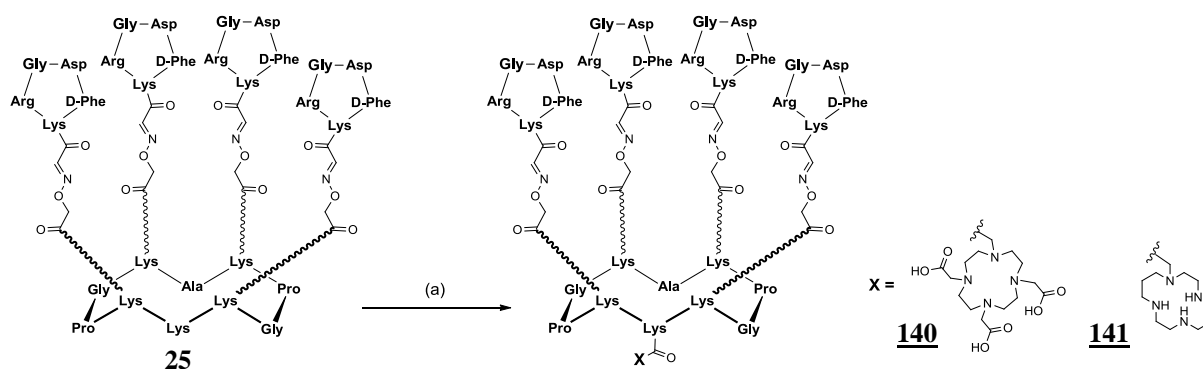
Figure 138 : Schéma de synthèse des ligands **137** et **139**

Pour préparer le dérivé de cyclam, le TriBoc-Cyclam commercial est couplé avec le bromoacetate d'éthyl par substitution nucléophile puis saponifié par de la soude pour donner le dérivé acide **138**. L'acide carboxylique du composé **138** est ensuite activé sous forme d'ester N-hydroxysuccinimide en présence de DCC et de NHS. A l'issue de la réaction, le produit **139** est purifié sur gel de silice offrant le composé pur avec un rendement global de 50 %.

En ce qui concerne le dérivé de DOTA, l'ester activé est formé à partir du produit commercial Tri-Boc-DOTA en s'inspirant de la stratégie décrite ci-dessus. Le produit **137** est obtenu avec un bon rendement et une pureté suffisante pour son utilisation ultérieure.

²⁴⁹ Galibert, M.; Jin, Z.-H.; Furukawa, T.; Fukumura, T.; Saga, T.; Fujibayashi, Y.; Dumy, P.; Boturyn, D., RGD-cyclam conjugate: Synthesis and potential application for positron emission tomography. *Biomed Chem Lett* **2010**, 20 (18), 5422-5425.

★ Synthèse des conjugués Cyclam et DOTA



Réactifs : (a) **138** ou **137**, DIPEA, DMF 2h puis ajout de TFA/TIS/H₂O (2 vol, 94/3/3)

Figure 139 : Schéma de synthèse des conjugués **140** et **141**

Les conjugués **140** et **141** ont été préparés à partir de l'intermédiaire **25**. Le greffage des ligands DOTA ou Cyclam par lien amide a été réalisé en présence d'un léger excès d'ester activé **139** ou **137** en condition légèrement basique. Après 2 heures d'agitation, le milieu réactionnel est acidifié par ajout de 2 volumes de TFA afin de procéder à la déprotection des amines des ligands. Les composés déprotégés sont ensuite directement purifiés par HPLC préparative pour donner les produits **140** et **141** avec des rendements satisfaisants et une excellente pureté pour les tests in vivo (Figure 140).

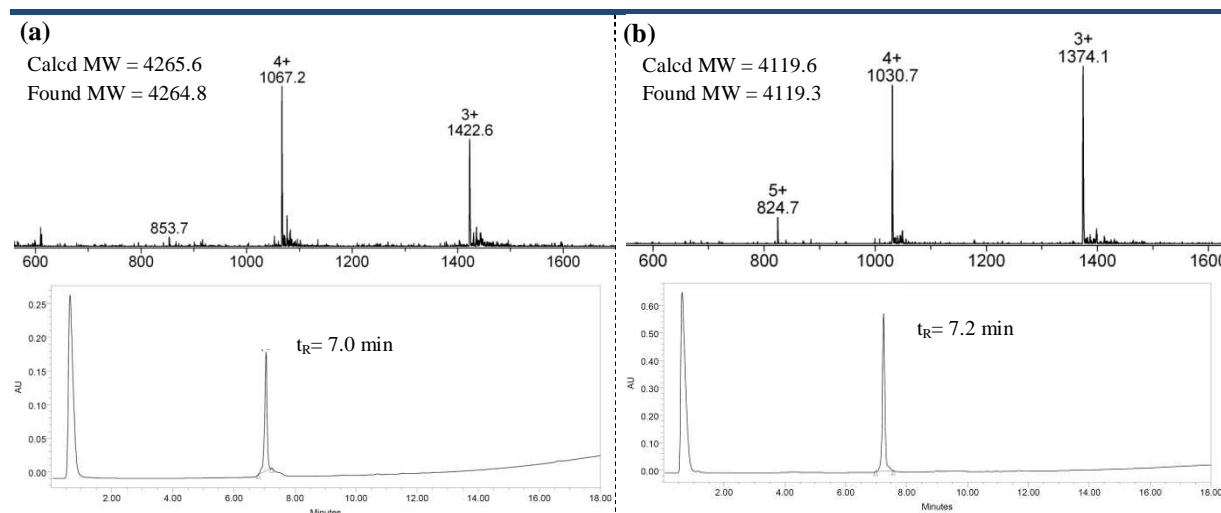


Figure 140 : Spectre ESI des composés (a) **140** et (b) **141**

C.3. Etudes biologiques des vecteurs multivalents

C.3.1. Evaluation de l'affinité des vecteurs multivalents

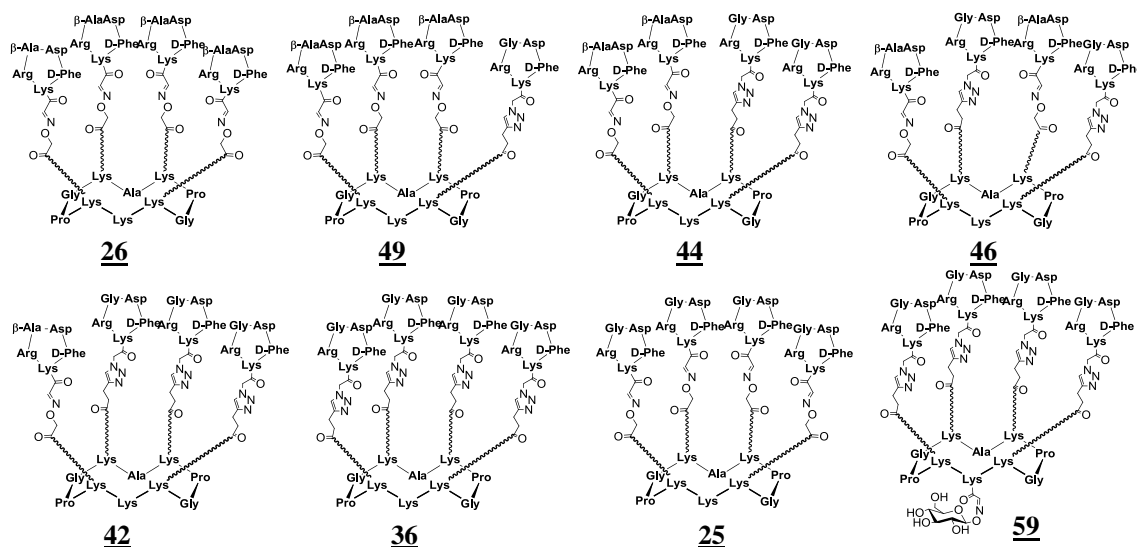


Figure 141 : Structure des composés étudiés

La capacité d'adhésion des différents montages de ligand RGD a été déterminée par un test d'inhibition cellulaire de type ELISA (cf Annexe II).²⁰⁰ Ces mesures ont été réalisées par le Dr. L. Sancey (Responsable Dr J.L Coll, INSERM U823, Institut Albert Bonniot). Dans cette expérience, l'efficacité d'adhésion des peptides sur les cellules HEK- β_3 , qui surexpriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, a été mesurée en compétition avec son substrat naturel, la vitronectine. Pour réaliser ce test, les cellules HEK- β_3 ont été incubées avec différentes concentrations des peptides **25**, **26**, **36**, **42**, **44**, **46**, **49** et **59** à 37°C dans une microplaque fonctionnalisée par la vitronectine adsorbée en surface. Après rinçage des plaques, les cellules restantes immobilisées sur la plaque sont quantifiées afin de déterminer l'IC₅₀ qui correspond à la concentration nécessaire de peptides permettant d'inhiber 50% de l'attachement des cellules avec la vitronectine. Ces mesures d'IC₅₀ sont répertoriées dans le graphe ci-dessous.

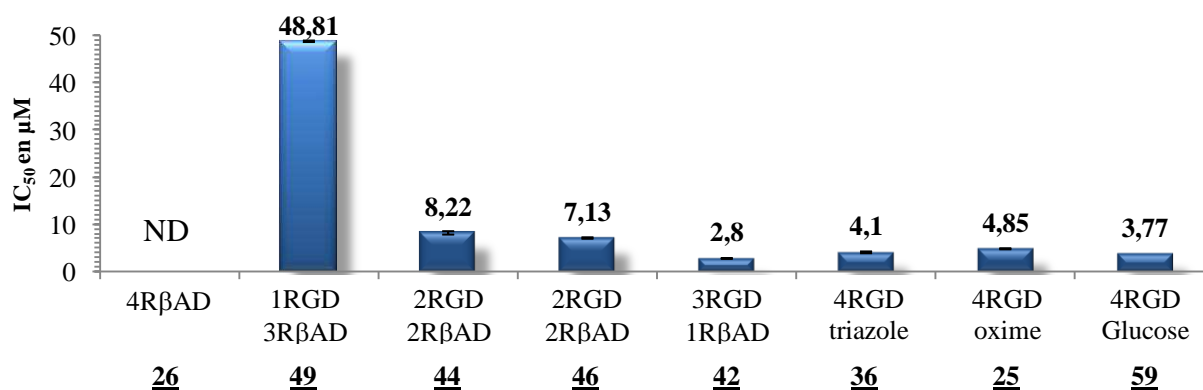


Figure 142 : IC₅₀ mesurées par test d'inhibition cellulaire

Pour valider ces résultats, le peptide contrôle **26** présentant quatre motifs R β AD a également été testé et n'a révélé aucune inhibition d'adhésion cellulaire. Comme il avait été observé précédemment,¹³³ l'augmentation progressive du nombre de motif RGD supporté par le châssis améliore l'efficacité du ligand, passant d'une IC₅₀ de 48,8 μ M pour le composé **49** à une IC₅₀ 10 fois plus faible pour le composé **36** (4,1 μ M). Ces résultats nous amène à penser

que l'effet de multivalence observé résultent de la forte concentration locale d'unité RGD. C'est pourquoi, les peptides **44** et **46** qui diffèrent par la position sur le châssis des unités RGD montre des IC_{50} similaires. La position des cyclopeptides RGD n'influence en rien l'affinité de la molécule pour sa cible. Les composés **36**, **25** et **59** présentant quatre unités de RGD montrent des potentiels d'inhibition similaires avec des IC_{50} de l'ordre de 4 μ M. On peut donc noter que la nature de la liaison (oxime ou triazole) ou l'introduction d'un motif sucre n'a aucune influence sur l'activité des composés. Étonnamment, la molécule **42** exhibant 3 unités de ligand s'est révélée être la plus efficace avec une IC_{50} de 2.8 μ M. Dans des études précédentes, il avait été démontré que les composés possédant 3 ou 4 motifs RGD affichaient une activité similaire. Ce résultat peut s'expliquer par la courte taille du lien oxime, liant le peptide non-sens R β AD au châssis, qui génère une gêne stérique moins importante entre les ligands lors de l'adhésion aux récepteurs $\alpha_v\beta_3$. Nous pouvons en conclure que l'effet de multivalence est optimum pour 3 unités RGD.

C.3.2. Localisation des Tumeurs in vivo par Tomographie à fluorescence proche infrarouge

Dans l'optique de déterminer l'influence d'un motif saccharide en imagerie médicale, les vecteurs multivalents **133** et **134** marqué au fluorophore ont été évalués in vivo (cf Annexe II).²⁰⁰ Pour cela, la capacité de ces molécules à cibler une tumeur solide chez la souris a été mesurée en utilisant la technique d'imagerie de fluorescence proche infrarouge. Les clichés d'imagerie optique (Figure 143) ont été réalisés après injection intraveineuse de 10 nmol du composé fluorescent **133** ou **134** sur un modèle de souris nude exhibant une tumeur humaine TS/A-pc sous-cutané. Une heure après l'injection, les molécules fluorescentes s'accumulent dans la tumeur mais aussi au niveau des reins. La forte intensité du signal au niveau des reins reflète une importante et rapide excrétion de nos vecteurs peptidiques. L'étude de la biodistribution des deux composés, 9 heures après l'injection, montre que le composé **134** modifié par un sucre est plus rapidement éliminé comparé au composé **133**. Les images des souris traitées avec **133** ou **134** révèlent des valeurs moyennes de ratios tumeur/peau très similaires, avec un ratio de 1.39 ± 0.37 pour **133** et 1.32 ± 0.15 pour **134**. Cependant, le composé **134** induit un meilleur contraste tumeur/peau par rapport à **133**. Pour conclure, ces résultats expérimentaux sont en accord avec ce que nous attendions et prouvent que l'introduction d'un sucre augmente la clairance de notre vecteur peptidique.

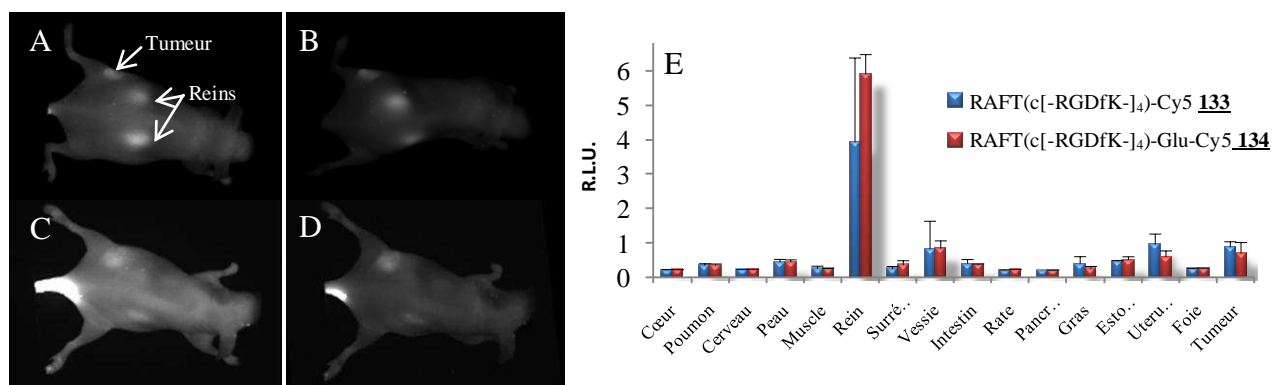


Figure 143 : Imagerie optique d'une souris portant une tumeur sous-cutané à 1 h (A-C) et 3h (B-D) après injection de **134** (A-B) ou **133** (C-D). (E) Biodistribution de **134** et **133** 20h après injection

C.3.3. Localisation des Tumeurs *in vivo* par Tomographie à émission de positron

Ces études ont été réalisées par le Dr. Zhao-Hui Jin (Responsable Dr. Y. Fujibayashi, Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japon).

★ Comparaison des conjugués DOTA et Cyclam pour la chélation du Cuivre

L'étude comparative pour la complexation du cuivre avec des conjugués DOTA et Cyclam a été réalisée dans les mêmes conditions puis analysé en CCM et HPLC. La réaction de chélation est effectuée en mélangeant les composés **140** ou **141** avec un équivalent de $^{64}\text{CuCl}_2$ dans un milieu tamponné à 37°C. Après une heure de réaction, les analyses CCM et HPLC du mélange réactionnel contenant le conjugué DOTA **140** montrent que la chélation est incomplète avec 75 % de cuivre libre restant en solution (Figure 144). A contrario, le conjugué Cyclam **141** s'est révélé plus performant pour complexer le cuivre étant donné qu'aucune trace de cuivre libre n'a été détectée durant l'analyse du mélange.

Bien qu'étant très largement utilisé pour complexer le Cu^{2+} , certaines études ont montré une instabilité *in vivo* du complexe ^{64}Cu -DOTA engendrant un relargage de cuivre libre dans l'organisme. La dégradation de ce complexe dans le sang ou le foie peut provoquer une accumulation de la radioactivité dans le foie ou d'autres tissus non-ciblés. Comparé au DOTA, le cyclam forme un complexe thermodynamiquement plus stable avec Cu^{2+} . L'étude précédente démontre bien que l'utilisation du Cyclam comme agent chélatant du ^{64}Cu est préférable pour des applications *in vivo*.

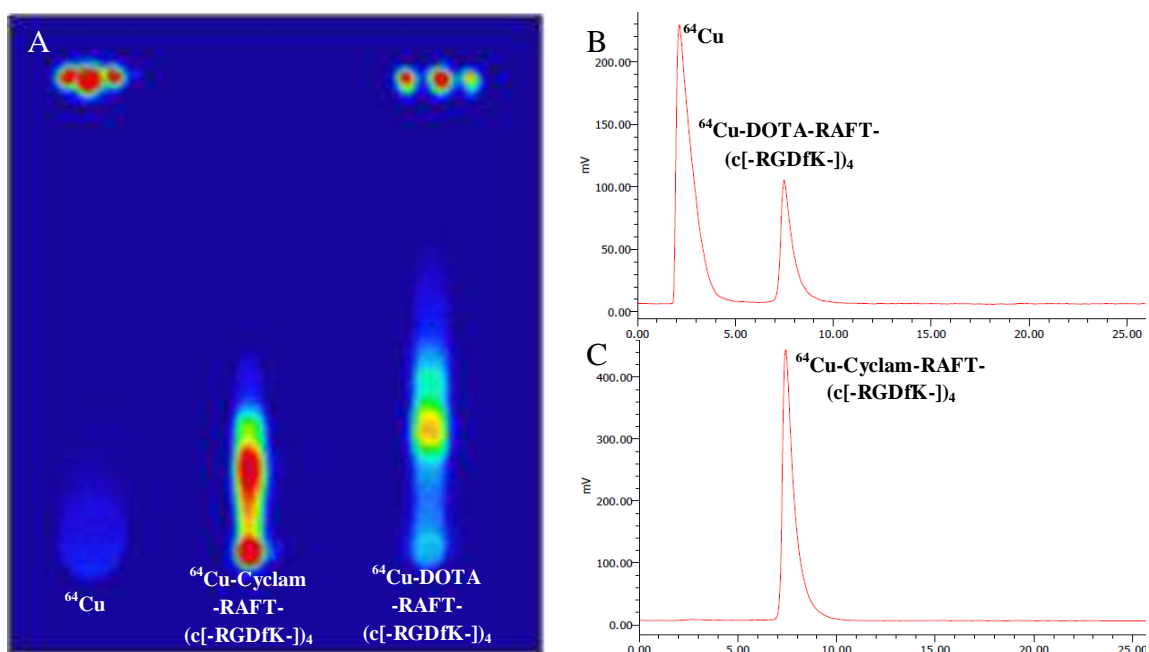


Figure 144 : Analyse CCM (A) et HPLC des composés **140** (B) et **141** (C) après ajout de $^{64}\text{CuCl}_2$

★ Evaluation du conjugué Cyclam en TEP

Avant d'effectuer les tests *in vivo*, l'affinité du composé **141** complexé au ^{64}Cu a été évaluée par un test d'inhibition cellulaire. Dans cette expérience, l'efficacité d'adhésion de ce peptide sur les cellules HEK- β_3 a été mesurée en compétition avec le composé **141** sans cuivre et le ligand monovalent c(RGDfV). Le produit **141** a ainsi révélé une affinité bien supérieure à son homologue monovalent c(RGDfV) avec des IC_{50} respectives de 38.9 ± 1.41 nM and $2,64 \pm 0,22$ μM .

Les études *in vivo* du composé **141** complexé au ^{64}Cu ont été réalisées sur deux modèles de souris. Le premier modèle de souris présente une tumeur de lignées cellulaires HEK293(β_3) qui surexprime l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le second modèle de souris sert de contrôle négatif et présente une tumeur de lignées cellulaires HEK293(β_1) qui exprime exclusivement l'intégrine β_1 non-reconnu par le ligand RGD. Les études de biodistribution et d'imagerie TEP réalisées sur les deux modèles de tumeur ont démontré que le composé **141** complexé au ^{64}Cu s'accumule fortement et spécifiquement dans la tumeur exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Figure 145). Ce radiotracer présente aussi une clairance rapide dans le sang avec une forte excrétion au niveau des reins. Par contre, la molécule est très peu retenue au niveau des tissus sains ce qui permet d'avoir une bonne qualité d'image avec un excellent contraste. La présence de cuivre libre n'ayant pas été détectée dans les urines, on peut supposer que le complexe n'a pas été dégradé dans l'organisme.

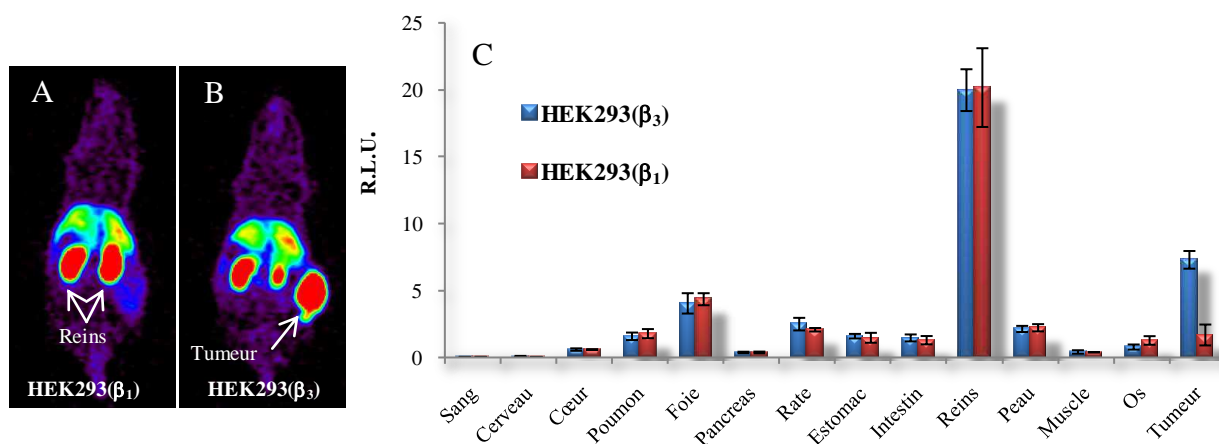


Figure 145 : Imagerie TEP d'une souris portant une tumeur sous-cutané à HEK293(β_1) (A) ou HEK293(β_3)(B) 20h après injection de **141** (E) Biodistribution de **141** 20h après injection sur les modèles de souris HEK293(β_1) et HEK293(β_3)

C.4. Bilan des travaux

Ces travaux démontrent que la présentation multivalente de ligands RGD, confère au vecteur une bonne spécificité et une excellente affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Les études comparatives des différents assemblages présentant un nombre variable de ligands RGD montrent que l'affinité d'adhésion est optimale à partir de trois unités. Par ailleurs, le type de ligation ou la position des ligands sur le châssis n'a aucune influence sur l'affinité. Il serait

intéressant de synthétiser de nouveaux vecteurs en faisant varier la taille et la flexibilité des bras espaceurs entre les ligands et le châssis. Cette étude pourrait permettre de déterminer si l'effet de multivalence est dû à un effet cluster ou un effet de concentration locale.

Le RAFT4(c[-RGDfK-]) s'est révélé être un agent de ciblage cellulaire particulièrement modulable et efficace *in vivo* pour concentrer des agents de détections au niveau des tumeurs. Nous avons ainsi montré qu'il est possible d'augmenter la clairance de notre vecteur en le conjuguant avec un saccharide. Cet effet est particulièrement intéressant si l'on souhaite diminuer le temps de vie dans l'organisme d'un composé toxique comme les traceurs radioactifs. De plus, cette étude a démontré que l'introduction d'un sucre n'affectait ni la sélectivité ni la rétention du composé au niveau de la cellule ciblée.

Toutefois, l'utilisation de ce vecteur n'est pas appropriée à toutes les techniques d'imagerie. Le composé **136** conjugué au complexe de Gadolinium n'a pas été efficace en tant qu'agent de contraste pour l'IRM. La sensibilité de cette technique est trop basse pour détecter de très faibles concentrations de produits.

Par contre, la tomographie à émission de positron est une technique extrêmement sensible pouvant détecter des concentrations en traceurs de l'ordre du picomolaire. Les études *in vivo* du composé **141** complexé au radiotracer ^{64}Cu ont permis la visualisation de cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par imagerie nucléaire non invasive. Ce composé présente plusieurs avantages pour des applications en imagerie TEP comme une haute affinité et spécificité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ainsi qu'une pharmacocinétique favorable. En étude clinique, l'utilisation du cuivre comme radiotracer est limitée par sa toxicité or notre composé est rapidement éliminé par voie rénal limitant ainsi l'exposition aux radiations dans l'organisme. Il est envisageable de conjuguer notre vecteur à un sucre afin d'augmenter sa clairance et ainsi diminuer les effets néfastes liés au ^{64}Cu .

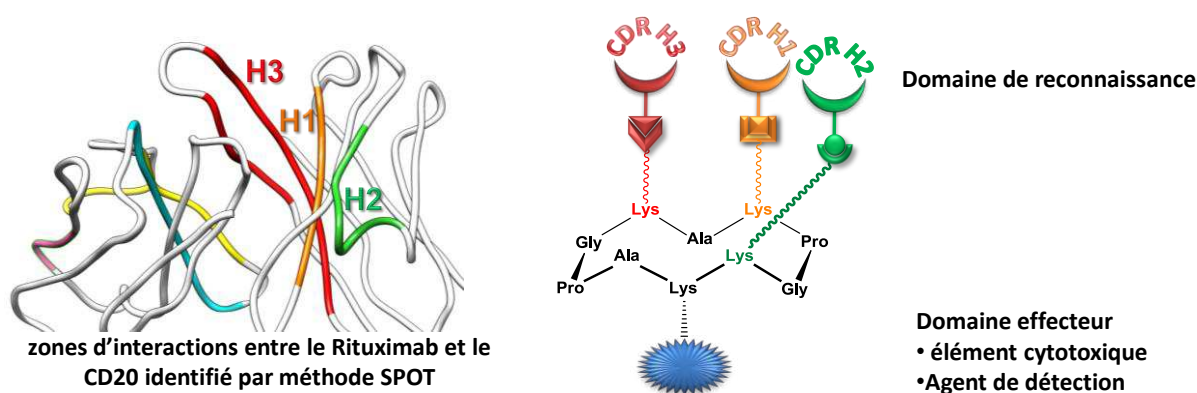
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux ont été consacrés à la conception de vecteurs peptidiques pour des applications anticancéreuses en thérapie ciblée. Nos systèmes ont été élaborés à partir d'un châssis moléculaire cyclodécapeptidique présentant des propriétés conformationnelles particulières. Les travaux antérieurs ont montré que ce châssis pouvait être utilisé en tant que support multivalent pour présenter des éléments de ciblage et délivrer des éléments de détection et/ou cytotoxique dans des cellules tumorales exprimant le récepteur cible *in vitro* et *in vivo*. Dans ce manuscrit, deux approches différentes ont été développées. La première a consisté à rechercher de nouveaux ligands de récepteurs tumoraux s'inspirant du domaine de reconnaissance d'un anticorps monoclonal thérapeutique. La seconde a été de mettre au point des vecteurs multivalents de ligands RGD destinés à des applications d'imagerie tumorale. Dans ces deux stratégies, les systèmes de vecteurs sont constitués d'un domaine de reconnaissance présentant un ou plusieurs ligands, et d'un module effecteur composé d'un élément de détection, le tout assemblé sur le châssis moléculaire. Plusieurs procédures d'assemblages chimiosélectif ont donc été élaborées, afin d'optimiser et contrôler l'assemblage des différents édifices moléculaires.

Pour faciliter la synthèse des produits, l'assemblage des précurseurs sur le cyclodécapeptide a été effectué via des réactions chimiosélectives. Dans l'optique d'optimiser la voie de synthèse et de contrôler les différents sites de greffages du châssis, de nouveaux acides aminés modifiés présentant des fonctions impliquées dans différentes ligations chimiosélectives ont été préparés. Ces différents synthons, stables en SPPS, ont permis de concevoir des châssis fonctionnalisés par plusieurs sites chimiosélectif orthogonaux. Cette stratégie a ouvert la voie à des procédures d'assemblages biomoléculaires originales en combinant jusqu'à trois ligations chimiosélectives orthogonales. Les différentes combinaisons des ligations oxime, thioéther et CuAAC se sont montrées efficaces et compatibles avec de nombreux composés (peptide, sucre, acide nucléique et fluorophore). Cette stratégie offre plusieurs avantages comparée à une stratégie plus classique basée sur l'utilisation de groupements protecteurs. Cette voie de synthèse permet de s'affranchir de certaines étapes de synthèse, de diminuer le nombre de purifications intermédiaires et peut être réalisée en « One pot » dans des conditions réactionnelles relativement simples. Cette stratégie n'est pas restreinte à l'assemblage de biomolécule mais peut tout aussi bien être appliquée dans d'autres domaines comme les dendrimères, la fonctionnalisation de nanoparticules ou l'immobilisation sur surface (biosensor).

Ces méthodologies de synthèse ont été très utiles pour la conception d'assemblages peptidiques mimant l'activité de reconnaissance du Rituximab. Dans ce projet, l'analyse par technique SPOT du domaine variable du mAb Rituximab a permis de déterminer des fragments peptidiques interagissant avec l'antigène. La plupart de ces segments sont issus des boucles CDR H1, H2 et H3 impliquées dans la reconnaissance de l'épitope. En comparant l'étude cristallographique et l'analyse SPOT, nous avons pu remarquer que ces deux techniques révélées des zones d'interactions légèrement différentes entre le mAb et l'antigène. Ces différences peuvent être expliquées par un repliement de la protéine pendant la cristallisation. L'étude SPR a ensuite montré que l'assemblage multivalent de ces fragments sur le châssis permettait d'augmenter l'affinité pour la cible. Deux montages présentant une bonne affinité relative pour l'antigène ont pu ainsi être identifiés par SPR. Cependant

l'évaluation biologique de ces produits s'est montrée peu concluante dû à un manque de spécificité envers la cible. Plusieurs études complémentaires sont à prévoir afin de diminuer les interactions non-spécifiques. Il est notamment prévu d'évaluer de nouveaux fragments peptidiques issus de mutation. Bien que n'ayant pas aboutit pour le moment, cette stratégie reste néanmoins intéressante pour imiter le site de reconnaissance d'un anticorps. L'objectif de cette étude est de se rapprocher au maximum des propriétés du mAb en réalisant un domaine de reconnaissance à la fois très sélectif et affin envers la cible. La conception de montages comportant un site de reconnaissance discontinu demande une étude plus approfondie. Une analyse bioinformatique de la structure cristalline du Rituximab permettra de mieux positionner et orienter les différents fragments sur le châssis. Les procédures de synthèses combinant trois ligations orthogonales seraient grandement utiles si l'on souhaite assembler sur le châssis trois fragments issus de boucles CDR différentes.



Le but final de ce projet étant d'obtenir un mime de mAb thérapeutique, le domaine effecteur devra être fonctionnalisé. Pour cela, la molécule sera conjuguée à un élément cytotoxique ou un élément permettant de déclencher la réponse immunitaire.

Enfin, des études précédentes menées au sein du laboratoire ont démontré que l'assemblage tétravalent de ligand RGD sur le châssis permettait d'augmenter l'affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ tout en maintenant une excellente sélectivité. Les études *in vivo* réalisées avec ce type de vecteur peptidique ont montré son efficacité pour le ciblage de tumeurs solides exprimant l'intégrine. A ce jour, une molécule analogue conjuguée à un fluorophore est utilisée en phase pré-clinique (clinique prévue pour 2011) pour l'aide à la chirurgie de l'ostéosarcome. Ces excellents résultats nous ont amené à concevoir de nouveaux vecteurs peptidiques destinés à des applications d'imagerie tumorale plus performantes. Ces châssis multivalents de ligands RGD ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont été conjugués avec différents agents de détection puis évalués par techniques d'imagerie TEP, IRM et imagerie optique. Grâce aux procédures d'assemblages de ligation CuAAC/oxime, un vecteur conjugué à la fois par un fluorophore et un saccharide a pu être synthétisé. L'étude *in vivo* a ainsi montré que l'introduction d'un sucre permettait d'augmenter la clairance du produit sans affecter la spécificité et la rétention au niveau de la tumeur. Cette stratégie est très utile pour diminuer le temps de vie d'un composé nocif dans l'organisme comme les radiotraceurs. Cependant, notre vecteur multivalent n'est pas adapté à tous types d'imagerie médicale. Le composé

RAFT4(c[-RGDfK-]) conjugué au Gadolinium n'a pas eu l'effet escompté en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie IRM. Ce résultat est lié à la technique d'imagerie qui possède un seuil de détection trop élevé pour détecter le produit. Par contre, la technique d'imagerie TEP est particulièrement sensible et détecte des composé jusqu'à une concentration de l'ordre du picomolaire. Les études in vivo par imagerie TEP du RAFT4(c[-RGDfK-]) conjugué au complexe Cyclam- ^{64}Cu s'est révélé particulièrement efficace pour la visualisation de cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Sa clairance relativement rapide et sa sélectivité font de se produit un excellent agent d'imagerie pour la technique TEP. Des études supplémentaires permettront de déterminer le potentiel de cette molécule en tant qu'agent d'imagerie ciblé en oncologie. Pour cela, ce composé devra être synthétisé en grande quantité afin d'effectuer des études cliniques plus approfondies. En perspective de ce projet, il est envisageable d'étendre l'utilisation de ce vecteur en thérapie anticancéreuse. Conjugué au ^{67}Cu , cette molécule pourrait être employée pour traiter les tumeurs par radiothérapie.²⁵⁰

²⁵⁰ Novak-Hofer, I.; Schubiger, A., Copper-67 as a therapeutic nuclide for radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2002**, 29 (6), 821-830.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. 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.

I.1. Materials and Equipments

I.1.1. Reagents

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[®], FMPB resin were obtained from Calbiochem-Novabiochem and 2-chlorotriylchloride[®] 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)

I.1.2. Equipments

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 50 mM triethylammonium 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). The multiply charged data produced by the mass spectrometer on the m/z scale were converted to the molecular weight. 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.

I.2. General Procedures for Peptides Syntheses

I.2.1. Syntheses of linear protected peptides by SPPS

Assembly of all linear protected peptides was performed manually or automatically by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl/tert-butyl (Fmoc/tBu) 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. The 2-chlorotrityl resin was preloaded for 30 min in dry CH_2Cl_2 with N_α -Fmoc-protected amino acid substituted at 1 mmol/g and capped with 6 mL of methanol/DIPEA/ CH_2Cl_2 (2/1/17) for 5 min and then one more time for 10 min. 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 TNBS 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 room temperature for 1 min. Remaining of free amino functions resulted in a 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).

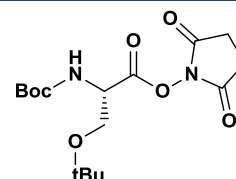
N_α -Fmoc protecting groups were removed by treatment with piperidine/DMF (1:4) (10 mL/g resin) for 10 min. The process was repeated three times and the resin was further washed five times with DMF (10 mL/g resin) for 1 min. The completeness of the deprotection was checked by UV measurement. Indeed, 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.

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.

I.2.2. General Procedure for Cyclization Reactions.

All linear peptides (0.5 mM) were dissolved in DMF and the pH values were adjusted to 8-9 by addition of DIPEA. PyBOP (1.2 equiv.) was added and the solution stirred at room temperature for 1 h. Solvent was removed under reduced pressure and the residue dissolved in the minimum of CH_2Cl_2 . Diethyl ether was added to precipitate peptides. Then they were triturated and washed three times with diethyl ether to obtain crude materials that were used in the next step without further purification.

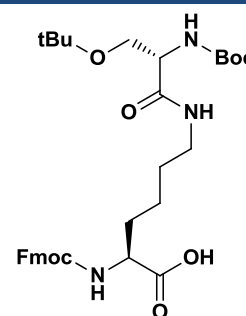
I.3. Synthesis protocols

Boc-Ser(tBu)-N-hydroxysuccinimide ester ¹⁸²1

To a stirred solution of Boc-Ser(tBu)-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 h stirring at room temperature. 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 MgSO₄. Boc-Ser(tBu)-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):**C₁₆H₂₆N₂O₇Calcd 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(tBu)]-OH ¹⁸²2

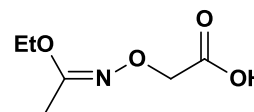
The above Boc-Ser(tBu)-NHS 1 (8.00 g, 22.3 mmol) in CH₂Cl₂ (75 mL) was added dropwise over 30 min to a stirred suspension of finely powdered TFA-salt of Fmoc-lysine (10.90 g, 22.6 mmol) and DIPEA (15.6 mL, 90.0 mmol) in CH₂Cl₂ (130 mL). After 5 h reaction, the solvent was evaporated off in vacuum and 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(tBu)]-OH 2 as a pure white powder (12.53 g, 20.5 mmol).

Yield: 92 %**RP-HPLC:** RT = 11.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₃₃H₄₅N₃O₈Calcd 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 Acid¹⁸²**3**

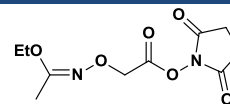
To a stirred solution of iodoacetic acid (9.00 g, 48.4 mmol) in water (19 mL) at 0 °C was added aqueous NaOH (3.0 mL, 40% w/w). The resulting solution was allowed to heat to room temperature, whereafter ethyl N-hydroxyacetimidate (6.0 g, 58.3 mmol) was added followed by aqueous NaOH (4.5 mL, 40% w/w) and water (19 mL) (pH of solution >12). After 4.5 h of stirring at 80 °C and cooling to room temperature, water was added (70 mL) and the aqueous mixture was washed with DCM (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 EtOAc (4 x 50 mL) (NB: After each extraction the pH was adjusted to 2-3 with a 1 M hydrochloride solution), and the combined organic phases from this last extraction was washed with brine (50 mL), dried over MgSO₄, and concentrated in vacuum, providing compound **3** as a colorless oil (5.69 g, 35.3 mmol).

**Yield: 73%****MS (ESI-MS, negative mode):**C₆H₁₁NO₄Calcd 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)acetate¹⁸²**4**

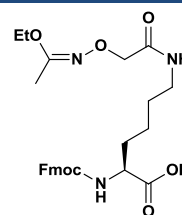
To a stirred solution of compound **3** (5.69 g, 35.3 mmol) and N-hydroxysuccinimide (4.06 g, 35.3 mmol) in ethyl acetate/ dioxane (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (7.28 g, 35.3 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 h. The formed DCU was filtered off and 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%****MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₀H₁₄N₃O₇Calcd MW = 258,1 g.mol⁻¹Found MW = 258.3 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]-OH¹⁸²**5**

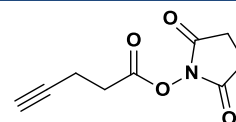
To a stirred mixture of Fmoc-lysine (6.22 g, 16.9 mmol) and DIPEA (3.0 mL, 17.3 mmol) in DMF (100 mL) at room temperature was added dropwise over 20 min a solution of the above-prepared NHS-ester **4** (4.35 g, 16.9 mmol) in DMF (40 mL). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIPEA. After 2 h of reaction, the reaction mixture was concentrated under vacuum providing an oily residue. After addition of Ethyl acetate (100 mL), the organic phase was washed with a concentrated citric acid solution (3 x 30mL).. The organic phases were then washed with brine (100 mL), dried over MgSO₄, and evaporated under reduced pressure. The crude product was then purified by column chromatography using DCM/EtOH (9:1) as eluent. The different fractions was concentrated under reduced pressure the compound **5** as a white solid (7.47 g, 14.6 mmol).

**Yield: 86 %****MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₇H₃₃N₃O₇Calcd 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)

4-Pentynoic acid succinimidyl ester¹⁸⁷**6**

To a stirred solution of pent-4-ynoic acid (1 g, 10.2 mmol) and N-hydroxysuccinimide (1.18 g, 10.2 mmol) in ethyl acetate/dioxane (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (2.10 g, 10.2 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5h. 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 layer was separated, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. Recrystallization from CH₂Cl₂ / pentane afforded **6** as white solid which was used without further purification (1.95 g, 10 mmol).

**Yield: 98%****¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):**

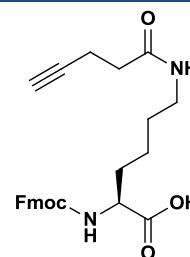
δ 2.03 (1H, t, J = 2.4 Hz), 2.60 (2H, td, J = 2.4, 7.0 Hz), 2.83 (4H, s), 2.87 (2H, t, J = 7.0 Hz)

¹³C NMR (68 MHz, CDCl₃):

δ 14.1, 25.6, 30.3, 69.6, 80.3, 167.1, 169.0.

Fmoc-Lys[N-4-Pentynoic acid]-OH¹⁸⁷**7**

To a stirred mixture of Fmoc-lysine (3.68 g, 10 mmol) and DIPEA (1.9 mL, 11 mmol) in dimethylformamide (50 mL) at room temperature was added dropwise over 10 min a solution of **6** (1.95 g, 10 mmol) in dimethylformamide (20 mL). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIPEA. After 2 h of reaction, the reaction mixture was concentrated under vacuum providing an oily residue. After addition of ethyl acetate (50 mL), the organic phase was washed with a concentrated citric acid solution (2 x 25 mL), water (25 mL), and brine (25 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. Precipitation from CH₂Cl₂ / pentane afforded the building block **7** as a white solid which was used without further purification (4 g, 9 mmol).

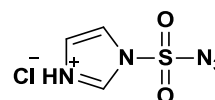
**Yield: 90%****RP-HPLC:** RT = 9.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₆H₂₈N₂O₅Calcd MW = 448.5 g.mol⁻¹Found MW = 449.1 g.mol⁻¹

¹H NMR (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), 6.0 (1H, t, J = 5.6 Hz), 5.70 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.38-4.36 (3H, m), 4.12 (1H, t, J = 6.9 Hz), 3.19 (2H, m), 2.42 (2H, t, J = 7.0 Hz), 2.30 (2H, dt, J = 2.3, 7.0 Hz), 1.92 (1H, t, J = 2.4 Hz), 1.96 (3H, s), 1.81 (2H, m), 1.58 (2H, m), 1.45 (2H, m), 1.24 (3H, t, J = 7.1 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 173.9, 170.0, 156.1, 143.8, 143.7, 140.6, 127.6, 127.0, 125.2, 120.0, 83.7, 71.2, 65.6, 53.7, 46.6, 38.2, 34.2, 30.4, 28.6, 23.0, 14.2

Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride¹⁹⁰**8**

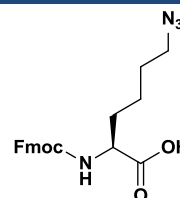
Sulfonyl chloride (16.1 mL, 200 mol) was added drop-wise to an ice-cooled suspension of NaN₃ (13.0g, 200 mmol) in MeCN (200 mL) and the mixture stirred overnight at room temperature. Imidazole (25.9 g, 380 mmol) was added portion-wise to the ice-cooled mixture and the resulting slurry stirred for 3 h. at room temperature. The mixture was diluted with EtOAc (400 mL), washed with H₂O (2 × 400 mL) then saturated aqueous NaHCO₃ (2 × 400 mL), dried over MgSO₄ and filtered. A solution of HCl in EtOH [obtained by the drop-wise addition of AcCl (21.3 mL, 300 mmol) to ice-cooled dry ethanol (75 mL)] was added drop-wise to the filtrate with stirring, the mixture chilled in an ice-bath, filtered and the filter cake washed with EtOAc (3 × 100 mL) to give **8** as colorless needles (26.4 g, 0.125 mmol).

**Yield: 63%****MS (ESI-MS, positive mode):**C₃H₄ClN₅O₂SCalcd MW = 173.1 g.mol⁻¹Found MW = 173.0 g.mol⁻¹

NMR ¹H (400 MHz, D₂O): 9.53 (1 H, dd, J = 1.3, 1.6 Hz) δ, 8.09 (1 H, dd, J = 1.6, 2.2 Hz), 7.68 (1H, dd, J = 1.3, 2.2 Hz)

Fmoc-azidonorleucine**9**

To a stirred mixture of Fmoc-lysine (3.68 g, 10 mmol) and CuSO₄ (0.025g, 0.16 mmol) in MeOH/Water (8:2, 80 mL) at room temperature was added NaHCO₃ (3 g, 35 mmol) followed by imidazole-1-sulfonyl azide **8** (2.5g, 12 mmol). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of NaHCO₃. The reaction mixture was stirred overnight and the pH was acidified at 2 using HCl 3M. The mixture was extracted with ethyl acetate (4 × 75 mL), then the combined organic phase was washed with brine (50ml), dried over anhydrous Mg₂SO₄, filtered and concentrated in order to obtain the building block **9** as a yellowish oil which was used without further purification (3.58 g, 9.1 mmol).

**Yield: 91%**

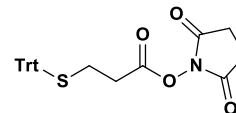
RP-HPLC: RT = 10.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):C₂₆H₂₈N₂O₅Calcd MW = 394.44 g.mol⁻¹Found MW = 394.2 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 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), 5.3 (1H, d), 4.2 (2H, d), 4.12 (1H, t, J = 6.9 Hz), 3.8 (1H, m), 3.2 (2H, t), 1.9-1.1 (6H, m)

3-(tritylthio)propanoic acid succinimidyl ester**10**

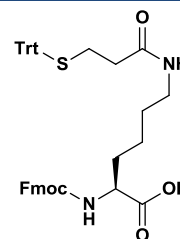
To a stirred solution of 3-(Tritylthio)propionic acid (6.96 g, 20 mmol) and N-hydroxysuccinimide (2.32 g, 20 mmol) in Dimethylformamide (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (4.11 g, 20 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5h. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under vacuum to obtain **10** as a white solid which was used without further purification (8.46 g, 19 mmol).

**Yield: 95%****MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₆H₂₃O₄NSCalcd MW = 445.5 g.mol⁻¹Found MW = 445.6 g.mol⁻¹

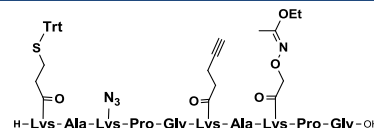
NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.43-7.46 (6H, m), 7.20-7.33 (9H, m), 2.80 (4H, s), 2.54 (2H, t), 2.40 (2H, t)

Fmoc-Lys(CO-CH₂H₄-S-Trt)-OH**11**

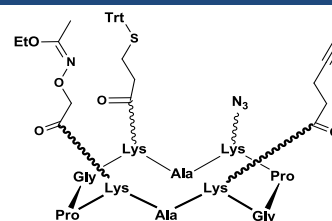
To a stirred mixture of Fmoc-lysine (3.68 g, 10 mmol) and DIPEA (1.9 mL, 11 mmol) in dimethylformamide (50 mL) at room temperature was added dropwise over 10 min a solution of **10** (4.45 g, 10 mmol) in dimethylformamide (20 mL). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIPEA. After 2 h of reaction, the reaction mixture was concentrated under vacuum providing an oily residue. After addition of ethyl acetate (50 mL), the organic phase was washed with a concentrated citric acid solution (2 x 25 mL), water (25 mL), and brine (25 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. Precipitation from CH₂Cl₂ / pentane afforded the building block **11** as a white solid which was used without further purification (4 g, 91 mmol).

**Yield: 91%****RP-HPLC:** RT = 12.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₃H₄₂N₂O₅SCalcd MW = 698.9 g.mol⁻¹Found MW = 689.1 g.mol⁻¹**¹H NMR (400 MHz, DMSO):** δ 7.9-7.25 (23H, m), 4.33-4.23 (3H, m), 3.95 (1H, m), 3.03 (2H, m), 2.28 (2H, t, J = 7.6 Hz), 2.17 (2H, t, J = 7.5 Hz), 1.81-1.62 (2H, m), 1.48-1.31 (4H, m)**¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz):** δ 174.9, 170.7, 157.1, 145.4, 144.7, 141.6, 129.9, 128.9, 128.5, 127.9, 127.6, 126.2, 121.0, 66.9, 66.5, 54.6, 47.6, 39.2, 34.9, 31.3, 29.5, 28.4, 23.9**Linear RAFT (S-Trt)-(N₃)-(Alkyne)-(Acetimide)****12**

The linear decapeptide **12** was assembled on 2-chlorotriylchloride[®] resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5**, **7**, **9** and **11**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding 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). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (158 mg, 101 μmol).

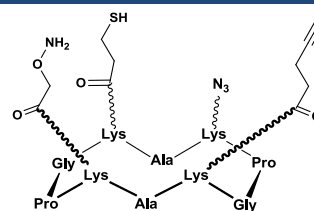
**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 10.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₇H₁₀₉N₁₇O₁₆SCalcd MW = 1560.9 g.mol⁻¹Found MW = 1560.6 g.mol⁻¹**cRAFT (S-Trt)-(N₃)-(Alkyne)-(Acetimide)****13**

The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide **12** (158 mg, 101 μmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **13** as a white solid powder (149 mg, 96.5 μmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: 95%****RP-HPLC:** RT = 11.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₇H₁₀₇N₁₇O₁₅SCalcd MW = 1542.9 g.mol⁻¹Found MW = 1543.2 g.mol⁻¹

cRAFT (SH)-(N₃)-(Alkyne)-(ONH₂)**14**

The cyclopeptide **13** (20 mg, 13 μmol) was dissolved in a 5 mL of TFA/TIS/H₂O (80/10/10) solution. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the raw peptide as a yellowish solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **14** as a white powder. (9.7 mg, 7.9 μmol).

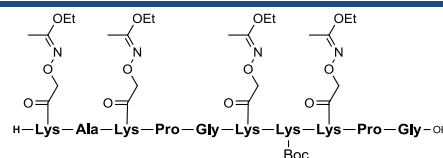
**Yield: 61%****RP-HPLC:** RT = 9.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₅₄H₈₇N₁₇O₁₄SCalcd MW = 1230.5 g.mol⁻¹Found MW = 1230.7 g.mol⁻¹

Linear RAFT 4(Acetimidate)-NH-Boc

187

15

The linear decapeptide **15** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (450 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding 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). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (550 mg, 321 μmol).

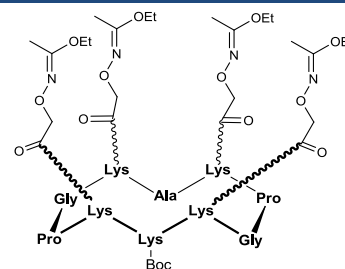
**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 9.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₆H₁₃₁N₁₉O₂₅Calcd MW = 1711.0 g.mol⁻¹Found MW = 1711.2 g.mol⁻¹

cRAFT 4(Acetimidate)-NHBoc

187

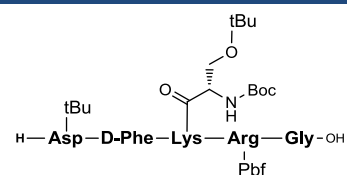
16

The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide **15** (550 mg, 321 μmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **16** as a white solid powder (521 mg, 307 μmol). This crude material was used without further purification.

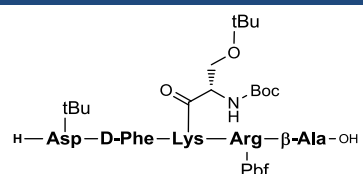
**Yield: 96%****RP-HPLC:** RT = 11.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₆H₁₂₉N₁₉O₂₄Calcd MW = 1693.0 g.mol⁻¹Found MW = 1693.0 g.mol⁻¹

H-D(tBu)-f-K(BocS(tBu))-R(Pbf)-G-OH**17**

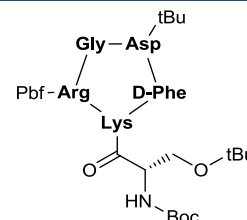
The linear decapeptide **17** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (450 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **2**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1:99). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (358 mg, 305 μmol).

**Yield: 97%****RP-HPLC:** RT = 12.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₅₆H₈₈N₁₀O₁₅SCalcd MW = 1173.5 g.mol⁻¹Found MW = 1173.1 g.mol⁻¹**H-D(tBu)-f-K(BocS(tBu))-R(Pbf)-βA-OH****18**

The linear decapeptide **18** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (450 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **2**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1:99). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (341 mg, 287 μmol).

**Yield: 91%****RP-HPLC:** RT = 12.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₅₇H₉₀N₁₀O₁₅SCalcd MW = 1187.5 g.mol⁻¹Found MW = 1187.1 g.mol⁻¹**c[-R(Pbf)-G-D(tBu)-f-K(BocS(tBu))-]****19**

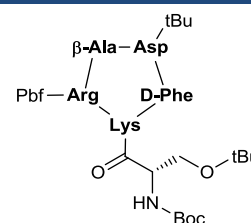
The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide **17** (358 mg, 305 μmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide as a white **19** solid powder (352 mg, 305 μmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 13.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₅₆H₈₆N₁₀O₁₄SCalcd MW = 1155.4 g.mol⁻¹Found MW = 1155.2 g.mol⁻¹

c[-R(Pbf)-βA-D(tBu)-f-K(BocS(tBu))-]

20

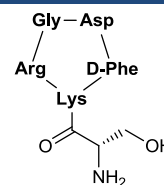
The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide **18** (341 mg, 287 μmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **20** as a white solid powder (335 mg, 287 μmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 13.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₅₇H₈₈N₁₀O₁₄SCalcd MW = 1169.5 g.mol⁻¹Found MW = 1169.2 g.mol⁻¹

c[-R-G-D-f-K(S)-]

21

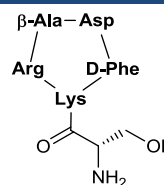
The cyclopeptide **19** (352 mg, 305 μmol) was dissolved in 30 mL of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded peptide **21** as a white solid powder (211 mg, 305 μmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 5.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₃₀H₄₆N₁₀O₉Calcd MW = 690.8 g.mol⁻¹Found MW = 690.5 g.mol⁻¹

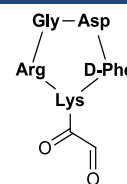
c[-R-βA-D-f-K(S)-]

22

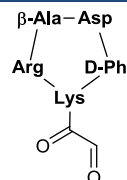
The cyclopeptide **20** (335 mg, 287 μmol) was dissolved in 30 mL of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded peptide **22** as a white solid powder (203 mg, 287 μmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 5.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₃₁H₄₈N₁₀O₉Calcd MW = 704.8 g.mol⁻¹Found MW = 704.4 g.mol⁻¹

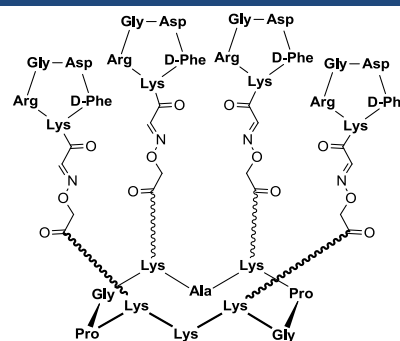
c[-R-G-D-f-K(COCHO)-]

23

Peptide 21 (211 mg, 305 μmol) and 10 equiv. of NaIO_4 (282 mg, 1.32 mmol) were dissolved in water at 10^{-2}M . The mixture was stirred for 20 min at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclopeptide 23 as a white powder (116 mg, 176 μmol).

Yield: 58%**RP-HPLC:** RT = 5.8 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_9\text{O}_9$ Calcd MW = 659.7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 659.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ c[-R- β A-D-f-K(COCHO)-]24

Peptide 22 (335 mg, 287 μmol) and 10 equiv. of NaIO_4 (282 mg, 1.32 mmol) were dissolved in water at 10^{-2}M . The mixture was stirred for 20 min at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclopeptide 24 as a white powder (124 mg, 184 μmol).

Yield: 64 %**RP-HPLC:** RT = 5.6 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{O}_9$ Calcd MW = 673.7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 673.6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ RAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}25

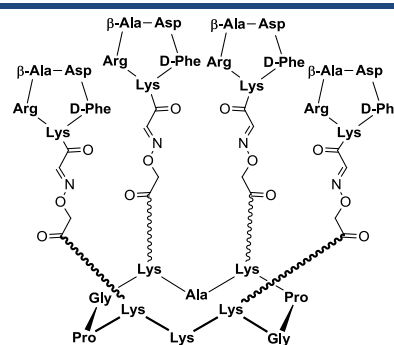
The scaffold 16 (10 mg, 6.0 μmol) and 6 equiv. of c[-RGDfK(COCHO)-] 23 (23.5 mg, 36 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/ H_2O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate 25 as a white powder (16.0 mg, 4.1 μmol).

Yield: 70%**RP-HPLC:** RT = 7.1 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{171}\text{H}_{253}\text{N}_{55}\text{O}_{50}$ Calcd MW = 3879.3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 3878.6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RAFT4(c[-RβADfK-])_{oxime}¹⁸⁷

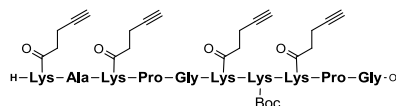
26

The scaffold **16** (7.5 mg, 4.5 μmol) and 6 equiv. of c[-RβADfK(COCHO)-] **24** (18.2 mg, 27 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/H₂O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **26** as a white powder (13.0 mg, 3.2 μmol).

**Yield: 72%****RP-HPLC:** RT = 7.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₇₅H₂₆₁N₅₅O₅₀Calcd MW = 3935.4 g.mol⁻¹Found MW = 3934.7 g.mol⁻¹Linear RAFT4(Alkyne)-NH_{Boc}¹⁸⁷

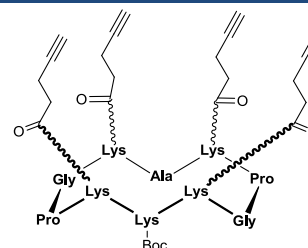
27

The linear decapeptide **27** was assembled on 2-chlorotriethylchloride[®] resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **7**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1:99). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (158 mg, 100 μmol).

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 7.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₂H₁₁₁N₁₅O₁₇Calcd MW = 1458.8 g.mol⁻¹Found MW = 1458.6 g.mol⁻¹cRAFT4(Alkyne)-NH_{Boc}¹⁸⁷

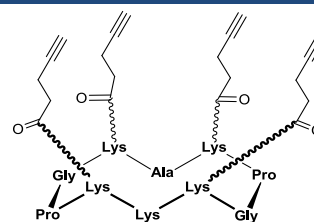
28

The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide **27** (158 mg, 100 μmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **28** as a white solid powder (150 mg, 100 μmol).

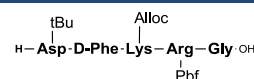
**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 7.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₂H₁₀₉N₁₅O₁₆Calcd MW = 1440.8 g.mol⁻¹Found MW = 1441.7 g.mol⁻¹

cRAFT4(Alkyne)-NH₂¹⁸⁷**29**

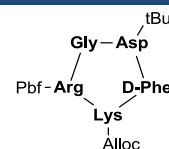
The cyclopeptide **28** (150 mg, 100 μmol) was dissolved in a 5 mL of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the raw peptide as a white solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **29** as a white powder (81 mg, 61 μmol).

**Yield: 61%****RP-HPLC:** RT = 7.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₆₇H₁₀₁N₁₅O₁₄Calcd MW = 1340.6 g.mol⁻¹Found MW = 1340.2 g.mol⁻¹**H-D(tBu)-f-K(Alloc)-R(Pbf)-G-OH**¹⁸⁷**30**

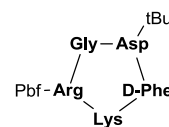
The linear decapeptide **30** was assembled on 2-chlorotriethylchloride[®] resin (450 mg, loading of 0.8 mmol/g) using the general procedure. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1:99). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (362 mg, 0.35 mmol).

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 11.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₈H₇₁N₉O₁₃SCalcd MW = 1014.2 g.mol⁻¹Found MW = 1043.9 g.mol⁻¹**c[-R(Pbf)-G-D(tBu)-f-K(Alloc)-]**¹⁸⁷**31**

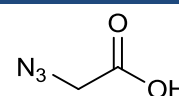
The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide **30** (362 mg, 0.35 mmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide as a white **31** solid powder (360 mg, 0.35 mmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 11.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₈H₆₉N₉O₁₂SCalcd MW = 996.2 g.mol⁻¹Found MW = 996.1 g.mol⁻¹**c[-R(Pbf)-G-D(tBu)-f-K-]**¹⁸⁷**32**

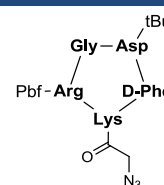
The peptide **31** (360 mg, 0.35 mmol) was dissolved in 35 mL of anhydrous CH₂Cl₂/DMF (3/1) under argon. 100 equiv of Phenylsilane and 0.2 equiv. Of Pd(PPh₃)₄ were added under argon. The reaction was stirred under argon for 30 min at room temperature. The mixture was treated with 2 mL of methanol before 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 **32** (266 mg, 0.28 mmol,) as a white powder. This material was further used without additional purification.

**Yield: 82%****RP-HPLC:** RT = 10.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₄H₆₅N₉O₁₀SCalcd MW = 912.1 g.mol⁻¹Found MW = 911.7 g.mol⁻¹

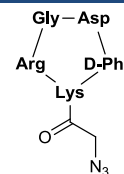
Acide azidoacetique

33

A solution of bromoacetic acid (1.00 g, 7.2 mmol) and 2 equiv. of NaN_3 (0.93 g, 14.3 mmol) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ (1/1) was stirred overnight at room temperature. The pH was adjusted to 2.5 with concentrated HCl before extraction with AcOEt. The organic phase was separated, washed with a saturated aqueous solution of NaCl, dried and concentrated to give compound **33** as viscous oil (0.62g, 6.0mmol).

Yield: 81%**MS (ESI-MS, negative mode):** $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_2$ Calcd MW = 101.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 100.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **^1H NMR (300 MHz, CDCl_3)** δ 3.89 (2H,s) **^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3)** δ 50.1 (C-2), 171.0 (C-1)c[-R(Pbf)-G-D(tBu)-f-K(COCH₂N₃)-] ¹⁸⁷**34**

2-azidoacetic acid **33** (30.3 mg, 0.3 mmol) and PyBOP (156 mg, 0.3 mmol) were added to a solution containing the crude peptide **32** (138 mg, 0.15 mmol) in 30 mL of DMF and DIPEA to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 30 min at room temperature and then concentrated under diminished pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound **34** as a white powder (145 mg, 0.15 mmol).

Yield: 96%**RP-HPLC:** RT = 11.1 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{46}\text{H}_{66}\text{N}_{12}\text{O}_{11}\text{S}$ Calcd MW = 995.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 995.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ c[-R-G-D-f-K(COCH₂N₃)-] ¹⁸⁷**35**

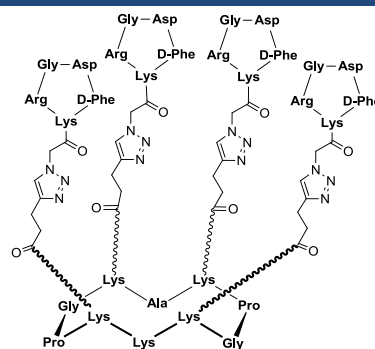
The cyclopeptide **34** (145 mg, 0.15 mmol) was dissolved in 5 mL of TFA/TIS/ H_2O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et_2O afforded the raw peptide as a white solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **35** as a white powder (70 mg, 0.1 mmol).

Yield: 66%**RP-HPLC:** RT = 5.9 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_{12}\text{O}_8$ Calcd MW = 686.7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 686.3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT4(c[-RGDfK-])triazole¹⁸⁷

36

The scaffold **29** (10 mg, 7.5 μmol) and 5 equiv. of c[-RGDfK(COCH₂N₃-)] **35** (25.6 mg, 37.3 μmol) and 10 equiv. of Cu(0) microsize powder were dissolved in 500 μL tBuOH/PBS buffer (6:4). The mixture was stirred for overnight at room temperature and then centrifuged for 5 min. The aqueous phase was removed, and the Cu(0) powder was washed with 500 μL of water and centrifuged. The light blue solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **36** as a white powder (20.5 mg, 5 μmol).



Yield: 67%

RP-HPLC: RT = 7.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₁₈₃H₂₆₉N₆₃O₄₆

Calcd MW = 4087.6 g.mol⁻¹

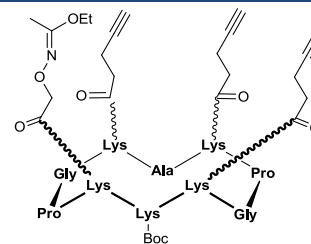
Found MW = 4086.4 g.mol⁻¹

cRAFT3(Alkyne)-1(Acetimidate)-NHBOc¹⁸⁷

37

The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotriylchloride[®] resin (150 mg, loading of 1.1 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5** and **7**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding 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). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **37** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (156 mg, 100 μmol).



Yield: Quantitative

RP-HPLC: RT = 9.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₇₃H₁₁₄N₁₆O₁₈

Calcd MW = 1503.82 g.mol⁻¹

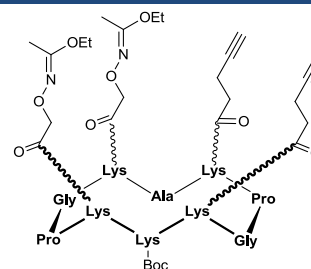
Found MW = 1503.5 g.mol⁻¹

cRAFT-2(Alkyne)-2(Acetimidate)-NHBOc¹⁸⁷

38

The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotriylchloride[®] resin (150 mg, loading of 1.1 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5** and **7**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding 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). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **38** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (148 mg, 95 μmol).



Yield: 95%

RP-HPLC: RT = 10.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₇₄H₁₁₉N₁₇O₂₀

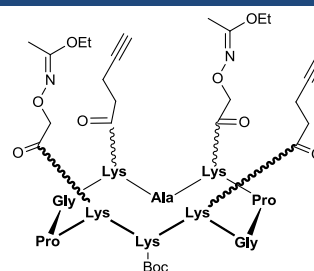
Calcd MW = 1566.9 g.mol⁻¹

Found MW = 1567.2 g.mol⁻¹

cRAFT-2(Alkyne)-2(Acetimidate)-NH_{Boc}¹⁸⁷**39**

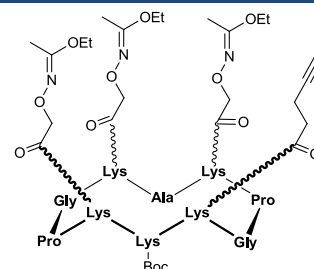
The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotriylchloride[®] resin (150 mg, loading of 1.1 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5** and **7**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2:1:7). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **39** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (148 mg, 95 μmol).

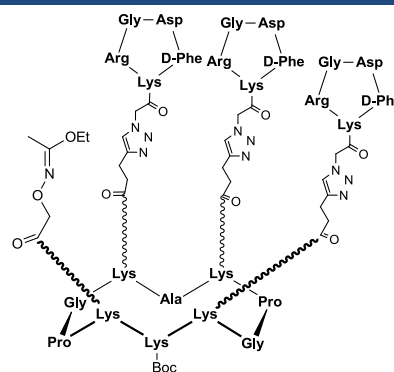
**Yield: 95%****RP-HPLC:** RT = 10.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₄H₁₁₉N₁₇O₂₀Calcd MW = 1566.9 g.mol⁻¹Found MW = 1567.2 g.mol⁻¹**cRAFT-1(Alkyne)-3(Acetimidate)-NH_{Boc}**¹⁸⁷**40**

The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotriylchloride[®] resin (150 mg, loading of 1.1 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5** and **7**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding 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). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **40** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (165 mg, 100 μmol).

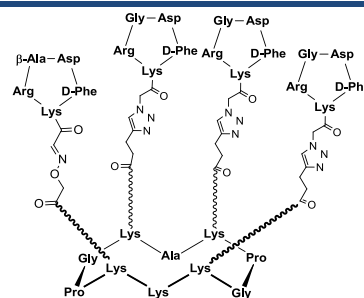
**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 10.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₅H₁₂₄N₁₈O₂₂Calcd MW = 1629.9 g.mol⁻¹Found MW = 1629.6 g.mol⁻¹**cRAFT3(c[-RGDfK-])_{triazole}-1(Acetimidate)-NH_{Boc}**¹⁸⁷**41**

The scaffold **37** (10 mg, 6.6 μmol) and 3.6 equiv. of c[-RGDfK(COCH₂N₃)-] **35** (16.3 mg, 23.8 μmol) and Cu(0) microsize powder were dissolved in 500 μL tBuOH/PBS buffer (6:4). The mixture was stirred for overnight at room temperature and then centrifuged for 5 min. The aqueous phase was removed, and the Cu(0) powder was washed with 500 μL of water and centrifuged. The light blue solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **41** as a white powder (15.3 mg, 4.3 μmol).

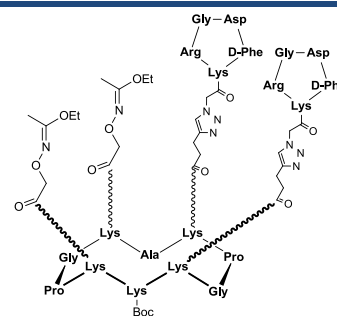
**Yield: 65%****RP-HPLC:** RT = 8.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₆₀H₂₄₀N₅₂O₄₂Calcd MW = 3564.0 g.mol⁻¹Found MW = 3564.0 g.mol⁻¹

cRAFT3(c[-RGDfK-])₃triazole-1(c[-RβADfK-])₃oxime-NH₂¹⁸⁷
42

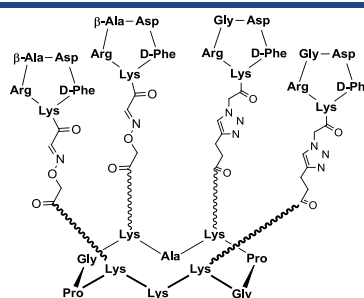
To a mixture of peptide **41** (15.3 mg, 4.3 μmol) and 1.5 equiv. of c[-RβADfK(COCHO)-] **24** (4.3 mg, 6.45 μmol) were added 500 μL TFA/Water (9:1) at room temperature. The reaction mixture was stirred 2 h and the solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **42** as a white powder (12.1 mg, 3 μmol).

**Yield: 70%****RP-HPLC:** RT = 7.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₈₁H₂₆₇N₆₁O₄₇Calcd MW = 4049.5 g.mol⁻¹Found MW = 4049.4 g.mol⁻¹
cRAFT2(c[-RGDfK-])₃triazole-2(Acetimidate)-NH₂Boc¹⁸⁷
43

The scaffold **38** (10 mg, 6.4 μmol) and 2.4 equiv. of c[-RGDfK(COCH₂N₃-)] **35** (10.5 mg, 15.4 μmol) and Cu(0) microsize powder were dissolved in 500 μL tBuOH/PBS buffer (6:4). The mixture was stirred for overnight at room temperature and then centrifuged for 5 min. The aqueous phase was removed, and the Cu(0) powder was washed with 500 μL of water and centrifuged. The light blue solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **43** as a white powder (13.1 mg, 4.5 μmol).

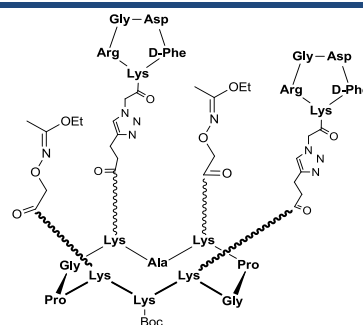
**Yield: 70 %****RP-HPLC:** RT = 9.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₃₂H₂₀₃N₄₁O₃₆Calcd MW = 2940.3 g.mol⁻¹Found MW = 2940.4 g.mol⁻¹
cRAFT2(c[-RGDfK-])₃triazole-2(c[-RβADfK-])₃oxime-NH₂¹⁸⁷
44

To a mixture of peptide **43** (13.1 mg, 4.5 μmol) and 3 equiv. of c[-RβADfK(COCHO)-] **24** (9.1 mg, 13.5 μmol) were added 500 μL TFA/Water (9:1) at room temperature. The reaction mixture was stirred 2 h and the solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **44** as a white powder (13.0 mg, 3.2 μmol).

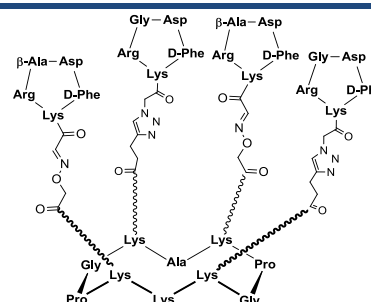
**Yield: 72%****RP-HPLC:** RT = 7.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₇₉H₂₆₅N₅₉O₄₈Calcd MW = 4011.5 g.mol⁻¹Found MW = 4011.1 g.mol⁻¹

cRAFT2(c[-RGDfK-])_{triazole}-2(Acetimidate)-NH_{Boc} ¹⁸⁷**45**

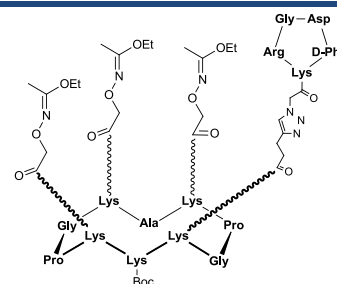
The scaffold **39** (10 mg, 6.4 μmol) and 2.4 equiv. of c[-RGDfK(COCH₂N₃-)] **35** (10.5 mg, 15.4 μmol) and Cu(0) microsize powder were dissolved in 500 μL tBuOH/PBS buffer (6:4). The mixture was stirred for overnight at room temperature and then centrifuged for 5 min. The aqueous phase was removed, and the Cu(0) powder was washed with 500 μL of water and centrifuged. The light blue solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **45** as a white powder (12.7 mg, 4.3 μmol).

**Yield: 68 %****RP-HPLC:** RT = 8.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₃₂H₂₀₃N₄₁O₃₆Calcd MW = 2940.3 g.mol⁻¹Found MW = 2940.4 g.mol⁻¹**cRAFT2(c[-RGDfK-])_{triazole}-2(c[-RβADfK-])_{oxime}-NH₂** ¹⁸⁷**46**

To a mixture of peptide **45** (12.7 mg, 4.3 μmol) and 3 equiv. of c[-RβADfK(COCHO)-] **24** (9.1 mg, 13.5 μmol) were added 500 μL TFA/Water (9:1) at room temperature. The reaction mixture was stirred 2 h and the solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **46** as a white powder (12.0 mg, 3.0 μmol).

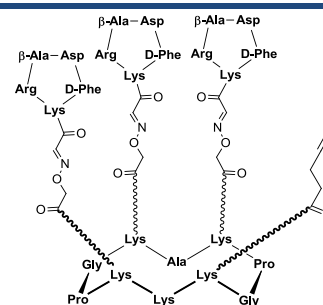
**Yield: 70%****RP-HPLC:** RT = 7.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₇₉H₂₆₅N₅₉O₄₈Calcd MW = 4011.5 g.mol⁻¹Found MW = 4011.1 g.mol⁻¹**cRAFT1(c[-RGDfK-])_{triazole}-3(Acetimidate)-NH_{Boc}** ¹⁸⁷**47**

The scaffold **40** (10 mg, 6.1 μmol) and 1.2 equiv. of c[-RGDfK(COCH₂N₃-)] **35** (5 mg, 7.4 μmol) and Cu(0) microsize powder were dissolved in 500 μL tBuOH/PBS buffer (6:4). The mixture was stirred for overnight at room temperature and then centrifuged for 5 min. The aqueous phase was removed, and the Cu(0) powder was washed with 500 μL of water and centrifuged. The light blue solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **47** as a white powder (10.5 mg, 4.5 μmol).

**Yield: 74%****RP-HPLC:** RT = 9.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₀₄H₁₆₆N₃₀O₃₀Calcd MW = 2316.6 g.mol⁻¹Found MW = 2316.7 g.mol⁻¹

cRAFT1(Alkyne)-3(c[-RβADfK-])_{oxime-NH₂}¹⁸⁷**48**

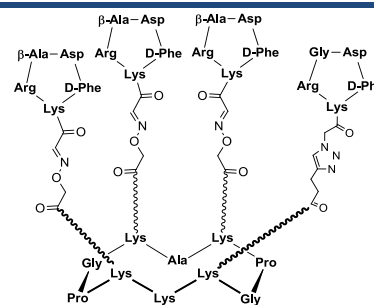
To a mixture of scaffold **40** (10 mg, 6.1 μmol) and 4.5 equiv. of c[-RβADfK(COCHO)-] **24** (18.9 mg, 27.6 μmol) were added 500 μL TFA/Water (9:1) at room temperature. The reaction mixture was stirred 2 h and the solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **48** as a white powder (13.8 mg, 4.2 μmol).

**Yield: 69%****RP-HPLC:** RT = 7.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₄₈H₂₂₁N₄₅O₄₁Calcd MW = 3286.7 g.mol⁻¹Found MW = 3287.0 g.mol⁻¹**cRAFT1(c[-RGDfK-])_{triazole}-3(c[-RβADfK-])_{oxime-NH₂}**¹⁸⁷**49**

The compound **49** was synthesized following two proceed:

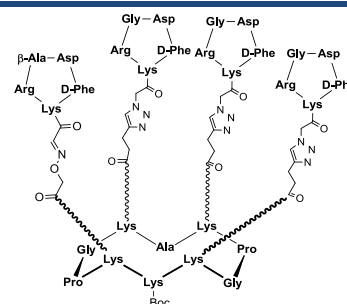
To a mixture of peptide **47** (10.5 mg, 4.5 μmol) and 4.5 equiv. of c[-RβADfK(COCHO)-] **24** (13.6 mg, 20.3 μmol) were added 500 μL TFA/Water (9:1) at room temperature. The reaction mixture was stirred 2 h and the solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **49** as a white powder (12.3 mg, 3.1 μmol, **69%**).

To a mixture of peptide **48** (13.8 mg, 4.2 μmol) and 1.2 equiv. of c[-RGDfK(COCH₂N₃-)] **35** (3.5 mg, 5.0 μmol) and Cu(0) microsize powder were added 500 μL tBuOH/PBS buffer (6:4). The mixture was stirred for overnight at room temperature and then centrifuged for 5 min. The aqueous phase was removed, and the Cu(0) powder was washed with 500 μL of water and centrifuged. The light blue solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **49** as a white powder (10.8 mg, 2.7 μmol, **65%**).

**RP-HPLC:** RT = 7.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₇₇H₂₆₃N₅₇O₄₉Calcd MW = 3973.4 g.mol⁻¹Found MW = 3973.6 g.mol⁻¹**cRAFT3(c[-RGDfK-])_{triazole}-1(c[-RβADfK-])_{oxime-NHBoc}**¹⁸⁷**50**

To a mixture of cyclic peptide **37** (5 mg, 3.3 μmol), 3.6 equiv. of c[-RGDfK(COCH₂N₃-)] **35** (8.2 mg, 12 μmol) and 1.5 equiv. of c[-RβADfK(COCHO)-] **24** (3.4 mg, 5.0 μmol) were added 500 μL tBuOH/H₂O/TFA (50:45:5) and 1 equiv. of Cu(0) microsize powder at room temperature.

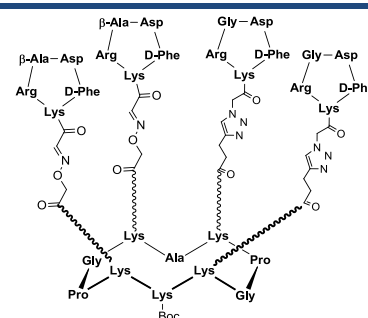
The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The pH was adjusted to 7-8 by addition of DIPEA and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was centrifuged for 5 min and the light blue solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound (9.4 mg, 2.2 μmol).

**Yield: 68%****RP-HPLC:** RT = 7.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₈₆H₂₇₅N₆₁O₄₉Calcd MW = 4149.6 g.mol⁻¹Found MW = 4149.6 g.mol⁻¹

cRAFT2(c[-RGDfK-])_{triazole-2}(c[-RβADfK-])_{oxime-NHBoc}¹⁸⁷
51

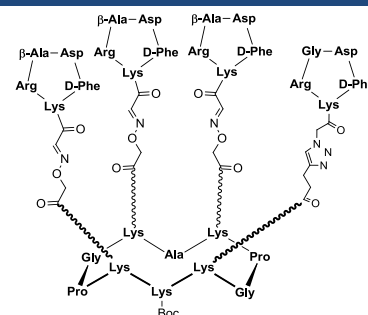
To a mixture of cyclic peptide **38** (5 mg, 3.3 μmol), 2.4 equiv. of c[-RGDfK(COCH₂N₃-)] **35** (5.3 mg, 7.6 μmol) and 3 equiv. of c[-RβADfK(COCHO-)] **24** (6.7 mg, 9.9 μmol) were added 500 μL tBuOH/H₂O/TFA (50:45:5) and 1 equiv. of Cu(0) microsize powder at room temperature.

The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The pH was adjusted to 7-8 by addition of DIPEA and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was centrifuged for 5 min and the light blue solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **51** (8.0 mg, 1.9 μmol).

**Yield: 61%****RP-HPLC:** RT = 7.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₈₄H₂₇₃N₅₉O₅₀Calcd MW = 4111.6 g.mol⁻¹Found MW = 4111.4 g.mol⁻¹
cRAFT2(c[-RGDfK-])_{triazole-3}(c[-RβADfK-])_{oxime-NHBoc}¹⁸⁷
52

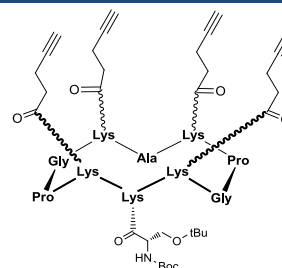
To a mixture of cyclic peptide **40** (5 mg, 3.1 μmol), 1.2 equiv. of c[-RGDfK(COCH₂N₃-)] **35** (5.3 mg, 3.7 μmol) and 4.5 equiv. of c[-RβADfK(COCHO-)] **24** (9.4 mg, 14.0 μmol) were added 500 μL tBuOH/H₂O/TFA (50:45:5) and 1 equiv. of Cu(0) microsize powder at room temperature.

The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The pH was adjusted to 7-8 by addition of DIPEA and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was centrifuged for 5 min and the light blue solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **52** (7.9 mg, 1.9 μmol).

**Yield: 63%****RP-HPLC:** RT = 7.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₈₂H₂₇₁N₅₇O₅₁Calcd MW = 4073.5 g.mol⁻¹Found MW = 4073.6 g.mol⁻¹
cRAFT4(Alkyne)-(Boc-Ser(tBu))²⁰⁰
53

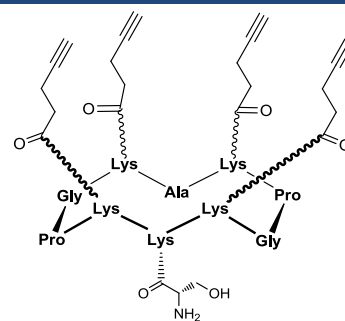
The linear peptide was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5** and **2**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2:1:7). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **53** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (161 mg, 100 μmol).

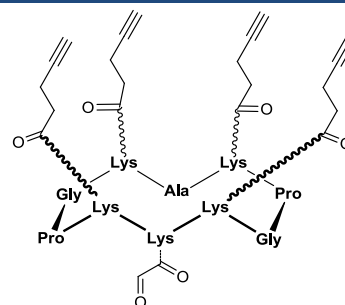
**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 10.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₉H₁₂₂N₁₆O₁₈Calcd MW = 1584.0 g.mol⁻¹Found MW = 1584.0 g.mol⁻¹

cRAFT4(Alkyne)-(Ser)²⁰⁰**54**

The cyclopeptide **53** (161 mg, 100 μ mol) was dissolved in 10 mL of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the raw peptide as a white solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **54** as a white powder (143 mg, 100 μ mol).

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 9.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₀H₁₀₆N₁₆O₁₆Calcd MW = 1427.7 g.mol⁻¹Found MW = 1428.0 g.mol⁻¹cRAFT4(Alkyne)-(COCHO)²⁰⁰**55**

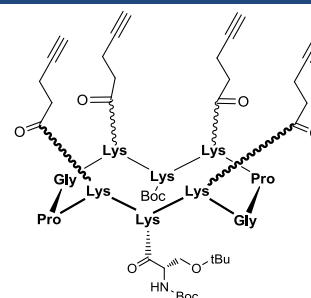
Peptide **54** (143 mg, 100 μ mol) and 10 equiv. of NaIO₄ (215 mg, 1000 μ mol) were dissolved in water at 10⁻² M. The mixture was stirred for 20 min at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclopeptide **55** as a white powder (72 mg, 48 μ mol).

**Yield: 48%****RP-HPLC:** RT = 9.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₆₉H₁₀₁N₁₅O₁₆Calcd MW = 1396.7 g.mol⁻¹Found MW = 1396.6 g.mol⁻¹

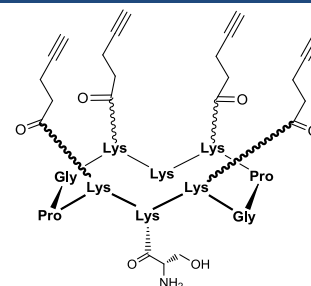
cRAFT4(Alkyne)-(Boc-Ser(tBu))-NH_{Boc}²⁰⁰**56**

The linear peptide was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5** and **2**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding 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). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

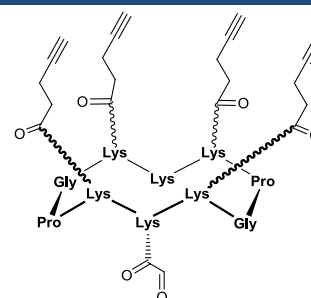
The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **56** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (167 mg, 96 μmol).

**Yield: 96%****RP-HPLC:** RT = 11.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₈₇H₁₃₇N₁₇O₂₀Calcd MW = 1741.2 g.mol⁻¹Found MW = 1740.9 g.mol⁻¹**cRAFT4(Alkyne)-(Ser)-NH₂**²⁰⁰**57**

The cyclopeptide **56** (167 mg, 96 μmol) was dissolved in 10 mL of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the raw peptide as a white solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **57** as a white powder (142 mg, 96 μmol).

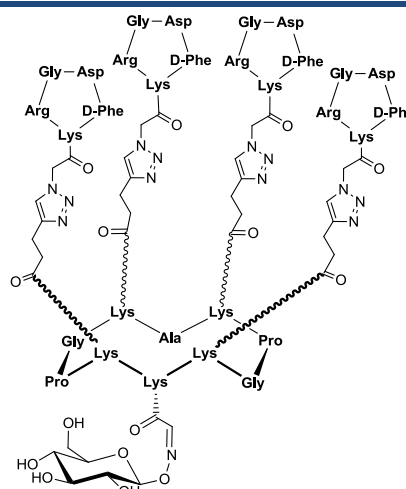
**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 7.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₃H₁₁₃N₁₇O₁₆Calcd MW = 1484.8 g.mol⁻¹Found MW = 1484.6 g.mol⁻¹**cRAFT4(Alkyne)-(COCHO)-NH₂**²⁰⁰**58**

Peptide **57** (142 mg, 96 μmol) and 10 equiv. of NaIO₄ (205 mg, 960 μmol) were dissolved in water at 10⁻² M. The mixture was stirred for 20 min at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclopeptide **58** as a white powder (60 mg, 41 μmol).

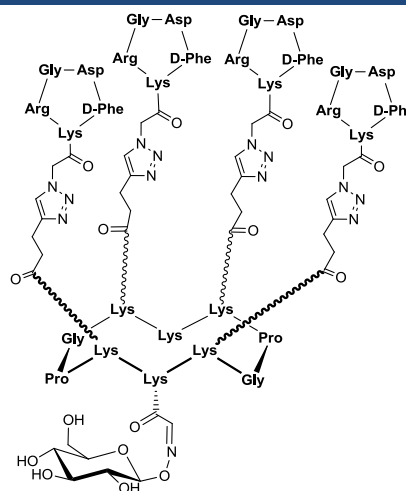
**Yield: 43%****RP-HPLC:** RT = 8.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₂H₁₀₈N₁₆O₁₆Calcd MW = 1453.8 g.mol⁻¹Found MW = 1453.8 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{triazole}-(β -D-Glucose)_{oxime}²⁰⁰**59**

To a solution containing the cyclodecapeptide **55** (5 mg, 3.5 μ mol) in 500 μ L tBuOH/H₂O/AcOH (50:45:5) were added 3 equiv. of Glc-ONH₂ (2mg, 10.2 μ mol). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. Then, the pH was adjusted to 8 by addition of a NaHCO₃ solution (10%) and 6 equiv. of c[-RGDfK(COCH₂N₃)-] **35** (14mg, 20.4 μ mol) and 5 equiv. of Cu(0) microsize powder were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and centrifuged for 5 min. The solution was then purified by RP-HPLC to give the desired compound **59** (9.8 mg, 2.3 μ mol).

**Yield: 64%****RP-HPLC:** RT = 6.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₉₁H₂₈₀N₆₄O₅₃Calcd MW = 4320.8 g.mol⁻¹Found MW = 4320.5 g.mol⁻¹cRAFT4(c[-RGDfK-])_{triazole}-(β -D-Glucose)_{oxime}-NH₂²⁰⁰**60**

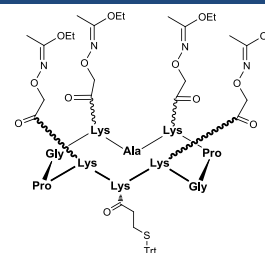
To a solution containing the cyclodecapeptide **58** (5 mg, 3.4 μ mol) in 500 μ L tBuOH/H₂O/AcOH (50:45:5) were added 3 equiv. of Glc-ONH₂ (2mg, 10.2 μ mol). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. Then, the pH was adjusted to 8 by addition of a NaHCO₃ solution (10%) and 6 equiv. of c[-RGDfK(COCH₂N₃)-] **35** (14mg, 20.4 μ mol) and 5 equiv. of Cu(0) microsize powder were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and centrifuged for 5 min. The solution was then purified by RP-HPLC to give the desired compound **60** (8.7 mg, 2 μ mol).

**Yield: 58%****RP-HPLC:** RT = 9.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₉₄H₂₈₇N₆₅O₅₃Calcd MW = 4377.85 g.mol⁻¹Found MW = 4377.7 g.mol⁻¹

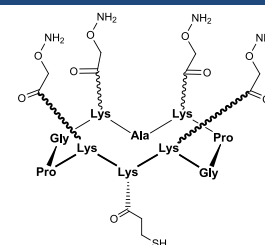
cRAFT4(Acetimidate)-(S-Trt)**61**

The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotriylchloride[®] resin (150 mg, loading of 1.1 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5** and **11**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding 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). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

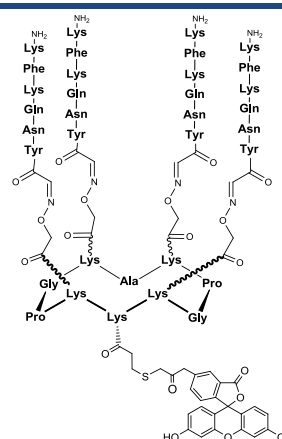
The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **61** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (165 mg, 88 μmol).

**Yield: 88%****RP-HPLC:** RT = 11.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₉₃H₁₃₉N₁₉O₂₃SCalcd MW = 1923.3 g.mol⁻¹Found MW = 1923.8 g.mol⁻¹**cRAFT4(OH₂)-(SH)****62**

The cyclopeptide **61** (165 mg, 88 μmol) was dissolved in 10 mL of TFA/H₂O/TIS/MeONH₂ (80/10/5/5) solution. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the raw peptide as a white solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **62** as a white powder (50 mg, 36 μmol).

**Yield: 41%****RP-HPLC:** RT = 8.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₅₈H₁₀₁N₁₉O₁₉SCalcd MW = 1400.6 g.mol⁻¹Found MW = 1400.0 g.mol⁻¹**cRAFT4(H₂-6)_{N-oxime}-(Fluorescein)_{thioether}****63**

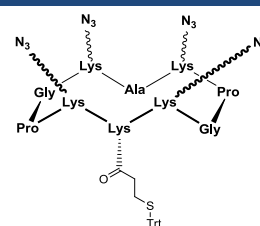
To a solution containing the cyclodecapeptide **62** (5 mg, 3.5 μmol) in 500 μL AcOH/H₂O/CH₃CN (5:50:45) were added 6 equiv. peptide aldehyde **103** (18.9 mg, 21.5 μmol) under inert atmosphere. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. Then, the pH was adjusted to 7 by addition of a NaHCO₃ solution (10%) and 1.2 equiv. of 5-(Iodoacetamido)fluorescein (2.1 mg, 4.2 μmol) and 20 equiv. of TCEP were added. The reaction mixture was stirred 1 h at room temperature and the solution was directly purified by RP-HPLC to give the desired compound **63** (8.7 mg, 2 μmol).

**Yield: 58%****RP-HPLC:** RT = 12.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₄₄H₃₄₂N₆₄O₆₅SCalcd MW = 5243.9 g.mol⁻¹Found MW = 5244.4 g.mol⁻¹

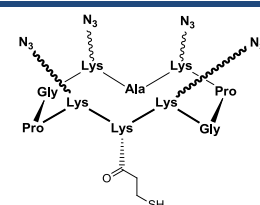
cRAFT4(N₃)-(S-Trt)**64**

The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotriethylchloride[®] resin (150 mg, loading of 1.1 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **9** and **11**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding 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). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

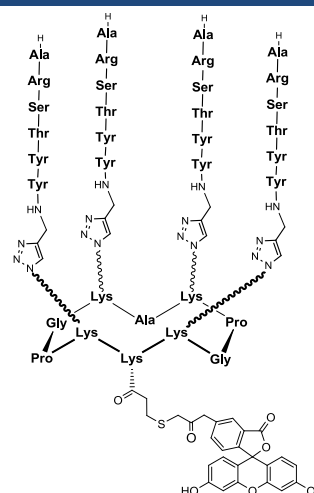
The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **64** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (132 mg, 91 μmol).

**Yield: 91%****MS (ESI-MS, positive mode):**C₆₉H₉₅N₂₃O₁₁SCalcd MW = 1454.7 g.mol⁻¹Found MW = 1454.1 g.mol⁻¹**cRAFT4(N₃)-(SH)****65**

The cyclopeptide **64** (132 mg, 91 μmol) was dissolved in 10 mL of TFA/H₂O/TIS/ (90/5/5) solution. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the raw peptide as a white solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **65** as a white powder (56 mg, 46 μmol).

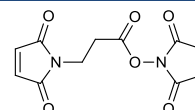
**Yield: 51 %****RP-HPLC:** RT = 9.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₅₀H₈₁N₂₃O₁₁SCalcd MW = 1212.4 g.mol⁻¹Found MW = 1211.8 g.mol⁻¹**cRAFT4(H3-6)_C-triazole-(Fluorescein)thioether****66**

To a solution containing the cyclodecapeptide **65** (5 mg, 4.1 μmol) in 500 μL of aqueous buffer tBuOH/H₂O (40:60, Ammonium Acetate 100mM pH 7.2) were added 1.2 equiv. of 5-(Iodoacetamido) fluorescein (2.5 mg, 5 μmol). The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature under inert atmosphere. Then, 6 equiv. of peptide containing alkyne **116** (19.6 mg, 24.6 μmol) and 5 equiv. of Cu(0) microsize powder were added. The reaction mixture was stirred 5 h at 50°C and the solution was directly purified by RP-HPLC to give the desired compound **66** (7.7 mg, 1.6 μmol).

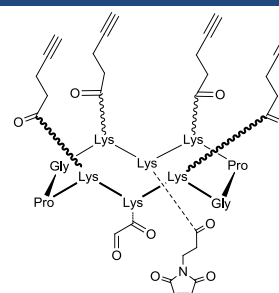
**Yield: 39%****RP-HPLC:** RT = 11.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₂₀H₃₀₂N₆₄O₅₇SCalcd MW = 4787.3 g.mol⁻¹Found MW = 4787.2 g.mol⁻¹

Succinimido 3-maleimido-propionate**67**

β -Alanine (2.7 g, 30 mmol) was added to a solution of maleic anhydride (2.9 g, 30 mmol) in 30 mL of DMF and the mixture was stirred for 2 h. The resulting solution was cooled in an ice bath and N-hydroxysuccinimide (4.2 g, 37 mmol) was added followed by DCC (12.9 g, 63 mmol). After 5 min, the ice bath was removed and the solution was vigorously stirred overnight. The white precipitate formed was filtered, washed with 5 mL of DMF and the filtrate was poured onto ice. The white precipitate formed in the water was filtered, washed with 10 mL of H₂O and dried in vacuum to give succinimido 3-maleimido-propionate **67** (4.5 g, 17.1 mmol).

**Yield: 57%****MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₁H₁₀N₂O₆Calcd MW = 266.2 g.mol⁻¹Found MW = 266.6 g.mol⁻¹**¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆):**
 δ 2.79 (4H,s), 3.04 (2H,t, J = 7 Hz), 3.74 (2H, t, J = 7 Hz), 7.04 (2H, s)
cRAFT4(Alkyne)-(COCHO)-(Maleimide)**68**

The purified peptide **58** (20 mg, 13.7 μ mol) was dissolved in 1 mL of aqueous buffer CH₃CN/H₂O (40:60, phosphate 100mM pH 7.2) and 3 equiv. of 3-maleimido-propionate **67** (11 mg, 41 μ mol) was added to this solution. The mixture was stirred for 1 h at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC. After lyophilization, the scaffold **68** was obtained as a white powder (15.8 mg, 9.8 μ mol).

**Yield: 72%****RP-HPLC:** RT = 17.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₉H₁₁₃N₁₇O₁₉Calcd MW = 1604.88 g.mol⁻¹Found MW = 1605.0 g.mol⁻¹**KLAKLAK peptide****69**

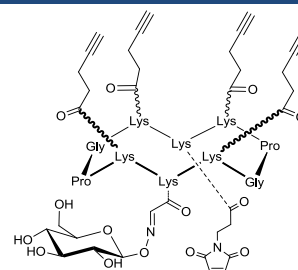
H-Cys-Gly-Gly-Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys-Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys-NH₂

The linear peptide **69** was assembled on Rink-amide resin (300 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure set. Peptide was released from the resin using a solution of TFA/EDT/TIS/H₂O (90:5:2.5:2.5) for 3 h. The product **69** was purified by RP-HPLC and obtained after lyophilization as a white powder (159.5 mg, 60.0 μ mol).

Yield: 29%**RP-HPLC:** RT = 16.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₉H₁₅₀N₂₄O₁₇SCalcd MW = 1739.1 g.mol⁻¹Found MW = 1739.5 g.mol⁻¹

cRAFT4(Alkyne)-(β -D-Glucose)_{oxime}-(Maleimide)**70**

To a mixture of cyclodecapeptide scaffold **68** (3.2 mg, 2 μ mol) dissolved in 2 mL of aqueous buffer CH₃CN/H₂O (40:60, 100mM phosphate pH 2.2) were added 3 equiv. of compound Glc- β -ONH₂ (1.2 mg, 6 μ mol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature afforded the intermediate **70**.



RP-HPLC: RT = 17.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

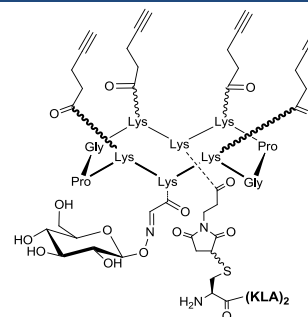
C₈₅H₁₂₄N₁₈O₂₄

Calcd MW = 1782.0 g.mol⁻¹

Found MW = 1782.1 g.mol⁻¹

cRAFT4(Alkyne)-(β -D-Glucose)_{oxime}-(KLA)_{thioether}**71**

The pH was adjusted to 7.2 by addition of NaHCO₃ solution (10%) follow by the addition of 1.3 equiv. of KLA peptide **69**. The reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature and the total conversion of **70** was followed by HPLC afforded the intermediate **71**



RP-HPLC: RT = 17.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

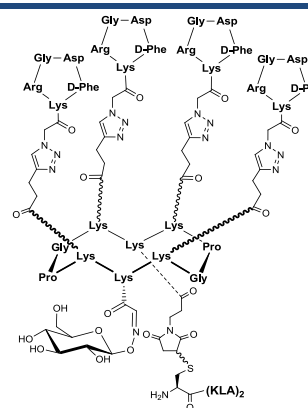
C₁₆₄H₂₇₄N₄₂O₄₁S

Calcd MW = 3522.3 g.mol⁻¹

Found MW = 3522.4 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{triazole}-(β -D-Glucose)_{oxime}-(KLA)_{thioether}**72**

To the precedent mixture, 6 equiv of c[-RGDfK(COCH₂N₃)-] **35** dissolved in 500 μ L tBuOH/H₂O (4:6, 100mM Phosphate pH 7) and Cu(0) microsize powder (5 equiv) were added to mixture containing **71**. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and the total conversion was followed by HPLC. The mixture was centrifuged for 5 min and the solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **72** (6.7 mg, 1.08 μ mol)



Yield: 54%

RP-HPLC: RT = 15.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₂₈₀H₄₄₂N₉₀O₇₃

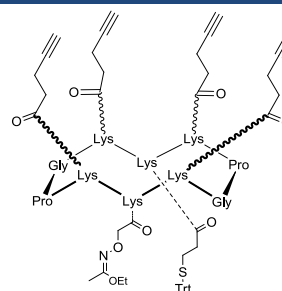
Calcd MW = 6269.3 g.mol⁻¹

Found MW = 6269.5 g.mol⁻¹

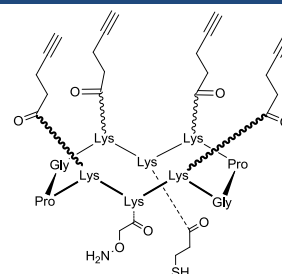
cRAFT4(Alkyne)-(Acetimidate)-(STrt)**73**

The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (150 mg, loading of 1.1 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5**, **7** and **11**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding 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). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

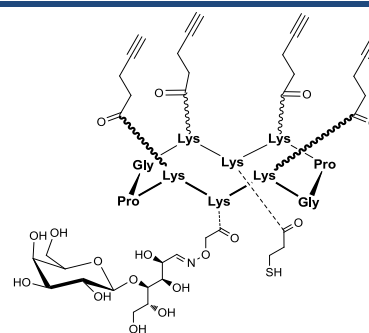
The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **73** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (161 mg, 86 μmol).

**Yield: 86%****MS (ESI-MS, positive mode):**C₉₈H₁₃₅N₁₇O₁₈SCalcd MW = 1871.3 g.mol⁻¹Found MW = 1871.8 g.mol⁻¹**cRAFT4(Alkyne)-(ONH₂)-(SH)****74**

The cyclopeptide **73** (161 mg, 86 μmol) was dissolved in 10 mL of TFA/H₂O/TIS/MeONH₂ (80/10/5/5) solution. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the raw peptide as a white solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **74** as a white powder (49 mg, 31 μmol).

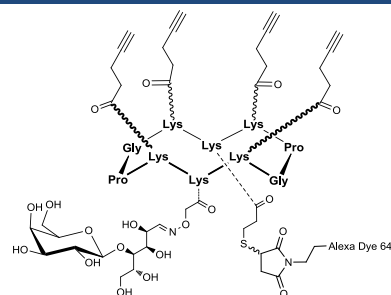
**Yield: 36%****RP-HPLC:** RT = 15.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₅H₁₁₅N₁₇O₁₇SCalcd MW = 1558.9 g.mol⁻¹Found MW = 1558.9 g.mol⁻¹**cRAFT4(Alkyne)-(β-D-Lactose)_{oxime}-(SH)****75**

To a mixture of cyclodecapeptide scaffold **74** (3.1 mg, 2 μmol) dissolved in 2 mL CH₃CN/H₂O (100mM Ammonium Acetate pH 4.5) were added compound 5equiv. of lactose (3.4 mg, 10 μmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 5 h at 50°C affording the intermediate **75**.

**RP-HPLC:** RT = 15.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₈₇H₁₃₅N₁₇O₂₇SCalcd MW = 1883.2 g.mol⁻¹Found MW = 1883.1 g.mol⁻¹

cRAFT4(Alkyne)-(β -D-Lactose)_{oxime}-(Alexa⁶⁴⁷)_{thioether}**76**

The pH of the mixture containing **75** was adjusted to 7.2 by addition of NaHCO₃ solution (10%) follow by the addition of Alexa Fluor[®] 647 C₂-maleimide (1.3 equiv). The reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature afforded the intermediate **76**.



RP-HPLC: RT = 14.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

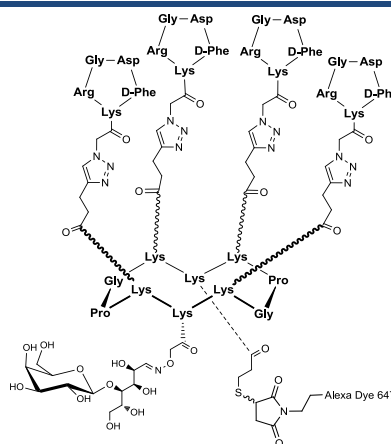
MS (ESI-MS, positive mode):

Calcd MW = 2864.1 g.mol⁻¹

Found MW = 2865.0 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{triazole}-(β -D-Lactose)_{oxime}-(Alexa⁶⁴⁷)_{thioether}**77**

To the precedent mixture, 6 equiv of c[-RGDfK(COCH₂N₃)-] **35** dissolved in 500 μ L tBuOH/H₂O (4:6, 100mM Phosphate pH 7) and Cu(0) microsize powder (5 equiv) were added to mixture containing **76**. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and the total conversion was followed by HPLC. The mixture was centrifuged for 5 min and the solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **77** (3.6 mg, 0.64 μ mol).



Yield: 32 %

RP-HPLC: RT = 14.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

Calcd MW = 5612,0 g.mol⁻¹

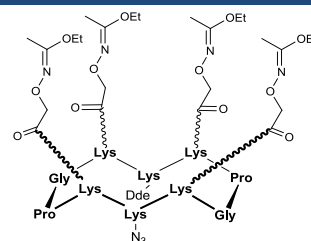
Found MW = [M+Na]⁺ 5635.2 g.mol⁻¹

[M+K]⁺ 5650.8 g.mol⁻¹

cRAFT4(Acetimidate)-(N₃)-(Dde)**78**

The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotriylchloride[®] resin (150 mg, loading of 1.1 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5**, **9** and Fmoc-Lys(Dde)-OH. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding 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). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **78** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (167 mg, 91 μ mol).



Yield: 91%

MS (ESI-MS, positive mode):

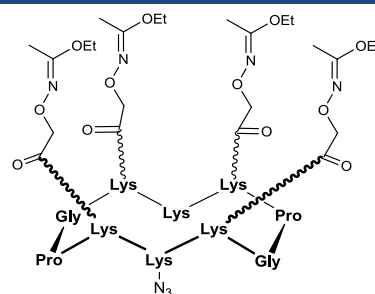
C₈₄H₁₃₈N₂₂O₂₄

Calcd MW = 1840.2 g.mol⁻¹

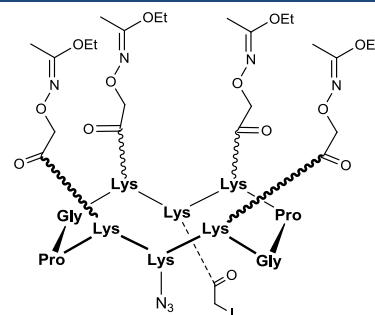
Found MW = 1840.5 g.mol⁻¹

cRAFT4(Acetimidate)-(N₃)-NH₂**79**

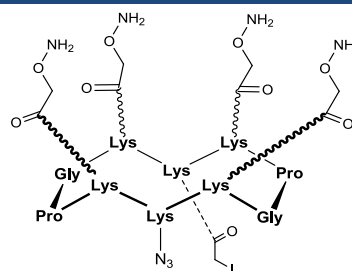
The cyclopeptide **78** (167 mg, 91 μmol) was dissolved in 20 mL of Hydrazine/DMF (2:98) solution. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded peptide **79** as a white solid powder (134 mg, 80 μmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: 88 %****RP-HPLC:** RT = 9.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₄H₁₂₆N₂₂O₂₂Calcd MW = 1676.0 g.mol⁻¹Found MW = 1676.2 g.mol⁻¹**cRAFT4(Acetimidate)-(N₃)-(COCH₂I)****80**

The purified peptide **79** (134 mg, 80 μmol) was dissolved in 10 mL of aqueous buffer CH₃CN/H₂O (40:60, 100mM phosphate pH 7.2) and 3 equiv. of Iodoacetic acid N-hydroxysuccinimide ester (67 mg, 240 μmol) was added to this solution. The mixture was stirred for 2 h at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC. After lyophilization, the scaffold **80** was obtained as a white powder (82.5 mg, 44.8 μmol).

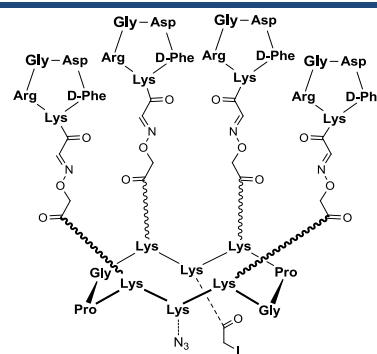
**Yield: 56 %****RP-HPLC:** RT = 10.6 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₆H₁₂₇I N₂₂O₂₃Calcd MW = 1843.9 g.mol⁻¹Found MW = 1843.9 g.mol⁻¹**cRAFT4(OH₂)-(N₃)-(COCH₂I)****81**

The cyclopeptide **80** (40 mg, 21.8 μmol) was dissolved in 10 mL of TFA/H₂O/TIS/MeONH₂ (80/10/5/5) solution. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the raw peptide as a white solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **81** as a white powder (12.9 mg, 8.3 μmol).

**Yield: 38%****RP-HPLC:** RT = 7.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₆₀H₁₀₃I N₂₂O₁₉Calcd MW = 1563.5 g.mol⁻¹Found MW = 1564.0 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime}-(N₃)-(COCH₂I)**82**

To a mixture of cyclic peptide **80** (3.7 mg, 2 μmol), 5 equiv. of c[-RGDFK(COCHO)-] **23** (6.7 mg, 10 μmol) were added 2 mL CH₃CN/H₂O/TFA (50:45:5) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 1 h afforded the intermediate **82**.



RP-HPLC: RT = 10.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

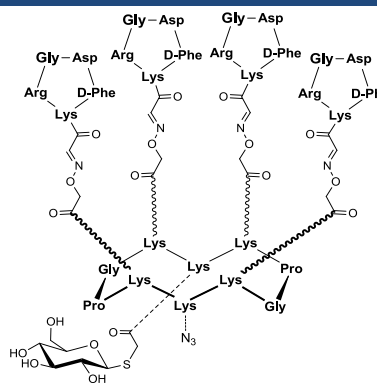
C₁₇₆H₂₅₉N₅₈O₅₁

Calcd MW = 4130.3 g.mol⁻¹

Found MW = 4130.1 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime}-(N₃)-(β-D-ThioglucoSe)_{thioether}**83**

The pH of the mixture containing **82** was adjusted to 7.2 by addition of NaHCO₃ solution (10%) follow by the addition of 2 equiv. β-D-ThioglucoSe (0.9 mg, 4 μmol). The reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature afforded the intermediate **83**.



RP-HPLC: RT = 9.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₁₈₂H₂₇₀N₅₈O₅₆S

Calcd MW = 4198.6 g.mol⁻¹

Found MW = 4198.5 g.mol⁻¹

CpG-alkyne**84**

Synthesis of ODNs was carried out on an ABI 3400 DNA synthesizer (Applied Biosystems) by using standard β-cyanoethyl nucleoside phosphoramidite chemistry at 1 μM scale. The ODNs were 5'-modified by incorporating during the last step of the automated synthesis Hexynyl Phosphoramidite (purchase from Glen Research, Sterling, Virginia). Once synthesized the modified protected oligonucleotides were cleaved from the solid support and released into solution by treatment with 28% aqueous ammonia (1.5 mL) for 16 h at 55°C. After purification on RP-HPLC, the pure ODN-alkyne was obtained (0.56 μmol).

Yield: 56%

RP-HPLC: RT = 15.9 min (C₁₈, 260 nm, 0-40% B in 30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

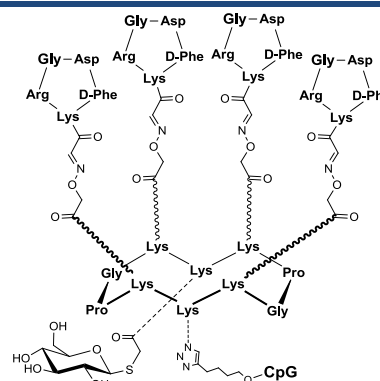
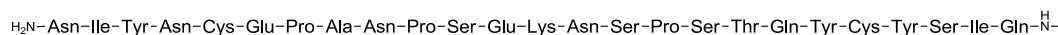
C₂₀₀H₂₅₇N₆₇O₁₂₅P₂₀

Calcd MW = 6219.1 g.mol⁻¹

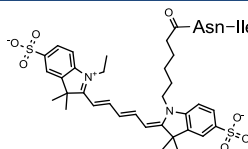
Found MW = 6218.8 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDFK-])oxime-(CpG)triazole-(β-D-Thioglucose)thioether**85**

The purified oligonucleotide-alkyne **84** (0.2 μmol) and Cu(0) microsize powder (5 equiv.) was dissolved in 100 μL of aqueous buffer tBuOH/H₂O (50:50). 250 μL of the precedent solution containing **83** (0.25 μmol) was added to this solution and the reaction mixture was stirred 5 h at 50°C. After completion of conversion, the mixture was centrifuged for 5 min and the solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **13** (1.2 mg, 0.12 μmol).

**Yield: 59 %****RP-HPLC:** RT = 20.5 min (C₁₈, 260 nm, 0-40% B in 30 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₃₈₂H₅₂₇N₁₂₅O₁₈₁P₂₀SCalcd MW = 10417.7 g.mol⁻¹Found MW = 10417.9 g.mol⁻¹**Linear CD20 epitope on resin****86**

The linear peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure.

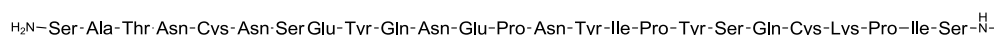
Linear Cy5-CD20 epitope**87**

20 mg of resin containing peptide **86** was solved in 500 μL of DMF, adjusted with DIPEA to pH 9, and CyTM 5 Mono NHS Ester (2 mg, 2.6 μmol) was added to the resin solution. The mixture was stirred for 24 h at room temperature and the resin was washed with DMF and DCM. The peptide was released from the resin using 1 mL cleavage solution of TFA/TIS/H₂O/DIOD (94/2/2/2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a blue solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **87** as a white powder (5.1 mg, 1.5 μmol).

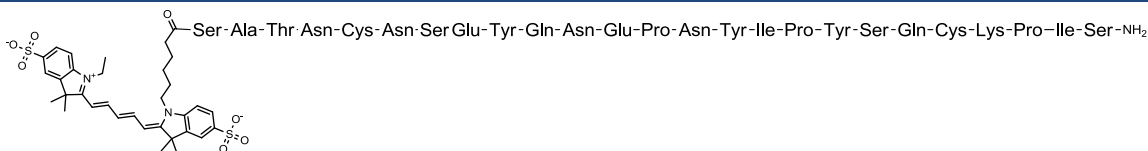
Yield: 57%**RP-HPLC:** RT = 7.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₅₄H₂₂₀N₃₅O₅₀S₄Calcd MW = 3489.93 g.mol⁻¹Found MW = 3489.0 g.mol⁻¹

Cy5-CD20 epitope**88**

The purified peptide **87** (5.1 mg, 1.5 μmol) was dissolved at 10^{-3}M in aqueous buffer $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (40:60, 100mM Ammonium Bicarbonate pH 8). The reaction was vigorously stirred overnight without cap and the formation of the disulfure bond was followed by HPLC. The reaction mixture was lyophilised and afforded the compound **88** (5.1 mg, 1.5 μmol).

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 6.0 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{154}\text{H}_{218}\text{N}_{35}\text{O}_{50}\text{S}_4$ Calcd MW = 3487.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 3787.0 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **Linear control peptide on resin****89**

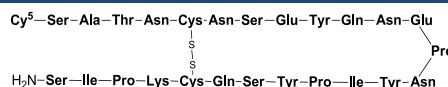
The linear peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure.

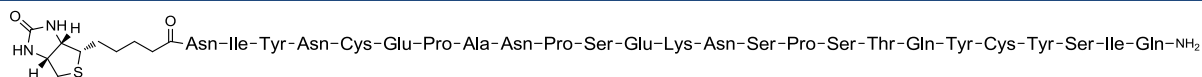
Linear Cy5-control peptide**90**

20 mg of resin containing peptide **89** was solved in 500 μL of DMF, adjusted with DIPEA to pH 9, and Cy^{TM} 5 Mono NHS Ester (2 mg, 2.6 μmol) was added to the resin solution. The mixture was stirred for 24 h at room temperature and the resin was washed with DMF and DCM. The peptide was released from the resin using 1mL cleavage solution of TFA/TIS/ H_2O /DIOD (94/2/2/2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et_2O afforded the peptide as a blue solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **90** as a white powder (4.5 mg, 1.3 μmol).

Yield: 49%**RP-HPLC:** RT = 7.1 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{154}\text{H}_{220}\text{N}_{35}\text{O}_{50}\text{S}_4$ Calcd MW = 3489.93 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 3489.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **Cy5-control peptide****91**

The purified peptide **90** (4.5 mg, 1.3 μmol) was dissolved at 10^{-3}M in aqueous buffer $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (40:60, 100mM Ammonium Bicarbonate pH 8). The reaction was vigorously stirred overnight without cap and the formation of the disulfure bond was followed by HPLC. The reaction mixture was lyophilised and afforded the compound **91** (4.5 mg, 1.3 μmol).

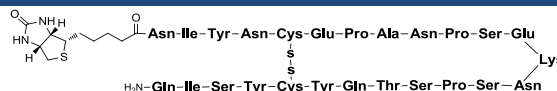
**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 6.0 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{154}\text{H}_{218}\text{N}_{35}\text{O}_{50}\text{S}_4$ Calcd MW = 3487.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 3487.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Linear Biot-CD20 epitope**92**

20 mg of resin containing peptide **86** was solved in 500 μ L of DMF, adjusted with DIPEA to pH 9. Then, PyBOP (15.6 mg, 30 μ mol) and Biotine (7.3 mg, 30 μ mol) were added to the resin solution. The mixture was stirred for 2 h at room temperature and the resin was washed with DMF and DCM. The peptide was released from the resin using 1 mL cleavage solution of TFA/TIS/H₂O/DIOD (94/2/2/2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **92** as a white powder (12.6 mg, 4.1 μ mol).

Yield: 48%**RP-HPLC:** RT = 6.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**

C₁₃₁H₁₉₅N₃₅O₄₅S₃
 Calcd MW = 3076.4 g.mol⁻¹
 Found MW = 3076.0 g.mol⁻¹

Biot-CD20 epitope**93**

The purified peptide **92** (12.6 mg, 4.1 μ mol) was dissolved at 10⁻³M in aqueous buffer CH₃CN/H₂O (40:60, 100mM Ammonium Bicarbonate pH 8). The reaction was vigorously stirred overnight without cap and the formation of the disulfure bond was followed by HPLC. The reaction mixture was lyophilised and afforded the compound **93** (13.6 mg (salt), 4.1 μ mol).

Yield: Quantitative**RP-HPLC:** RT = 6.6 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**

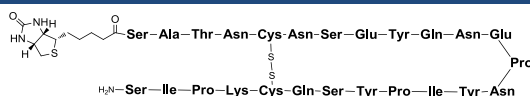
C₁₃₁H₁₉₃N₃₅O₄₅S₃
 Calcd MW = 3074.4 g.mol⁻¹
 Found MW = 3074.2 g.mol⁻¹

Linear Biot-control peptide**94**

20 mg of resin containing peptide **89** was solved in 500 μ L of DMF, adjusted with DIPEA to pH 9. Then, PyBOP (15.6 mg, 30 μ mol) and Biotine (7.3 mg, 30 μ mol) were added to the resin solution. The mixture was stirred for 2 h at room temperature and the resin was washed with DMF and DCM. The peptide was released from the resin using 1 mL cleavage solution of TFA/TIS/H₂O/DIOD (94/2/2/2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **94** as a white powder (10.4 mg, 3.4 μ mol).

Yield: 39%**RP-HPLC:** RT = 6.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**

C₁₃₁H₁₉₅N₃₅O₄₅S₃
 Calcd MW = 3076.4 g.mol⁻¹
 Found MW = 3075.9 g.mol⁻¹

Biot-control peptide**95**

The purified peptide **94** (10.4 mg, 3.4 μmol) was dissolved at 10^{-3}M in aqueous buffer $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (40:60, 100mM Ammonium Bicarbonate pH 8). The reaction was vigorously stirred overnight without cap and the formation of the disulfure bond was followed by HPLC. The reaction mixture was lyophilised and afforded the compound **95** (10.5 mg (salt), 3.4 μmol).

Yield: Quantitative**RP-HPLC:** RT = 6.4 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{131}\text{H}_{193}\text{N}_{35}\text{O}_{45}\text{S}_3$ Calcd MW = 3074.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 3073.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **H2-6****96**

The peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/ H_2O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et_2O afforded the peptide as a white powder This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **96** as a white powder (58.6 mg, 71 μmol).

 $\text{H-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Lys-NH}_2$ **Yield: 71%****RP-HPLC:** RT = 4.8 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{39}\text{H}_{59}\text{N}_{11}\text{O}_9$ Calcd MW = 825.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 825.5 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **H3-6****97**

The peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/ H_2O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et_2O afforded the peptide as a white powder This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **97** as a white powder (49.3 mg, 65 μmol).

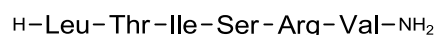
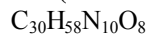
 $\text{H-Ala-Arg-Ser-Thr-Tyr-Tyr-NH}_2$ **Yield: 65%****RP-HPLC:** RT = 5.1 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{N}_{10}\text{O}_{10}$ Calcd MW = 758.8 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 758.5 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **LA-6****98**

The peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/ H_2O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et_2O afforded the peptide as a white powder This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **98** as a white powder (48.4 mg, 72 μmol).

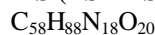
 $\text{H-Gly-Val-Pro-Val-Arg-Phe-NH}_2$ **Yield: 72%****RP-HPLC:** RT = 5.3 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_6$ Calcd MW = 672.8 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 672.5 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

LB-6**99**

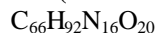
The peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/H₂O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **99** as a white powder (46.7 mg, 68 μmol).

**Yield: 68%****RP-HPLC:** RT = 5.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**Calcd MW = 686.8 g.mol⁻¹Found MW = 686.5 g.mol⁻¹**H2-12****100**

The peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/H₂O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **100** as a white powder (78.7 mg, 58 μmol).

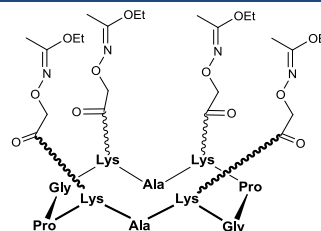
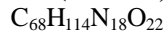
Yield: 58%**RP-HPLC:** RT = 5.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**Calcd MW = 1357.5 g.mol⁻¹Found MW = 1357.8 g.mol⁻¹**H3-12****101**

The peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/H₂O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **101** as a white powder (88 mg, 62 μmol).

Yield: 62%**RP-HPLC:** RT = 6.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**Calcd MW = 1429.5 g.mol⁻¹Found MW = 1429.2 g.mol⁻¹**cRAFT 4(Acetimidate)****102**

The linear peptide was assembled on 2-chlorotriylchloride[®] resin (150 mg, loading of 1.1 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding 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). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **102** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (125 mg, 81 μmol).

**Yield: 81%****RP-HPLC:** RT = 8.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**Calcd MW = 1535.8 g.mol⁻¹Found MW = 1535.5 g.mol⁻¹

H2-6(COCHO)**103**

The peptide was assembled on Rink amide resin (450 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and Boc-Ser(tBu)-OH introduced in N-Term side. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/H₂O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. A serine oxidation of derivative peptide (10⁻² M) by an aqueous solution containing 10 equiv of NaIO₄ afforded the aldehyde-containing peptide **103**. The product was directly purified by RP-HPLC to yield compound **103** as a white powder (75 mg, 85 μmol).

**Yield: 29%****RP-HPLC:** RT = 4.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**

C₄₁H₅₉N₁₁O₁₁
 Calcd MW = 882.0 g.mol⁻¹
 Found MW = 882.3 g.mol⁻¹

H3-6(COCHO)**104**

The peptide was assembled on Rink amide resin (450 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and Boc-Ser(tBu)-OH introduced in N-Term side. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/H₂O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. A serine oxidation of derivative peptide (10⁻² M) by an aqueous solution containing 10 equiv of NaIO₄ afforded the aldehyde-containing peptide **104**. The product was directly purified by RP-HPLC to yield compound **104** as a white powder (80 mg, 99 μmol).

**Yield: 33%****RP-HPLC:** RT = 5.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**

C₃₆H₅₀N₁₀O₁₂
 Calcd MW = 814.9 g.mol⁻¹
 Found MW = 815.3 g.mol⁻¹

Control(COCHO)**105**

The peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and Boc-Ser(tBu)-OH introduced in N-Term side. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/H₂O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. A serine oxidation of derivative peptide (10⁻² M) by an aqueous solution containing 10 equiv of NaIO₄ afforded the aldehyde component **105**. The product was directly purified by RP-HPLC to yield compound **105** as a white powder (110 mg, 125 μmol).

**Yield: 42%****RP-HPLC:** RT = 4.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**

C₄₁H₅₉N₁₁O₁₁
 Calcd MW = 882.0 g.mol⁻¹
 Found MW = 882.5 g.mol⁻¹

H2-12(COCHO)**106**

The peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and Boc-Ser(tBu)-OH introduced in N-Term side. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/H₂O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. A serine oxidation of derivative peptide (10⁻² M) by an aqueous solution containing 10 equiv of NaIO₄ afforded the aldehyde component **106**. The product was directly purified by RP-HPLC to yield compound **106** as a white powder (45 mg, 32 μmol).

Yield: 32%**RP-HPLC:** RT = 5.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**

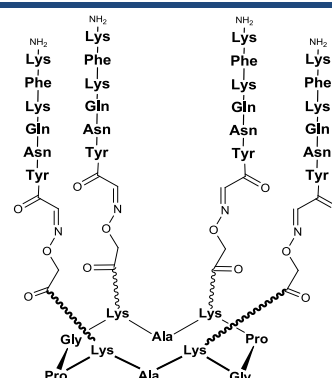
C₆₀H₈₈N₁₈O₂₂
 Calcd MW = 1413.5 g.mol⁻¹
 Found MW = 1413.9 g.mol⁻¹

H2-12(COCHO)**107**

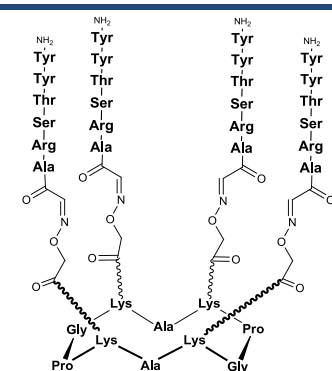
The peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and Boc-Ser(tBu)-OH introduced in N-Term side. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/H₂O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. A serine oxidation of derivative peptide (10⁻² M) by an aqueous solution containing 10 equiv of NaIO₄ afforded the aldehyde component **107**. The product was directly purified by RP-HPLC to yield compound **107** as a white powder (48 mg, 33 μmol).

**Yield: 33%****RP-HPLC:** RT = 6.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₆₈H₉₂N₁₆O₂₂Calcd MW = 1485.6 g.mol⁻¹Found MW = 1486.0 g.mol⁻¹**cRAFT4(H2-6)_{oxime}****108**

The scaffold **102** (4 mg, 2.6 μmol) and 6 equiv. of aldehyde containing peptide **103** (13.8 mg, 15.6 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/CH₃CN/H₂O (5/45/50) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **108** as a white powder (6.6 mg, 1.4 μmol).

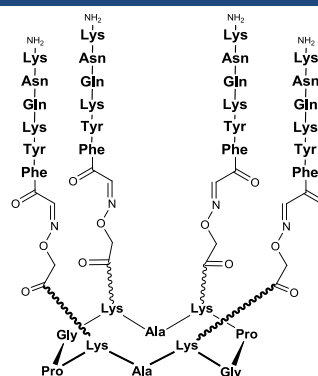
**Yield: 54%****RP-HPLC:** RT = 5.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₁₆H₃₁₈N₆₂O₅₈Calcd MW = 4711.3 g.mol⁻¹Found MW = 4711.4 g.mol⁻¹**cRAFT4(H3-6)_{oxime}****109**

The scaffold **102** (4 mg, 2.6 μmol) and 6 equiv. of aldehyde containing peptide **104** (12.7 mg, 15.6 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/CH₃CN/H₂O (5/45/50) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **109** as a white powder (5.5 mg, 1.2 μmol).

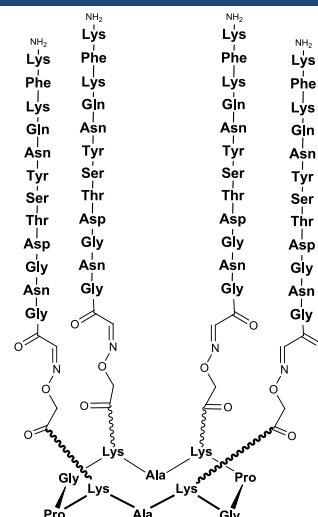
**Yield: 48%****RP-HPLC:** RT = 6.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₉₆H₂₈₂N₅₈O₆₂Calcd MW = 4442.8 g.mol⁻¹Found MW = 4443.1 g.mol⁻¹

cRAFT4(control)_{oxime}**110**

The scaffold **102** (4 mg, 2.6 μmol) and 6 equiv. of aldehyde containing peptide **105** (13.8 mg, 15.6 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/CH₃CN/H₂O (5/45/50) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **110** as a white powder (6.6 mg, 1.4 μmol).

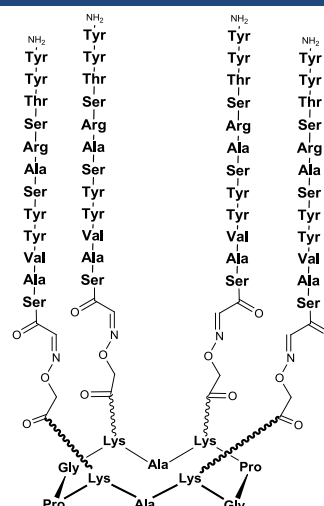
**Yield: 56%****RP-HPLC:** RT = 5.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₁₆H₃₁₈N₆₂O₅₈Calcd MW = 4711.3 g.mol⁻¹Found MW = 4711.4 g.mol⁻¹cRAFT4(H2-12)_{oxime}**111**

The scaffold **102** (4 mg, 2.6 μmol) and 6 equiv. of aldehyde containing peptide **106** (22.0 mg, 15.6 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/CH₃CN/H₂O (5/45/50) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **111** as a white powder (8.1 mg, 1.2 μmol).

**Yield: 46%****RP-HPLC:** RT = 5.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₉₂H₄₃₄N₉₀O₁₀₂Calcd MW = 6837.3 g.mol⁻¹Found MW = 6837.8 g.mol⁻¹

cRAFT4(H3-12)_{oxime}112

The scaffold **102** (4 mg, 2.6 μmol) and 6 equiv. of aldehyde-containing peptide **107** (23.2 mg, 15.6 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/CH₃CN/H₂O (5/45/50) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **112** as a white powder (9.1 mg, 1.3 μmol).



Yield: 49%

RP-HPLC: RT = 7.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₃₂₄H₄₅₀N₈₂O₁₀₂

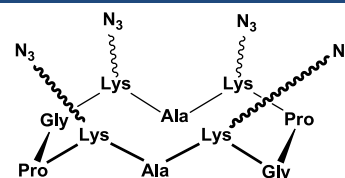
Calcd MW = 7125.7 g.mol⁻¹

Found MW = 7125.4 g.mol⁻¹

cRAFT4(N₃)113

The linear peptide was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (150 mg, loading of 0.8 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **9**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1:99). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide as a white solid powder after precipitation in Et₂O. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **113** as a white powder (56 mg, 53 μmol).



Yield: 53%

RP-HPLC: RT = 8.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₄₄H₇₀N₂₂O₁₀

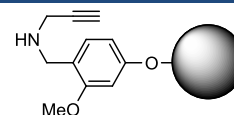
Calcd MW = 1067.2 g.mol⁻¹

Found MW = 1067.5 g.mol⁻¹

Propargylamine modified resin

114

500 mg of FMPB resin (loading of 0.8 mmol/g, Novabiochem) were pre-swell in DMF for 1 h. 10 equiv. of propargylamine (220 mg, 4 mmol) and 10 equiv. of NaBH₃CN (250 mg, 4 mmol) dissolved in AcOH/DMF (5:95) were added to the resin. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Then, the resin was washed with DMF, DIPEA 10% in DMF and DCM and dried.



C-Term alkyne-H2-6**115**

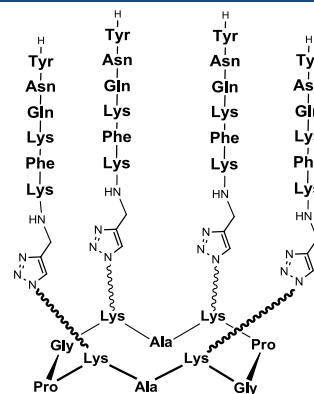
The peptide was assembled on resin **114** (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. The anchoring of the first amino acid was performed overnight using 5 equiv. of Fmoc-Lys-OH and 5 equiv. of PyAOP. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/H₂O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **115** as a white powder (25 mg, 30 μmol).

**Yield: 30%****RP-HPLC:** RT = 5.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₂H₆₁N₁₁O₉Calcd MW = 864.0 g.mol⁻¹Found MW = 864.3 g.mol⁻¹**C-Term alkyne-H3-6****116**

The peptide was assembled on resin **114** (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. The anchoring of the first amino acid was performed overnight using 5 equiv. of Fmoc-Lys-OH and 5 equiv. of PyAOP. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/H₂O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **116** as a white powder (45 mg, 56 μmol).

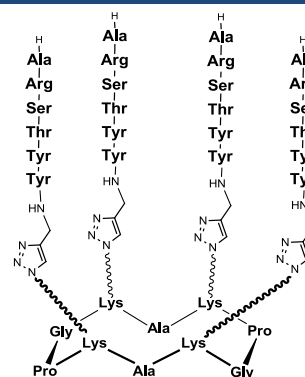
**Yield: 56%****RP-HPLC:** RT = 5.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₃₇H₅₂N₁₀O₁₀Calcd MW = 796.9 g.mol⁻¹Found MW = 796.5 g.mol⁻¹**cRAFT4(H2-6)C-triazole****117**

The scaffold **113** (5 mg, 4.7 μmol) and 6 equiv. of alkyne-containing peptide **115** (24.3 mg, 28.2 μmol), 1 equiv. of CuSO₄ and 1 equiv. of sodium ascorbate were dissolved in 500 μL tBuOH/PBS buffer (6:4). The mixture was stirred at 70 °C for 30 min under microwave. The solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **117** as a white powder (8.2 mg, 1.8 μmol).

**Yield: 39%****RP-HPLC:** RT = 5.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₁₂H₃₁₄N₆₆O₄₆Calcd MW = 4523.3 g.mol⁻¹Found MW = 4523.4 g.mol⁻¹

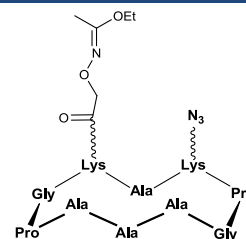
cRAFT4(H3-6)_C-triazole**118**

The scaffold **113** (5 mg, 4.7 μmol) and 6 equiv. of alkyne-containing peptide **116** (22.5 mg, 28.2 μmol), 1 equiv. of CuSO₄ and 1 equiv. of sodium ascorbate were dissolved in 500 μL tBuOH/PBS buffer (6:4). The mixture was stirred at 70 °C for 30 min under microwave. The solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **118** as a white powder (9.0 mg, 2.1 μmol).

**Yield: 45%****RP-HPLC:** RT = 6.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₉₂H₂₇₈N₆₂O₅₀Calcd MW = 4254.7 g.mol⁻¹Found MW = 4257.8 g.mol⁻¹cRAFT(Acetimidate)-(N₃)**119**

The linear peptide was assembled on 2-chlorotriylchloride[®] resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **5**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding 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). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **119** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (90 mg, 88 μmol).

**Yield: 88%****RP-HPLC:** RT = 9.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₄H₇₁N₁₅O₁₃Calcd MW = 1018.2 g.mol⁻¹Found MW = 1018.5 g.mol⁻¹

N-Term alkyne-H2-6

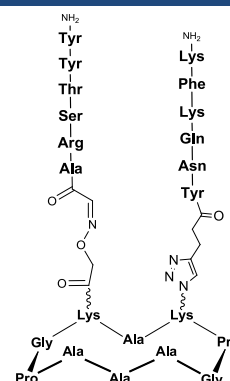
120

The peptide was assembled on resin Rink amide (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and propanoic acid. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/TIS/H₂O (96:2:2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a white powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **120** as a white powder (52 mg, 58 μmol).

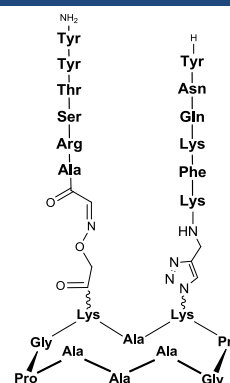
**Yield: 58%****RP-HPLC:** RT = 5.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₄H₆₃N₁₁O₁₀Calcd MW = 906.0 g.mol⁻¹Found MW = 905.6 g.mol⁻¹

cRAFT(H3-6)_{oxime}-(H2-6)_N-triazole**121**

To a solution containing the cyclodecapeptide **119** (5 mg, 4.9 μmol) in 500 μL tBuOH/H₂O/TFA (50:45:5) were added 1.5 equiv. of aldehyde-containing peptide **104** (6.0 mg, 7.3 μmol). The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. Then, the pH was adjusted to 8 by addition of a NaHCO₃ solution (10%) and 1.5 equiv. of alkyne-peptide **120** (6.6 mg, 7.3 μmol) and 5 equiv. of Cu(0) microsize powder were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and centrifuged for 5 min. The solution was then purified by RP-HPLC to give the desired compound **121** (8.2 mg, 3.1 μmol).

**Yield: 63%****RP-HPLC:** RT = 5.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₂₀H₁₇₆N₃₆O₃₃Calcd MW = 2650.9 g.mol⁻¹Found MW = 2650.6 g.mol⁻¹cRAFT(H3-6)_{oxime}-(H2-6)_C-triazole**122**

To a solution containing the cyclodecapeptide **119** (5 mg, 4.9 μmol) in 500 μL tBuOH/H₂O/TFA (50:45:5) were added 1.5 equiv. of aldehyde-containing peptide **104** (6.0 mg, 7.3 μmol). The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. Then, the pH was adjusted to 8 by addition of a NaHCO₃ solution (10%) and 1.5 equiv. of alkyne-peptide **115** (6.3 mg, 7.3 μmol) and 5 equiv. of Cu(0) microsize powder were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and centrifuged for 5 min. The solution was then purified by RP-HPLC to give the desired compound **122** (7.4 mg, 2.9 μmol).

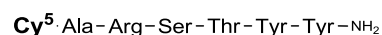
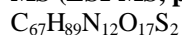
**Yield: 58%****RP-HPLC:** RT = 6.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₁₈H₁₇₄N₃₆O₃₂Calcd MW = 2608.9 g.mol⁻¹Found MW = 2608.6 g.mol⁻¹**H2-6-Cy5****123**

The linear peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. 20 mg of resin containing peptide was solved in 500 μL of DMF, adjusted with DIPEA to pH 9, and CyTM 5 Mono NHS Ester (0.5 mg, 650 μmol) was added to the resin solution. The mixture was stirred for 24 h at room temperature and the resin was washed with DMF and DCM. The peptide was released from the resin using 1 mL cleavage solution of TFA/TIS/H₂O/DIOD (94/2/2/2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a blue solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **123** as a white powder (609 μg , 416 nmol).

Cy⁵-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Lys-NH₂**Yield: 64%****RP-HPLC:** RT = 6.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₂H₉₈N₁₃O₁₆S₂Calcd MW = 1465.8 g.mol⁻¹Found MW = 1465.8 g.mol⁻¹

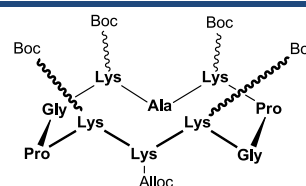
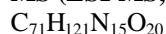
H3-6-Cy5**124**

The linear peptide was assembled on Rink amide resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. 20 mg of resin containing peptide was solved in 500 μL of DMF, adjusted with DIPEA to pH 9, and CyTM 5 Mono NHS Ester (1 mg, 1.3 μmol) was added to the resin solution. The mixture was stirred for 24 h at room temperature and the resin was washed with DMF and DCM. The peptide was released from the resin using 1 mL cleavage solution of TFA/TIS/H₂O/DIOD (94/2/2/2). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O afforded the peptide as a blue solid powder. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **124** as a white powder (1328 μg , 950 nmol).

**Yield: 73%****RP-HPLC:** RT = 8.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**Calcd MW = 1398.6 g.mol⁻¹Found MW = 1398.9 g.mol⁻¹**cRAFT4(Boc)-(Alloc)****125**

The linear peptide was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (150 mg, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1:99). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

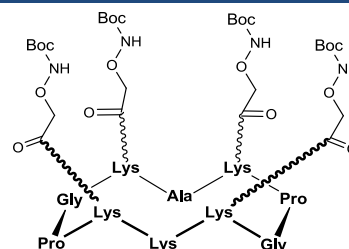
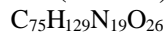
The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **125** as a white solid powder after precipitation in Et₂O (155 mg, 100 μmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 12.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**Calcd MW = 1503.9 g.mol⁻¹Found MW = 1504.1 g.mol⁻¹**cRAFT4(ONHBoc)-NH₂****126**

The cyclopeptide **125** (155 mg, 100 μmol) was dissolved in 30 mL of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O.

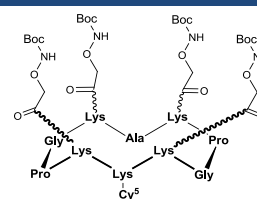
The crude peptide was dissolved in 30 mL of DMF and the pH was adjusted to 8 using DIPEA. Then, 6 equiv BocNHCH₂COOH (115 mg, 600 μmol) and PyBOP (313 mg, 600 μmol) were added to this solution. The reaction was stirred for 30 min at room temperature and then concentrated under diminished pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield peptide as a white powder.

Then, Alloc group was removed using the procedure as described above affording the crude product **126** which was purified by RP-HPLC (82 mg, 48 μmol).

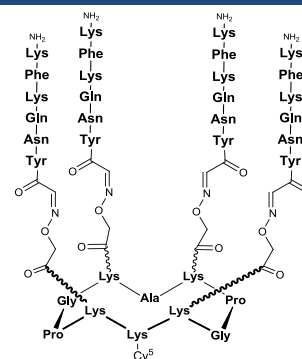
**Yield: 48%****RP-HPLC:** RT = 9.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**Calcd MW = 1713.0 g.mol⁻¹Found MW = 1712.2 g.mol⁻¹

cRAFT4(ONHBoc)-Cy5**127**

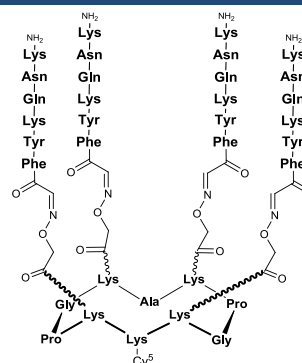
The peptide **126** (5.0 mg, 2.9 μmol) was dissolved in 1 mL of anhydrous DMF and the pH adjusted with DIPEA to pH 9. The solution was added to CyTM 5 Mono NHS Ester (2 mg, 2.6 μmol) and stirred for 3 h at room temperature. The product was then purified by RP-HPLC affording the fluorescent peptide **127** as a deep blue solid powder (4.6 mg, 2.0 μmol).

**Yield: 75%****RP-HPLC:** RT = 10.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{108}\text{H}_{168}\text{N}_{21}\text{O}_{33}\text{S}_2$ Calcd MW = 2352.8 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 2352.7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **cRAFT4(H2-6)_{N-oxime}-Cy5****128**

The scaffold **127** (1.2 mg, 0.5 μmol) and 6 equiv. of aldehyde containing peptide **103** (2.6 mg, 3 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/H₂O (70/30) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **128** as a white powder (2080 μg , 384 μmol).

**Yield: 76 %****RP-HPLC:** RT = 9.0 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{252}\text{H}_{364}\text{N}_{65}\text{O}_{65}\text{S}_2$ Calcd MW = 5408.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 5408.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **cRAFT4(control)_{N-oxime}-Cy5****129**

The scaffold **127** (1.2 mg, 0.5 μmol) and 6 equiv. of aldehyde containing peptide **105** (2.6 mg, 3 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/H₂O (70/30) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **129** as a white powder (680 μg , 125 nmol).

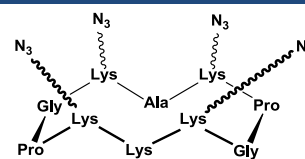
**Yield: 25 %****RP-HPLC:** RT = 8.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{252}\text{H}_{364}\text{N}_{65}\text{O}_{65}\text{S}_2$ Calcd MW = 5408.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 5408.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT4(N₃)-NH₂**130**

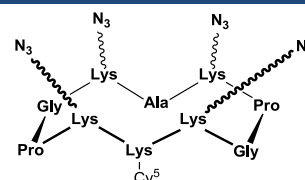
The linear peptide was assembled on 2-chlorotriylchloride[®] resin (150 mg, loading of 0.8 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **9**. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1:99). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with Et₂O.

The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide as a white solid powder after precipitation in Et₂O

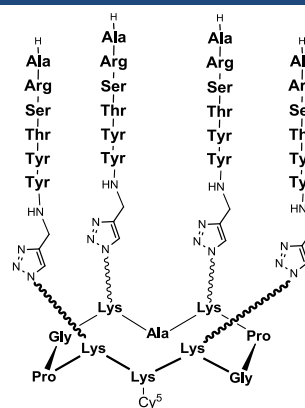
The cyclopeptide was dissolved in 30 mL of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitate from Et₂O. This crude material was purified by RP-HPLC affording the pure product **130** as a white powder (56 mg, 58 μmol).

**Yield: 58%****RP-HPLC:** RT = 8.6 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₇H₇₇N₂₃O₁₀Calcd MW = 1124.3 g.mol⁻¹Found MW = 1124.8 g.mol⁻¹**cRAFT4(N₃)-Cy5****131**

The scaffold **130** (4.0 mg, 3.5 μmol) was dissolved in 1 mL of anhydrous DMF and the pH adjusted with DIPEA to pH 9. The solution was added to CyTM 5 Mono NHS Ester (2 mg, 2.6 μmol) and stirred for 3 h at room temperature. The product was then purified by RP-HPLC affording the fluorescent peptide **127** as a deep blue solid powder (3.4 mg, 1.9 μmol).

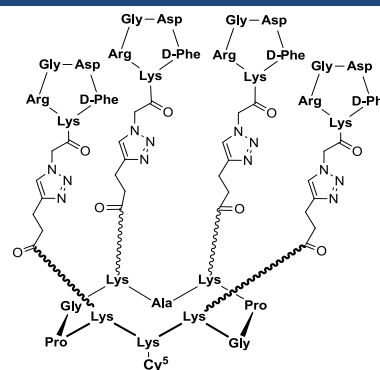
**Yield: 73%****RP-HPLC:** RT = 9.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₈₀H₁₁₆N₂₅O₁₇S₂Calcd MW = 1764.1 g.mol⁻¹Found MW = 1764.4 g.mol⁻¹**cRAFT4(H3-6)_C-triazole-Cy5****132**

The scaffold **131** (0.8 mg, 0.5 μmol) and 6 equiv. of alkyne-containing peptide **116** (2.4 mg, 3 μmol), 1 equiv. of CuSO₄ and 1 equiv. of sodium ascorbate were dissolved in 500 μL tBuOH/PBS buffer (6:4). The mixture was stirred at 70 °C for 30 min under microwave. The solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **132** as a blue powder (270 μg, 55 nmol).

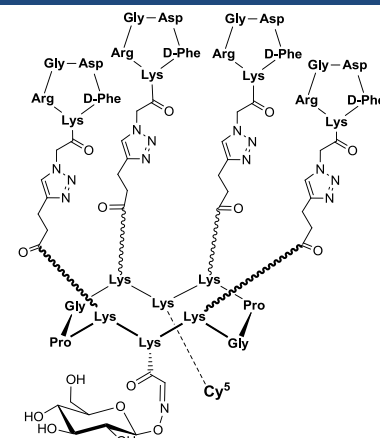
**Yield: 11%****RP-HPLC:** RT = 8.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₂₈H₃₂₄N₆₅O₅₇S₂Calcd MW = 4951.6 g.mol⁻¹Found MW = 4951.6 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDFK-])_{triazole}-Cy5²⁰⁰**133**

The peptide **36** (3.0 mg, 0.73 μmol) was dissolved in 1 mL of anhydrous DMF and the pH adjusted with DIPEA to pH 9. The solution was added to CyTM 5 Mono NHS Ester (0.54 mg, 0.73 μmol) and stirred for 3 h at room temperature. The product was then purified by RP-HPLC affording the fluorescent peptide **133** as a deep blue solid powder (2.5 mg, 0.53 μmol).

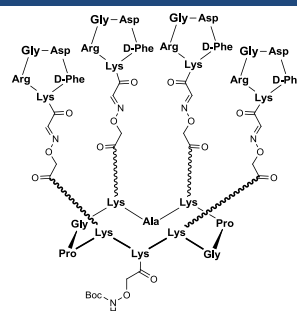
**Yield: 73%****RP-HPLC:** RT = 7.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₁₆H₃₀₈N₆₅O₅₃S₂Calcd MW = 4727.39 g.mol⁻¹Found MW = 4727.4 g.mol⁻¹cRAFT4(c[-RGDFK-])_{triazole}-(β -D-Glucose)_{oxime}-Cy5²⁰⁰**134**

The peptide **60** (7.0 mg, 1.59 μmol) was dissolved in 1 mL of anhydrous DMF and the pH adjusted with DIPEA to pH 8. The solution was added to CyTM 5 Mono NHS Ester (1.2 mg, 1.59 μmol) and stirred for 3 h at room temperature. The product was then purified by RP-HPLC affording the fluorescent peptide **134** as a deep blue solid powder (5.77 mg, 1.14 μmol).

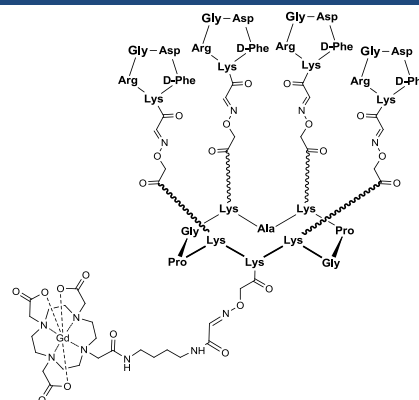
**Yield: 72%****RP-HPLC:** RT = 7.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₂₇H₃₂₄N₆₇O₆₀S₂Calcd MW = 5015.65 g.mol⁻¹Found MW = 5016.7 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime} COCH₂ONH₂-Boc**135**

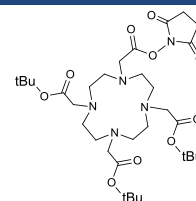
The peptide **25** (30 mg, 7.7 μmol) was dissolved in 1 mL of anhydrous DMF and the pH adjusted with DIPEA to pH 9. To this solution, 1.5 equiv. of Boc-amino-oxyacetic NHS Ester (3.4 mg, 11.6 μmol) were added and the reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The product was then purified by RP-HPLC affording the peptide **135** as a white solid powder (24.5 mg, 6.0 μmol).

**Yield: 78%****RP-HPLC:** RT = 7.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₇₈H₂₆₄N₅₆O₅₄Calcd MW = 4052.4 g.mol⁻¹Found MW = 4052.8 g.mol⁻¹**cRAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime}-DOTA-Gd****136**

The peptide **135** (20 mg, 5 μmol) and 2 equiv. of aldehyde containing Gadolinium complex (6.8 mg, 10 μmol) were dissolved in 1 mL of TFA/H₂O (70/30) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **136** as a white powder (16.2 mg, 3.5 μmol).

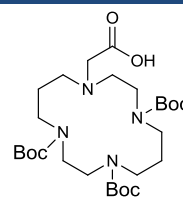
**RP-HPLC:** RT = 7.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**Yield: 70 %****MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₉₅H₂₈₉GdN₆₂O₆₀Calcd MW = 4619.1 g.mol⁻¹Found MW = 4618.0 g.mol⁻¹**Tri-tBu-DOTA-NHS**²⁴⁹**137**

To a stirred solution of DOTA-tris-tBu-ester purchase from Aldrich (50 mg, 0.08 mmol) and N-hydroxysuccinimide (11.5 mg, 0.1 mmol) in ethyl acetate/dioxane (5 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (16.5 mg, 0.08 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 h. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (5 mL), and the solution was washed with 5% aqueous NaHCO₃ (2 x 3 mL), water (3 mL), and brine (3 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated for afforded the product **137** in as white solid which was used without further purification (54.2 mg, 0.08 mmol).

**Yield: 95%****MS (ESI-MS, positive mode):**C₃₂H₅₅N₅O₁₀Calcd MW = 670.8 g.mol⁻¹Found MW = 670.4 g.mol⁻¹**¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 3.51–3.42 (br, 8H), 3.04–2.70 (br, 20H), 1.47 (s, 27H)

2-(4,8,11-tris(tert-butoxycarbonyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1-yl)acetic acid²⁴⁹ **138**

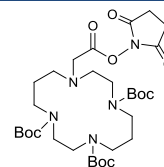
To a solution of tri-tert-butyl 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8-tricarboxylate (200 mg, 0.40 mmol) in CH₃CN (10 mL) were added 1.5 equiv. of Na₂CO₃ (63 mg, 0.60 mmol) and 1.5 equiv. of ethyl bromoacetate (100 mg, 0.60 mmol). The mixture was stirred at reflux overnight. The reaction mixture was cooled to room temperature and the insoluble salts were removed by filtration. The solution was concentrated under reduced pressure and the resultant crude material was dissolved in MeOH (10 mL). 5 M NaOH (4 mL) was added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure and the resultant crude material was dissolved in water (5 mL) and the aqueous layer was adjusted to pH 3 with 1 N HCl. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 × 20 mL), dried over MgSO₄ and the solution was concentrated under reduced pressure and the resultant crude material purified by flash column chromatography (EtOAc) to give the acid **138** as a white solid (125 mg, 0.22 mmol, 56%).

**Yield: 56%****MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₇H₅₀N₄O₈Calcd MW = 559.7 g.mol⁻¹Found MW = 559.8 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.20 (br s, 1H, OH), 3.75- 3.73 (m, 2H), 3.64-3.61 (m, 2H), 3.45-3.27 (m, 12H), 3.11-3.08 (m, 2H), 1.95-1.71 (m, 4H), 1.48-1.38 (m, 27H)

Tri-Boc-Cyclam-NHS²⁴⁹ **139**

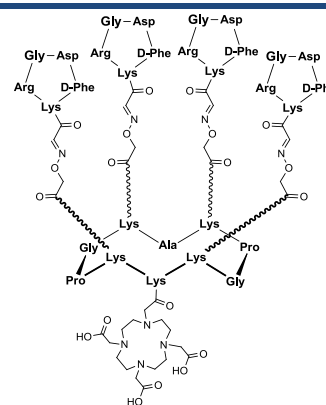
To a stirred solution of **138** (40 mg, 0.071 mmol) and N-hydroxysuccinimide (11.5 mg, 0.1 mmol) in EtOAc/dioxane (5 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (14.74 mg, 0.071 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 h. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (5 mL), and the solution was washed with 5% aqueous NaHCO₃ (2 x 3 mL), water (3 mL), and brine (3 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated afforded the product **139** in 88% yield as white solid which was used without further purification (41.3 mg, 0.062 mmol).

**Yield: 88%****MS (ESI-MS, positive mode):**C₃₁H₅₃N₅O₁₀Calcd MW = 655.8 g.mol⁻¹Found MW = 655.3 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.45-3.12 (m, 14H), 2.90 (4H, s), 2.78-2.45 (m, 4H), 1.96-1.72 (m, 4H), 1.48-1.38 (s, 27H)

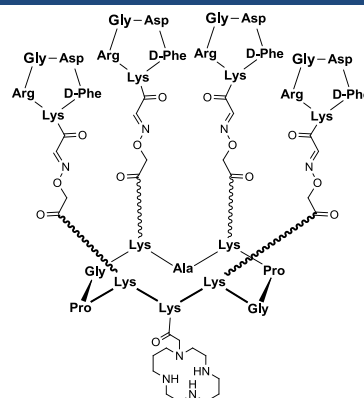
cRAFT4(c[-RGDFK-])oxime-DO3A²⁴⁹ **140**

The purified peptide **25** (10.0 mg, 2.57 μmol) was dissolved in 500 μL of anhydrous DMF adjusted with DIPEA to pH 9. 5 equiv. of the succinimidyl ester **137** (8.64 mg, 12.9 μmol) was added to this solution. After stirring for 2 h at room temperature, 1 ml of TFA/TIS/H₂O (94:3:3) was added to the mixture. The mixture was stirred for 2 h and the product was purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min). After lyophilization, the conjugate **140** was obtained as a white solid powder (7.45 mg, 1.74 μmol)

**Yield: 68%****RP-HPLC:** RT = 7.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₈₇H₂₇₉N₅₉O₅₇Calcd MW = 4265.6 g.mol⁻¹Found MW = 4264.8 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime}-Cyclam²⁴⁹**141**

The purified peptide **25** (10.0 mg, 2.57 μmol) was dissolved in 500 μL of anhydrous DMF adjusted with DIPEA to pH 9. 5 equiv of the succinimidyl ester **139** (8.44 mg, 12.9 μmol) was added to this solution. After stirring for 2 h at room temperature, 1 ml of TFA/TIS/H₂O (94:3:3) was added to the mixture. The mixture was stirred for 2 h and the product was purified by RP-HPLC. After lyophilisation, the conjugate **141** was obtained as a white solid powder (7.62 mg, 1.85 μmol , yield 72%)

**Yield: 72%****RP-HPLC:** RT = 7.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₈₃H₂₇₇N₅₉O₅₁Calcd MW = 4119.6 g.mol⁻¹Found MW = 4119.3 g.mol⁻¹

II. Méthode SPOT

II.1. Peptide synthesis on cellulose membranes

Membranes were obtained from Intavis (Bergisch Gladbach, Germany). Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) amino acids and N-hydroxybenzotriazole (HOBT) were from Novabiochem (Meudon, France). N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) was from Fluka (Germany). N,N'-dimethylformamide (DMF) and N-methylpyrrolidone-2 (NMP), were of the highest available quality (SDS, Peypin, France) and were tested daily for the absence of contaminating free amines by the bromophenol blue method.

Fmoc amino acids were preactivated daily by incubating 300 μ l of a 0.6 M solution of the Fmoc amino acid with 150 μ l of 1.2 M DIC and 150 μ l of 1.2 M HOBT (except for Fmoc arginine which has to be preactivated for each coupling). The side chains of $N\alpha$ Fmoc protecting groups were the following: Pbf (arginine), Trt (asparagine, glutamine, histidine and cysteine), Acm (cysteine), tBu ether (threonine, tyrosine, serine), OtBu ester (aspartic and glutamic acids) Boc (lysine, tryptophan). All solutions were in NMP. An ASP 222 robot (Abimed) was used for the coupling steps. The standard coupling procedure was triple coupling of a preactivated solution of 0.3 M Fmoc amino acid for 15 min. After coupling, the membrane was treated with DMF (three times, 2 min), then 10% (vol/vol) acetic anhydride in DMF (10 min, or until decoloration of the Spots) was added to block any unreacted amino groups. After piperidine (20% in DMF, vol/vol) deprotection (5 min), the membrane was treated with a 0.005% bromophenol blue solution in DMF (two times, 2 min), washed with methanol (three times, 2 min), and dried using cold air. For the last cycle, the deprotection with piperidine was done before acetylation with 10% acetic anhydride in DMF.

After the peptide sequences had been assembled, the side chain protecting groups were removed by treatment with trifluoroacetic acid/dichloromethane (DCM) (1:1, vol/vol) with 2.5% triethylsilane as scavenger (1 h). This treatment was followed by three washes (2 min) with DCM, three with DMF, three with 1% acetic acid in water, and three with methanol. The membrane was dried before use.

II.2. SPOT revelation

The peptide spot membrane was first incubated in ethanol for 2 min at room temperature, and then washed 3 times with TBS buffer (50 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, pH 7.0). The peptide spot membrane was further incubated overnight in blocking buffer (TBS, 10% Western Blocking Reagent Roche; 0.05 g/ml sucrose and 0.1% Tween20). The tested peptide containing Cyanine5 was diluted with blocking buffer to a final concentration of 10^{-8} M, then incubated with the peptide membrane for 2 h at 37°C with gentle shaking. After removing the solution containing the test peptide, the membrane was washed for 10 min with TBS-Tween20 0.1%.. The membrane was scanned by Typhoon Variable Scanner using excitation laser at 633 nm, the following settings: fluorophore Cy5 and output voltage 450 V. The fluorescent intensities of each spots were quantified by using volume analysis of the ImageQuant software. The background fluorescent intensity was

subtracted using object average method of ImageQuant software. Finally, the membrane was evaluated by attributing the spots to their corresponding peptides in the sequence list, which is supplied with the peptide spot membrane.

III. Etudes SPR

A BIAcore T100 Biosensor was used in SPR measurements. Immobilization of the substrate was done at 25°C as follows. The sensor chip was washed for 5 min with HBS buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA) at a flow rate of 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ and activation of the dextran matrix was carried out by injecting a mixture (35 μl) of 100 mM N-hydroxysuccinimide and 400 mM N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl carbodiimide in equal volumes. In order to covalently immobilize streptavidin to the dextran matrix, 35 μl streptavidin was injected at 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 10 mM sodium acetate (pH 5.0), followed by reaction of excess activated groups with ethanolamine 1M hydrochloride (pH 8.5) to give a final response of ~ 3500 RU. Biotinylate peptide control was immobilized on control surface (channel 1) and the biotinilate CD20 epitope was immobilized on measure surface (channel 2). A solution of **93** and **95** ($5\mu\text{M}$ in WB.) was injected at $2\mu\text{L min}^{-1}$ until the attainment of final responses of ~ 200 RU

All measurements were performed at 25°C using a running buffer (HEPES-buffered saline), which was prepared using 15 mM HEPES, 450mM NaCl, 50 mM KCl and 0.05 % (v/v) surfactant P20, pH 7. Binding experiments were performed by injecting different ligands in the both channels at a rate of $30\mu\text{L min}^{-1}$. Surfaces were regenerated by injecting glycine solution (10mM, pH 2). Curves obtained on the control surfaces bearing **95** were deducted from the curves obtained on the surfaces bearing the Epitope CD20 **93** to eliminate the effect of refractive index changes and to apply a correction for non-specific interactions. The absence of a mass transport limitation on the experiments was checked on each surface by separately running one injection of each ligand for 120 sec at different flow rates ranging from 10 to $70\mu\text{L min}^{-1}$. The curves obtained could be overlaid, confirming the kinetic control of the experiments.

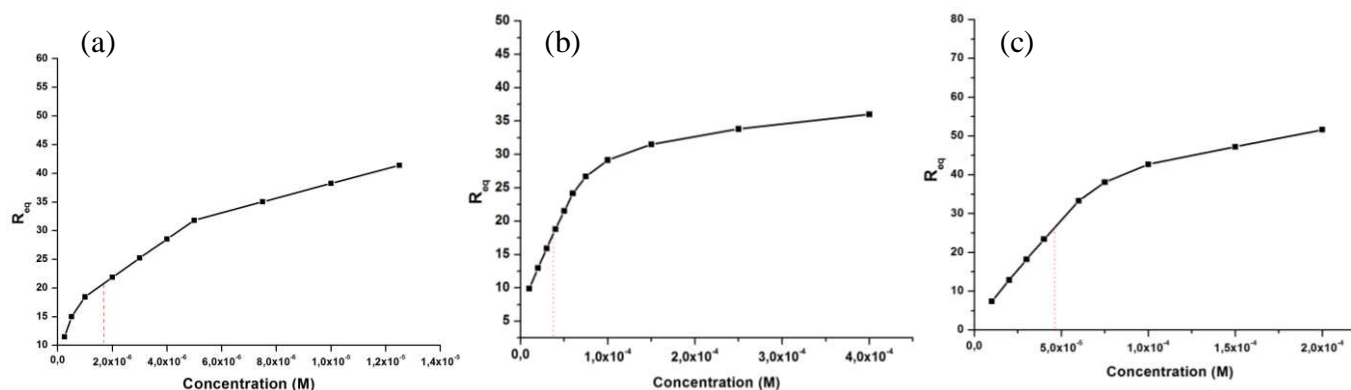


Figure 146 : Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of CD20 epitope with (a) Rituximab (b) compound **128** (c) compound **132**

IV. Protocoles des Tests Biologiques

IV.1. Cell lines and culture conditions

The $\alpha_v\beta_3$ -negative HEK293(β_1) and $\alpha_v\beta_3$ -overexpressing HEK293(β_3) cells (kindly provided by J.-F. Gourvest, Aventis, France) are stable transfectants of human embryonic kidney HEK293 cell line, overexpressing human integrin β_1 and β_3 subunits, respectively. They were cultured in DMEM-GlutaMAXTM (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), enriched with 4.5 g.L⁻¹ glucose and supplemented with 10% FBS, penicillin (50 U.mL⁻¹), streptomycin (50 μ g.mL⁻¹) and 700 μ g.mL⁻¹ G418. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂.

IV.2. Competitive cell adhesion assays

96-well assay plates (Falcon, Becton Dickinson, France) were coated for 1 h at room temperature with 5 μ g.mL⁻¹ vitronectin in PBS and blocked for 30 min with 3% bovine serum albumin (BSA). Varying amounts of peptides were added simultaneously with 10⁵ trypsinated HEK- β_3 cells to the wells and the plate was incubated for 30min at 37°C. Wells were rinsed three times with cold PBS to remove vitronectin-unbound cells. Attached cells were then fixed with methanol, stained with methylene blue and quantified by OD reading at 630nm on Dynatech MR5000 plate reader. The activity of peptides is expressed as IC₅₀ values (concentration of peptide necessary to inhibit 50% of cell attachment to the vitronectin substrate) and determinates from triplicates in three separate experiments.

IV.3. Fluorescence Reflectance Imaging (2D-FRI)

Female NMRI nude mice (8-10 weeks old, n=6, Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were injected subcutaneously with human TS/A-pc cells (1x10⁶ cells per mouse). After tumor growth (~10 days), anesthetized mice (isoflurane/oxygen 3.5/4% for induction and 1.5/2 % thereafter, CSP, Cournon, France) were injected intravenously with 10 nmol of Cy5-peptide. Mice were illuminated by 633-nm light-emitting diodes equipped with interference filters. Fluorescence images as well as black and white pictures were acquired during 100 ms by a back-thinned CCD camera at -80°C (ORCAII-BT-512G, Hamamatsu, Massy, France) (Josserand et al., 2007) fit with a colored glass long-pass RG 665 filter (Melles Griot, Voisins Le Bretonneaux, France). Images were adjusted between 1700-39000 RLU. At the end of the experiment, mice were euthanized to quantify the biodistribution in the different organs. Images of the organs were adjusted between 10000-65535 RLU, with an exposition time of 100 ms.

IV.4. Pet studies

IV.4.1. ^{64}Cu Radiolabeling

Cyclam-RAFT-RGD (1 mM in 10% HEPES/90% MeOH [HEPES: 10 mM in H_2O , pH 7.0]) and $^{64}\text{CuCl}_2$ (0.74 MBq/ μL in 0.1 M ammonium citrate buffer [pH 5.5]) were mixed at 1/1, 1/9, 1/19 or 1/49 (v/v), and incubated at 37°C for 20 min, 1 or 4 h. Radiolabeling reaction was assessed by RP (reversed phase)-HPLC (solvent A = 0.1% TFA in H_2O ; solvent B = 0.1% TFA-0.9% H_2O in acetonitrile; flow rate = 1.3 mL/min; linear gradient = 5 to 100% solvent B in 15 min; 5C18-MS-II column, 15×4.6 mm [Nacalai Tesque, Inc.]) or thin-layer chromatography (TLC) (eluent = 10% $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{MeOH}$ (v/v: 50/50), stationary phase = TLC glass plate pre-coated with Silica gel 60 RP-18 F254s) with autoradiography using a bio-imaging analyzer (FLA-7000, Fujifilm Co. Ltd.). Biostability of ^{64}Cu -cyclam-RAFT-RGD was evaluated by incubating with mouse serum at 37°C for 1 h, and followed by mixing with ethanol to precipitate the serum proteins. After centrifugation at 15000 rpm for 10 min, the supernatant was analyzed by RP-HPLC.

IV.4.2. Cell Binding and Competitive Inhibition Assay

Cell binding assay was performed using cells in suspension or in monolayer-culture. For the former case, 2.5×10^6 cells suspended in 1 mL binding buffer (Hank's Balanced Salt Solution, 25 mM HEPES, 0.1% bovine serum albumin, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , and 1 mM MnCl_2) were incubated with ^{64}Cu -cyclam-RAFT-RGD at radioactivity doses of 10000-50000 cpm on ice for 1 h. After rinse with ice-cold phosphate buffered saline (PBS), the cell-bound radioactivity (cpm) was measured using a γ -counter. The cell-binding ratio was defined as the percentage of added radioactivity ($n = 3$). For the latter case, cells, seeded at a density of 0.2×10^6 cells per well in 24-well plate previous day, were incubated in 500 μL fresh culture medium containing 10000 cpm ^{64}Cu -cyclam-RAFT-RGD at 37°C for 1 h. Cells were then gently washed with PBS, lysed in 0.2 N NaOH, and followed by measurement of the radioactivity and the total protein contents. The cell-binding ratio was normalized to 100 μg of protein ($n = 6$).

Competitive inhibition assay was performed using cell suspension incubated with 10000 cpm ^{64}Cu -cyclam-RAFT-RGD in the presence or absence of increasing concentrations of cyclam-RAFT-RGD or c(RGDfV), a known $\alpha_v\beta_3$ antagonist (Peptide Institute, Inc.). The results were expressed as percentage of cell-bound radioactivity to that of control (without unlabeled peptides) ($n = 3$). IC_{50} values (half maximal (50%) inhibitory concentration) were determined by nonlinear regression analysis using KaleidaGraph (Version 4.0, Synergy Software).

IV.4.3. Animal Models

Animal procedures were approved by Institutional Animal Care and Use Committee of the National Institutes of Radiological Sciences. Tumor models were established by subcutaneous (s.c.) injection of 10^7 HEK293(β_1), 2×10^7 HEK293(β_3) or 10^7 U87MG cells into the right flank of the female athymic nude mice (BALB/cA Jcl-nu/nu, CLEA Japan, Inc.). When approximate 7-10 mm diameter tumors developed, the mice were used for experiments.

IV.4.4. Biodistribution and Receptor Blocking Experiments

Mice bearing s.c. tumors received tail vein (i.v.) injection of 0.37 or 0.74 MBq ^{64}Cu -cyclam-RAFT-RGD. The blocking experiment was performed by coinjection of 0.37 MBq (0.5 nmol) ^{64}Cu -cyclam-RAFT-RGD with 150 nmol unlabeled cyclam-RAFT-RGD or 600 nmol c(RGDfV). At indicated time postinjection (p.i.), the mice were sacrificed with tumor and normal tissues of interest being collected, weighed and counted for the radioactivity using a γ -counter. The radioactivity uptake in the tumor and normal tissues was expressed as a percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g) normalized to a 20-g mouse body weight.

IV.4.5. microPET Studies

Tumor-bearing mice were i.v. injected with approximate 11.1 MBq ^{64}Cu -141. At 1, 3, 6, and 20 h p.i., 30-min (60-min at 20 h p.i.) static scans were acquired using a small-animal PET system (Inveon; Siemens Medical Solutions USA, Inc.) under 1% isoflurane anesthesia. The images were reconstructed using filtered backprojection (a ramp filter with a cutoff frequency of 0.5) with attenuation correction.

ANNEXES

Annexe I

One-Pot Approach to Well-Defined Biomolecular Assemblies by Orthogonal Chemoselective Ligations

Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D., *Angew Chem Int Ed* **2009**, 48 (14), 2576-2579.

One-Pot Approach to Well-Defined Biomolecular Assemblies by Orthogonal Chemoselective Ligations**

Mathieu Galibert, Pascal Dumy,* and Didier Boturyn*

The use of highly efficient and chemoselective ligations is crucial to construct biomolecular assemblies. The major barriers to the chemical synthesis of these systems arise from their high molecular weight and/or from the incompatibility of the reaction conditions that are involved in the chemistry of carbohydrates, peptides, and nucleic acids. Numerous chemoselective reactions have proved to be particularly useful to tailor proteins,^[1] and oligonucleotide^[2] or carbohydrate derivatives.^[3] We successfully exploited oxime bond formation to prepare diverse bioconjugates;^[4] this reaction benefits from the high chemoselectivity and reactivity between the aminoxy and the carbonyl groups. Among other chemoselective reactions,^[5] the copper(I)-catalyzed alkyne–azide cycloaddition reaction^[6] is a powerful tool to prepare new peptidic derivatives by a triazole linkage.^[7] The chemoselective formation of two successive triazole linkages (“click–click” chemistry) in one pot allows a direct access to complex structures.^[8] The method utilizes copper(I)-catalyzed cycloaddition reactions combined with a silver(I)-catalyzed (trimethylsilyl)alkyne deprotection. During the preparation of this manuscript, dual labeling of model compounds was carried out by using similar click–click chemistry.^[9] The feasibility of this approach was demonstrated by means of orthogonal systems encompassing cyclooctyne and terminal alkyne allowing respectively copper-free^[10] and copper(I)-mediated click chemistry.

Herein we report a novel strategy for the synthesis of well-defined biomolecular assemblies using orthogonal oxime bond formation and copper(I)-mediated alkyne–azide cycloaddition reactions in a stepwise or in a one-pot approach. We believe that this strategy could be a very convenient method to access to highly sophisticated assemblies. To illustrate this strategy, we performed the regioselective ligation of biologically relevant RGD peptides onto a cyclopeptidic scaffold. Arginine–glycine–aspartic acid (RGD) peptides are used to specifically target tumor tissue through the $\alpha_v\beta_3$ integrin

receptor.^[11] We designed tetrameric RGD peptides^[12] with desirable biological properties, showing the benefit of the multivalency presentation.^[13] To study the contribution of each RGD motif, we synthesized an array of compounds containing from one to four copies of the RGD monomer (compounds **1–5**, Figure 1). Previously, we used a combina-

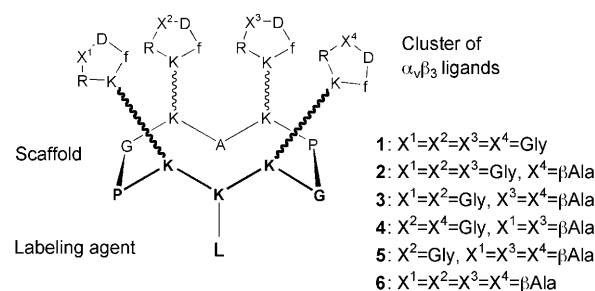


Figure 1. Structures of tetrameric RGD/R β AD-containing peptides **1–6**. L = labeling agent.

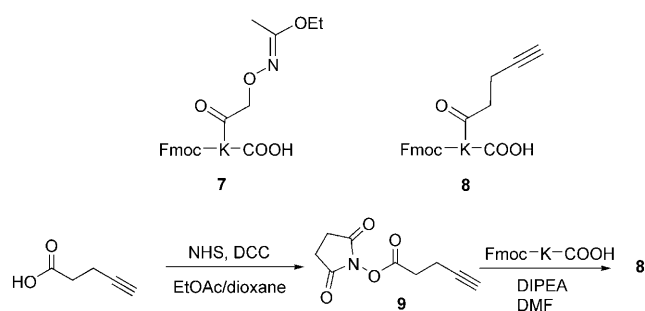
tory assembling strategy to explore all possible positions of the RGD motifs on the cyclodecapeptide scaffold.^[14] To obtain molecules with similar shape, similar steric hindrance, and close molecular weights, we opted to substitute RGD ligands with nonsense R β AD peptide. Both were grafted to the cyclodecapeptide scaffold by stepwise oxime bonds. However, we were unable to isolate the different isomers that differ in the position of cyclic RGD pentapeptides onto the cyclodecapeptide scaffold. We then chose to exploit Huisgen dipolar cycloaddition to introduce RGD motifs onto the scaffold, nonsense R β AD peptides being introduced by orthogonal oxime bond formation. Using this strategy, we are able to synthesize well-defined biomolecular assemblies in which the position of RGD units can be distinguished within, for example, the related compounds **3** and **4** (Figure 1).

To incorporate chemoselective functions within the cyclodecapeptide chain, we synthesized building blocks **7** and **8**, which contain protected aminoxy and alkyne groups, respectively (Scheme 1). The introduction of building blocks during the solid-phase peptide synthesis (SPPS) considerably reduces the number of steps involved and the combination of protecting groups required for the synthesis of functionalized peptides. For this purpose, we developed 1-ethoxyethylidene (Eei) as a new protecting group for the aminoxy moiety.^[15] We completed the peptide-chain elongation by the stepwise incorporation of Fmoc-protected amino acids, including building blocks **7** and **8**. Alkyne-containing amino acid **8** is entirely compatible with SPPS conditions, and it may be easily exploited to prepare alkyne-containing peptides ready for

[*] M. Galibert, Prof. P. Dumy, Dr. D. Boturyn
Département de Chimie Moléculaire, UMR CNRS/UJF 5250, ICMG
FR 2607
301, rue de la chimie, BP53, 38041 Grenoble cedex 9 (France)
Fax: (+33) 4-7651-4946
E-mail: pascal.dumy@ujf-grenoble.fr
didier.boturyn@ujf-grenoble.fr

[**] This work was supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC N° 3741), the Région Rhône-Alpes (N° 0301372501 and 0301372502), the Cancéropôle (N° 032115 and 042259), the Université Joseph Fourier, and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200806223>.



Scheme 1. Structures and syntheses of building blocks **7** and **8**. Compound **7** was prepared according to reference [15]. Fmoc = 9-fluorenylmethoxycarbonyl, NHS = *N*-hydroxysuccinimide, DCC = dicyclohexylcarbodiimide, DIPEA = diisopropylethylamine, DMF = *N,N*-dimethylformamide, K = lysine.

copper(I)-mediated click chemistry. Glycine at the *C*-terminal end was essential to ensure the subsequent head-to-tail cyclization from epimerization. Peptides **10–14** (Tables 1 and 2) were isolated in sufficient purity to carry out subsequent chemoselective assemblies.

Table 1: Stepwise chemoselective assemblies of **15** and **16**.^[a]

Entry	Method ^[b]	Scaffold	Intermediate	Product	Yield ^[d]
1	A ^[c]				70%
2	A,B				51%
3	B,A				45%
4	B				72%

[a] $R_n = \text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$ or $\text{O}-\text{N}=\text{C}(\text{OEt})\text{CH}_3$, $X_n = \text{Gly}$ or βAla . [b] A: **15** (1.2 equiv per site), Cu^0 (1 equiv per site), *t*BuOH/PBS (7:3), room temperature, 18 h; B: **16** (1.5 equiv per site), TFA/ H_2O (9:1), room temperature, 2 h. PBS = phosphate buffer saline. [c] TFA/ H_2O (9:1), room temperature, 2 h. [d] Yield of isolated product.

Cyclopentapeptides **15** and **16** (Table 1), bearing the prerequisite functions (azide and alkyne groups, respectively), were prepared through a combination of solid and solution-phase syntheses (see the Supporting Information). We then determined appropriate reaction conditions to carry out the copper(I)-catalyzed azido–alkyne cycloaddition. A variety of conditions have already been reported,^[16] the copper(I) species can be introduced directly or generated in situ by reduction of copper(II) with reducing agents.

Although this reaction allows, for example, fourth-generation triazole dendrimers from polyacetylene cores to be obtained,^[17] the conversion of tetraalkyne-containing calixarene failed.^[18] Recently, the conversion of a tetraalkyne-containing calixarene was reported, but only at high temperatures.^[19] The initial formation of a copper acetylide species on one of the alkyne chains probably led to formation of complexes with preferred neighboring alkyne units, thus preventing the binding of azide.^[20] Taking into account this result, we examined the conversion of tetraalkyne-containing cyclodecapeptide **10** in the presence of azidopeptide **15** using copper nanosize powder (Table 1, entry 1). This catalyst was successfully used in the cycloaddition of azides with terminal alkynes.^[21] The desired cycloaddition proceeded cleanly, with up to quantitative conversion, over 18 hours at room temperature. When standard CuSO_4 /sodium ascorbate was used for the generation of the active copper(I) species, the reaction was markedly less efficient (see the Supporting Information, Table S2).

The optimized conditions for the cycloaddition reaction then allowed the development of synthetic methods for access to successive chemoselective ligations of peptides **15** and **16**. The cycloaddition was carried out prior to oxime ligation (Table 1, method A,B; entry 2). As expected, we observed quantitative conversion of peptide **11** in the presence of azidopeptide **15**. It is important to note that Eei function was stable during the copper(I)-catalyzed cycloaddition. The following oxime ligation was then performed with the conditions used to yield compound **6** (Table 1, entry 4). One-pot aminoxy deprotection of **17** and subsequent ligation of aldehyde derivative **16** were carried out in aqueous TFA (trifluoroacetic acid) solution. Under these conditions, removal of the *tert*-butoxycarbonyl (Boc) group, thus triggering *tert*-butoxy cation and isobutene formation, did not affect highly nucleophilic residues

such as aminoxy functions: compound **5** with one copy of RGD monomer was obtained without the formation of undesirable by-products. This result emphasizes the utility of this method for peptide ligation starting from Boc/*t*Bu protected peptides.

To ensure the versatility of our chemical strategy, a reverse method B,A was performed (Table 1, entry 3). Starting with peptide **11**, ligation of derivative **16** was effectively achieved. Subsequent cycloaddition of azidopeptide **15** furnished compound **5** quantitatively. As a result, we have shown that the oxime linkage is stable under copper(I)-catalyzed cycloaddition conditions, even in the presence of a slight excess of azidopeptide **15**. Once again, this two-step method was efficient in terms of chemoselectivity and reactivity. However, even if these methods permit quantitative peptide ligations, low overall yields were obtained from HPLC purifications.

To avoid a lengthy separation process and purification of intermediate peptides, we decided to perform both chemoselective ligations in a one-pot approach (Table 2). As copper(I)-catalyzed cycloaddition occurs under neutral conditions, it is necessary to adjust the pH to complete biomolecular assemblies, as oxime bond formation is very slow at pH 7 or higher.^[22] During preliminary studies, it was found that aldehyde-containing peptide **16** is slightly unstable to the reaction conditions used for copper(I)-catalyzed cycloaddition. Therefore, peptides **13**, **15** (3.6 equiv), and **16** (1.2 equiv) were applied under mild acidic conditions using a solution containing 5% TFA and copper nanosize powder.

Rapid conversion of **13** was observed, affording principally aminoxy deprotection and the subsequent oxime ligation (Figure 2). Exclusive formation of the intermediate comprising one R β AD unit and three alkyne groups was

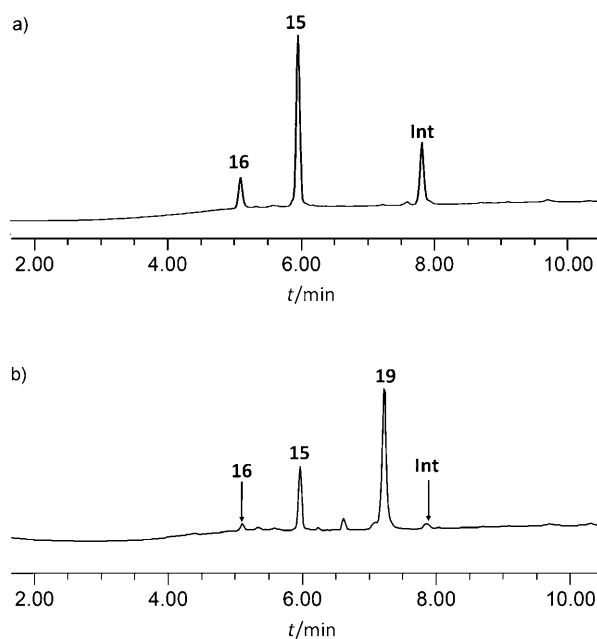


Figure 2. One-pot chemoselective assembly of peptides **13**, **15**, and **16**. HPLC traces are shown at a) 2 h and b) 18 h. Int = intermediate.

obtained (See the Supporting Information, Figure S37). Neutralizing the pH resulted in complete disappearance of the intermediate and the exclusive formation of compound **19**. Starting with compounds **14** and **11** that have more aminoxy groups and then using higher concentration of aldehyde **16** (up to 3.6 equiv), one-pot reactions provided similar results.

In conclusion, we have expanded the scope of click-click chemistry by gaining access to sophisticated macromolecules. We have shown for the first time that well-defined biomolecular assemblies are possible by means of orthogonal oxime and copper-mediated click reactions in a stepwise or in a one-pot approach. The latter method is much desired, as it avoids purification of intermediates while increasing overall chemical yield. The simple reaction conditions suggest that this one-pot chemoselective ligation strategy could have wide potential for the chemical synthesis of complex systems. An extension of the method combining carbohydrates and peptides is in progress and will be reported in due course.

Received: December 19, 2008
Published online: February 19, 2009

Keywords: chemoselectivity · click chemistry · copper · oximes · peptides

Table 2: One-pot chemoselective assemblies of **15** and **16**.^[a]

Entry	Scaffold	Product	Yield ^[b]
1			68%
2			61%
3			63%

[a] **15** (1.2 equiv per site), **16** (1.2 equiv per site), Cu⁰ (1 equiv per site), *t*BuOH/H₂O/TFA (50:45:5), room temperature, 2 h, then pH adjusted to 7 using DIPEA; 18 h. [b] Yield of isolated product.

- [1] a) P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923; b) H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 727; c) I. S. Carrico, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1423.
[2] a) N. Venkatesan, B. H. Kim, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3712; b) Y. Singh, N. Spinelli, E. Defrancq, *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 263.
[3] a) F. Peri, F. Nicotra, *Chem. Commun.* **2004**, 623; b) J. M. Langenhan, J. S. Thorson, *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 59.

- [4] a) Y. Singh, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359; b) E. Garanger, D. Boturyn, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2402.
- [5] See, for example, the Staudinger ligation: J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13; and the thiol–ene coupling: A. Dondoni, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8995.
- [6] a) C. W. Tornøe, M. Meldal in *Peptides: The Wave of the Future* (Eds.: H. Lebl, R. A. Houghten), American Peptide Society, San Diego, **2001**, pp. 263–264; b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057; c) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [7] Y. L. Angell, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1674.
- [8] V. Aucagne, D. A. Leigh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505.
- [9] P. Kele, G. Mezö, D. Achatz, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 350; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 344.
- [10] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046.
- [11] K.-E. Gottschalk, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3919; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3767.
- [12] D. Boturyn, J.-L. Coll, E. Garanger, M.-C. Favrot, P. Dumy, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730.
- [13] a) J. Razkin, V. Josserand, D. Boturyn, Z. Jin, P. Dumy, M. Favrot, J.-L. Coll, I. Texier, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069; b) S. Foillard, Z. Jin, E. Garanger, D. Boturyn, M.-C. Favrot, J.-L. Coll, P. Dumy, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2326; c) S. Foillard, L. Sancey, J.-L. Coll, D. Boturyn, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 221.
- [14] E. Garanger, D. Boturyn, J.-L. Coll, M.-C. Favrot, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1958.
- [15] We have shown the benefit of compound **7** for the synthesis of aminoxy-containing peptides. See: S. Foillard, M. Ohsten Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983.
- [16] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952.
- [17] P. Wu, A. K. Feldman, A. K. Nugent, C. J. Hawker, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. J. Fréchet, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4018; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3928.
- [18] E.-H. Ryu, Y. Zhao, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1035.
- [19] V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51.
- [20] A. Dondoni, A. Marra, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7546.
- [21] a) Q. Wan, J. Chen, G. Chen, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8244; b) L. D. Pachón, J. H. van Maarseveen, G. Rothenberg, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 811.
- [22] W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475.

Annexe II

Application of click-click chemistry to the synthesis of new multivalent RGD conjugates

Galibert, M.; Sancey, L.; Renaudet, O.; Coll, J.-L.; Dumy, P.; Boturyn, D. *Org Biomol Chem* **2010**, 8 (22), 5133-5138.

Application of click–click chemistry to the synthesis of new multivalent RGD conjugates†

Mathieu Galibert,^a Lucie Sancey,^b Olivier Renaudet,^a Jean-Luc Coll,^b Pascal Dumy^a and Didier Boturyn^{*a}

Received 30th April 2010, Accepted 20th July 2010

DOI: 10.1039/c0ob00070a

New multivalent RGD-containing macromolecules were designed by exploiting two orthogonal chemoselective ligations. They were next applied to a competitive cell adhesion assay and used for the non invasive optical imaging of tumour in small animals.

Introduction

The design and the synthesis of targeting molecules for diagnostic and therapeutic applications represent a major goal in cancer medicine. To this end, peptide ligands for various targets have been identified using combinatorial libraries¹ or phage display method.² To attain improved activity and receptor selectivity, it is often essential to restrict the conformational space of peptides by using them in a cyclic form.³ In this context, cyclic peptides encompassing RGD (Arg-Gly-Asp) sequence have served as the basis for the development of potent peptide ligands used to selectively target the $\alpha_v\beta_3$ integrin.⁴ The latter represents an attractive target for cancer therapeutic purposes.⁵ Furthermore, it is well known that the multivalent display of a ligand enhances the binding strength of the ligand to its receptor and can promote receptor-mediated internalisation of the bound entity.⁶ Today, the principle of multivalency has then been recognized as an important strategy for the design of synthetic ligands.⁷ The effect of multivalency in ligand binding was particularly demonstrated for glycoconjugates,⁸ and for peptide ligands.⁹ Enhancements of biological activity were especially obtained from multivalent RGD (Arg-Gly-Asp) peptide ligand used to target cell surface receptors such as $\alpha_v\beta_3$ integrin.¹⁰

Recently, we have shown that tetrameric RGD-containing scaffolds exhibit desirable biological properties for tumour imaging¹¹ and for targeted drug delivery.¹² These compounds contain a cluster of four copies of a cyclo[-RGDfK-] monomer grafted onto a cyclic decapeptide scaffold (Fig. 1). Preliminary work aimed at studying the effect of the multivalency parameter in terms of interaction between the ligand and the target receptor and examining the contribution of each c[-RGDfK-] motif. For this purpose, we designed an array of peptide derivatives containing from one to four copies of the c[-RGDfK-] monomer (Fig. 1).¹³ In order to obtain ligands with similar shape, similar steric hindrance and close molecular weights, which is essential for their comparison *in vitro*, we opted to substitute c[-RGDfK-] for non

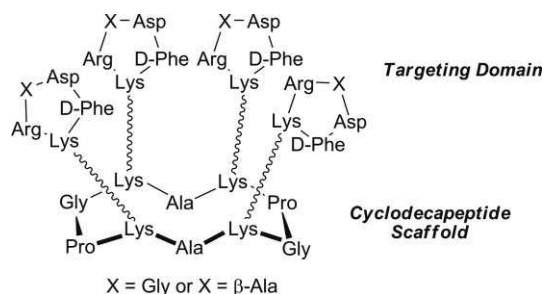


Fig. 1 Structure of clustered RGD-containing compounds.

sense c[-R β ADfK-] motifs in the ligands whose valency was lower than four. We used a combinatory assembling strategy to explore all possible positions of the RGD motifs on the cyclodecapeptide scaffold. Consequently, we were unable to isolate the different isomers that differ in the position of cyclic RGD pentapeptides onto the cyclodecapeptide scaffold.

To overcome this problem, the formation of two successive chemoselective linkages (“click–click” chemistry) enables a direct access to complex structures.¹⁴ Such reactions, in particular the azide-alkyne cycloaddition, can be achieved under conditions which are fully compatible with biological environments.¹⁵ We recently reported an orthogonal chemoselective ligation strategy that allows access to well defined biomolecular assemblies by exploiting the Huisgen dipolar cycloaddition and the oxime bond formation.¹⁶ Following this strategy, herein we describe the synthesis of new multivalent RGD compounds such as the fluorescent glycoconjugate **1** (Scheme 1). The incorporation of the carbohydrate moiety may provide an enhanced solubility and clearance. With the molecules in hand, we then concentrated our work on assessing biological activities to determine the potency of the different RGD-containing compounds.

Results and discussion

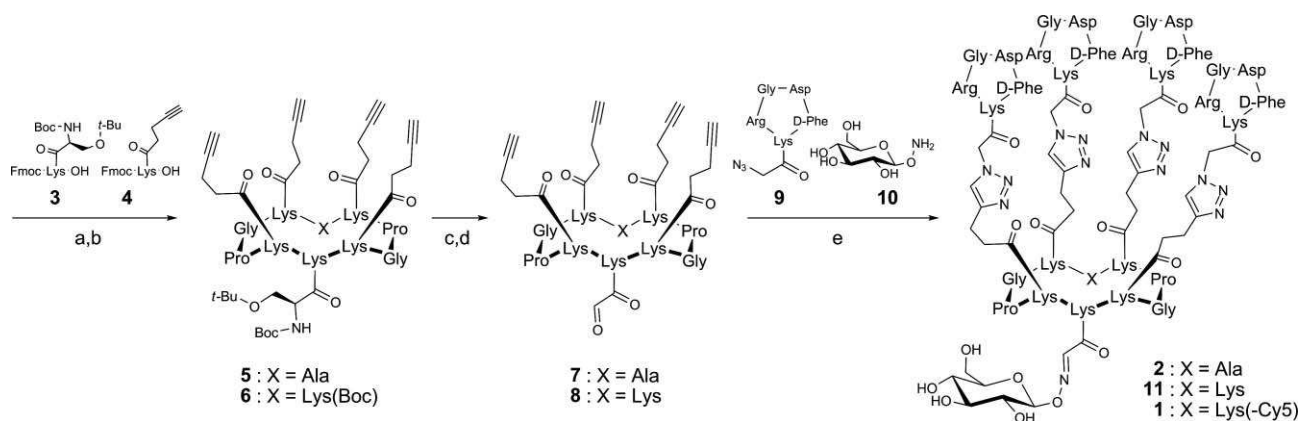
Chemical assemblies

Scheme 1 illustrates the approach used for the synthesis of compounds **1–2**. The biomolecular assembling process implies two chemoselective ligations (click–click chemistry): the oxime ligation¹⁷ and the Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC).¹⁸ To introduce suitable functions within peptide moieties, we synthesized building blocks such as compounds **3** and **4** which contain protected serine (masked aldehyde) and alkyne

^aDépartement de Chimie Moléculaire, UMR CNRS/UJF 5250, ICMG FR 2607, 570 rue de la chimie, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France. E-mail: didier.boturyn@ujf-grenoble.fr; Fax: + 33 4 56 52 08 05; Tel: + 33 4 56 52 08 32

^bInstitut Albert Bonniot, INSERM U823, BP 170, 38042 Grenoble cedex 9, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: General procedures for peptide synthesis; Synthesis of **9**; RP-HPLC profiles and ESI-MS analysis of **5**, **6**, **7**, **8**, **11**, **1**, **2** and **19**; General biological procedures. See DOI: 10.1039/c0ob00070a



Scheme 1 Synthesis of compounds 1–2. a) Standard Fmoc/*t*-Bu Solid-Phase Peptide Synthesis; b) PyBOP (1 equiv.), DIPEA (4 equiv.), 1 h; c) TFA/ H_2O (95 : 5), 2 h; d) $NaIO_4$ (10 equiv.), 30 min; e) **10** (3 equiv.), *t*-BuOH/ H_2O -AcOH (50 : 45 : 5), 2 h then **9** (6 equiv.), Cu(0) microsize powder (0.5 mg), pH 7.0, 18 h; For X = Lys, then Cy5–OsU (1 equiv.), DMF, DIPEA (pH 8), 3 h. Compounds **3** and **4** were prepared as previously described.^{16,19}

groups, respectively (Scheme 1). The use of building blocks during the solid-phase peptide synthesis (SPPS) reduces the number of steps involved for the construction of such conjugates.¹⁹

In this context, linear peptides encompassing chemoselective ligations were prepared following rigorously the standard Fmoc/*t*-Bu SPPS procedure using PyBOP as coupling reagent. The head-to-tail cyclizations provided the desired cyclodecapeptide scaffolds **5** and **6**. Deprotection of serine residue using a concentrated TFA solution followed by a subsequent oxidation with periodate²⁰ afforded key intermediates **7** and **8**, isolated in sufficient purity to carry out subsequent chemoselective assemblies. In parallel, RGD-containing cyclopentapeptide **9** bearing the prerequisite azide function and aminoxy-carbohydrate **10** were prepared as described.^{16,21} Very recently, we have shown that cyclopeptide assemblies are possible by means of orthogonal oxime and copper-mediated click reactions in a stepwise or in a one-pot approach.¹⁶ The latter method is much desired, as it avoids lengthy separation process and purification of intermediates while increasing overall chemical yield. Biomolecular ligations of azido-peptide **9** and aminoxy-carbohydrate **10** were then performed on either molecular scaffold **7** or **8**. Peptides **7** and carbohydrate **10** (3 equiv.) were applied under mild acidic conditions using a solution containing dilute acetic acid. Rapid oxime ligation of **10** was observed (Fig. 2). Neutralizing the pH and addition of **9** (6 equiv.) and copper microsize powder resulted in complete disappearance of the intermediate and the exclusive formation of the expected compound **2** in a 64% yield.

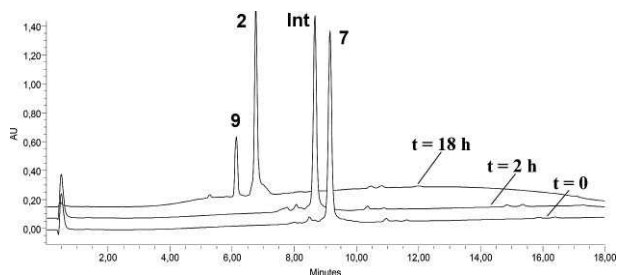


Fig. 2 One-pot chemoselective assembly of peptides **7**, **9**, and carbohydrate **10**. HPLC traces are shown at 2 h and 18 h. Int = intermediate.

To evaluate the RGD-containing compounds for further *in vivo* studies, we decided to introduce a fluorescent reporter such as Cyanine 5 (Cy5) because its near-infrared (NIR) band ($\lambda_{em} = 670$ nm) can penetrate tissue up to 6 cm allowing non invasive optical imaging in small animals. Furthermore, this NIR band is free from interfering biofluorescence. For this purpose, the intermediate **11** was synthesized according to the procedure described above. Cy5 dye was then introduced at the lysine side-chain of **11** under neutral conditions (pH 8.0) affording the fluorescent conjugate **1** in 72% yield after RP-HPLC purification. Compounds **1** and **2** were characterized by ES-MS and the observed molecular weights were found to be in excellent agreement with the calculated values.

To study the contribution of each [c-RGDfK-] motif, an array of molecules **12**–**19** was designed and prepared according to the method previously described (Fig. 3).^{12a,16} Briefly, RGD ligands and nonsense R₃AD peptides were introduced onto the scaffold by using respectively the Huisgen dipolar cycloaddition and orthogonal oxime bond formation, the latter providing shorter linker.

Biological assays

The adhesion potency of the different multivalent RGD-containing peptides was first determined using a traditional ELISA-type inhibition assay. In this experiment, we measured the efficiency of peptides to compete with vitronectin, the natural substrate of the $\alpha_v\beta_3$ integrin, when binding to HEK- β_3 cells that overexpress $\alpha_v\beta_3$ receptors. HEK- β_3 cells were therefore incubated with soluble compounds **2**, **12**–**18** at 37 °C onto vitronectin-coated assay plates. The IC_{50} values, or concentration of compounds required to inhibit 50% of the cells from attaching to vitronectin, are reported in Table 1. As expected the negative control peptide **13** did not inhibit cell adhesion to vitronectin as reported for similar compounds.^{10d,13} Increasing the number of RGD motifs from 1 to 3 gradually improved the potency of the ligand to compete with vitronectin. We reasoned that the observed multivalent effect arises from a statistical rebinding of the RGD-containing compound due to the high local concentration of RGD moieties. This phenomenon was observed for dendrimer scaffolds.^{8f} It is worth noting that compounds **16** and **17** that

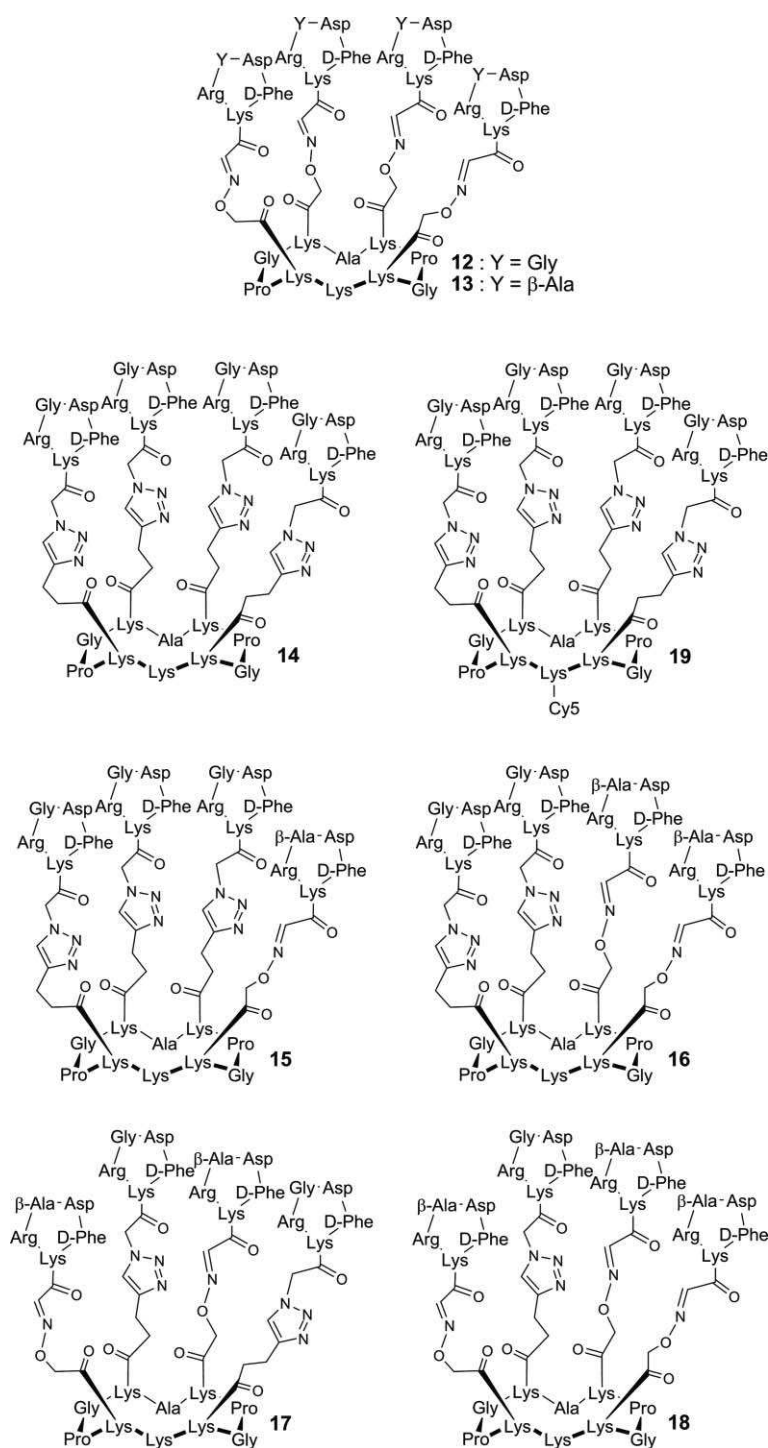


Fig. 3 Structure of compounds **12–19**.

differ in the position of the RGD units onto the cyclodecapeptide scaffold show similar IC_{50} (respectively, 7.1 and 8.2 μM). The position of the RGD peptides onto the cyclodecapeptide scaffold does not improve the affinity of the molecule. Compounds that display four RGD units (*i.e.* molecules **2**, **12** and **14**) showed potent inhibitory effect. Nevertheless, IC_{50} values for compounds **2** and **14** (respectively, 3.8 and 4.1 μM) are slightly lower than the value obtained for compound **12** (4.9 μM) encompassing

shorter oxime linkers. Surprisingly, the molecule **15** encompassing three RGD units displayed the best IC_{50} (2.8 μM). We previously showed that compounds including three or four RGD ligands exhibit close IC_{50} .¹³ We argue that the shorter oxime linker used to graft non-sense R β AD peptide within molecule **15** generates less steric hindrance than unbound RGD moieties within molecules **2**, **12** or **13** while the RGD-containing compound binds to $\alpha_v\beta_3$ receptor.

Table 1 Competitive cell adhesion assay

Compounds			
#	RGD unit/molecule	IC ₅₀ /μM ^a	Standard deviation/μM ^a
12	4	4.85	0.19
13	0	NI ^b	—
14	4	4.10	0.08
15	3	2.80	0.15
16	2	7.13	0.36
17	2	8.22	0.16
18	1	48.81	0.24
2	4	3.77	0.11

^a Values were determined from three separate experiments; ^b NI, no inhibition was observed.

Then, fluorescent derivatives **1** and **19** have been comparatively evaluated *in vivo* in order to pinpoint the influence of the carbohydrate moiety. We measured the capacity of the molecules to target tumour in mice. Fig. 4 shows typical FRI images of nude mice bearing an subcutaneous human TS/A-pc tumour at different time points after intravenous (iv) injection of 10 nmol fluorescent molecules (*i.e.* **1** or **19**) (see also the ESI†). A strong signal is observed in the kidneys reflecting the prominent and fast renal excretion of RGD-containing molecules as previously shown.¹¹ One hour postinjection, fluorescent molecules accumulate in the tumour but the whole body is also fluorescent due to the presence of unbound circulating molecules. The average values for the tumour/skin ratios were found to be similar for mice treated with **1** and for mice treated with **19** (respectively 1.39 ± 0.37 and 1.32 ± 0.15) (see Table S1 in the ESI†). The contrast (tumour/skin ratio) was found to be statistically better with **1** (Fig. 4D) 3 h after iv injection while the ratio was lower at late time. In comparison, tumour/skin ratio for mice treated with **19** reaches its maximum at 6 h, and then slowly decreases (see the ESI†). These experimental results are in good agreement with a better clearance of the carbohydrate-containing compound **1**.

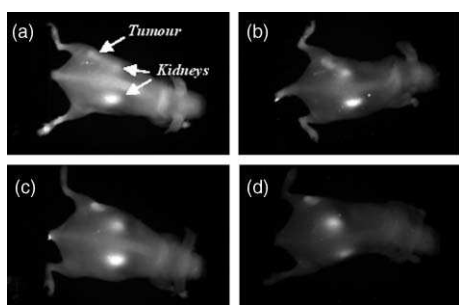


Fig. 4 Representative images of optical imaging of subcutaneous tumour-bearing mice observed at (A–C) 1 h and (B–D) 3 h after iv injection of (A–B) 10 nmol **19** and (C–D) 10 nmol **1**.

Conclusions

We have expanded the scope of click–click chemistry by gaining access to new RGD-containing macromolecules. For instance, we have shown that biomolecular assembly combining carbohydrate and peptides is possible by means of orthogonal oxime and copper-mediated click reactions in a one-pot synthesis. This approach is

part of the general trend of organic chemistry taking control of macromolecule synthesis to produce well-defined constructs that could likely become the rule in drug applications. The ensuing RGD compounds were then evaluated through competitive cell adhesion assays and *in vivo* experiments. The results obtained highlight the utility of a clustered ligand, and as expected the grafting of an additional carbohydrate enhances clearance of the RGD-containing compound. It is worth noting that our approach is not limited to integrin ligands, it may be conceptually exploited to synthesize other sophisticated macromolecular conjugates.

Experimental

Cyclodecapeptide scaffolds 5. Linear decapeptides were assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (150 mg, loading of 0.8 mmol g^{-1}) using the general procedure (see the ESI†) by using building blocks **3** and **4**. The cyclization reaction were carried out in DMF using linear peptide (172 mg, 100 μmol, 0.5 mM) and PyBOP (1 equiv.) for 1 h at room temperature. After completion of the reaction, the solvent was evaporated and the cyclic peptide **5** was obtained as a white solid powder after ether precipitation (161 mg, 100 μmol, quantitative yield). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calc for C₇₉H₁₂₂N₁₆O₁₈: 1583.95, found *m/z*: 1584.0.

Cyclodecapeptide scaffolds 6. Following the procedure previously described and starting with linear peptide (171 mg, 92 μmol), cyclic peptide **5** was obtained as a white solid powder (167 mg, 96 μmol, 96% yield). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calc for C₈₇H₁₃₇N₁₇O₂₀ 1741.16, found *m/z*: 1740.9.

Cyclodecapeptide scaffolds 7. Full deprotection of peptide **5** (161 mg, 100 μmol) was carried out in a solution containing 10 mL of TFA/H₂O (95 : 5) for 2 h at room temperature. The product was isolated after removal of solvents under reduced pressure and precipitation from Et₂O. A serine oxidation by an aqueous solution containing NaIO₄ (10 equiv.) afforded the peptide **7**. The crude product was directly purified by using RP-HPLC affording the compound **7** as a white powder. (72 mg, 48 μmol, 48% yield). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calc for C₆₉H₁₀₁N₁₅O₁₆: 1396.67, found *m/z*: 1396.7.

Cyclodecapeptide scaffolds 8. Following the procedure previously described and starting with cyclic peptide **6** (167 mg, 96 μmol), peptide **8** was obtained as a white powder. (60 mg, 41 μmol, 43% yield). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calc for C₇₂H₁₀₈N₁₆O₁₆ 1453.76, found *m/z*: 1453.8.

Carbohydrate 10. Compound **10** was prepared as previously described.²¹

Peptide 2. To a solution containing the cyclodecapeptide **7** (5 mg, 3.5 μmol) in 500 μL *t*BuOH/H₂O–AcOH (50 : 45 : 5) were added the carbohydrate **10** (3 equiv.). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. Then, the pH was adjusted to 8 by addition of a NaHCO₃ solution (10%) and the compound **9** *c*[-RGDFK(COCH₂N₃)] (6 equiv.) and Cu(0) microsize powder (5 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and centrifuged for 5 min. The solution was then purified by RP-HPLC to give the desired compound **2** (9.8 mg, 2.3 μmol, yield 64%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calc for C₁₉₁H₂₈₀N₆₄O₅₃ 4320.76, found *m/z* 4320.5.

Peptide 11. To a solution containing the cyclodecapeptide **8** (5 mg, 3.4 μmol) in 500 μL $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}-\text{AcOH}$ (50 : 45 : 5) were added the carbohydrate **10** (3 equiv.). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. Then, the pH was adjusted to 8 by addition of a NaHCO_3 solution (10%) and the compound **9** ϵ -[RGDfK(COCH₂N₃)-] (6 equiv.) and Cu(0) microsize powder (5 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and centrifuged for 5 min. The solution was then purified by RP-HPLC to give the desired compound **11** (8.7 mg, 2 μmol , yield 58%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calc for C₁₉₄H₂₈₇N₆₅O₅₃ 4377.85, found m/z 4377.7.

Peptide 1. The peptide **11** (7.0 mg, 1.59 μmol) was dissolved in 1 mL of anhydrous DMF and the pH adjusted with DIPEA to pH 9. The solution was added to CyTM 5 Mono NHS Ester (1.2 mg, 1.59 μmol) and stirred for 3 h at room temperature. The product was then purified by RP-HPLC affording the fluorescent peptide **11** as a deep blue solid powder (5.77 mg, 1.14 mmol, yield 72%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calc for C₂₂₇H₃₂₄N₆₇O₆₀S₂ 5015.65, found 5016.7.

Peptide 19. The peptide **14** (3.0 mg, 0.73 μmol) was dissolved in 1 mL of anhydrous DMF and the pH adjusted with DIPEA to pH 9. The solution was added to CyTM 5 Mono NHS Ester (0.54 mg, 0.73 μmol) and stirred for 3 h at room temperature. The product was then purified by RP-HPLC affording the fluorescent peptide **14** as a deep blue solid powder (2.5 mg, 0.53 mmol, yield 73%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calc for C₂₁₆H₃₀₈N₆₅O₅₃S₂ 4727.39, found 4727.4.

Peptides 12–18. Peptides **12–16** were prepared as previously described.¹⁶

Competitive cell adhesion assays. Competitive assay was carried out as described.¹² Briefly, 96-well assay plates were coated for 1 h at room temperature with 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ vitronectin in PBS and blocked for 30 min with 3% bovine serum albumin (BSA). Varying amounts of peptides were added simultaneously with 10⁵ trypsinated HEK- β 3 cells to the wells and the plate was incubated for 30 min at 37 °C. Wells were rinsed three times with cold PBS to remove vitronectin-unbound cells. Attached cells were then fixed with methanol, stained with methylene blue and quantified. The activity of peptides is expressed as IC50 values (concentration of peptide necessary to inhibit 50% of cell attachment to the vitronectin substrate) and determinates from triplicates in three separate experiments.

Fluorescence Reflectance Imaging (2D-FRI). Female NMRI nude mice (8–10 weeks old, $n = 6$) were injected subcutaneously with human TS/A-pc cells (1 \times 10⁶ cells per mouse). After tumor growth (~10 days), anaesthetized mice were injected intravenously with 10 nmol of Cy5-containing peptide. Mice were illuminated by 633 nm light-emitting diodes equipped with interference filters. Fluorescence images were acquired during 100 ms.

Acknowledgements

This work was supported by the Université Joseph Fourier, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the

Institut National du Cancer (INCA), the Nanoscience Foundation and NanoBio (Grenoble).

Notes and references

- L. A. Thompson and J. A. Ellman, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 555.
- R. C. Ladner, A. K. Sato, J. Gorzelany and M. de Souza, *Drug Discovery Today*, 2004, **9**, 525.
- H. Kessler, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1982, **21**, 512.
- (a) M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl and H. Kessler, *FEBS Lett.*, 1991, **291**, 50; (b) H. M. Ellerby, W. Arap, L. M. Ellerby, R. Kain, R. Andrusiak, G. Del Rio, S. Krajewski, C. R. Lombardo, R. Rao, E. Ruoslahti, D. E. Bredesen and R. Pasqualini, *Nat. Med.*, 1999, **5**, 1032.
- (a) R. O. Hynes, *Nat. Med.*, 2002, **8**, 918; (b) K. Temming, R. M. Schiffelers, G. Molema and R. J. Kok, *Drug Resist. Updates*, 2005, **8**, 381.
- M. Mammen, S. K. Choi and G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1998, **37**, 2754.
- L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki and L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000, **4**, 696.
- (a) D. Pagé, D. Zanini and R. Roy, *Bioorg. Med. Chem.*, 1996, **4**, 1949; (b) U. Sprengard, M. Schudok, G. Kretzschmar and H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1996, **35**, 321; (c) S. M. Dimick, S. C. Powell, A. McMahon, N. Moothoo, J. H. Naismith and E. J. Toone, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 10286; (d) P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read and D. R. Bundle, *Nature*, **403**, 669; (e) D. A. Fulton and J. F. Stoddart, *Bioconjugate Chem.*, 2001, **12**, 655; (f) J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen and L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 14922; (g) O. Renaudet, K. Křenek, I. Bossu, P. Dumy, A. Kádek, D. Adámek, O. Vaněk, D. Kavan, R. Gažák, M. Šulc, K. Bezouška and V. Křen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6800; (h) D. Arosio, M. Fontanella, L. Baldini, L. Mauri, A. Bernardi, A. Casnati, F. Sansone and R. Ungaro, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 3660.
- (a) C.-B. Yim, O. C. Boerman, M. de Visser, M. de Jong, A. C. Dechesne, D. T. S. Rijkers and R. M. J. Liskamp, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 1323; (b) N. Trouche, S. Wieckowski, W. Sun, O. Chaloin, J. Hoebcke, S. Fournel and G. Guichard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 13480.
- (a) H. D. Maynard, S. Y. Okada and R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 1275; (b) R. J. Kok, A. J. Schraa, E. J. Bos, H. E. Moorlag, S. A. Ásgeirsdóttir, M. Everts, D. K. F. Meijer and G. Molema, *Bioconjugate Chem.*, 2002, **13**, 128; (c) G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman and H. Kessler, *Chem.-Eur. J.*, 2003, **9**, 2717; (d) D. Boturyn, J.-L. Coll, E. Garanger, M.-C. Favrot and P. Dumy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 5730; (e) X. Montet, M. Funovics, K. Montet-Abou, R. Weissleder and L. Josephson, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 6087.
- (a) Z. Jin, V. Josserand, J. Razkin, E. Garanger, D. Boturyn, M.-C. Favrot, P. Dumy and J.-L. Coll, *Mol. Imaging*, 2006, **5**, 188; (b) J. Razkin, V. Josserand, D. Boturyn, Z. Jin, P. Dumy, M. Favrot, J.-L. Coll and I. Texier, *ChemMedChem*, 2006, **1**, 1069; (c) Z. Jin, J. Razkin, V. Josserand, D. Boturyn, A. Grichine, I. Texier, M.-C. Favrot, P. Dumy and J.-L. Coll, *Mol. Imaging*, 2007, **6**, 43; (d) L. Sancey, V. Ardisson, L. M. Riou, M. Ahmadi, D. Marti-Batlle, D. Boturyn, P. Dumy, D. Fagret, C. Ghezzi and J.-P. Vuillez, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2007, **34**, 2037; (e) L. Sancey, S. Dufort, V. Josserand, M. Keramidias, C. Rome, A.-C. Faure, S. Foillard, S. Roux, D. Boturyn, O. Tillement, A. Koenig, J. Boutet, P. Rizo, P. Dumy and J.-L. Coll, *Int. J. Pharm.*, 2009, **379**, 309; (f) J. Dimastromatteo, L. M. Riou, M. Ahmadi, G. Pons, E. Pellegrini, A. Broisat, L. Sancey, T. Gavrilinea, D. Boturyn, P. Dumy, D. Fagret and C. Ghezzi, *J. Nucl. Cardiol.*, 2010, **17**, 435.
- (a) S. Foillard, Z. Jin, E. Garanger, D. Boturyn, M. Favrot, J.-L. Coll and P. Dumy, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 2326; (b) S. Foillard, L. Sancey, J.-L. Coll, D. Boturyn and P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 221.
- E. Garanger, D. Boturyn, J.-L. Coll, M.-C. Favrot and P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 1958.
- (a) C. Grandjean, C. Rommens, H. Gras-Masse and O. Melnyk, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, **39**, 1068; (b) Aucagne and D. A. Leigh, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 4505; (c) P. Kele, G. Mez, D. Achatz and O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 344; (d) J. Xiao and T. J. Tolbert, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 4134; (e) D. J. Lee, K. Mandal, P. W. R. Harris, M. A. Brimble and S. B. H. Kent, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 5270; (f) A. Vieyres, T. Lam,

- R. Gillet, G. Franc, A. Castonguay and A. Kakkar, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 1875; (g) A. Meyer, N. Spinelli, P. Dumy, J.-J. Vasseur, F. Morvan and E. Defrancq, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 3927.
- 15 (a) R. K. V. Lim and Q. Lin, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 1589; (b) J.-F. Lutz, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 2182.
- 16 M. Galibert, P. Dumy and D. Boturyn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 2576.
- 17 (a) K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 30; (b) J. Shao and J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 3893.
- 18 (a) C. W. Tornøe and M. Meldal, in *Peptides: The Wave of the Future* (ed.: H. Lebl, R. A. Houghten), American Peptide Society, San Diego, 2001, pp. 263; (b) C. W. Tornøe, C. Christensen and M. Meldal, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3057; (c) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 2596.
- 19 S. Foillard, M. Ohsten Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn and P. Dumy, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 983.
- 20 B. H. Nicolet and L. A. Shinn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 1615.
- 21 O. Renaudet and P. Dumy, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 7575.

Annexe III

RGD-cyclam conjugate: Synthesis and potential application for positron emission tomography

Galibert, M.; Jin, Z.-H.; Furukawa, T.; Fukumura, T.; Saga, T.; Fujibayashi, Y.; Dumy, P.; Boturyn, D. *Biomed Chem Lett* **2010**, 20 (18), 5422-5425



RGD–cyclam conjugate: Synthesis and potential application for positron emission tomography

Mathieu Galibert ^a, Zhao-Hui Jin ^b, Takako Furukawa ^b, Toshimitsu Fukumura ^b, Tsuneo Saga ^b, Yasuhisa Fujibayashi ^b, Pascal Dumy ^a, Didier Boturyn ^{a,*}

^a Département de Chimie Moléculaire, UMR-5250, CNRS–Université Joseph Fourier, Grenoble, France

^b Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2010

Revised 23 July 2010

Accepted 25 July 2010

Available online 3 August 2010

Keywords:

RGD conjugate

Cyclam

DOTA

⁶⁴Cu PET

ABSTRACT

Cyclam and DOTA-containing positron emission tomography radiotracers were prepared by using a modular chemical strategy based on peptide synthesis and chemoselective ligations. These molecules encompass two functional domains, one a tumour ‘homing’ domain and the other a chelating ligand for copper allowing nuclear imaging of tumours.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

In recent years, a series of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide conjugates was developed for the non-invasive imaging of tumours through the molecular targeting of $\alpha_v\beta_3$ integrin.¹ Different techniques were used including positron emission tomography (PET),² single photon emission tomography (SPECT),³ magnetic resonance imaging (MRI),⁴ and optical imaging.⁵ Among these methodologies, the most sensitive molecular imaging techniques are the radionuclide-based PET and SPECT imaging modalities.⁶ In particular, PET has emerged as non-invasive imaging technique since the most successful commercial radiopharmaceutical 2-deoxy-2-[¹⁸F]-fluoroglucose is routinely used for clinical evaluation (oncological imaging). At the same time, we and others designed and synthesized multivalent RGD (Arg-Gly-Asp) peptide ligands with enhanced binding affinity for $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins.⁷ We have shown that tetrameric RGD-containing scaffolds exhibit desirable biological properties for tumour imaging⁸ and for targeted drug delivery.⁹ These compounds contain a cluster of four copies of a cyclo[-RGDfK-] monomer grafted onto a cyclic decapeptide scaffold (Fig. 1). We recently measured the affinity constant (K_D) of RGD-containing compounds for purified integrins. K_D values rose from 3.87 nM for tetrameric RGD-containing compound to 41.70 nM for cyclo[-RGDfK-].¹⁰ This result agreed well with electronic microscopy study of $\alpha_v\beta_3$ /RGD-peptides. Tetrameric RGD peptide

but not monomeric RGD peptide could form clusters of two integrins.¹⁰ We also hypothesize that the observed multivalent effect could arise from a statistical rebinding of tetrameric-RGD peptide due to the high local concentration of RGD elements.

To further improve the in vivo imaging quality by enhancing the signal to noise ratio through the use of tetrameric RGD-containing scaffolds, we herein report the synthesis and applicability for PET imaging. Several reports have focused on the use of ¹⁸F to label RGD-containing probes.¹¹ For instance, molecular imaging using

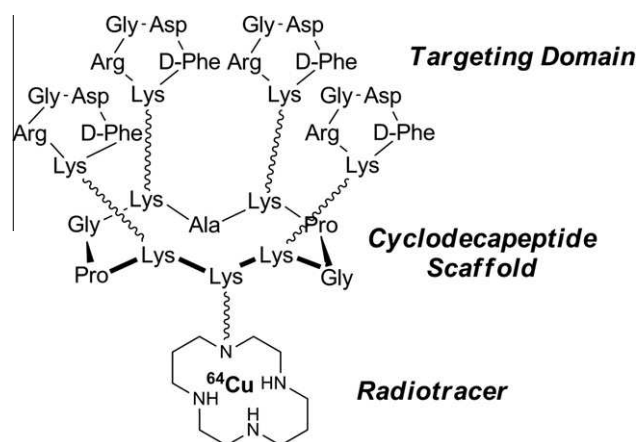
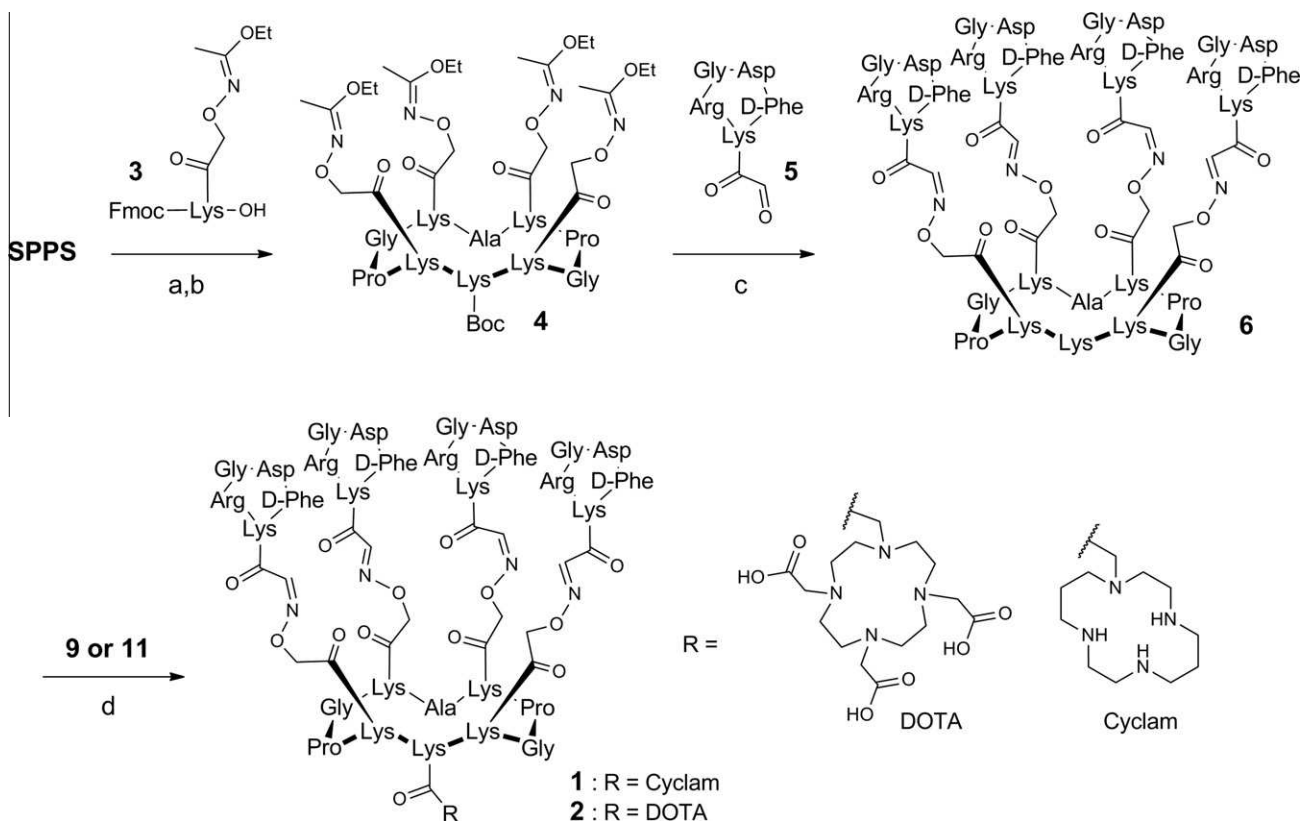


Figure 1. Structure of radiolabelled clustered RGD-containing compound.

* Corresponding author. Address: Département de Chimie Moléculaire, UMR-5250, CNRS–Université Joseph Fourier, 570 rue de la chimie, BP53, 38041 Grenoble cedex 9, France. Tel.: +33 4 56 52 08 32; fax: +33 4 56 52 08 05.

E-mail address: didier.boturyn@ujf-grenoble.fr (D. Boturyn).



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) Standard Fmoc SPPS chemistry; (b) PyBOP, DIPEA, DMF, 30 min; (c) **5** (6 equiv), TFA/H₂O (1:9), 1 h; (d) **9** or **11** (5 equiv), DIPEA (pH 9.0), DMF, 2 h, then TFA/TIS/H₂O (2 vol, 94:3:3), 2 h.

[¹⁸F]-galacto-RGD compound can efficiently show the level of $\alpha_v\beta_3$ expression in man and therefore this radiotracer can be potentially used for planning and controlling $\alpha_v\beta_3$ -targeted therapies.^{11a} Copper-based radiopharmaceuticals are also extensively used for PET. Cu-radionuclides offer a varying range of half-lives and decay forms that make copper an ideal radioisotope for PET imaging and radiotherapy. We decided to use ⁶⁴Cu radiotracer ($t_{1/2} = 12.7$ h), and RGD-containing compounds that exhibit DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) or Cyclam (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) chelate agents were designed (Fig. 1).

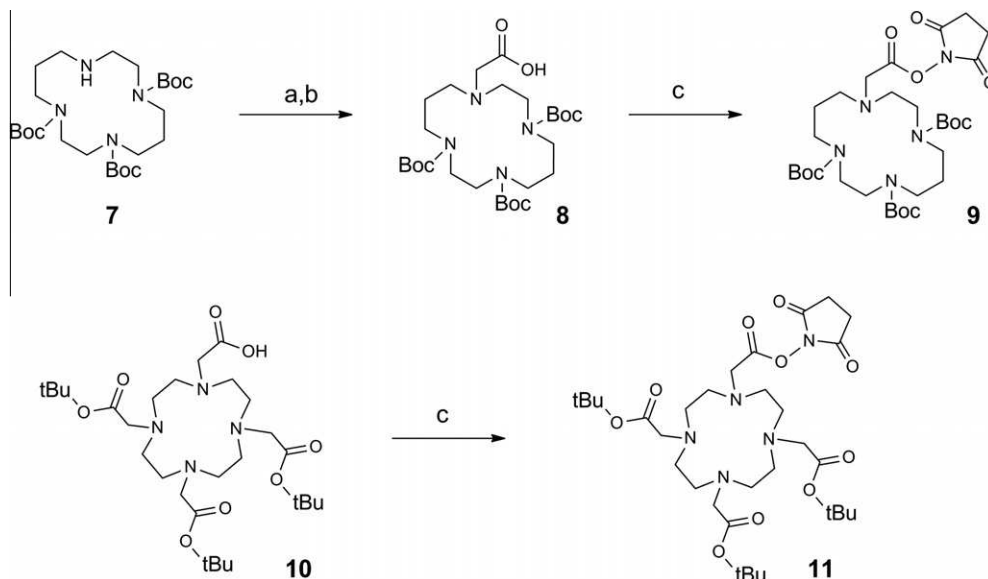
Scheme 1 gives an overview of the route to construct RGD conjugates **1–2**. A modular synthesis was adopted: stable oxime bonds were utilized to append aldehyde-bearing RGD motifs to the cyclodecapeptide scaffold prior to grafting copper chelators. All peptides were prepared by means of solid-phase peptide syntheses (SPPS) according to methods already developed by our group.¹² Aminoxy groups were directly incorporated during the SPPS by using the building block **3**. We have previously shown that the 1-ethoxyethylidene protecting group is entirely compatible with the SPPS and prevents the N-overacylation side reaction obtained with Boc protecting group.¹² The following head-to-tail cyclisation was performed in DMF under high dilution with PyBOP reagent as reported^{7d} providing the fully protected cyclodecapeptide **4**. By using a similar synthesis scheme,¹³ RGD compound **5** bearing a glyoxylyl aldehyde group at the lysine side chain was prepared. To append RGD targeting elements to the cyclodecapeptide scaffold, we performed full deprotection of **4** under acidic conditions and its chemoselective ligation with the peptide **5**. RP-HPLC purification afforded the key intermediate **6** in satisfying 70% yield. Compound **6** was characterized by ESI-MS and the observed molecular weight

(3877.0) was found in excellent agreement with the calculated values (3876.9).

In parallel, succinimidyl esters of Cyclam and DOTA were prepared (Scheme 2). Commercially available Cyclam **7** was coupled with ethyl bromoacetate and then treated under alkaline conditions to give the acid **8**. Cyclam **9** was then obtained by using *N*-hydroxysuccinimide and *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. Starting with acid **10**, we prepared the DOTA compound **11** using the same synthetic strategy. Finally, peptide intermediate **6** was coupled with succinimidyl esters of Cyclam or DOTA under mild condition (pH 8.0) to provide, respectively, the novel RGD-containing compounds **1** and **2** in 70% yields after RP-HPLC. The two conjugates **1** and **2** were characterised without ambiguity by ESI-MS as the deconvoluted masses were in total agreement with the calculated values.

As shown in Figure 2 (right chromatogram), the labelling using the DOTA-containing compound **2** was not complete after 1 h of incubation with ⁶⁴CuCl₂ at 37 °C: a significant amount of free copper remained in the reaction mixture. In contrast, the labelling via cyclam (Fig. 2, left chromatogram) gave no free copper under the same labelling condition. Labelling efficiencies obtained for radiotracers **1** and **2** were approximately 100% and 25%, respectively. Similar results were also revealed from autoradiography of TLC plate (see Supplementary data). Therefore, the use of cyclam as chelating agent for ⁶⁴Cu is far more advantageous than the use of DOTA.

For this reason, we next examined if ⁶⁴Cu radiotracer **1** is applicable for PET. The evaluation was performed on HEK(β_3) or HEK(β_1) ($\alpha_v\beta_3$ -negative control) tumour-bearing mice. The PET image at 5 h post-injection showed a strong tumour uptake in mouse who received a single dose of 3.7 MBq of ⁶⁴Cu radiotracer **1** (Fig. 3). As



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, Na_2CO_3 , CH_3CN , 85°C , 16 h; (b) NaOH , MeOH , 5 h; (c) NHS (1.4 equiv), DCC (1 equiv), AcOH/dioxane (1:1), 5 h.

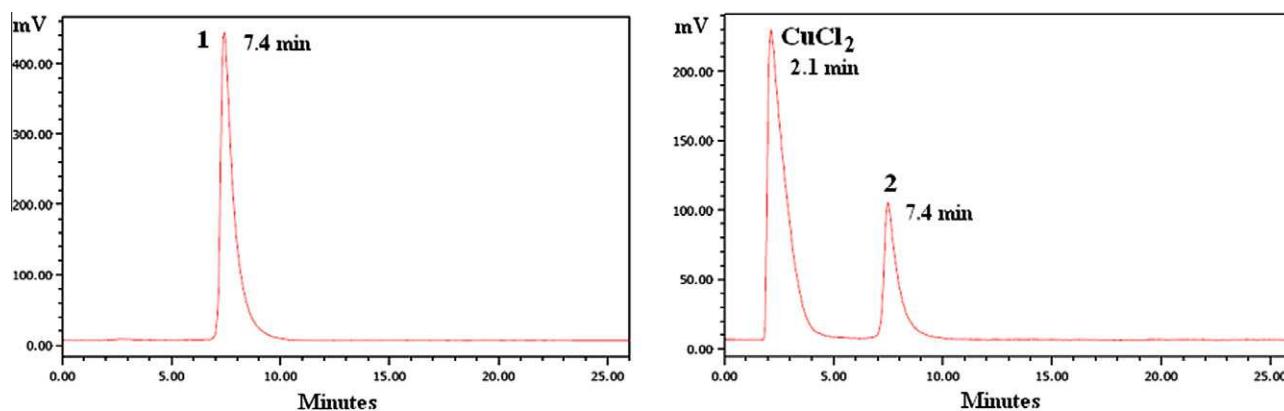


Figure 2. HPLC traces at 1 h for ^{64}Cu labelling of **1** (left chromatogram) and **2** (right chromatogram).

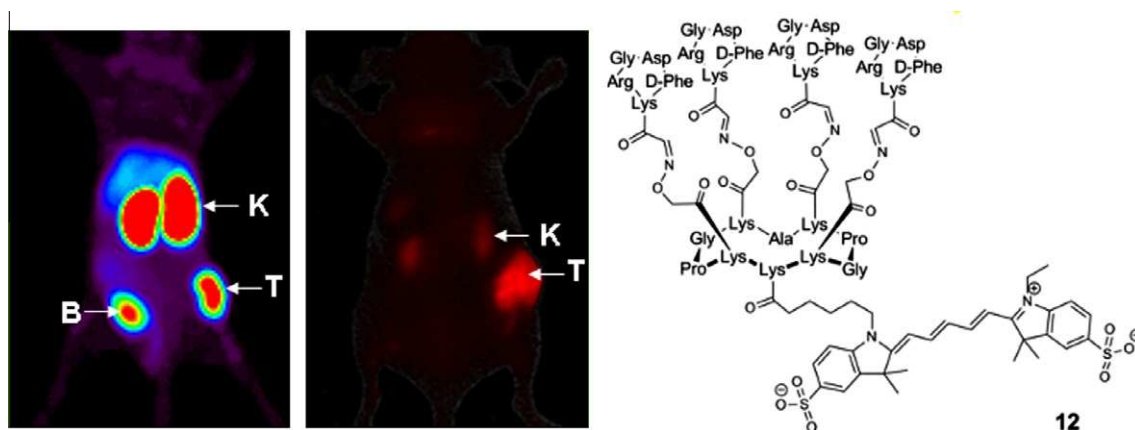


Figure 3. PET and optical image at 5 h of athymic nude mouse bearing subcutaneous $\alpha_v\beta_3$ (+) HEK(β_3) tumour. Mouse received tail vein injection (iv) of 3.7 MBq of ^{64}Cu radiotracer **1** (left) and 3 days later, iv injection of 10 nM of **12** (right). K = kidney, B = bladder, T = tumour.

expected, significant retention of radioactivity was found in kidneys and bladder. This result corroborates previous findings on Cy5-containing fluorescent probes **12** rapidly evacuated with urine.^{14,15} Urine samples collected from mice at 4 h post-injection were

analyzed and no free copper or Cu -cyclam complex was detected but a major compound that we assume to be a partially degraded peptide and a small amount of radiotracer **1**. Detailed in vivo metabolic stability studies will be evaluated in further study.

After 3 days, the same mouse was injected with RGD-containing fluorescent probe **12** (Fig. 3). The latter was extensively used for the in vivo optical imaging of tumour in mice⁸ and successfully exploited for the intraoperative near-infrared image-guided surgery.¹⁶ Optical imaging at 5 h post-injection of **12** shows the accumulation of clustered RGD compound within subcutaneous HEK(β_3) tumour and confirms that the selective targeting of tumour arises from RGD moieties. Further biodistribution studies in mice bearing HEK(β_3) or HEK(β_1) tumours demonstrate that ⁶⁴Cu radiotracer **1** had much lower radioactivity accumulation in $\alpha_V\beta_3$ -negative HEK(β_1) tumours (see Supplementary data). This result reinforces the selectivity of the targeting domain of ⁶⁴Cu radiotracer **1** for $\alpha_V\beta_3$ integrin.

In conclusion, we used a flexible and modular chemical strategy that gives access to the synthesis of radiotracers in good yields. From basic in vivo studies, ⁶⁴Cu radiotracer **1** allowed the non-invasive nuclear imaging of $\alpha_V\beta_3$ integrin-expressing tumours. This study emphasizes the use of Copper-64-based radiopharmaceuticals as potential oncological PET imaging agent, and further studies are currently carried out to determine the potential of ⁶⁴Cu radiotracer **1** for clinical imaging.

Acknowledgements

This work was supported by the Université Joseph Fourier, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and NanoBio (Grenoble).

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bmcl.2010.07.114.

References and notes

- Beer, A. J.; Schwaiger, M. *Cancer Metastasis Rev.* **2008**, *27*, 631.
- Wu, Y.; Zhang, X. Z.; Xiong, Z. M.; Cheng, Z.; Fisher, D. R.; Liu, S.; Gambhir, S. S.; Chen, X. Y. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 1707.
- Liu, S.; Hsieh, W. Y.; Jiang, Y.; Kim, Y. S.; Sreerama, S. G.; Chen, X. Y.; Jia, B.; Wang, F. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 438.
- Johansson, L. O.; Bjornerud, A.; Ahlstrom, H. K.; Ladd, D. L.; Fujii, D. K. *J. Magn. Reson. Imaging* **2001**, *13*, 615.
- Chen, X. Y.; Conti, P. S.; Moats, R. A. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 8009.
- Liu, S. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 2199.
- (a) Maynard, H. D.; Okada, S. Y.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1275; (b) Kok, R. J.; Schraa, A. J.; Bos, E. J.; Moorlag, H. E.; Åsgeirsdóttir, S. A.; Everts, M.; Meijer, D. K. F.; Molema, G. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 128; (c) Thumshirn, G.; Hersel, U.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2717; (d) Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Garanger, E.; Favrot, M.-C.; Dumy, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730; (e) Montet, X.; Funovics, M.; Montet-Abou, K.; Weissleder, R.; Josephson, L. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6087.
- (a) Jin, Z.; Razkin, J.; Jossierand, V.; Boturyn, D.; Grichine, A.; Texier, I.; Favrot, M.-C.; Dumy, P.; Coll, J.-L. *Mol. Imaging* **2007**, *6*, 43; (b) Sancey, L.; Ardisson, V.; Riou, L. M.; Ahmadi, M.; Marti-Batlle, D.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Fagret, D.; Ghezzi, C.; Vuillez, J.-P. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34*, 2037.
- (a) Foillard, S.; Jin, Z.; Garanger, E.; Boturyn, D.; Favrot, M.; Coll, J.-L.; Dumy, P. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2326; (b) Foillard, S.; Sancey, L.; Coll, J.-L.; Boturyn, D.; Dumy, P. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 221.
- Sancey, L.; Garanger, E.; Foillard, S.; Schoehn, G.; Hurbin, A.; Albiges-Rizo, C.; Boturyn, D.; Souchier, C.; Grichine, A.; Dumy, P.; Coll, J.-L. *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 837.
- (a) Haubner, R.; Weber, W. A.; Beer, A. J.; Vabulienė, E.; Reim, D.; Sarbia, M.; Becker, K. F.; Goebel, M.; Hein, R.; Wester, H. J.; Kessler, H.; Schwaiger, M. *PLoS Med.* **2005**, *2*, 244; (b) Zhang, X. Z.; Xiong, Z. M.; Wu, Y.; Cai, W. B.; Tseng, J. R.; Gambhir, S. S.; Chen, X. Y. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 113.
- Foillard, S.; Olsten Rasmussen, M.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983.
- Boturyn, D.; Dumy, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2787.
- Garanger, E.; Boturyn, D.; Jin, Z.; Dumy, P.; Favrot, M.-C.; Coll, J.-L. *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 1168.
- Jin, Z.; Jossierand, V.; Razkin, J.; Garanger, E.; Boturyn, D.; Favrot, M.-C.; Dumy, P.; Coll, J.-L. *Mol. Imaging* **2006**, *5*, 188.
- Keramidas, M.; Jossierand, V.; Righini, C. A.; Wenk, C.; Faure, C.; Coll, J. L. *Br. J. Surg.* **2010**, *97*, 737.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ¹ Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57-70.
- ² Genentech biooncology. <http://www.biooncology.com/images/pathways-lg.jpg>.
- ³ Carmeliet, P., Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **2005**, *438* (7070), 932-936.
- ⁴ Gambhir, S. S., Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2* (9), 683-693.
- ⁵ Allen, T. M., Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2* (10), 750-63.
- ⁶ Kohler, G.; Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256* (5517), 495-7.
- ⁷ <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Hybridomotechnik.png>.
- ⁸ Reichert, J. M.; Rosensweig, C. J.; Faden, L. B.; Dewitz, M. C., Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* **2005**, *23* (9), 1073-1078.
- ⁹ Gerber, D. E., Targeted therapies: A new generation of cancer treatments. *Am Fam Phys* **2008**, *77* (3), 311-319.
- ¹⁰ Reichert, J. M.; Valge-Archer, V. E., Outlook - Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, *6* (5), 349-356.
- ¹¹ McLaughlin, P.; Grillo-Lopez, A. J.; Link, B. K.; Levy, R.; Czuczman, M. S.; Williams, M. E.; Heyman, M. R.; Bence-Bruckler, I.; White, C. A.; Cabanillas, F., *et al.*, Rituximab chimeric Anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* **1998**, *16* (8), 2825-2833.
- ¹² (a) Czuczman, M. S.; Grillo-Lopez, A. J.; White, C. A.; Saleh, M.; Gordon, L.; LoBuglio, A. F.; Jonas, C.; Klippenstein, D.; Dallaire, B.; Varns, C., Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* **1999**, *17* (1), 268-76; (b) Lenz, G.; Dreyling, M.; Hoster, E.; Wormann, B.; Duhrsen, U.; Metzner, B.; Eimermacher, H.; Neubauer, A.; Wandt, H.; Steinhauer, H., *et al.*, Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: Results of a prospective randomized trial of the German low grade lymphoma study group (GLSG). *J Clin Oncol* **2005**, *23* (9), 1984-1992.
- ¹³ Weiner, L. M.; Surana, R.; Wang, S. Z., Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2010**, *10* (5), 317-327.
- ¹⁴ Sharkey, R. M.; Goldenberg, D. M., Use of antibodies and immunoconjugates for the therapy of more accessible cancers. *Adv Drug Deliver Rev* **2008**, *60* (12), 1407-1420.
- ¹⁵ (a) Hamann, P. R.; Hinman, L. M.; Hollander, I.; Beyer, C. F.; Lindh, D.; Holcomb, R.; Hallett, W.; Tsou, H. R.; Upeslaci, J.; Shochat, D., *et al.*, Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. *Bioconj Chem* **2002**, *13* (1), 47-58; (b) Sievers, E. L.; Larson, R. A.; Stadtmauer, E. A.; Estey, E.; Lowenberg, B.; Dombret, H.; Karanes, C.; Theobald, M.; Bennett, J. M.; Sherman, M. L., *et al.*, Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* **2001**, *19* (13), 3244-3254.
- ¹⁶ (a) Witzig, T. E.; Gordon, L. I.; Cabanillas, F.; Czuczman, M. S.; Emmanouilides, C.; Joyce, R.; Pohlman, B. L.; Bartlett, N. L.; Wiseman, G. A.; Padre, N., *et al.*, Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **2002**, *20* (10), 2453-2463; (b) Witzig, T. E.; Flinn, I. W.; Gordon, L. I.; Emmanouilides, C.; Czuczman, M. S.; Saleh, M. N.; Cripe, L.; Wiseman, G.; Olejnik, T.; Multani, P. S., *et al.*, Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **2002**, *20* (15), 3262-3269.
- ¹⁷ Wu, A. M.; Senter, P. D., Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* **2005**, *23* (9), 1137-1146.
- ¹⁸ Breedveld, F. C., Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* **2000**, *355* (9205), 735-740.
- ¹⁹ Lonberg, N., Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* **2005**, *23* (9), 1117-1125.

- ²⁰ Adams, G. P.; Weiner, L. M., Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **2005**, *23* (9), 1147-1157.
- ²¹ Hoogenboom, H. R., Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* **2005**, *23* (9), 1105-1116.
- ²² Biotech-Production.
http://www.roche.com/research_and_development/innovation_and_technologies/biotechnology/production.html.
- ²³ Carson, K. L., Flexibility-the guiding principle for antibody manufacturing. *Nat Biotechnol* **2005**, *23* (9), 1054-1058.
- ²⁴ Cartron, G.; Dacheux, L.; Salles, G.; Solal-Celigny, P.; Bardos, P.; Colombat, P.; Watier, H., Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma RIIIA gene. *Blood* **2002**, *99* (3), 754-758.
- ²⁵ Shinkawa, T.; Nakamura, K.; Yamane, N.; Shoji-Hosaka, E.; Kanda, Y.; Sakurada, M.; Uchida, K.; Anazawa, H.; Satoh, M.; Yamasaki, M., *et al.*, The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* **2003**, *278* (5), 3466-3473.
- ²⁶ Siberil, S.; Dutertre, C. A.; Boix, C.; Bonnin, E.; Menez, R.; Stura, E.; Jorieux, S.; Fridman, W. H.; Teillaud, J. L., Molecular aspects of human Fc gamma R interactions with IgG: Functional and therapeutic consequences. *Immunol Lett* **2006**, *106* (2), 111-118.
- ²⁷ Elnakat, H.; Ratnam, M., Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv Drug Deliver Rev* **2004**, *56* (8), 1067-1084.
- ²⁸ Asadishad, B.; Vosoughi, M.; Alamzadeh, I.; Tavakoli, A., Synthesis of Folate-Modified, Polyethylene Glycol-Functionalized Gold Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *J Disper Sci Technol* **2010**, *31* (4), 492-500.
- ²⁹ (a) Gabizon, A.; Tzemach, D.; Gorin, J.; Mak, L.; Amitay, Y.; Shmeeda, H.; Zalipsky, S., Improved therapeutic activity of folate-targeted liposomal doxorubicin in folate receptor-expressing tumor models. *Cancer Chemoth Pharm* **2010**, *66* (1), 43-52; (b) Leamon, C. P.; Reddy, J. A., Folate-targeted chemotherapy. *Adv Drug Deliver Rev* **2004**, *56* (8), 1127-1141.
- ³⁰ Zhang, Y. D.; Lu, J., Tc-99m Labeled Folate Tumor Imaging Agents. *Prog Chem* **2010**, *22* (4), 603-609.
- ³¹ Wiener, E. C.; Konda, S.; Shadron, A.; Brechbiel, M.; Gansow, O., Targeting dendrimer-chelates to tumors and tumor cells expressing the high-affinity folate receptor. *Invest Radiol* **1997**, *32* (12), 748-754.
- ³² Rigo, P.; Paulus, P.; Kaschten, B. J.; Hustinx, R.; Bury, T.; Jerusalem, G.; Benoit, T.; FoidartWillems, J., Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur J Nucl Med* **1996**, *23* (12), 1641-1674.
- ³³ Merwin, J. R.; Noell, G. S.; Thomas, W. L.; Chiou, H. C.; Derome, M. E.; McKee, T. D.; Spitalny, G. L.; Findeis, M. A., Targeted delivery of DNA using YEE(GalNAcAH)₃, a synthetic glycopeptide ligand for the asialoglycoprotein receptor. *Bioconj Chem* **1994**, *5* (6), 612-620.
- ³⁴ (a) Fulton, D. A.; Elemento, E. M.; Aime, S.; Chaabane, L.; Botta, M.; Parker, D., Glycoconjugates of gadolinium complexes for MRI applications. *Chem Commun* **2006**, (10), 1064-1066; (b) Prata, M. I. M.; Santos, A. C.; Torres, S.; Andre, J. P.; Martins, J. A.; Neves, M.; Garcia-Martin, M. L.; Rodrigues, T. B.; Lopez-Larrubia, P.; Cerdan, S., *et al.*, Targeting of lanthanide(III) chelates of DOTA-type glycoconjugates to the hepatic asialoglycoprotein receptor: cell internalization and animal imaging studies. *Contrast Media Mol I* **2006**, *1* (6), 246-258.
- ³⁵ (a) Seymour, L. W.; Ferry, D. R.; Anderson, D.; Hesslewood, S.; Julyan, P. J.; Poyner, R.; Doran, J.; Young, A. M.; Burtles, S.; Kerr, D. J., *et al.*, Hepatic drug targeting: Phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *J Clin Oncol* **2002**, *20* (6), 1668-1676; (b) Di Stefano, G.; Derenzini, M.; Kratz, F.; Lanza, M.; Fiume, L., Liver-targeted doxorubicin: effects on rat regenerating hepatocytes. *Liver Int* **2004**, *24* (3), 246-252.
- ³⁶ Toole, B. P.; Wight, T. N.; Tammi, M. I., Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J Biol Chem* **2002**, *277* (7), 4593-4596.

- ³⁷ Ponta, H.; Sherman, L.; Herrlich, P. A., CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2003**, *4* (1), 33-45.
- ³⁸ Luo, Y.; Bernshaw, N. J.; Lu, Z. R.; Kopecek, J.; Prestwich, G. D., Targeted delivery of doxorubicin by HPMA copolymer-hyaluronan bioconjugates. *Pharm Res* **2002**, *19* (4), 396-402.
- ³⁹ Leonelli, F.; La Bella, A.; Migneco, L. M.; Bettolo, R. M., Design, synthesis and applications of hyaluronic acid-paclitaxel bioconjugates. *Molecules* **2008**, *13* (2), 360-378.
- ⁴⁰ Ferrara, N.; Kerbel, R. S., Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **2005**, *438* (7070), 967-974.
- ⁴¹ Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R. G.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Aranout, 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* (5565), 151-155.
- ⁴² 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 F-18-labelled linear peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2002**, *29* (6), 754-759.
- ⁴³ 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* (3), 911-21.
- ⁴⁴ 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* (32), 20233-8.
- ⁴⁵ Goodman, S. L.; Holzemann, G.; Sulyok, G. A.; Kessler, H., Nanomolar small molecule inhibitors for alphav(beta)6, alphav(beta)5, and alphav(beta)3 integrins. *J Med Chem* **2002**, *45* (5), 1045-51.
- ⁴⁶ Haubner, R.; Wester, H. J.; Reuning, U.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Diefenbach, B.; Kessler, H.; Stocklin, G.; Schwaiger, M., Radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin antagonists: A new class of tracers for tumor targeting. *J Nucl Med* **1999**, *40* (6), 1061-1071.
- ⁴⁷ Sugahara, K. N.; Teesalu, T.; Karmali, P. P.; Kotamraju, V. R.; Agemy, L.; Greenwald, D. R.; Ruoslahti, E., Coadministration of a Tumor-Penetrating Peptide Enhances the Efficacy of Cancer Drugs. *Science* **2010**, *328* (5981), 1031-1035.
- ⁴⁸ Arap, W.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E., Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* **1998**, *279* (5349), 377-380.
- ⁴⁹ Mukhopadhyay, S.; Barnes, C. M.; Haskel, A.; Short, S. M.; Barnes, K. R.; Lippard, S. J., Conjugated platinum(IV)-peptide complexes for targeting angiogenic tumor vasculature. *Bioconj Chem* **2008**, *19* (1), 39-49.
- ⁵⁰ Chen, X. Y.; Plasencia, C.; Hou, Y. P.; Neamati, N., Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery. *J Med Chem* **2005**, *48* (4), 1098-1106.
- ⁵¹ Ellerby, H. M.; Arap, W.; Ellerby, L. M.; Kain, R.; Andrusiak, R.; Del Rio, G.; Krajewski, S.; Lombardo, C. R.; Rao, R.; Ruoslahti, E., *et al.*, Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* **1999**, *5* (9), 1032-1038.
- ⁵² Li, J. J.; Ji, J. F.; Holmes, L. M.; Burgin, K. E.; Barton, L. B.; Yu, X. Z.; Wagner, T. E.; Wei, Y. Z., Fusion protein from RGD peptide and Fc fragment of mouse immunoglobulin G inhibits angiogenesis in tumor. *Cancer Gene Ther* **2004**, *11* (5), 363-370.
- ⁵³ 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)beta(3) integrin expression using F-18-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res* **2001**, *61* (5), 1781-1785.
- ⁵⁴ Su, Z.; Liu, G. Z.; Gupta, S.; Zhu, Z. H.; Rusckowski, M.; Hnatowich, D. J., In vitro and in vivo evaluation of a technetium-99m-labeled cyclic RGD peptide as a specific marker of alpha(V)beta(3) integrin for tumor imaging. *Bioconj Chem* **2002**, *13* (3), 561-570.
- ⁵⁵ Wu, Y.; Zhang, X. Z.; Xiong, Z. M.; Cheng, Z.; Fisher, D. R.; Liu, S.; Gambhir, S. S.; Chen, X. Y., microPET imaging of glioma integrin alpha(V)beta(3) expression using Cu-64-labeled tetrameric RGD peptide. *J Nucl Med* **2005**, *46* (10), 1707-1718.
- ⁵⁶ Park, J. A.; Lee, J. J.; Jung, J. C.; Yu, D. Y.; Oh, C.; Ha, S.; Kim, T. J.; Chang, Y. M., Gd-DOTA Conjugate of RGD as a Potential Tumor-Targeting MRI Contrast Agent. *ChemBioChem* **2008**, *9* (17), 2811-2813.

- ⁵⁷ Jin, Z. H.; Josserand, V.; Razkin, J.; Garanger, E.; Boturyn, D.; Favrot, M. C.; Dumy, P.; Coll, J. L., Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK)(4). *Mol Imaging* **2006**, *5* (3), 188-197.
- ⁵⁸ Tuerk, C.; Gold, L., Systematic evolution of ligands by exponential enrichment - RNA ligands to bacteriophage-T4 DNA-polymerase. *Science* **1990**, *249* (4968), 505-510.
- ⁵⁹ Ellington, A. D.; Szostak, J. W., In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**, *346* (6287), 818-822.
- ⁶⁰ Keefe, A. D.; Pai, S.; Ellington, A., Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (7), 537-550.
- ⁶¹ Gragoudas, E. S.; Adamis, A. P.; Cunningham, E. T.; Feinsod, M.; Guyer, D. R.; Neova, V. I. S. O., Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **2004**, *351* (27), 2805-2816.
- ⁶² Hwang, D. W.; Ko, H. Y.; Lee, J. H.; Kang, H.; Ryu, S. H.; Song, I. C.; Lee, D. S.; Kim, S., A Nucleolin-Targeted Multimodal Nanoparticle Imaging Probe for Tracking Cancer Cells Using an Aptamer. *J Nucl Med* **2010**, *51* (1), 98-105.
- ⁶³ Lee, J. H.; Yigit, M. V.; Mazumdar, D.; Lu, Y., Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates. *Adv Drug Deliver Rev* **2010**, *62* (6), 592-605.
- ⁶⁴ Matsumura, Y.; Maeda, H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer-chemotherapy-mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* **1986**, *46* (12), 6387-6392.
- ⁶⁵ Faraji, A. H.; Wipf, P., Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (8), 2950-2962.
- ⁶⁶ Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; FaroKhazad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R., Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* **2007**, *2* (12), 751-760.
- ⁶⁷ (a) Lindgren, M.; Hallbrink, M.; Prochiantz, A.; Langel, U., Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* **2000**, *21* (3), 99-103; (b) Tamsamani, J.; Vidal, P., The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Drug Discov Today* **2004**, *9* (23), 1012-1019.
- ⁶⁸ Gupta, B.; Levchenko, T. S.; Torchilin, V. P., Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliver Rev* **2005**, *57* (4), 637-651.
- ⁶⁹ Hassane, F. S.; Saleh, A. F.; Abes, R.; Gait, M. J.; Lebleu, B., Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cell Mol Life Sci* **2010**, *67* (5), 715-726.
- ⁷⁰ Torchilin, V. P.; Rammohan, R.; Weissig, V.; Levchenko, T. S., TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, *98* (15), 8786-8791.
- ⁷¹ Tai, C. K.; Logg, C. R.; Park, J. M.; Anderson, W. F.; Press, M. F.; Kasahara, N., Antibody-mediated targeting of replication-competent retroviral vectors. *Hum Gene Ther* **2003**, *14* (8), 789-802.
- ⁷² (a) Gollan, T. J.; Green, M. R., Redirecting retroviral tropism by insertion of short, nondisruptive peptide ligands into envelope. *J Virol* **2002**, *76* (7), 3558-3563; (b) Borovjagin, A. V.; Krendelchtchikov, A.; Ramesh, N.; Yu, D. C.; Douglas, J. T.; Curiel, D. T., Complex mosaicism is a novel approach to infectivity enhancement of adenovirus type 5-based vectors. *Cancer Gene Ther* **2005**, *12* (5), 475-486.
- ⁷³ Khuri, F. R.; Nemunaitis, J.; Ganly, I.; Arseneau, J.; Tannock, I. F.; Romel, L.; Gore, M.; Ironside, J.; MacDougall, R. H.; Heise, C., *et al.*, A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* **2000**, *6* (8), 879-885.
- ⁷⁴ Waehler, R.; Russell, S. J.; Curiel, D. T., Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **2007**, *8* (8), 573-587.
- ⁷⁵ Parato, K. A.; Senger, D.; Forsyth, P. A. J.; Bell, J. C., Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* **2005**, *5* (12), 965-976.
- ⁷⁶ Bird, R. E.; Hardman, K. D.; Jacobson, J. W.; Johnson, S.; Kaufman, B. M.; Lee, S. M.; Lee, T.; Pope, S. H.; Riordan, G. S.; Whitlow, M., Single-Chain Antigen-Binding Proteins. *Science* **1988**, *242* (4877), 423-426.

- ⁷⁷ Nelson, A. L.; Reichert, J. M., Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat Biotechnol* **2009**, *27* (4), 331-337.
- ⁷⁸ Huhlov, A.; Chester, K. A., Engineered single chain antibody fragments for radioimmunotherapy. *Q J Nucl Med Mol Im* **2004**, *48* (4), 279-288.
- ⁷⁹ Todorovska, A.; Roovers, R. C.; Dolezal, O.; Kortt, A. A.; Hoogenboom, H. R.; Hudson, P. J., Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods* **2001**, *248* (1-2), 47-66.
- ⁸⁰ Holliger, P.; Hudson, P. J., Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **2005**, *23* (9), 1126-1136.
- ⁸¹ Hu, S. Z.; Shivery, L.; Raubitschek, A.; Sherman, M.; Williams, L. E.; Wong, J. Y. C.; Shively, J. E.; Wu, A. M., Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-C(H)3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res* **1996**, *56* (13), 3055-3061.
- ⁸² Holliger, P.; Prospero, T.; Winter, G., Diabodies - small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**, *90* (14), 6444-6448.
- ⁸³ Hollander, N., Bispecific antibodies for cancer therapy. *Immunotherapy* **2009**, *1* (2), 211-222.
- ⁸⁴ Kaspar, M.; Trachsel, E.; Neri, D., The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Res* **2007**, *67* (10), 4940-8.
- ⁸⁵ Olafsen, T.; Wu, A. M., Antibody Vectors for Imaging. *Semin Nucl Med* **2010**, *40* (3), 167-181.
- ⁸⁶ Park, B. W.; Zhang, H. T.; Wu, C. J.; Berezov, A.; Zhang, X.; Dua, R.; Wang, Q.; Kao, G.; O'Rourke, D. M.; Greene, M. I., *et al.*, Rationally designed anti-HER2/neu peptide mimetic disables p185(HER2/neu) tyrosine kinases in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* **2000**, *18* (2), 194-198.
- ⁸⁷ Feng, J. N.; Li, Y.; Zhang, W.; Shen, B. F., Rational design of potent mimic peptide derived from monoclonal antibody: antibody mimic design. *Immunol Lett* **2005**, *98* (2), 311-316.
- ⁸⁸ Casset, F.; Roux, F.; Mouchet, P.; Bes, C.; Chardes, T.; Granier, C.; Mani, J. C.; Pugniere, M.; Laune, D.; Pau, B., *et al.*, A peptide mimetic of an anti-CD4 monoclonal antibody by rational design. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, *307* (1), 198-205.
- ⁸⁹ Timmerman, P.; Barderas, R.; Desmet, J.; Altschuh, D.; Shochat, S.; Hollestelle, M. J.; Hoppener, J. W. M.; Monasterio, A.; Casal, J. I.; Meloen, R. H., A Combinatorial Approach for the Design of Complementarity-determining Region-derived Peptidomimetics with in Vitro Anti-tumoral Activity. *J Biol Chem* **2009**, *284* (49), 34126-34134.
- ⁹⁰ Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M., Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew Chem Int Ed* **1998**, *37* (20), 2755-2794.
- ⁹¹ 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* (50), 14922-14933.
- ⁹² Simons, K.; Ikonen, E., Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, *387* (6633), 569-572.
- ⁹³ Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E., Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction. *Angew Chem Int Ed* **2006**, *45* (15), 2348-2368.
- ⁹⁴ Carlson, C. B.; Mowery, P.; Owen, R. M.; Dykhuizen, E. C.; Kiessling, L. L., Selective tumor cell targeting using low-affinity, multivalent interactions. *Acs Chemical Biology* **2007**, *2* (2), 119-127.
- ⁹⁵ Sinha, R.; Kim, G. J.; Nie, S. M.; Shin, D. M., Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther* **2006**, *5* (8), 1909-1917.
- ⁹⁶ Hong, S.; Leroueil, P. R.; Majoros, I. J.; Orr, B. G.; Baker, J. R.; Holl, M. M. B., The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform. *Chem Biol* **2007**, *14* (1), 107-115.
- ⁹⁷ Zhang, Y. F.; Wang, J. C.; Bian, D. Y.; Zhang, X.; Zhang, Q., Targeted delivery of RGD-modified liposomes encapsulating both combretastatin A-4 and doxorubicin for tumor therapy: In vitro and in vivo studies. *Eur J Pharm Biopharm* **2010**, *74* (3), 467-473.

- ⁹⁸ Schiffelers, R. M.; Ansari, A.; Xu, J.; Zhou, Q.; Tang, Q. 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* (19).
- ⁹⁹ Sofou, S.; Sgouros, G., Anti body-targeted liposomes in cancer therapy and imaging. *Expert Opin Drug Deliv* **2008**, *5* (2), 189-204.
- ¹⁰⁰ Li, Z. M.; Huang, P.; Zhang, X. J.; Lin, J.; Yang, S.; Liu, B.; Gao, F.; Xi, P.; Ren, Q. S.; Cui, D. X., RGD-Conjugated Dendrimer-Modified Gold Nanorods for in Vivo Tumor Targeting and Photothermal Therapy. *Mol Pharmaceut* **2010**, *7* (1), 94-104.
- ¹⁰¹ Gao, J. H.; Chen, K.; Xie, R. G.; Xie, J.; Yan, Y. J.; Cheng, Z.; Peng, X. G.; Chen, X. Y., In Vivo Tumor-Targeted Fluorescence Imaging Using Near-Infrared Non-Cadmium Quantum Dots. *Bioconj Chem* **2010**, *21* (4), 604-609.
- ¹⁰² Tam, J. P., Synthetic Peptide Vaccine Design - Synthesis and Properties of a High-Density Multiple Antigenic Peptide System. *Proc Natl Acad Sci USA* **1988**, *85* (15), 5409-5413.
- ¹⁰³ Chen, X.; Hui, L.; Foster, D. A.; Drain, C. M., Efficient synthesis and photodynamic activity of porphyrin-saccharide conjugates: Targeting and incapacitating cancer cells. *Biochemistry* **2004**, *43* (34), 10918-10929.
- ¹⁰⁴ Kralova, J.; Koivukorpi, J.; Kejik, Z.; Pouckova, P.; Sievanen, E.; Kolehmainen, E.; Kral, V., Porphyrin-bile acid conjugates: from saccharide recognition in the solution to the selective cancer cell fluorescence detection. *Org Biomol Chem* **2008**, *6* (9), 1548-1552.
- ¹⁰⁵ Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T., Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 2045-2076.
- ¹⁰⁶ Hattori, K.; Kenmoku, A.; Mizuguchi, T.; Ikeda, D.; Mizuno, M.; Inazu, T., Saccharide-branched cyclodextrins as targeting drug carriers. *J Incl Phenom Macro* **2006**, *56* (1-2), 9-16.
- ¹⁰⁷ (a) Oda, Y.; Kobayashi, N.; Yamanoi, T.; Katsuraya, K.; Takahashi, K.; Hattori, K., beta-cyclodextrin conjugates with glucose moieties designed as drug carriers: Their syntheses, evaluations using concanavalin A and doxorubicin, and structural analyses by NMR spectroscopy. *Med Chem* **2008**, *4* (3), 244-255; (b) Oda, Y.; Miura, M.; Hattori, K.; Yamanoi, T., Syntheses and Doxorubicin-Inclusion Abilities of beta-Cyclodextrin Derivatives with a Hydroquinone alpha-Glycoside Residue Attached at the Primary Side. *Chem Pharm Bull* **2009**, *57* (1), 74-78.
- ¹⁰⁸ Cecioni, S.; Lalor, R.; Blanchard, B.; Praly, J. P.; Imbert, A.; Matthews, S. E.; Vidal, S., Achieving High Affinity towards a Bacterial Lectin through Multivalent Topological Isomers of Calix 4 arene Glycoconjugates. *Chem-Eur J* **2009**, *15* (47), 13232-13240.
- ¹⁰⁹ Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R., Calixarene-based multivalent ligands. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (2), 254-266.
- ¹¹⁰ Roy, O.; Faure, S.; Thery, V.; Didierjean, C.; Taillefumier, C., Cyclic beta-peptoids. *Org. Lett.* **2008**, *10* (5), 921-924.
- ¹¹¹ Le Grel, P.; Salaun, A.; Mocquet, C.; Le Grel, B.; Roisnel, T.; Potel, M., Postsynthetic modification of C-3-symmetric aza-beta(3)-cyclohexapeptides. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (4), 1306-1310.
- ¹¹² Shin, S. B. Y.; Yoo, B.; Todaro, L. J.; Kirshenbaum, K., Cyclic peptoids. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (11), 3218-3225.
- ¹¹³ 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* (6), 432-437.
- ¹¹⁴ (a) Mutter, M., Nature's rules and chemists tools- a way for creating novel proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **1988**, *13* (7), 260-265; (b) Yoo, B.; Shin, S. B. Y.; Huang, M. L.; Kirshenbaum, K., Peptoid Macrocycles: Making the Rounds with Peptidomimetic Oligomers. *Chem-Eur J* **2010**, *16* (19), 5528-5537.
- ¹¹⁵ Mocquet, C.; Salaun, A.; Claudon, P.; Le Grel, B.; Potel, M.; Guichard, G.; Jamart-Gregoire, B.; Le Grel, P., Aza-beta(3)-cyclopeptides: A New Way of Controlling Nitrogen Chirality. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (40), 14521-14525.
- ¹¹⁶ Robinson, J. A., beta-Hairpin Peptidomimetics: Design, Structures and Biological Activities. *Accounts Chem Res* **2008**, *41* (10), 1278-1288.

- ¹¹⁷ Trouche, N.; Wieckowski, S.; Sun, W.; Chaloin, O.; Hoebeke, J.; Fournel, S.; Guichard, G., Small multivalent architectures mimicking homotrimers of the TNF superfamily member CD40L: delineating the relationship between structure and effector function. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (44), 13480-92.
- ¹¹⁸ (a) Mutter, M.; Vuilleumier, S., A chemical approach to protein design - Template-Assembled Synthetic Proteins (TASP). *Angew Chem Int Ed* **1989**, *28* (5), 535-554; (b) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G., Template assembled synthetic proteins (TASP) as functional mimetics of proteins. *Angew Chem Int Ed* **1996**, *35* (13-14), 1482-1485.
- ¹¹⁹ 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* (3), 297-308.
- ¹²⁰ Peng, Z. H., Solid phase synthesis and NMR conformational studies on cyclic decapeptide template molecule. *Biopolymers* **1999**, *49* (7), 565-74.
- ¹²¹ 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* (8), 1255-1258.
- ¹²² Mutter, M.; Tuchscherer, G. G.; Miller, C.; Altmann, K. H.; Carey, R. I.; Wyss, D. F.; Labhardt, A. M.; Rivier, J. E., Template-Assembled Synthetic proteins with 4-helix-bundle topology - total chemical synthesis and conformational studies. *J Am Chem Soc* **1992**, *114* (4), 1463-1470.
- ¹²³ Rau, H. K.; Haehnel, W., Design, synthesis, and properties of a novel cytochrome b model. *J Am Chem Soc* **1998**, *120* (3), 468-476.
- ¹²⁴ Futaki, S., Peptide ion channels: Design and creation of function. *Biopolymers* **1998**, *47* (1), 75-81.
- ¹²⁵ Murat, P.; Cressend, D.; Spinelli, N.; Van der Heyden, A.; Labbe, P.; Dumy, P.; Defrancq, E., A novel conformationally constrained parallel g quadruplex. *ChemBioChem* **2008**, *9* (16), 2588-91.
- ¹²⁶ Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J., Control of amyloid beta-peptide protoribril formation by a designed template assembly. *Angew Chem Int Ed* **2006**, *45* (17), 2699-2702.
- ¹²⁷ Renaudet, O.; Krenek, K.; Bossu, I.; Dumy, P.; Kadek, A.; Adamek, D.; Vanek, O.; Kavan, D.; Gazak, R.; Sulc, M., *et al.*, Synthesis of Multivalent Glycoconjugates Containing the Immunoactive LELTE Peptide: Effect of Glycosylation on Cellular Activation and Natural Killing by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (19), 6800-6808.
- ¹²⁸ 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. *Bioconj Chem* **2005**, *16* (5), 1149-1159.
- ¹²⁹ Renaudet, O.; Dumy, P., Chemoselectively template-assembled glycoconjugates as mimics for multivalent presentation of carbohydrates. *Org. Lett.* **2003**, *5* (3), 243-246.
- ¹³⁰ 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* (19), 2221-2232.
- ¹³¹ Boturnyn, 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* (18), 5730-5739.
- ¹³² Garanger, E.; Boturnyn, 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* (10), 1958-1965.
- ¹³³ Foillard, S.; Dumy, P.; Boturnyn, D., Highly efficient cell adhesion on beads functionalized with clustered peptide ligands. *Org Biomol Chem* **2009**, *7* (20), 4159-4162.
- ¹³⁴ Sancey, L.; Garanger, E.; Foillard, S.; Schoehn, G.; Hurbin, A.; Albiges-Rizo, C.; Boturnyn, D.; Souchier, C.; Grichine, A.; Dumy, P., *et al.*, Clustering and Internalization of Integrin alpha(v)beta(3) With a Tetrameric RGD-synthetic Peptide. *Mol Ther* **2009**, *17* (5), 837-843.
- ¹³⁵ Garanger, E.; Boturnyn, D.; Jin, Z. H.; Dumy, P.; Favrot, M. C.; Coll, J. L., New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol Ther* **2005**, *12* (6), 1168-1175.

- ¹³⁶ Keramidas, M.; Josserand, V.; Righini, C. A.; Wenk, C.; Faure, C.; Coll, J. L., Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model. *Br J Surg* **2010**, *97* (5), 737-43.
- ¹³⁷ (a) 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 Tc-99m-RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2007**, *34* (12), 2037-2047; (b) Dimastromatteo, J.; Riou, L. M.; Ahmadi, M.; Pons, G.; Pellegrini, E.; Broisat, A.; Sancey, L.; Gavrulina, T.; Boturyn, D.; Dumy, P., *et al.*, In vivo molecular imaging of myocardial angiogenesis using the alpha(v)beta(3) integrin-targeted tracer Tc-99m-RAFT-RGD. *J Nucl Cardiol* **2010**, *17* (3), 435-443.
- ¹³⁸ 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* (10), 1069-+.
- ¹³⁹ 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* (1), 43-55.
- ¹⁴⁰ Foillard, S. Synthèse de nouveaux vecteurs peptidiques pour la thérapie anti-cancéreuse et l'imagerie tumorale. Thèse :Chimie-Biologie, Université Joseph Fourier, 2008.
- ¹⁴¹ Foillard, S.; Jin, Z. H.; Garanger, E.; Boturyn, D.; Favrot, M. C.; Coll, J. L.; Dumy, P., Synthesis and Biological Characterisation of Targeted Pro-Apoptotic Peptide. *ChemBioChem* **2008**, *9* (14), 2326-2332.
- ¹⁴² Foillard, S.; Sancey, L.; Coll, J. L.; Boturyn, D.; Dumy, P., Targeted delivery of activatable fluorescent pro-apoptotic peptide into live cells. *Org Biomol Chem* **2009**, *7* (2), 221-224.
- ¹⁴³ Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F., Amino acid-protecting groups. *Chem Rev* **2009**, *109* (6), 2455-504.
- ¹⁴⁴ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed* **2001**, *40* (11), 2004-+.
- ¹⁴⁵ Hackenberger, C. P. R.; Schwarzer, D., Chemoselective Ligation and Modification Strategies for Peptides and Proteins. *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47* (52), 10030-10074.
- ¹⁴⁶ (a) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B., Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **1994**, *266* (5186), 776-9; (b) Dawson, P. E.; Kent, S. B. H., Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu Rev Biochem* **2000**, *69*, 923-960; (c) Muir, T. W.; Sondhi, D.; Cole, P. A., Expressed protein ligation: A general method for protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**, *95* (12), 6705-6710.
- ¹⁴⁷ (a) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T., Staudinger ligation: A peptide from a thioester and azide. *Org. Lett.* **2000**, *2* (13), 1939-1941; (b) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T., High-yielding Staudinger ligation of a phosphinothioester and azide to form a peptide. *Org Lett* **2001**, *3* (1), 9-12.
- ¹⁴⁸ Shangguan, N.; Katukojvala, S.; Greenberg, R.; Williams, L. J., The reaction of thio acids with azides: a new mechanism and new synthetic applications. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (26), 7754-5.
- ¹⁴⁹ Knapp, S.; Darout, E., New reactions of selenocarboxylates. *Org Lett* **2005**, *7* (2), 203-6.
- ¹⁵⁰ Bode, J. W.; Fox, R. M.; Baucom, K. D., Chemoselective amide ligations by decarboxylative condensations of N-alkylhydroxylamines and alpha-ketoacids. *Angew Chem Int Ed* **2006**, *45* (8), 1248-1252.
- ¹⁵¹ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem* **2002**, *67* (9), 3057-64.
- ¹⁵² Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed* **2002**, *41* (14), 2596-9.
- ¹⁵³ (a) Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P., Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates: Chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Chem-Eur J* **2001**, *7* (18), 3976-3984; (b) Shao, J.; Tam, J. P., Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with Oxime, Hydrazone, and Thiazolidine linkages. *J Am Chem Soc* **1995**, *117*

- (14), 3893-3899; ^(c) Melnyk, O.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J.; Gras-Masse, H., Functionalization of peptides and proteins by aldehyde or keto groups. *Biopolymers* **2000**, *55* (2), 165-186.
- ¹⁵⁴ Wittrock, S.; Becker, T.; Kunz, H., Synthetic vaccines of tumor-associated glycopeptide antigens by immune-compatible thioether linkage to bovine serum albumin. *Angew Chem Int Ed* **2007**, *46* (27), 5226-30.
- ¹⁵⁵ de Araujo, A. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Seitz, O.; Alexandrov, K.; Waldmann, H., Diels-Alder ligation of peptides and proteins. *Chemistry* **2006**, *12* (23), 6095-109.
- ¹⁵⁶ Kent, S. B. H., Total chemical synthesis of proteins. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 338-351.
- ¹⁵⁷ Bang, D.; Kent, S. B. H., A one-pot total synthesis of crambin. *Angew Chem Int Ed* **2004**, *43* (19), 2534-2538.
- ¹⁵⁸ Torbeev, V. Y.; Kent, S. B. H., Convergent chemical synthesis and crystal structure of a 203 amino acid "covalent dimer" HIV-1 protease enzyme molecule. *Angew Chem Int Ed* **2007**, *46* (10), 1667-1670.
- ¹⁵⁹ Gramlich, P. M. E.; Warncke, S.; Gierlich, J.; Carell, T., Click-click-click: Single to triple modification of DNA. *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47* (18), 3442-3444.
- ¹⁶⁰ Jencks, W. P., Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation1. *J Am Chem Soc* **1959**, *81* (2), 475-481.
- ¹⁶¹ Rose, K., Facile Synthesis of Homogeneous Artificial Proteins. *J Am Chem Soc* **1994**, *116* (1), 30-33.
- ¹⁶² Kalia, J.; Raines, R. T., Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47* (39), 7523-7526.
- ¹⁶³ Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E., Nucleophilic catalysis of oxime ligation. *Angew Chem Int Ed* **2006**, *45* (45), 7581-7584.
- ¹⁶⁴ Zeng, Y.; Ramya, T. N. C.; Dirksen, A.; Dawson, P. E.; Paulson, J. C., High-efficiency labeling of sialylated glycoproteins on living cells. *Nat Meth* **2009**, *6* (3), 207-209.
- ¹⁶⁵ Baskin, J. M.; Dehnert, K. W.; Laughlin, S. T.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R., Visualizing enveloping layer glycans during zebrafish early embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **2010**, *107* (23), 10360-10365.
- ¹⁶⁶ Singh, Y.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P., Preparation of a multitopic glycopeptide-oligonucleotide conjugate. *Org. Lett.* **2005**, *7* (7), 1359-1362.
- ¹⁶⁷ Huisgen, R., 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew Chem Int Ed* **1963**, *2* (10), 565-632.
- ¹⁶⁸ Kolb, H. C.; Sharpless, K. B., The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today* **2003**, *8* (24), 1128-37.
- ¹⁶⁹ Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952-3015.
- ¹⁷⁰ Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G., Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48* (52), 9879-83.
- ¹⁷¹ Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R., Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1272-1279.
- ¹⁷² Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R., A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (46), 15046-15047.
- ¹⁷³ Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R., In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish. *Science* **2008**, *320* (5876), 664-667.
- ¹⁷⁴ Nefzi, A.; Sun, X. C.; Mutter, M., Chemoselective ligation of multifunctional peptides to topological templates via thioether formation for TASP synthesis. *Tetrahedron Lett* **1995**, *36* (2), 229-230.
- ¹⁷⁵ Englebretsen, D. R.; Garnham, B. G.; Bergman, D. A.; Alewood, P. F., A Novel Thioether Linker: Chemical Synthesis of a HIV-1 Protease Analogue by Thioether Ligation. *Tetrahedron Lett* **1995**, *36* (48), 8871-8874.
- ¹⁷⁶ Merrifield, R. B., Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **1963**, *85* (14), 2149-54.

- ¹⁷⁷ 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* (12), 4153-4160.
- ¹⁷⁸ Spetzler, J. C.; Hoeg-Jensen, T., Masked side-chain aldehyde amino acids for solid-phase synthesis and ligation. *Tetrahedron Lett* **2002**, *43* (12), 2303-2306.
- ¹⁷⁹ (a) 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* (3), 262-8; (b) 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. *Bioconj Chem* **1992**, *3* (2), 138-146.
- ¹⁸⁰ Wahl, F.; Mutter, M., Analogues of oxytocin with an oxime bridge using chemoselectively addressable building blocks. *Tetrahedron Lett* **1996**, *37* (38), 6861-6864.
- ¹⁸¹ Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P., 1-ethoxyethylidene, a new group for the stepwise SPPS of aminooxyacetic acid containing peptides. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (3), 983-991.
- ¹⁸² Spetzler, J. C.; Hoeg-Jensen, T., Preparation and application of O-amino-serine, Ams, a new building block in chemoselective ligation chemistry. *Journal of Peptide Science* **1999**, *5* (12), 582-592.
- ¹⁸³ Peluso, S.; Imperiali, B., Asparagine surrogates for the assembly of N-linked glycopeptide mimetics by chemoselective ligation. *Tetrahedron Lett* **2001**, *42* (11), 2085-2087.
- ¹⁸⁴ Isaad, A. L.; Barbetti, F.; Rovero, P.; D'Ursi, A. M.; Chelli, M.; Chorev, M.; Papini, A. M., N-alpha-Fmoc-Protected omega-Azido- and omega-Alkynyl-L-amino Acids as Building Blocks for the Synthesis of "Clickable" Peptides. *Eur J Org Chem* **2008**, (31), 5308-5314.
- ¹⁸⁵ Tejedor, D.; Lopez-Tosco, S.; Cruz-Acosta, F.; Mendez-Abt, G.; Garcia-Tellado, F., Acetylides from Alkyl Propiolates as Building Blocks for C-3 Homologation. *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48* (12), 2090-2098.
- ¹⁸⁶ Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D., One-Pot Approach to Well-Defined Biomolecular Assemblies by Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48* (14), 2576-2579.
- ¹⁸⁷ Alper, P. B.; Hung, S. C.; Wong, C. H., Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines. *Tetrahedron Lett* **1996**, *37* (34), 6029-6032.
- ¹⁸⁸ Nyffeler, P. T.; Liang, C. H.; Koeller, K. M.; Wong, C. H., The chemistry of amine-azide interconversion: Catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction. *J Am Chem Soc* **2002**, *124* (36), 10773-10778.
- ¹⁸⁹ Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V., An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: Imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3797-3800.
- ¹⁹⁰ Katayama, H.; Hojo, H.; Ohira, T.; Nakahara, Y., An efficient peptide ligation using azido-protected peptides via the thioester method. *Tetrahedron Lett* **2008**, *49* (38), 5492-5494.
- ¹⁹¹ (a) Wan, Q.; Chen, J. H.; Chen, G.; Danishefsky, S. J., A potentially valuable advance in the synthesis of carbohydrate-based anticancer vaccines through extended cycloaddition chemistry. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (21), 8244-8249; (b) Pachon, L. D.; van Maarseveen, J. H.; Rothenberg, G., Click chemistry: Copper clusters catalyse the cycloaddition of azides with terminal alkynes. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347* (6), 811-815.
- ¹⁹² Aucagne, V.; Leigh, D. A., Chemoselective formation of successive triazole linkages in one pot: "Click-click" chemistry. *Org. Lett.* **2006**, *8* (20), 4505-4507.
- ¹⁹³ Grandjean, C.; Rommens, C.; Gras-Masse, H.; Melnyk, O., One-pot synthesis of antigen-bearing, lysine-based cluster mannosides using two orthogonal chemoselective ligation reactions. *Angew Chem Int Ed* **2000**, *39* (6), 1068-+.
- ¹⁹⁴ Clave, G.; Boutal, H.; Hoang, A.; Perraut, F.; Volland, H.; Renard, P. Y.; Romieu, A., A novel heterotrifunctional peptide-based cross-linking reagent for facile access to bioconjugates. Applications to peptide fluorescent labelling and immobilisation. *Org Biomol Chem* **2008**, *6* (17), 3065-3078.
- ¹⁹⁵ Canne, L. E.; Ferredamare, A. R.; Burley, S. K.; Kent, S. B. H., Total chemical synthesis of a unique transcription factor-related protein: cMycMax. *J Am Chem Soc* **1995**, *117* (11), 2998-3007.

- ¹⁹⁶ Vieyres, A.; Lam, T.; Gillet, R.; Franc, G.; Castonguay, A.; Kakkar, A., Combined Cu-I-catalysed alkyne-azide cycloaddition and furan-maleimide Diels-Alder "click" chemistry approach to thermoresponsive dendrimers. *Chem Commun* **2010**, 46 (11), 1875-1877.
- ¹⁹⁷ (a) Xiao, J. P.; Tolbert, T. J., Synthesis of N-Terminally Linked Protein Dimers and Trimers by a Combined Native Chemical Ligation-CuAAC Click Chemistry Strategy. *Org. Lett.* **2009**, 11 (18), 4144-4147; (b) Lee, D. J.; Mandal, K.; Harris, P. W. R.; Brimble, M. A.; Kent, S. B. H., A One-Pot Approach to Neoglycopeptides using Orthogonal Native Chemical Ligation and Click Chemistry. *Org. Lett.* **2009**, 11 (22), 5270-5273.
- ¹⁹⁸ (a) Karskela, M.; Helkearo, M.; Virta, P.; Lonnberg, H., Synthesis of Oligonucleotide Glycoconjugates Using Sequential Click and Oximation Ligations. *Bioconj Chem* **2010**, 21 (4), 748-755; (b) Meyer, A.; Spinelli, N.; Dumy, P.; Vasseur, J. J.; Morvan, F.; Defrancq, E., Oligonucleotide sequential bis-conjugation via click-oxime and click-Huisgen procedures. *J Org Chem* **2010**, 75 (11), 3927-30.
- ¹⁹⁹ Galibert, M.; Sancey, L.; Renaudet, O.; Coll, J.-L.; Dumy, P.; Boturyn, D., Application of click-click chemistry to the synthesis of new multivalent RGD conjugates. *Org Biomol Chem* **2010**, 8 (22), 5133-5138.
- ²⁰⁰ Renaudet, O.; Dumy, P., Expedient synthesis of aminoxyated-carbohydrates for chemoselective access of glycoconjugates. *Tetrahedron Lett* **2001**, 42 (43), 7575-7578.
- ²⁰¹ Song, H. Y.; Ngai, M. H.; Song, Z. Y.; MacAry, P. A.; Hobley, J.; Lear, M. J., Practical synthesis of maleimides and coumarin-linked probes for protein and antibody labelling via reduction of native disulfides. *Org Biomol Chem* **2009**, 7 (17), 3400-3406.
- ²⁰² Cervigni, S. E.; Dumy, P.; Mutter, M., Synthesis of glycopeptides and lipopeptides by chemoselective ligation. *Angew Chem Int Ed* **1996**, 35 (11), 1230-1232.
- ²⁰³ Thygesen, M. B.; Munch, H.; Sauer, J.; Clo, E.; Jorgensen, M. R.; Hindsgaul, O.; Jensen, K. J., Nucleophilic Catalysis of Carbohydrate Oxime Formation by Anilines. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (5), 1752-1755.
- ²⁰⁴ Stashenko, P.; Nadler, L. M.; Hardy, R.; Schlossman, S. F., Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol* **1980**, 125 (4), 1678-1685.
- ²⁰⁵ Stashenko, P.; Nadler, L. M.; Hardy, R.; Schlossman, S. F., Expression of cell surface markers after human B lymphocyte activation. *P Natl Acad Sci-Biol* **1981**, 78 (6), 3848-3852.
- ²⁰⁶ Anderson, K. C.; Bates, M. P.; Slaughenhaupt, B. L.; Pinkus, G. S.; Schlossman, S. F.; Nadler, L. M., Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* **1984**, 63 (6), 1424-1433.
- ²⁰⁷ Pescovitz, M. D., Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: History and mechanism of action. *Am J Transplant* **2006**, 6 (5), 859-866.
- ²⁰⁸ van Meerten, T.; Hagenbeek, A., CD20-Targeted Therapy: The Next Generation of Antibodies. *Semin Hematol* **2010**, 47 (2), 199-210.
- ²⁰⁹ Reff, M. E.; Carner, K.; Chambers, K. S.; Chinn, P. C.; Leonard, J. E.; Raab, R.; Newman, R. A.; Hanna, N.; Anderson, D. R., Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **1994**, 83 (2), 435-445.
- ²¹⁰ Cardarelli, P. M.; Quinn, M.; Buckman, D.; Fang, Y.; Colcher, D.; King, D. J.; Bebbington, C.; Yarranton, G., Binding to CD20 by Anti-B1 Antibody or F(ab')(2) is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines. *Cancer Immunol Immun* **2002**, 51 (1), 15-24.
- ²¹¹ Smith, M. R., Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* **2003**, 22 (47), 7359-68.
- ²¹² Fanale, M. A.; Younes, A., Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Drugs* **2007**, 67 (3), 333-350.
- ²¹³ Cohen, S. B.; Emery, P.; Greenwald, M. W.; Dougados, M.; Furie, R. A.; Genovese, M. C.; Keystone, E. C.; Loveless, J. E.; Burmester, G. R.; Cravets, M. W., *et al.*, Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy - Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis and Rheumatism* **2006**, 54 (9), 2793-2806.

- ²¹⁴ Looney, R. J.; Anolik, J. H.; Campbell, D.; Felgar, R. E.; Young, F.; Arend, L. J.; Sloand, J. A.; Rosenblatt, J.; Sanz, I., B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus - A phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis and Rheumatism* **2004**, *50* (8), 2580-2589.
- ²¹⁵ Coiffier, B.; Lefretre, S.; Pedersen, L. M.; Gadeberg, O.; Fredriksen, H.; van Oers, M. H. J.; Wooldridge, J.; Kloczko, J.; Holowiecki, J.; Hellmann, A., *et al.*, Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study. *Blood* **2008**, *111* (3), 1094-1100.
- ²¹⁶ Polyak, M. J.; Deans, J. P., Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood* **2002**, *99* (9), 3256-3262.
- ²¹⁷ Perosa, F.; Favoino, E.; Caragnano, M. A.; Dammacco, F., Generation of biologically active linear and cyclic peptides has revealed a unique fine specificity of rituximab and its possible cross-reactivity with acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b precursor. *Blood* **2006**, *107* (3), 1070-1077.
- ²¹⁸ Binder, M.; Otto, F.; Mertelsmann, R.; Veelken, H.; Trepel, M., The epitope recognized by rituximab. *Blood* **2006**, *108* (6), 1975-1978.
- ²¹⁹ Ernst, J. A.; Li, H.; Kim, H. S.; Nakamura, G. R.; Yansura, D. G.; Vandlen, R. L., Isolation and characterization of the B-cell marker CD20. *Biochemistry* **2005**, *44* (46), 15150-15158.
- ²²⁰ Du, J. M.; Wang, H.; Zhong, C.; Peng, B. Z.; Zhang, M. L.; Li, B. H.; Huo, S.; Guo, Y. J.; Ding, J. P., Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody rituximab. *J Biol Chem* **2007**, *282* (20), 15073-15080.
- ²²¹ Al-Lazikani, B.; Lesk, A. M.; Chothia, C., Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* **1997**, *273* (4), 927-948.
- ²²² Frank, R., Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **1992**, *48* (42), 9217-9232.
- ²²³ Hilpert, K.; Elliott, M.; Jensen, H.; Kindrachuk, J.; Fjell, C. D.; Körner, J.; Winkler, D. F. H.; Weaver, L. L.; Henklein, P.; Ulrich, A. S., *et al.*, Screening and Characterization of Surface-Tethered Cationic Peptides for Antimicrobial Activity. *Chem Biol* **2009**, *16* (1), 58-69.
- ²²⁴ Reineke, U.; Volkmer-Engert, R.; Schneider-Mergener, J., Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. *Curr Opin Biotech* **2001**, *12* (1), 59-64.
- ²²⁵ Reineke, U.; Sabat, R., Antibody epitope mapping using SPOT peptide arrays. *Methods Mol Biol* **2009**, *524*, 145-67.
- ²²⁶ Laune, D.; Molina, F.; Ferrieres, G.; Mani, J. C.; Cohen, P.; Simon, D.; Bernardi, T.; Piechaczyk, M.; Pau, B.; Granier, C., Systematic exploration of the antigen binding-activity of synthetic peptides isolated from the variable regions of immunoglobulins. *J Biol Chem* **1997**, *272* (49), 30937-30944.
- ²²⁷ Monnet, C.; Laune, D.; Laroche-Traineau, J.; Biard-Piechaczyk, M.; Briant, L.; Bes, C.; Pugniere, M.; Mani, J. C.; Pau, B.; Cerutti, R., *et al.*, Synthetic peptides derived from the variable regions of an anti-CD4 monoclonal antibody bind to CD4 and inhibit HIV-1 promoter activation in virus-infected cells. *J Biol Chem* **1999**, *274* (6), 3789-3796.
- ²²⁸ Laune, D.; Molina, F.; Ferrieres, G.; Villard, S.; Bes, C.; Rieunier, F.; Chardes, T.; Granier, C., Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J Immunol Methods* **2002**, *267* (1), 53-70.
- ²²⁹ Snyder, D. A.; Chen, Y.; Denissova, N. G.; Acton, T.; Aramini, J. M.; Ciano, M.; Karlin, R.; Liu, J.; Manor, P.; Rajan, P. A., *et al.*, Comparisons of NMR Spectral Quality and Success in Crystallization Demonstrate that NMR and X-ray Crystallography Are Complementary Methods for Small Protein Structure Determination. *J Am Chem Soc* **2005**, *127* (47), 16505-16511.
- ²³⁰ Yee, A. A.; Savchenko, A.; Ignachenko, A.; Lukin, J.; Xu, X.; Skarina, T.; Evdokimova, E.; Liu, C. S.; Semesi, A.; Guido, V., *et al.*, NMR and X-ray Crystallography, Complementary Tools in Structural Proteomics of Small Proteins. *J Am Chem Soc* **2005**, *127* (47), 16512-16517.
- ²³¹ Rich, R. L.; Myszk, D. G., Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008: 'The Mighty Binders'. *J Mol Recognit* **2010**, *23* (1), 1-64.

- ²³² Pockrand, I.; Raether, H., Surface plasma oscillations at sinusoidal silver surfaces. *Appl Opt* **1977**, *16* (7), 1784-6.
- ²³³ Wilson, W. D., Analyzing biomolecular interactions. *Science* **2002**, *295* (5562), 2103-+.
- ²³⁴ Cooper, M. A., Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1* (7), 515-528.
- ²³⁵ Blasco, H.; Lalmanach, G.; Godat, E.; Maurel, M. C.; Canepa, S.; Belghazi, A.; Paintaud, G.; Degenne, D.; Chatelut, E.; Cartron, G., *et al.*, Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum. *J Immunol Methods* **2007**, *325* (1-2), 127-139.
- ²³⁶ Chen, X. Y.; Conti, P. S.; Moats, R. A., In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin $\alpha_5\beta_3$ in brain tumor xenografts. *Cancer Res* **2004**, *64* (21), 8009-8014.
- ²³⁷ von Wallbrunn, A.; Holtke, C.; Zuhlsdorf, M.; Heindel, W.; Schafers, M.; Bremer, C., In vivo imaging of integrin $\alpha_5\beta_3$ expression using fluorescence-mediated tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2007**, *34* (5), 745-754.
- ²³⁸ Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S., Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **2005**, *307* (5709), 538-544.
- ²³⁹ Smith, B. R.; Cheng, Z.; De, A.; Koh, A. L.; Sinclair, R.; Gambhir, S. S., Real-time intravital imaging of RGD-quantum dot binding to luminal endothelium in mouse tumor neovasculature. *Nano Lett.* **2008**, *8* (9), 2599-2606.
- ²⁴⁰ Higuchi, T.; Wester, H. J.; Schwaiger, M., Imaging of angiogenesis in cardiology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2007**, *34*, S9-S19.
- ²⁴¹ Zhang, C. F.; Jugold, M.; Woenne, E. C.; Lammers, T.; Morgenstern, B.; Mueller, M. M.; Zentgraf, H.; Bock, M.; Eisenhut, M.; Semmler, W., *et al.*, Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer Res* **2007**, *67* (4), 1555-1562.
- ²⁴² Sun, C.; Lee, J. S. H.; Zhang, M. Q., Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev* **2008**, *60* (11), 1252-1265.
- ²⁴³ Haukkala, J.; Laitinen, I.; Luoto, P.; Iveson, P.; Wilson, I.; Karlsen, H.; Cuthbertson, A.; Laine, J.; Leppanen, P.; Yla-Herttula, S., *et al.*, Ga-68-DOTA-RGD peptide: biodistribution and binding into atherosclerotic plaques in mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2009**, *36* (12), 2058-2067.
- ²⁴⁴ 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* (2), 326-336.
- ²⁴⁵ Beer, A. J.; Haubner, R.; Goebel, M.; Luderschmidt, S.; Spilker, M. E.; Wester, H. J.; Weber, W. A.; Schwaiger, M., Biodistribution and pharmacokinetics of the $\alpha_5\beta_3$ -selective tracer F-18-Galacto-RGD in cancer patients. *J Nucl Med* **2005**, *46* (8), 1333-1341.
- ²⁴⁶ (a) Chen, X. Y.; Liu, S.; Hou, Y. P.; Tohme, M.; Park, R.; Bading, J. R.; Conti, P. S., MicroPET imaging of breast cancer α_5 -integrin expression with Cu-64-labeled dimeric RGD peptides. *Molecular Imaging and Biology* **2004**, *6* (5), 350-359; (b) Chen, X. Y.; Hou, Y. P.; Tohme, M.; Park, R.; Khankaldyyan, V.; Gonzales-Gomez, I.; Bading, J. R.; Laug, W. E.; Conti, P. S., Pegylated Arg-Gly-Asp peptide: Cu-64 labeling and PET imaging of brain tumor $\alpha_5\beta_3$ -integrin expression. *J Nucl Med* **2004**, *45* (10), 1776-1783.
- ²⁴⁷ Smith, S. V., Molecular imaging with copper-64. *J Inorg Biochem* **2004**, *98* (11), 1874-1901.
- ²⁴⁸ Galibert, M.; Jin, Z.-H.; Furukawa, T.; Fukumura, T.; Saga, T.; Fujibayashi, Y.; Dumy, P.; Boturyn, D., RGD-cyclam conjugate: Synthesis and potential application for positron emission tomography. *Biomed Chem Lett* **2010**, *20* (18), 5422-5425.
- ²⁴⁹ Novak-Hofer, I.; Schubiger, A., Copper-67 as a therapeutic nuclide for radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2002**, *29* (6), 821-830.

Synthèse par ingénierie moléculaire de vecteurs peptidiques pour des applications anticancéreuses

La recherche sur le cancer s'oriente vers le développement de « stratégies ciblées » comme la vectorisation de composés actifs permettant d'augmenter l'efficacité thérapeutique et de réduire la toxicité du traitement. Dans ce contexte, ces travaux ont été consacrés à la conception de vecteurs peptidiques pour des applications anticancéreuses. Ces systèmes ont été élaborés à partir d'un châssis moléculaire cyclodécapeptidique présentant des propriétés conformationnelles particulières. Deux approches différentes ont été envisagées. La première a consisté à rechercher de nouveaux ligands de récepteurs tumoraux en s'inspirant du domaine de reconnaissance d'un anticorps monoclonal thérapeutique. Dans ce contexte, nous proposons la conception de mime du Rituximab ciblant l'antigène CD20 utilisé dans le traitement des lymphomes Non-Hodkinien. Dans la seconde approche, nous avons développé des vecteurs destinés à des applications d'imagerie tumorale. Pour cela, des châssis multivalents présentant des ligands peptidiques RGD ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont été conjugués avec différents agents de détection puis évalués par techniques d'imagerie TEP, IRM et imagerie optique. Dans ces deux stratégies, les systèmes de vecteurs sont constitués d'un domaine de reconnaissance présentant un ou plusieurs ligands, et d'un module effecteur composé d'un élément de détection, le tout assemblé sur le châssis moléculaire. Nous nous sommes donc intéressés à développer des procédures d'assemblages biomoléculaires permettant de moduler les sites d'accrochages du châssis. Pour cela, nous avons mis au point des méthodologies de synthèse originales combinant plusieurs ligations chimiosélectives orthogonales. On démontrera que cette stratégie offre de multiples avantages et permet un assemblage macromoléculaire en une seule étape sans déprotection ni purification intermédiaire.

Mots clés : Ligations chimiosélectives, Ligand -RGD-, mAb, Multivalence, Assemblage biomoléculaire, CuAAC, Oxime, Thioéther.

Peptide vector synthesis for cancer applications using molecular engineering

The cancer research focuses on the development of "targeted strategies" by increasing therapeutic efficacy and reducing toxicity. In this context, this work has been devoted to the design of peptide vectors for anticancer applications. These systems have been developed using a cyclodecapeptide scaffold which presents specific conformational properties. Two different approaches were considered. The first one was to investigate new tumor receptor ligands based on the recognition domain of a therapeutics monoclonal antibody. We propose the design of Rituximab mimics which targets the CD20 antigen used for the treatment of Non-Hodkinien lymphoma. In the second approach, we developed vectors for tumor imaging. For this purpose, multivalent scaffolds containing RGD peptide that target integrin $\alpha_v\beta_3$ were combined with several detection elements and evaluated by using PET, MRI and optical imaging techniques. In both strategies, delivery systems consist of a recognition domain bearing one or more ligands and an effector module consisting of an active element, both assembled on the molecular scaffold. Therefore, we developed procedures for biomolecular assemblies by modulating the grafting sites on scaffold. We have thendevloped synthetic methodologies combining several orthogonal chemoselective ligations. We demonstrate that this strategy offers many benefits and enables macromolecular assemblies in one step without intermediate purification or deprotection.

Key words: Chemoselective ligations, -RGD- ligand, mAb, Multivalency, Biomolecular assembly, CuAAC, Oxime, Thioether.