



**HAL**  
open science

# Conception, synthèse et caractérisation de vecteurs pour la nanomédecine : applications en thérapie anticancéreuse

Adrien Grassin

► **To cite this version:**

Adrien Grassin. Conception, synthèse et caractérisation de vecteurs pour la nanomédecine : applications en thérapie anticancéreuse. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV004 . tel-01179814

**HAL Id: tel-01179814**

**<https://theses.hal.science/tel-01179814>**

Submitted on 23 Jul 2015

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Adrien GRASSIN**

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

préparée au sein du **Département de Chimie Moléculaire**  
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

# Conception, synthèse et caractérisation de vecteurs pour la nanomédecine : applications en thérapie anticancéreuse

Thèse soutenue publiquement le **5 Mai 2015**,  
devant le jury composé de :

**Mr, Benoit, FRISCH**

Directeur de Recherche, Université de Strasbourg, Rapporteur

**Mr, Gilles, SUBRA**

Professeur, Université de Montpellier 1, Rapporteur

**Mr, Arnaud, FAVIER**

Chargé de recherche, INSA Lyon, Examineur

**Mr, Fabrice, THOMAS**

Professeur, Université Grenoble-Alpes, Président

**Mr, Didier, BOTURYN**

Directeur de recherche, Université Grenoble-Alpes, Examineur

**Mr, Pascal, DUMY**

Professeur, École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, Examineur



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Prof Pascal Dumy, Directeur de l'École nationale supérieure de chimie de Montpellier, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire à Grenoble.

Je tiens également à remercier tout particulièrement le Dr Didier Boturyn de m'avoir dirigé, conseillé et accordé sa confiance pendant ces trois années.

Je souhaite remercier la région Rhône-Alpes pour le financement de ces travaux

Je souhaite également remercier vivement les personnes d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail :

- Prof Fabrice Thomas
- Dr Arnaud Favier
- Prof Gilles Subra
- Dr Benoit Frisch

Je tiens à remercier le Dr Jean-Luc Coll et toute son équipe à l'Institut Albert Bonniot de Grenoble de m'avoir accueilli et encadré pour les évaluations sur cellules. Je tiens à remercier tout particulièrement Maxime Henry d'avoir pris le temps de me former, et Thibault Jacquet de nous avoir aidé par la suite, mais aussi Laetitia, Sandrine, Victor, Tao, Anastasia et Yoon pour leur accueil et leur disponibilité.

Je tiens également à remercier le Prof Patrick Couvreur pour son accueil chaleureux, ainsi que toute son équipe à l'Institut Galien de l'Université Paris Sud pour la formulation des nanoparticules de squalène. Je tiens à remercier tout particulièrement Simona Mura de m'avoir encadré au long de ces deux mois, ainsi que mes collègues de bureau pour leur aide précieuse : Dunja, Nadia et Alice, mais également Julie Mougin.

Je tiens aussi à remercier le Dr Arnaud Favier et Damien Duret pour la collaboration et les échanges que nous avons eu pour la conception des polymères modifiés.

Je souhaite également remercier tous le laboratoire I2BM, en particulier le Dr Muriel Jourdan pour son aide très précieuse sur la modélisation. Mais aussi tous les membres du laboratoire que j'ai rencontrés et qui m'ont aidé tout au long de ma thèse, en particulier Christopher, Michaël, Émilie, Nabil, Baptiste, Romaric, Morgane, Dhruv, Hugues, Marie, Damien, Fabien, Marc et Carlo.

Je souhaite aussi remercier tout le personnel du DCM, en particulier le plateau de spectrométrie de masse et le plateau de spectrométrie RMN.

Je souhaite enfin remercier ma famille et mes proches, Hélène, Bérenger, Mathias, Cyrielle, mes sœurs Mathilde et Julie, et enfin mes parents Antoine et Evelyne pour m'avoir soutenu tout au long de mes études.

## Table des matières

Abréviations .....	viii
INTRODUCTION.....	1
1 Préambule.....	2
2 Le développement de la nanomédecine .....	3
3 Vectorisation .....	5
3.1 Effet EPR .....	6
3.1.1 Limitations de l'effet EPR et améliorations.....	7
3.1.2 PEGylation .....	7
3.2 Utilisation de ligands .....	11
3.2.1 Cell penetrating peptides (CPP).....	12
3.2.2 Acide Folique (vitamine B9).....	12
3.2.3 Acide Hyaluronique .....	13
3.2.4 Anticorps .....	14
3.2.5 Aptamères.....	16
3.2.6 Sucres .....	18
3.2.7 Transferrine .....	19
3.2.8 Peptides .....	19
3.2.9 Interactions avec le micro environnement de la tumeur .....	21
3.2.10 Avantages et limitations des ligands .....	22
4 Nanoparticules.....	23
4.1 Nanoparticules Lipidiques .....	23
4.1.1 Micelles .....	23
4.1.2 Liposomes .....	24
4.1.3 Nanoparticules à base de lipides solides – Lipides nanostructurés.....	25
4.2 Nanoparticules polymériques.....	27
4.2.1 Dendrimères .....	27

4.2.2	Polymères .....	28
4.2.2.1	Poly(alkyl cyanoacrylate) .....	28
4.2.2.2	Acide hyaluronique.....	28
4.2.2.3	Chitosane .....	29
4.2.2.4	Acide lactique / glycolique .....	30
4.3	Nanoparticules inorganiques.....	31
4.3.1	Or.....	31
4.3.2	Oxyde de fer .....	33
4.3.3	Quantum Dots .....	34
4.4	Nanotubes de carbone .....	36
5	Objectifs des travaux .....	38
CHAPITRE I OPTIMISATION DU VECTEUR PEPTIDIQUE .....		40
1	Introduction .....	41
1.1	L'interaction RGD-intégrine.....	41
1.2	Résultats antérieurs du laboratoire.....	42
2	Conception et synthèse.....	44
3	Résultats et discussions .....	53
3.1	Déroulement des tests biologiques.....	53
3.2	Résultats.....	54
3.3	Modélisation moléculaire.....	56
3.3.1	Introduction .....	56
3.3.2	Résultats et discussions .....	57
4	Conclusions et perspectives .....	62
CHAPITRE II DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE DE REACTION « ONE-POT » .....		63
1	Introduction .....	64
1.1	CuAAC .....	66
1.2	Thioacid-mediated amine acylation (TAA).....	67

2	Optimisation de la TAA .....	68
2.1	Influence de la concentration .....	69
2.2	Effet du tampon.....	69
2.3	Effet du catalyseur .....	70
3	Étude de la réaction « one-pot » CuAAC + TAA .....	71
3.1	Objectif .....	71
3.2	Synthèse des composés .....	72
3.3	Cinétique .....	74
3.3.1	Réactions séquentielles CuAAC puis TAA .....	75
3.3.2	Réactions séquentielles TAA puis CuAAC .....	76
3.3.3	Réactions CuAAC/TAA simultanément .....	78
4	Couplage de composés d'intérêt biologique .....	78
5	Conclusion.....	82
CHAPITRE III SYNTHÈSE ET FONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES POUR LA THÉRAPIE .....		83
1	Introduction .....	84
2	Antécédents .....	84
2.1	Nanoparticules « squalénées » .....	84
2.2	Lipopeptides.....	88
3	Conception et Synthèse .....	88
4	Formulation et évaluation biologique des NP .....	94
4.1	Formulation.....	94
5	Conclusion et perspectives .....	99
CHAPITRE IV SYNTHÈSE ET FONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES POUR L'IMAGERIE.....		100
1	Introduction .....	101
2	Antécédents .....	101
2.1	Conjugués polymériques.....	101

2.1.1	Polymérisation RAFT .....	101
2.1.2	Copolymères NAM/NAS .....	101
2.1.3	Applications en imagerie.....	103
3	Conception et Synthèse .....	104
3.1	Introduction.....	104
3.2	Polymères linéaires .....	104
3.3	Nanoparticules polymériques.....	107
3.3.1	Conception .....	107
3.3.2	Avancement et perspectives .....	108
4	Résultats .....	108
5	Conclusions et perspectives .....	111
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES .....		112
PARTIE EXPERIMENTALE.....		116
BIBLIOGRAPHIE .....		156
ANNEXES .....		168

## Abréviations

<b>ABC</b>	Accelerated blood clearance	<b>FR</b>	Folate receptor
<b>Ac</b>	Acétyl	<b>HACA</b>	Human anti-chimeric antibodies
<b>AcOEt</b>	acetate d'éthyl		1-[Bis(dimethylamino)methylene]-
<b>AcOH</b>	Acide acétique	<b>HATU</b>	1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique		3-oxid hexafluorophosphate
<b>AH</b>	Acide hyaluronique	<b>HEK(293)</b>	Lignée de cellules embryonnaires
<b>Alloc</b>	Allyloxycarbonyl		de rein humain
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique	<b>HPLC</b>	High pressure liquid
<b>ASGP-R</b>	Asialoglycoprotein receptor		chromatography
<b>Boc</b>	<i>Tertio</i> -butyloxycarbonyl		Concentration inhibant un
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumine	<b>IC50</b>	paramètre de 50%
	Complementarity determining	<b>IFN-<math>\alpha</math>2a</b>	Interféron $\alpha$ 2a
<b>CDR</b>	region	<b>IRM</b>	Imagerie par Résonance
<b>CMC</b>	Concentration micellaire critique		Magnétique
<b>CNT</b>	Carbon nanotube	<b>KAHA</b>	Ketoacid-hydroxylamine
<b>CPP</b>	Cell penetrating peptide	<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
	Copper Catalyzed Azide-Alkyne	<b>MET</b>	Microscopie électronique en
<b>CuAAC</b>	Cycloaddition		transmission
<b>DCC</b>	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide	<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>DIPEA</b>	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine	<b>MMP</b>	Matrix metalloproteinase
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -Diméthylformamide		3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
	Dégénérescence maculaire liée à	<b>MTT</b>	diphenyltetrazolium bromide
<b>DMLA</b>	l'âge	<b>NCL</b>	Native chemical ligation
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde	<b>NHS</b>	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
<b>DSC</b>	Differential scanning calorimetry	<b>NK</b>	Natural killer
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor	<b>NP</b>	Nanoparticule
	Enhanced Permeability and	<b>ON</b>	Oligonucléotide
<b>EPR</b>	Retention effect	<b>PACA</b>	poly(alkyl cyanoacrylate)
<b>équiv.</b>	Équivalent molaire	<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>ESI</b>	Electrospray Ionisation	<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	Éther diéthylique	<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>EtOH</b>	Éthanol		Polymerization-induced self-
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	<b>PISA</b>	assembly
<b>Fmoc</b>	9-Fluorénylméthoxyloxycarbonyl	<b>PLGA</b>	poly(lactic-co-glycolic acid)

## Abréviations

---

<b>PSMA</b>	Prostate specific membrane antigen (Benzotriazol-1-yl)oxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate	<b>SPION</b>	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles
<b>PyBOP</b>	yl)oxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate	<b>SPPS</b>	Synthèse peptidique sur phase solide
<b>QD</b>	Quantum dot	<b>SQ</b>	Squalène
<b>RAFT</b>	reversible addition fragmentation chain transfer	<b>t.a.</b>	Température ambiante
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire	<b>TAT</b>	Trans-Activator of Transcription
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species	<b>t-Bu</b>	<i>Tertio</i> -butyl
	Reverse Phase High-	<b>TFA</b>	Acide trifluoroacétique
<b>RP-HPLC</b>	PerformanceLiquid Chromatography	<b>TIS</b>	Triisopropylsilane
<b>r.t.</b>	Room temperature	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumour Necrosis Factor $\alpha$
<b>SELEX</b>	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment	<b>t<sub>R</sub></b>	Temps de rétention
<b>SLN</b>	Solid lipid nanoparticle	<b>Trt</b>	trityl
		<b>UHPLC</b>	Ultra high pressure liquid chromatography
		<b>UV</b>	Ultraviolet
		<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor

# **INTRODUCTION**

## 1 Préambule

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération non contrôlée de cellules anormales. C'est la première cause de mortalité dans les pays développés et la deuxième cause de mortalité dans les pays en voie de développement.<sup>[1]</sup> On estime à 14,1 millions le nombre de nouveaux cas de cancer et à 8,2 millions le nombre de décès liés au cancer en 2012.

Le cancer du poumon est le plus diagnostiqué et celui avec le taux de mortalité le plus élevé chez l'homme. Le tabagisme entraîne plus de 70% des décès par cancer du poumon. Chez la femme, le cancer du sein est le plus diagnostiqué et responsable du plus grand nombre de décès. L'hérédité joue un rôle majeur chez 5% des patients seulement, et 30% des cancers sont causés par un style de vie peu sain : tabagisme, consommation d'alcool, surpoids, alimentation pauvre en fruits et légumes et exposition aux rayons UV.

Il existe 3 types de traitements :

- la chirurgie (ablation chirurgicale de la tumeur et, éventuellement, de ses extensions)
- la radiothérapie (traitement par diverses sources et modalités de rayonnement)
- les traitements médicamenteux (chimiothérapie, hormonothérapie, immunothérapie...)

Afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles, il est habituellement utilisé une combinaison de ces trois traitements. Dans la plupart des cas, une ablation chirurgicale est suivie d'une chimiothérapie ou radiothérapie afin d'éliminer les cellules cancéreuses restantes et d'éviter les récurrences. Il est également important de préciser que chaque cas de cancer est unique. Ainsi, il n'existe pas de traitement universel, chaque patient doit recevoir un traitement choisi en fonction des caractéristiques de la tumeur.

Cependant ces traitements présentent plusieurs inconvénients. En effet la chirurgie est une approche très invasive et peut laisser des cellules tumorales résiduelles non détectables. La radiothérapie et la chimiothérapie sont deux techniques non sélectives, c'est-à-dire qu'elles détruisent les cellules tumorales comme les cellules saines, ce qui implique des effets secondaires très importants. La chimiothérapie peut aussi s'avérer inefficace lorsque les cellules cancéreuses développent une résistance aux principes actifs.

Les limites des traitements actuels ont conduit à la recherche de nouveaux traitements moins invasifs et plus spécifiques. Depuis plus de 30 ans, l'explosion de la nanomédecine a permis de développer de nombreux traitements alternatifs potentiels, mais seulement quelques-uns sont actuellement disponibles sur le marché. Ceci témoigne de la difficulté rencontrée pour

transférer les techniques développées en laboratoire à l'échelle industrielle pour la mise sur le marché, dans le cas des systèmes nanoparticulaires.

## 2 Le développement de la nanomédecine

Paul Ehrlich (1854-1915) est souvent considéré comme le père de la chimiothérapie, c'est-à-dire du traitement des maladies par des substances chimiques. Il a inventé en 1907 le premier agent chimiothérapeutique dans le cadre du traitement de la syphilis, le Salvarsan, puis a reçu le prix Nobel en 1908 pour ses recherches sur l'immunologie.



Figure 1 - Paul Ehrlich

Ses travaux sur les colorants lui ont permis de comprendre que l'effet biologique d'un composé chimique dépendait de sa composition, et de la cellule avec laquelle il interagissait. En observant la sélectivité de certains colorants pour certains organes il a émis l'idée d'une « magic bullet », un composé qui permettrait d'amener un principe actif sélectivement à la zone à traiter. Il a ainsi relié la chimie à la biologie et la médecine.<sup>[2]</sup>

*“In order to use Chemotherapy successfully we must search for substances which have an affinity to the cells of the parasites and a power of killing them greater than the damage such substances cause to the organism itself, so that the destruction of the parasites will be possible without seriously hurting the organism. To do this, we must learn to aim with chemical substances”<sup>[3]</sup>*

- Paul Ehrlich

Près d'un siècle après ces premières découvertes, la communauté scientifique est toujours activement à la recherche d'une « magic bullet » qui permettrait d'augmenter l'efficacité du traitement tout en réduisant les nombreux effets secondaires causés par les chimiothérapies anticancéreuses actuelles. Pour ce faire, la majorité des travaux publiés découlant de ce concept

utilise des systèmes nanoparticulaires : lipidiques ou polymériques et plus récemment inorganiques.

Les nanoparticules sont des particules mesurant de quelques nanomètres à une centaine de nanomètres. Elles sont entre 100 et 10 000 fois plus petites qu'une cellule humaine. Une échelle de taille est représentée dans la Figure 2.

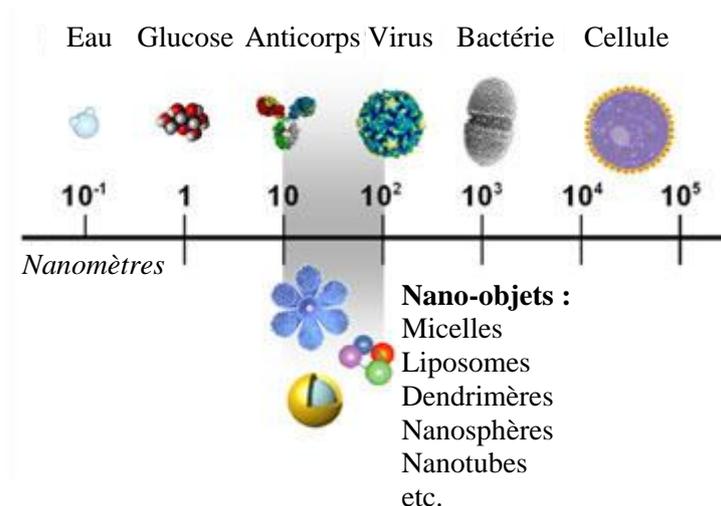


Figure 2 - Échelle de taille allant de la molécule à la cellule

Le développement des nanoparticules (NPs) pour le transport de principes actifs a commencé pendant les années 1970, dans le laboratoire du Prof. Peter Speiser, à l'ETH Zürich, notamment avec l'aide du Prof. Patrick Couvreur.<sup>[4]</sup>

Dans le cadre d'un usage thérapeutique, les NPs permettent d'amener à la tumeur des composés lipophiles et/ou hydrophiles augmentant ainsi leur solubilité et leur biodisponibilité. Elles permettent aussi d'augmenter les doses limites de toxicité. Ces principes actifs sont généralement encapsulés dans la nanoparticule, par interactions hydrophobe ou hydrophiles. Lorsqu'elles sont destinées à un usage diagnostique, les nanoparticules permettent d'amener à la tumeur des composés possédant des propriétés fluorescentes après excitation.

Afin de cibler préférentiellement le microenvironnement tumoral, les NPs peuvent être conçues pour s'accumuler dans les imperfections des vaisseaux sanguins irriguant la tumeur. Elles peuvent être également fonctionnalisées par des ligands spécifiques à certains récepteurs surexprimés à la surface des cellules tumorales. Les nanoparticules sont le plus souvent recouvertes de polyéthylène glycol (PEG) afin d'augmenter leur temps de circulation *in vivo*. Les groupements PEG empêchent les NPs d'être reconnues par les protéines présentes dans le

sang chargées d'éliminer les corps étrangers.<sup>[5-7]</sup> Ces techniques constituent le concept de vectorisation.

Des milliers d'articles concernant le développement de NPs ont été publiés, mais seulement une poignée de systèmes nanoparticulaires ont été approuvés pour des applications cliniques.<sup>[8]</sup> Plusieurs facteurs en sont la cause.

Tout d'abord, il est impossible de déterminer les caractéristiques (diamètre, forme, composition, etc.) de la nanoparticule idéale. Ceci doit être fait au cas par cas. Ensuite, les modèles animaux utilisés ne sont pas représentatifs des cas cliniques humains, et le comportement des nanoparticules *in vivo* est bien plus complexe chez l'Homme que chez les petits animaux (souris, rats, etc.). Les systèmes nanoparticulaires développés en laboratoire par les chercheurs sont souvent très complexes. Il est donc difficile et coûteux de les produire à grande échelle tout en obtenant une reproductibilité des formulations.<sup>[9-10]</sup> De plus, il n'existe pas de standards concernant la caractérisation des nanoparticules (taille, dynamiques de relargage, etc.) ainsi que les tests *in vivo* et *in vitro*.<sup>[11-12]</sup>

Malgré ces défis à relever, les NPs ont un avenir prometteur. Le marché de la nanomédecine était estimé entre 50,1 et 68 milliards de dollars en 2011 et devrait atteindre entre 97 et 129 milliards de dollars en 2016, selon un rapport récent de la société Bionest Partners. Les traitements à base de NPs disponibles aujourd'hui (Doxil<sup>®</sup>, Abraxane<sup>®</sup>...) ont permis d'assurer une place aux nanoparticules dans le combat contre le cancer, en permettant de diminuer les effets secondaires et dans certains cas d'augmenter l'efficacité thérapeutique par rapport aux traitements classiques.<sup>[9]</sup>

Enfin, le caractère versatile des NPs permet le développement de plusieurs techniques et stratégies novatrices. La théranostique personnalisée (diagnostic + thérapie) par exemple, permet de combiner la thérapie et l'imagerie non invasive, afin de valider puis d'optimiser le traitement pour chaque patient.<sup>[13]</sup> Le traitement de cancers métastatiques peut être également développé grâce au temps de circulation plasmatique prolongé des NPs, combiné à différents modes d'injection pour cibler différents organes.<sup>[14]</sup>

### **3 Vectorisation**

On rappelle qu'il existe deux approches pour la vectorisation de nanoparticules, souvent appelées dans la littérature « ciblage passif » et « ciblage actif ».

La première repose principalement sur l'accumulation de NPs dans les vaisseaux sanguins irréguliers qui alimentent les tumeurs. Ce phénomène appelé « effet EPR » peut être accompagné d'une fonctionnalisation des NPs par des groupements polyéthylène glycol hydrophiles. Cette technique permet d'obtenir des NPs « furtives » en augmentant leur temps de circulation dans le sang.

La seconde approche exploite le fait que les cellules cancéreuses surexpriment de nombreux récepteurs par rapport aux cellules saines. La fonctionnalisation des NPs par des ligands qui vont interagir avec leurs récepteurs correspondants permet de faciliter leur internalisation dans les cellules cancéreuses.

Ces deux concepts sont détaillés dans les paragraphes ci-dessous.

### 3.1 Effet EPR

Afin de permettre leur croissance rapide, les tumeurs ont besoin d'un apport élevé en nutriments et en oxygène. Pour cela, des vaisseaux sanguins sont créés rapidement. Ils se caractérisent par une structure irrégulière ainsi que des cavités allant de 200 à 2000 nm de large.<sup>[15-16]</sup> Ces caractéristiques sont communes au processus de cicatrisation.<sup>[17]</sup> Les nanoparticules possédant un temps de circulation *in vivo* élevé (d'une dizaine d'heures à plusieurs mois) vont alors s'accumuler dans ces cavités.

Puisque les tumeurs ne possèdent pas de vaisseaux lymphatiques fonctionnels<sup>[18-19]</sup>, les nanoparticules ne sont pas évacuées au niveau de ces cavités. Elles peuvent ensuite atteindre la tumeur par extravasation grâce à une pression favorable.<sup>[15, 20]</sup> Les NPs biodégradables peuvent ensuite relarguer les composés d'intérêt après actions des diverses enzymes présentes dans l'environnement tumoral (cf. Figure 3).

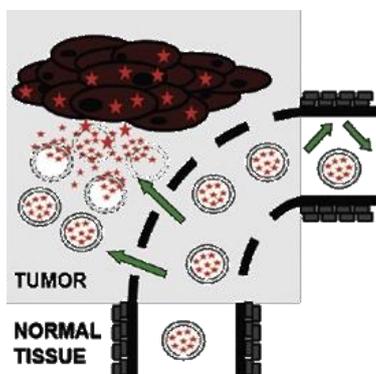


Figure 3 - Effet EPR - théorie

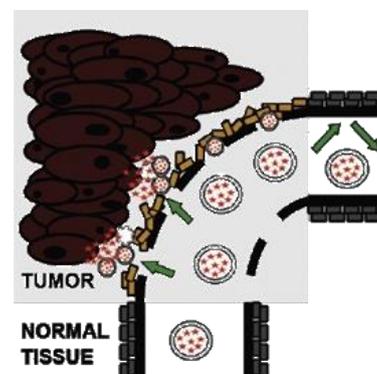


Figure 4 - Effet EPR – réalité

Ce sont ces deux caractéristiques (perméabilité des vaisseaux et rétention des nanoparticules) qui composent l'effet EPR, décrit pour la première fois en 1986 par Maeda *et al.*<sup>[21]</sup> La majorité des nanoparticules développées dans le cadre du traitement du cancer exploitent cet effet. De même, toutes les formulations nano approuvées par la FDA pour un usage clinique se basent sur l'effet EPR.

### 3.1.1 Limitations de l'effet EPR et améliorations

La majorité des études sont basées sur des rongeurs pour lesquels les tumeurs grandissent bien plus vite que chez l'Homme (quelques semaines contre quelques années). L'effet EPR est donc en général beaucoup moins prononcé chez l'humain, sauf dans certains cas particuliers, notamment le sarcome de Kaposi, qui répond assez bien aux traitements de ce type, tel que le Doxil<sup>®</sup>, formulation liposomale encapsulant la doxorubicine, un agent anticancéreux (cf. paragraphe 4.1.2).

Une autre limitation est que les nanoparticules doivent traverser plusieurs couches de cellules de péricytes, muscles lisses et fibroblastes pour atteindre leur cible (cf. Figure 4).

Il est possible en utilisant des nanoparticules chargées en agents d'imagerie de déterminer au cas par cas si la tumeur à traiter permet d'exploiter l'effet EPR, et d'adapter ainsi le traitement en fonction de ces résultats.<sup>[9]</sup>

Afin d'augmenter la perméabilité des vaisseaux et donc la rétention des nanoparticules, il est possible de traiter la tumeur avant l'injection de nanoparticules non ciblées. En utilisant des enzymes telles que la collagénase ou hyaluronidase<sup>[15-16, 22]</sup> ainsi que des agents anti-inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'histamine,<sup>[9]</sup> l'étape d'extravasation peut être facilitée en dégradant les barrières stromales ou en augmentant la perméabilité des vaisseaux sanguins. Cependant, ces traitements peuvent également favoriser le développement de métastases.<sup>[23]</sup>

### 3.1.2 PEGylation

Afin d'exploiter pleinement l'effet EPR, il est nécessaire que les NPs possèdent un temps de circulation dans le sang élevé. Pour éviter une élimination trop rapide par les macrophages, il est possible de rendre les nanoparticules « furtives » en les fonctionnalisant par une couche de polymères hydrophiles. Le polyéthylène glycol, ou « PEG », est couramment utilisé. Ce processus est appelé « PEGylation ».

Ce n'est pas une technique propre aux nanoparticules, puisque sa première utilisation remonte à 1977 lorsque Abuchowski *et al.* ont décrit la PEGylation de l'albumine et de la catalase afin de rendre ces protéines non immunogènes et d'augmenter leur temps de circulation dans le sang.<sup>[24-25]</sup>

Le premier traitement PEGylé approuvé par la FDA, en 1990 est l'Adagen<sup>®</sup>, une adénosine déaminase PEGylée pour le traitement du déficit immunitaire combiné sévère<sup>[26]</sup>. Depuis, plusieurs traitements PEGylés, (protéines, liposomes) ont été approuvés pour applications cliniques.

Dans le cas des liposomes, il existe une technique antérieure à celle de la PEGylation, datant de la fin des années 80 : en s'inspirant de la composition des membranes cellulaires riches en sucres des globules rouges, Allen *et al.* ont fonctionnalisé des liposomes par des gangliosides (composés entre autres d'acide sialique), et ont rapporté un temps de circulation plasmatique prolongé.<sup>[27]</sup> Au début des années 90, ces gangliosides ont ensuite été remplacés par des PEG, moins coûteux, et qui apportent des performances similaires.<sup>[28]</sup> Dans le cas de liposomes, le temps de demi-vie est multiplié par 8, passant de 2,5 heures à 20 heures.<sup>[29]</sup> Un chapitre de livre de Harris *et al.* rapporte l'effet de la PEGylation sur le temps de demi-vie de différentes protéines thérapeutiques.<sup>[30]</sup>

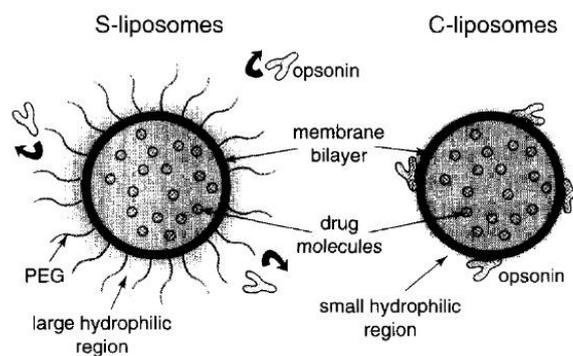


Figure 5 - Liposomes PEGylés et liposomes conventionnels <sup>[28]</sup>

Les groupements PEG hydrophiles apportent à la surface du liposome une concentration locale en molécules d'eau élevée, qui va créer une gêne stérique et empêcher les interactions avec une variété de protéines du sang, telles que les opsonines (cf. Figure 5).<sup>[31]</sup> Une opsonine est une protéine qui va se fixer sur un agent pathogène pour faciliter sa phagocytose.

Cette technique peut être appliquée à tous types de nanoparticules fonctionnalisables : NPs lipidiques, NPs polymériques, nanotubes de carbone, <sup>[32-33]</sup> etc.

Lorsque la densité de PEG en surface d'une NP est faible, les PEG adoptent une configuration « champignon », c'est-à-dire qu'ils sont repliés sur eux-mêmes. Lorsque la densité est élevée, les groupements PEG vont adopter une configuration « brosse », les chaînes étant étirées (cf. Figure 6).



Figure 6 - A gauche, configuration « champignon » - A droite, configuration « brosse » [34]

L'interféron, une glycoprotéine de la famille des cytokines est utilisé dans le cadre du traitement de l'hépatite C. Sa variante PEGylée, Pegasys®, permet d'effectuer des injections hebdomadaires plutôt que toutes les 48 heures (cf. Figure 7). Son élimination rénale est diminuée par un facteur 100.[35]

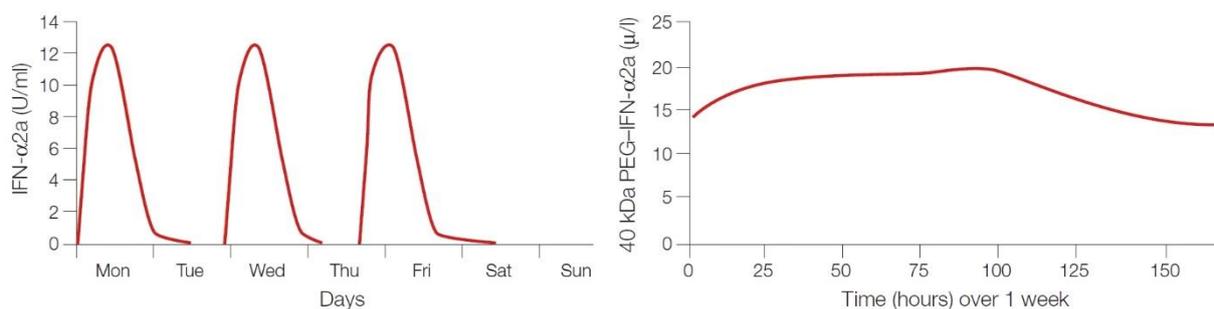


Figure 7 - Effet de la PEGylation sur la pharmacocinétique de l'interféron IFN-α2a [35]

Couvreur *et al.* ont également décrit l'effet bénéfique des groupements PEG sur la biodisponibilité de nanoparticules de polycyanoacrylate s'accumulant dans la rate. 30% des NPs PEGylées étaient présentes dans le plasma 6 heures après injection chez la souris, contre moins de 1% pour les NPs non PEGylées.[36]

Malgré cette amélioration très importante de la pharmacocinétique des NPs apportée par les groupements PEG, Ishida *et al.* ont observé un effet de mémoire : une première injection de nanoparticules PEGylées accélère l'élimination de ces mêmes NPs lors des injections suivantes (cf. Figure 8).[37-38] Cet effet est baptisé effet ABC pour « accelerated blood clearance » (élimination accélérée de la circulation sanguine).

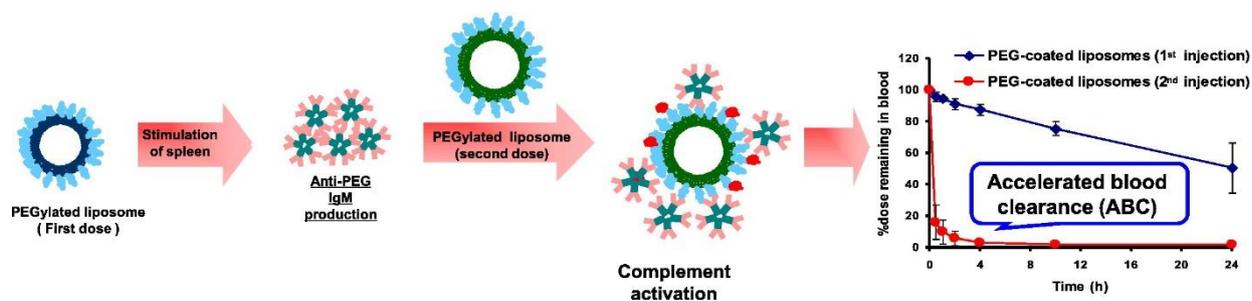


Figure 8 - Effet ABC lors d'injections répétées de NPs PEGylées [39]

Après la première injection, un anticorps spécifique anti-PEG (IgM anti-PEG), c'est-à-dire qui reconnaît les groupements  $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ , est produit en quelques jours dans la rate.

L'effet ABC est visible lorsque la deuxième injection est effectuée entre 5 et 21 jours après la première injection. Lors de la seconde injection, si les IgM anti-PEG sont toujours présentes dans le sang, elles vont pouvoir complexer les groupements PEG, activer l'opsonisation et l'élimination des NPs PEGylées (cf. Figure 8). En revanche, l'injection d'une troisième dose donne lieu à un effet ABC plus faible voire nul, ce qui serait dû à une saturation des macrophages à cause des injections répétées des NPs PEGylées.

Cet effet dépend cependant de plusieurs paramètres tels que les caractéristiques de la nanoparticule (taille, composition, dose d'agent cytotoxique contenue dans la NP), des groupements PEG utilisés, de la voie d'administration des NPs et du type d'animal sur lequel les tests sont effectués. Ces études prouvent que les NPs PEGylées ne sont pas si « furtives » et déclenchent une réponse du système immunitaire.<sup>[39]</sup>

Cependant, cet effet concerne principalement les liposomes pas ou très faiblement chargés en agents cytotoxiques. En effet, plusieurs publications décrivent que les liposomes contenant de la doxorubicine ou de la mitoxantrone ne déclenchent pas l'effet ABC. Ces agents cytotoxiques pourraient inhiber la prolifération de lymphocytes et de macrophages, empêchant ainsi la synthèse d'anticorps anti-PEG.<sup>[40-42]</sup> Cependant, ceci concerne les agents cytotoxiques non spécifiques du cycle cellulaire. Les liposomes contenant du topotecan (agent spécifique du cycle cellulaire, de la phase S, c'est-à-dire lors de la duplication du matériel génétique) déclenchent l'effet ABC. Ceci pourrait également être dû au fait que le topotecan est plus lipophile que la doxorubicine par exemple, et donc est expulsé du liposome beaucoup plus rapidement. Ainsi, au moment où le liposome arrive dans la rate, l'effet de l'agent cytotoxique sur les macrophages et lymphocytes est moindre.<sup>[43]</sup>

L'effet ABC n'est donc à priori pas à prendre en compte dans le cadre d'un traitement anticancéreux à base de NPs, mais doit être considéré pour des applications comme la théranostique, où les NPs sont moins chargées en agents cytotoxiques.

### 3.2 Utilisation de ligands

À cause de leur besoin de croissance continu, les cellules cancéreuses surexpriment un certain nombre de récepteurs par rapport aux cellules saines. Ces récepteurs peuvent être ciblés en utilisant divers ligands tels que des peptides, sucres, anticorps, aptamères ou de petites molécules. Le ciblage peut servir à améliorer la concentration locale en agents cytotoxiques, et permettre ou améliorer leur entrée dans la cellule, mais aussi dérégler la signalisation cellulaire. Les premières nanoparticules fonctionnalisées par des ligands de ciblage remontent à 1975. Les travaux de Gregoriadis sur des liposomes présentant des anticorps <sup>[44]</sup> ont ainsi permis de décrire l'internalisation des liposomes *via* une endocytose récepteur dépendant.

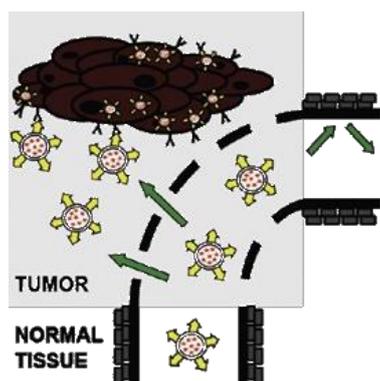


Figure 9 - Ciblage - théorie

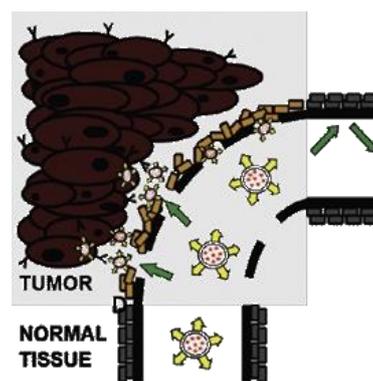


Figure 10 - Ciblage - réalité

L'utilisation de ligands n'est cependant pas une stratégie de ciblage en soi, elle est en fait complémentaire à l'effet EPR. En effet, l'utilisation de ligands ne permet pas d'amener directement les NPs aux cellules surexprimant ces récepteurs (cf. Figure 9). L'accumulation des NPs par effet EPR aux abords de la tumeur est une première étape nécessaire. Le ciblage permet ensuite d'améliorer l'internalisation cellulaire (cf. Figure 10).

Une stratégie multi-étapes peut alors être utilisée : des ligands PEG sont utilisés pour prolonger la circulation plasmatique de la NP, puis ceux-ci se décrochent aux environs de la tumeur pour faire apparaître des ligands de ciblage et ainsi favoriser l'internalisation de la particule. (cf. paragraphe 3.2.9)

Les ligands les plus utilisés et leurs récepteurs correspondants sont présentés ci-dessous.

### 3.2.1 Cell penetrating peptides (CPP)

Les CPP sont des peptides courts (en général moins de 30 a.a.) utilisés pour leur capacité à passer la membrane cellulaire. Ils sont la plupart du temps chargés positivement.

Le premier usage de CPP remonte à 1988 lorsque deux groupes décrivent indépendamment l'internalisation cellulaire de la protéine TAT [45-46], protéine de 86 acides aminés impliquée dans la transcription du virus du VIH. Neuf ans plus tard, Vivès *et al.* isolent la plus petite séquence nécessaire à l'internalisation cellulaire, constituée de 13 acides aminés : GRKKRRQRRPPQ.<sup>[47]</sup>

La plupart des CPP traversent les membranes *via* des interactions ioniques (poly arginine) avec la surface des cellules chargées négativement. Les résidus tryptophane des peptides peuvent également interagir avec les résidus tryptophanes présents à la surface des cellules.

Ces interactions sont donc non spécifiques et les CPP interagissent potentiellement avec toutes les cellules qu'ils rencontrent. En thérapie anti-cancéreuse, cela implique des effets secondaires importants. Pour éviter cet inconvénient, il est possible de créer des NPs furtives dont les PEG se détachent aux environs de la tumeur, exhibant ainsi les CPP uniquement autour de cellules tumorales (cf. paragraphe 3.2.9).

### 3.2.2 Acide Folique (vitamine B9)

Toutes les cellules vivantes nécessitent un apport en vitamines. Les cellules tumorales, à division rapide, ont un besoin particulièrement élevé en vitamines. C'est pourquoi elles surexpriment les récepteurs correspondants.<sup>[48]</sup>

L'acide folique, aussi connu sous le nom de vitamine B9, est une petite molécule (441,4 g/mol) nécessaire aux cellules eucaryotes pour la synthèse des nucléotides.

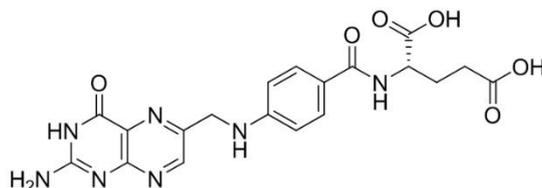


Figure 11 - Acide folique

La survie et la prolifération des cellules dépendent de la capacité de la cellule à capter cette molécule.<sup>[49]</sup>

Il a été décrit au début des années 90 que les deux principaux récepteurs à acide folique, FR- $\alpha$  et FR- $\beta$  sont surexprimés à la surface de certaines cellules cancéreuses, notamment dans le cas

des cancers de l'ovaire, utérus, endomètre, cerveau, rein, voies aérodigestives supérieures et mésothélium pour le récepteur FR- $\alpha$ , et leucémie et sarcome pour le récepteur FR- $\beta$ .<sup>[50-52]</sup>

L'endocytose de l'acide folique – ainsi que des conjugués de l'acide folique – donne lieu à une internalisation dans l'endosome, suivi d'une sortie de l'endosome vers le cytoplasme par un mécanisme encore inconnu.<sup>[49, 52-54]</sup> Ceci représente un grand avantage par rapport aux autres ligands de ciblage qui amènent les molécules dans le lysosome.

### 3.2.3 Acide Hyaluronique

L'acide hyaluronique est un polysaccharide naturel, alternant entre 250 et 25 000 motifs d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-D-glucosamine (cf. Figure 12). Il fait partie de la famille des glycosaminoglycanes.

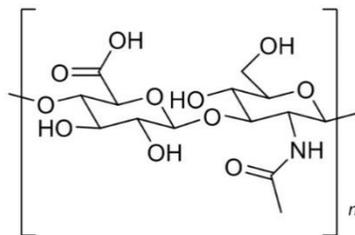


Figure 12 - Acide hyaluronique

Il est présent dans la matrice extracellulaire (MEC), le liquide synovial (liquide qui lubrifie les articulations), et de l'humeur vitrée des yeux. Il joue un rôle dans l'hydratation des tissus, puisqu'il fixe des molécules d'eau par ses groupements polaires et retient des cations hydratés. De plus, l'AH adopte une structure rigide très hydratée qui peut occuper en solution un volume près de 1 000 fois supérieur au volume occupé à l'état sec. Ainsi les solutions d'acide hyaluronique peuvent être très visqueuses, c'est pourquoi il est également impliqué dans l'absorption des chocs. L'AH est dégradé par l'hyaluronidase, qui hydrolyse les liaisons  $\beta(1\rightarrow4)$ .<sup>[55-56]</sup>

L'acide hyaluronique est également impliqué dans l'adhésion, la mobilité et la prolifération cellulaire par le biais de plusieurs récepteurs cellulaires dont CD44 et RHAMM qui sont surexprimés à la surface de certaines cellules cancéreuses. Le récepteur CD44 est également exprimé au niveau de la cornée et de la conjonctive. Ainsi les NPs constituées d'AH peuvent être utilisées pour le traitement de maladies oculaires.<sup>[57]</sup>

L'acide hyaluronique est un cas particulier puis qu'il est surtout utilisé comme matrice de nanoparticule (cf. paragraphe 4.2.2), et non pas comme ligand. Cependant, la couche extérieure d'acide hyaluronique peut interagir avec les récepteurs CD44 surexprimés.<sup>[58-61]</sup>

Une fois à l'intérieur des cellules, les NPs sont dégradées par les hyaluronidases présentes dans le cytosol des cellules cancéreuses.

### 3.2.4 Anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines synthétisés par les lymphocytes B, qui neutralisent les éléments étrangers ayant pénétré dans l'organisme, en reconnaissant des antigènes. L'anticorps se fixe sur l'antigène, puis le complexe anticorps-antigène est reconnu à son tour par les cellules du système immunitaire (lymphocytes NK, macrophages, protéines du complément), qui induisent la mort de l'élément étranger.

Tous les anticorps monoclonaux spécifiques d'un antigène ne reconnaissent qu'un épitope de cet antigène, alors que les anticorps polyclonaux sont un mélange très hétérogène d'anticorps monoclonaux reconnaissant tous le même antigène, mais sur des épitopes différents.

Les anticorps sont formés de 4 chaînes polypeptidiques :

- Deux chaînes lourdes identiques d'environ 50 kDa
- Deux chaînes légères identiques d'environ 25 kDa

Ils adoptent une structure en Y. Un anticorps est composé de 2 parties : le fragment Fab et le fragment Fc, liés entre eux par une région charnière flexible (cf. Figure 13).

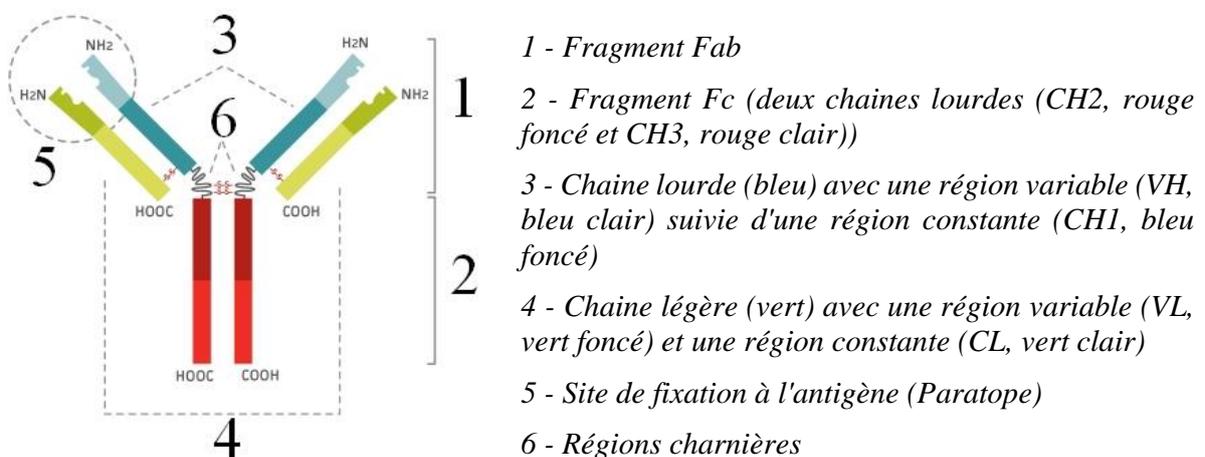


Figure 13 - Composition d'un anticorps<sup>[62]</sup>

La synthèse d'anticorps monoclonaux grâce aux hybridomes fut décrite en 1975<sup>[63]</sup> par Kohler *et al.* Les premières thérapies à base d'anticorps ont rapidement rencontré un obstacle majeur lorsqu'il a été découvert que les mAb murins engendraient une réponse immunitaire chez l'Homme *via* la production d'anticorps anti-mAb murins (Human anti-murine antibody,

HAMA).<sup>[64-65]</sup> Ce phénomène a conduit à la production d'anticorps chimériques dans un premier temps, puis humanisés dans un second temps (cf. Figure 14).

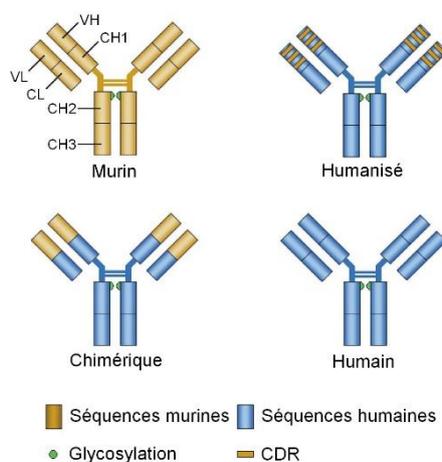


Figure 14 - Anticorps murin, chimérique, humanisé et humain

La chimérisation consiste à remplacer les domaines constants d'un anticorps murin par des fragments humains sans altérer sa spécificité. Les anticorps chimériques peuvent tout de même générer des réponses immunitaires, appelées HACA (Human anti-chimeric antibody).

Afin de diminuer davantage les réponses immunitaires, les anticorps humanisés ont été développés. L'anticorps est dit humanisé lorsque les fragments de chaînes hypervariables (appelées CDR pour « complementarity determining regions ») sont dérivés d'anticorps de murin, et que le reste de l'anticorps est d'origine humaine.<sup>[66]</sup> (Tableau 1)

Tableau 1 Anticorps chimériques et humanisés – chronologie

Anticorps chimérique	Anticorps humanisé
Premier anticorps chimérique, <b>1984</b> <sup>[67]</sup>	Premier anticorps humanisé, <b>1986</b> <sup>[68]</sup>
Abciximab, ReoPro <sup>®</sup> , <b>1993</b> Contre la formation de caillots lors d'angioplasties	Daclizumab, Zenapax <sup>®</sup> , <b>1997</b> Contre le rejet lors de transplant de reins
Rituximab, Rituxan <sup>®</sup> , <b>1997</b> Lymphome non Hodgkinien	Trastuzumab, Herceptin <sup>®</sup> , <b>1998</b> Cancer du sein métastaté

De par leur haute sélectivité, les anticorps ont d'abord été utilisés conjugués à des médicaments dès 1975.<sup>[69]</sup> Ces composés sont appelés immunoconjugués. Il n'existe qu'un immunoconjugué

approuvé par la FDA en 2000, le Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg<sup>®</sup>, laboratoires Wyeth) pour le traitement de la leucémie aigüe myéloïde,<sup>[70]</sup> avant d'être retiré en 2010.

Ils ont ensuite été conjugués à des nanoparticules, dès le début des années 90 pour l'imagerie de tumeurs<sup>[71-72]</sup>, pour la mise en place d'essais immunologiques plus sensibles<sup>[73]</sup>, pour la thérapie photodynamique en utilisant des NPs d'or<sup>[74]</sup>, pour l'imagerie et la thérapie avec des liposomes.<sup>[75]</sup> Une revue de Friedman *et al.* regroupe différents exemples d'applications de nanoparticules fonctionnalisées par des anticorps.<sup>[76]</sup>

L'utilisation d'anticorps comme ligands de ciblage comporte cependant plusieurs inconvénients par rapport à la façon dont l'anticorps est greffé à la nanoparticule. De par la présence de nombreux groupements fonctionnels, la plupart des techniques de ligations, notamment celle dépendant des chaînes latérales de lysine et cystéine, ne permet pas de contrôler l'orientation de l'anticorps sur les NPs. En résultent alors des NPs hétérogènes avec des pharmacocinétiques variables. Dans certains cas, les NP-mAb peuvent même être éliminées très rapidement de la circulation.<sup>[76]</sup> De même, puisque les anticorps ont une taille de l'ordre de la dizaine de nanomètres, ils peuvent augmenter de façon conséquente la taille de la NP sur laquelle ils sont greffés et changer son comportement.

### 3.2.5 Aptamères

Les aptamères sont des oligonucléotides (ON) simple brin (ADN ou ARN) adoptant des configurations tridimensionnelles uniques par le biais d'interactions intramoléculaires. Ils sont capables de lier spécifiquement des cibles biomoléculaires allant des petites molécules aux protéines (récepteur à transferrine, HER2, MUC1, PSMA, E-Selectine, intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , VEGF, protéine MMP-9, etc.) avec une forte affinité. Ils possèdent entre 20 et 100 résidus et un domaine constant pour leur reproduction enzymatique. Le terme « aptamère » est un mot inventé combinant le mot latin « aptus », pour « adapté à, attaché à » et le suffixe de grec ancien « -mer », pour « part, portion ».

Les aptamères sont créés *via* le processus SELEX (pour *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*).<sup>[77]</sup> La SELEX a été développée en 1990 par Tuerk et Gold<sup>[78]</sup>. Elle consiste à mettre une banque combinatoire d'oligonucléotides synthétiques en présence d'une cible définie. Après élimination des ODN non fixés, les ODN fixés sont élués, récupérés et amplifiés par PCR. Ce processus de sélection et d'amplification est répété jusqu'à obtenir une spécificité satisfaisante. Les séquences d'aptamères sont ensuite identifiées par séquençage.<sup>[79]</sup>

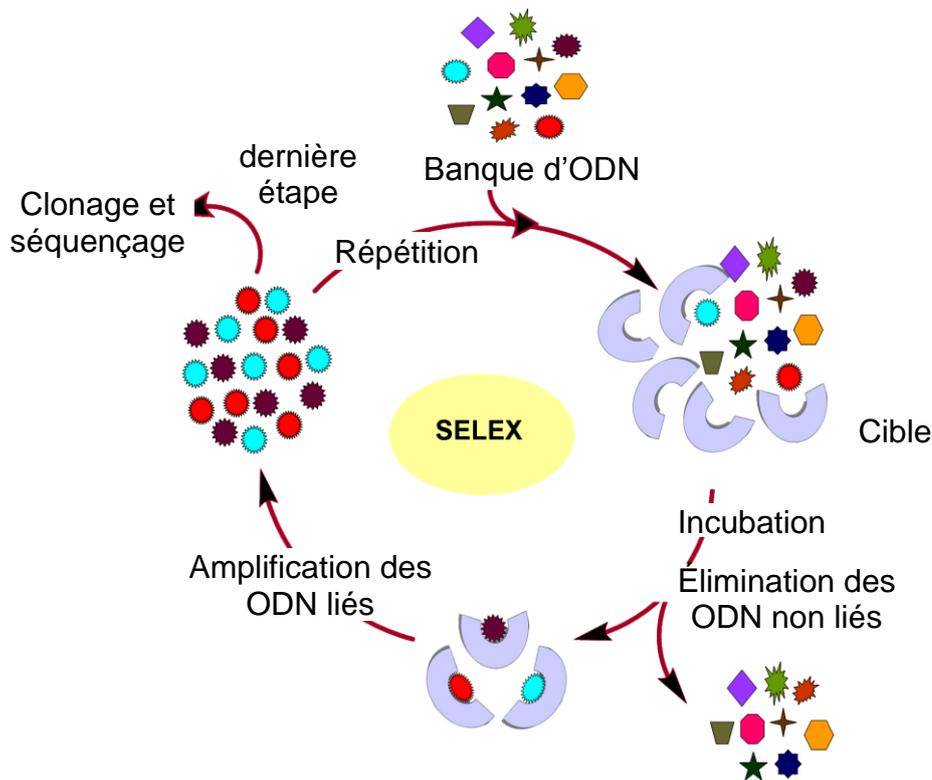


Figure 15 - Processus SELEX

La contre-SELEX a été développée en 1994 par Jenison *et al.* [80] pour augmenter la spécificité de l'aptamère. Les aptamères sont incubés avec des analogues de la cible, puis avec la cible, ce qui permet d'éliminer les aptamères qui se sont liés en premier lieu aux analogues.

Le Macugen® (Pegaptanib) est le premier traitement à base d'aptamères qui a été approuvé par la FDA, en 2004, dans le cadre de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) sous sa forme « humide », qui correspond à la création de vaisseaux sanguins sur la paroi du globe oculaire, troublant ainsi la vue. En ciblant VEGF, ces ODN empêchent la formation de nouveaux vaisseaux. Ce traitement a ensuite été remplacé par Lucentis® (ranibizumab), un traitement plus efficace, à base d'anticorps monoclonaux.[77]

Il existe aujourd'hui 10 traitements à base d'aptamères en phase clinique, dont deux contre le cancer (leucémie, myélome et cancer du rein métastaté), et de nombreux traitements sont à l'étude au stade préclinique.[81]

Les aptamères sont souvent comparés aux anticorps. Les traitements à base d'aptamères présentent plusieurs avantages, puisqu'il est possible de les produire à grande échelle et qu'ils sont non immunogéniques. De plus petite taille, ils sont plus faciles à manipuler chimiquement,

et il est facile de modifier leur extrémité afin de les conjuguer à d'autres molécules ou à des NPs, sans problèmes d'orientation, contrairement aux anticorps.

Le principal frein au développement des aptamères a été le brevet qui protège la technique SELEX. Sa tombée dans le domaine public en 2008 devrait augmenter la productivité dans ce domaine. Les aptamères sont également rapidement éliminés de la circulation sanguine :

- lorsqu'ils ne sont pas modifiés, ils sont facilement dégradés par les nucléases
- de par leur petite taille, ils peuvent être éliminés par les reins

Une technique permettant de pallier à ces désavantages est de les coupler à une petite molécule, un polymère ou une nanoparticule.<sup>[77]</sup>

Les premiers exemples de NP-aptamères pour cibler le cancer ont été publiés il y a environ 10 ans par le laboratoire de Robert Langer, au MIT.<sup>[82]</sup> Ils décrivent l'utilisation de nanoparticules d'acide polylactique PEGylées contenant du docetaxel et décorées par des aptamères ciblant les cellules épithéliales de la prostate.<sup>[83-84]</sup> Ont suivi ensuite de nombreux articles aussi bien pour la thérapie à base de nanoparticules polymériques<sup>[85-89]</sup> que pour l'imagerie à base de nanoparticules métalliques (SPION, Au)<sup>[90-93]</sup>, en grande partie concernant le cancer de la prostate.

### 3.2.6 Sucres

Les lectines sont des protéines qui interagissent spécifiquement avec certains complexes osidiques issus de glycolipides ou de glycoprotéines. Cette interaction peut être aussi spécifique qu'une interaction antigène-anticorps ou substrat-enzyme. Elles sont impliquées dans plusieurs processus biologiques tels que la reconnaissance, la croissance, la signalisation, l'apoptose, la migration et l'adhésion des cellules, les interactions cellule-MEC, l'inflammation, etc.<sup>[94]</sup>

L'équipe de Benjamin Davis a publié un exemple de NPs fonctionnalisées par des sialyl-LewisX ciblant les Selectines DC62, protéines de la famille des lectines, surexprimées lors d'inflammations. Ces NPs d'oxyde de fer permettent la détection de maladies neurologiques par IRM, telles que la sclérose en plaque et la maladie de Parkinson.<sup>[95]</sup>

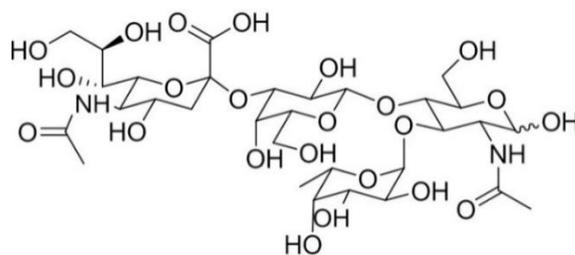


Figure 16 - Sialyl-LewisX

Plusieurs exemples décrivent leur application en thérapie <sup>[96-97]</sup> et en imagerie <sup>[98]</sup> dans le cas du cancer du foie. En effet, de par leur interaction avec les ASGP-R (asialoglycoprotein receptor), protéines de la famille des lectines présentes à la surface des hépatocytes, les NPs fonctionnalisées par des D-Galactose et/ou D-Galactosamine peuvent cibler spécifiquement les cellules parenchymales du foie.

### 3.2.7 Transferrine

La transferrine est une glycoprotéine responsable du transport des ions de fer dans les cellules *via* les récepteurs à transferrine, ou TfR. Il existe deux types de récepteurs, TfR1 et TfR2. Le premier est présent en faible quantité sur de nombreux tissus sains, notamment la peau, le pancréas, le foie, le cerveau, les testicules. Le second, un récepteur analogue, est quant à lui exprimé par les hépatocytes sains. Il a 25 fois moins d'affinité pour la transferrine que le récepteur TfR1.

Les deux récepteurs sont surexprimés par certaines cellules cancéreuses, <sup>[99]</sup> notamment dans les cas du cancer du côlon, du sein, du rein, du poumon, de l'estomac et de l'ovaire.<sup>[100]</sup>

Plusieurs stratégies permettent le ciblage de ces récepteurs : par l'utilisation de la transferrine, d'anticorps anti-TfR, de fragments d'anticorps ou de peptides reconnaissant les TfR. Les fragments d'anticorps de plus petite taille que la transferrine sont plus faciles à produire en grande quantité avec une bonne reproductibilité.<sup>[101]</sup> De plus, ils ne possèdent pas le fragment constant de l'anticorps et sont donc moins rapidement reconnus par le système immunitaire.

De nombreux exemples décrivent le couplage de ces ligands directement à des principes actifs ou à des cargos transportant des principes actifs.<sup>[102]</sup>

La majorité des nanoparticules ciblées à usage thérapeutique contre le cancer en phase clinique utilisent la transferrine comme ligand, du fait de son abondance et de son faible coût.<sup>[100-101]</sup>

### 3.2.8 Peptides

L'utilisation de peptides comme ligands de ciblage présente plusieurs avantages. Ils sont de plus petite taille que les anticorps et sont facilement synthétisés en grandes quantités. Il est possible d'identifier et sélectionner des peptides spécifiques d'une cible définie en utilisant le phage display. L'esprit de cette technique est similaire à celui de la SELEX (cf. paragraphe 3.2.5). Des phages sont modifiés pour exprimer à leur surface des peptides, mais aussi des protéines ou des fragments d'anticorps, en insérant un brin d'ADN qui va coder pour ce peptide (ou protéine ou anticorps). Une librairie de phages exprimant différentes séquences peptidiques est mise en présence d'une cible définie, les phages liés à la cible sont isolés et enfin amplifiés

par infection de bactéries. Ce cycle est répété plusieurs fois, puis les phages sélectionnés sont analysés et testés pour l'activité recherchée. La séquence du peptide (ou de la protéine ou de l'anticorps) est obtenue par séquençage du brin d'ADN correspondant.

Cette technique peut être effectuée *in vitro*, mais aussi *in vivo*, comme décrit par Ruoslahti *et al.* pour la première fois en 1996.<sup>[103]</sup> Après injection intraveineuse d'une librairie de phage à une souris, les différents organes de l'animal sont broyés et les phages correspondants amplifiés. Cette technique a permis d'identifier des peptides qui présentent une forte spécificité pour le cerveau.

Puisqu'il existe un très grand nombre de séquences peptidiques pouvant être utilisées pour cibler les tumeurs, nous dressons ici une liste non exhaustive d'exemples de littérature.

Le peptide cyclique c[-RGDfK-] est le peptide le plus utilisé pour la fonctionnalisation de NPs dans le cadre du ciblage des cellules cancéreuses. Il permet de cibler les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , récepteurs transmembranaires surexprimées à la surface de certaines cellules endothéliales autour de la tumeur. Son utilisation sera plus détaillée dans le l'introduction du Chapitre I.

Le peptide ATWLPPR est spécifique de la neuropiline-1, qui est un récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Benachour *et al.* ont rapporté l'utilisation de NPs de silice-gadolinium fonctionnalisées par ATWLPPR pour la photothérapie dynamique chez le rat exprimant un glioblastome.<sup>[104]</sup>

LyP-1 (CGNKRTRGC) est un nonapeptide cyclique découvert par phage display en 2002 par l'équipe d'Erkki Ruoslahti <sup>[105]</sup> ciblant la protéine p32, surexprimée à la surface de certaines cellules tumorales, dans les vaisseaux lymphatiques associés aux tumeurs. L'expression de cette protéine dans les zones hypoxiques permet d'amener des composés au cœur de la tumeur.<sup>[106]</sup> L'équipe de Weiyue Lu a fonctionnalisé des NPs de PLGA <sup>[107]</sup>, puis des liposomes PEGylés <sup>[108]</sup> par le peptide LyP-1 afin de cibler les tumeurs métastasées dans les lymphes.

Valetti *et al.* ont décrit la fonctionnalisation de nanoparticules de squalène par des peptides ciblant les vaisseaux sanguins des tumeurs des îlots pancréatiques. <sup>[109]</sup> Cette séquence peptidique (CKAAKN) a été également découverte par phage display par Joyce *et al.*<sup>[110]</sup>

### 3.2.9 Interactions avec le micro environnement de la tumeur

Il est également possible de concevoir des nanoparticules capables d'interagir avec le micro environnement de la tumeur, qui possède des caractéristiques particulières.

Puisque les cellules tumorales transforment le glucose majoritairement en acide lactique, le pH aux alentours de la tumeur est plus faible (6,0-7,0) que dans les autres tissus et vaisseaux sanguins (7,4).<sup>[111]</sup> Ainsi, de nombreux articles décrivent la synthèse de nanoparticules sensibles au pH, qui, soit par dégradation ou expansion de la matrice de la NP vont libérer le principe actif autour de la tumeur, principalement *via* la protonation d'amines (chitosan <sup>[112]</sup>, poly asparagine <sup>[113]</sup>, poly histidine <sup>[114]</sup>, sulfonamide <sup>[115]</sup>, amines masquées <sup>[116]</sup>, etc. <sup>[117]</sup>) soit afficher des agents de ciblage au préalable masqués par des PEG *via* l'utilisation de bras espaceurs acido-labiles (interactions ioniques <sup>[118]</sup>, imine <sup>[119]</sup>, hydrazone <sup>[120]</sup>).

Certaines NPs tirent aussi parti de la présence accrue de métalloprotéinases matricielles (MMP) dans la MEC, qui vont pouvoir couper sélectivement certains fragments peptidiques MMP-sensibles.

Les MMP sont surexprimées dans presque tous les cancers humains, et sont souvent associées à un mauvais pronostic. Ce sont des protéases qui vont défricher la matrice extracellulaire, mais aussi dégrader des précurseurs de facteurs de croissance ou modifier la fonction de protéines pré-existantes. Ces protéines jouent un rôle clé dans l'angiogénèse et la croissance tumorale.<sup>[121]</sup>

Parmi les exemples publiés, on retrouve l'utilisation d'un dendrimère révélant un bras polycationique après coupure d'un linker MMP-sensible, facilitant l'entrée dans la cellule.<sup>[122]</sup>

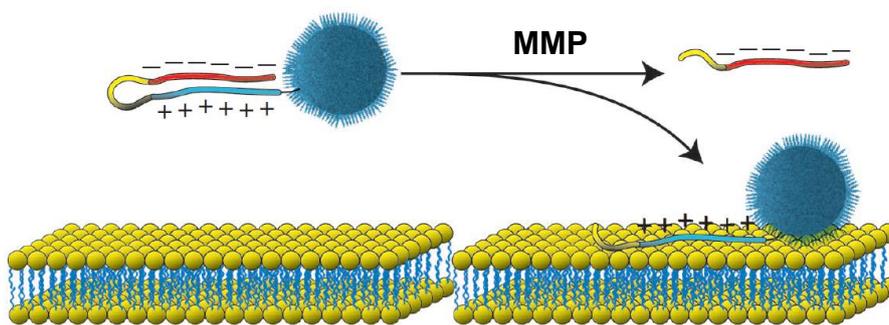


Figure 17 - NP révélant un bras polycationique après l'action de protéines MMP <sup>[100]</sup>

Un autre article décrit une nanoparticule PEGylée composée de gélatine encapsulant des quantum dots. Dans un premier temps les NPs (100 nm) vont s'accumuler au niveau de la

tumeur, puis libérer les quantum dots (10 nm) lors de la dégradation du gel par les MMP qui pourront entrer en profondeur dans les tissus tumoraux grâce à leur petite taille.<sup>[123]</sup>

Un autre exemple décrit l'utilisation de NPs de chitosane fonctionnalisées par des fluorophores liés à des « quencher » par une séquence peptidique sélectivement dégradable par les MMP. Ainsi, lorsque les NPs s'accumulent au niveau de la tumeur, les fluorophores se détachent de la nanoparticule et du « quencher » après dégradation du linker, permettant ainsi leur fluorescence.<sup>[124]</sup>

Harris *et al.* décrivent une NP d'oxyde de fer possédant un groupement PEG relié par un fragment peptidique MMP-sensible qui laisse apparaître des polyarginines après clivage du linker, afin d'améliorer l'internalisation cellulaire. Cette NP est fonctionnalisée par des fluorophores pour des applications en imagerie.<sup>[125]</sup>

### 3.2.10 Avantages et limitations des ligands

L'utilisation de ligands de ciblage ne fait pas encore l'unanimité, puisqu'ils ne permettent pas d'amener sélectivement les NPs aux cellules ciblées, mais plutôt de faciliter l'internalisation cellulaire une fois les NPs arrivées à proximité des cellules tumorales par effet EPR. Les interactions ligand/récepteur permettent aux NPs fonctionnalisées d'être retenues plus longtemps dans l'environnement de la tumeur, mais aussi d'être internalisées *via* une endocytose récepteur-dépendant. Ainsi, les principes actifs ne sont pas relâchés autour de la tumeur pour ensuite pénétrer par eux-mêmes dans les cellules tumorales, mais bien à l'intérieur des cellules après internalisation et dégradation des NP.

Le ciblage pourrait en revanche prendre le relais dans les cas de tumeurs où l'effet EPR est très faible voire inexistant, mais également dans le cas où les composés à amener dans la cellule ne peuvent pas d'eux-mêmes traverser la membrane cellulaire, typiquement les acides nucléiques, ou encore pour éviter les mécanismes de rejet ou « efflux » qui créent une résistance aux petites molécules hydrophobes telles que doxorubicine, vincristine, colchicine et etoposide.<sup>[126-128]</sup> De plus, en cherchant à cibler les cellules endothéliales plutôt que les cellules tumorales, il est possible d'éviter cet effet de résistance. Plusieurs peptides permettent de cibler les vaisseaux sanguins tumoraux<sup>[129]</sup>, dont le peptide RGD. Le peptide RGD a également été décrit plusieurs fois comme inhibiteur de métastases.<sup>[130-134]</sup>

Comme évoqué précédemment, à ce jour seulement 12 NPs possédant un système de ciblage ont atteint les tests cliniques dans le cadre du traitement du cancer. Tous ces traitements ont montré une efficacité augmentée lors des tests précliniques (*in vitro* et *in vivo*) par rapport à

leurs homologues non fonctionnalisés. Cependant, comme ces résultats ne peuvent être extrapolés chez l'Homme et que les tests cliniques actuels ne sont encore qu'en phase I ou II, il est difficile d'avoir une idée de l'apport réel des ligands de ciblage. De plus, lors de ces tests cliniques, aucune comparaison avec leur homologue non ciblé n'est étudiée.<sup>[101]</sup> Finalement, avant d'adopter une stratégie de ciblage, il est pour l'instant nécessaire d'évaluer les avantages et les inconvénients.

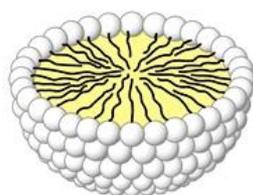
## 4 Nanoparticules

Un très grand nombre de nanoparticules ont été développées en laboratoire. Le choix du type de nanoparticule peut dépendre de l'application envisagée (relargage de principe actifs ou imagerie) en fonction de ses caractéristiques et de sa composition. Elles peuvent être regroupées en différentes familles. Les plus courantes sont présentées dans les paragraphes suivants.

### 4.1 Nanoparticules Lipidiques

#### 4.1.1 Micelles

Les micelles (cf. Figure 18) sont constituées de molécules amphiphiles qui s'auto-assemblent en une structure possédant un cœur hydrophobe et une partie extérieure hydrophile. Elles ont typiquement une taille inférieure à 100 nm.<sup>[135]</sup>



*Figure 18 - Micelle*

Les formes commerciales du paclitaxel et docetaxel, respectivement Taxol<sup>®</sup> et Taxotere<sup>®</sup> peuvent être qualifiées de micelles, puisqu'elles sont formulées avec un triglycéride émulsifiant, le Kolliphor<sup>®</sup> EL.

Les micelles représentent le plus simple des systèmes colloïdaux formés spontanément par des molécules amphiphiles. Selon le type de molécules amphiphiles utilisées, les micelles peuvent être lipidiques, polymériques ou hybrides. À faible concentration, les molécules amphiphiles sont dissoutes en milieu aqueux. Lorsque la concentration augmente, elles adoptent une

structure micellaire. La concentration la plus faible à partir de laquelle les micelles commencent à se former est appelée la concentration micellaire critique (CMC).

Les systèmes micellaires ont deux principaux désavantages : faible taux de chargement en principe actif dû à un faible espace disponible à l'intérieur de la micelle et dissociation des micelles au moment de l'injection chez le patient.

#### 4.1.2 Liposomes

Observés pour la première fois par Bangham *et al.* en 1964 <sup>[136]</sup>, les liposomes (cf. Figure 19) sont des vésicules artificielles formées par une ou plusieurs bicouches lipidiques concentriques composées de molécules amphiphiles qui s'auto-assemblent en milieu aqueux.

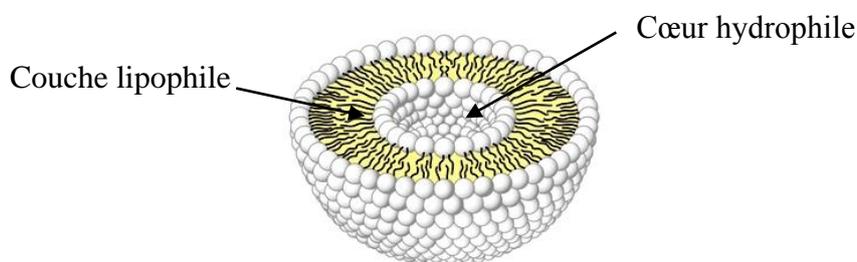


Figure 19 - Liposome unilamellaire

Les liposomes peuvent être composés de phospholipides naturels ou synthétiques. À la différence des micelles, les liposomes sont capables d'encapsuler des composés polaires et apolaires, dans le compartiment aqueux et dans la bicouche lipidique respectivement. Ils sont facilement formés à partir de molécules amphiphiles (le plus couramment des phospholipides) non toxiques, non immunogènes, naturels et biodégradables.<sup>[135]</sup> Ils ont une taille allant de 20 nm à 150 nm de diamètre.

Le premier « nano » traitement à avoir été approuvé par la FDA est le Doxil®, un liposome PEGylé encapsulant de la doxorubicine, en 1995.<sup>[137]</sup>

Il existe 4 méthodes classiques pour la synthèse de liposomes <sup>[138]</sup> :

- Un mélange de lipides est dissout dans un solvant organique, puis le solvant est évaporé pour obtenir un film lipidique. De l'eau est alors ajoutée, à une température supérieure à celle de transition des lipides utilisés. C'est avec cette technique que les premiers liposomes furent préparés. On obtient cependant des mélanges de liposomes multilamellaires de différentes tailles, allant jusqu'à 5 µm de diamètre. Il est possible

de réduire la taille par sonication et d'obtenir des liposomes unilamellaires par extrusion à travers des filtres.

- Une amélioration apportée est la redissolution des lipides dans un éther (diéthylique ou isopropylique) après obtention du film fin. Elle permet d'obtenir une efficacité d'encapsulation plus élevée.
- Un mélange de lipides est dissout dans un solvant (éthanol/éther), puis ajouté à une solution aqueuse. Cette technique permet d'obtenir des liposomes avec une faible polydispersité et une faible taille (< 100 nm) sans avoir recours à l'extrusion ou à la sonication.
- Un mélange de lipides est dissout dans un détergent, qui est ensuite éliminé par dialyse. Les liposomes sont formés lors de l'étape de dialyse.

La principale difficulté rencontrée lors du développement de formulations concerne la stabilité des liposomes, qui dépend du ratio principe actif/lipide. Idéalement, ce ratio doit être élevé, mais augmenter ce ratio diminue la stabilité des liposomes en milieux aqueux. En général les liposomes sont lyophilisés pour être conservés sous forme de poudre, puis solubilisés juste avant utilisation. La stabilité des liposomes peut être déterminée par différentes techniques : en mesurant la quantité de principe actif relâché par le liposome, par dichroïsme circulaire, par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), etc. En plus des problèmes de stabilité et de fuite de principes actifs, les liposomes présentent d'autres inconvénients tels que de faibles taux de chargement en principes actifs lipophiles et le besoin d'utiliser un solvant organique pour leur préparation.<sup>[7]</sup>

L'utilisation de copolymères amphiphiles possédant une masse molaire plus élevée que les phospholipides (de 1 000 g/mol à 10 000 g/mol) permet d'obtenir des liposomes polymériques, appelés polymersomes, avec une membrane plus épaisse, et donc une imperméabilité et une stabilité améliorées.<sup>[139]</sup>

### 4.1.3 Nanoparticules à base de lipides solides – Lipides nanostructurés

Les nanoparticules à base de lipides solides (solid lipid nanoparticles, ou SLN) ont été développées au début des années 90. Elles sont composées de lipides, d'eau et d'émulsifiants. Les lipides qui les constituent ont la particularité d'être solides à température ambiante et à la température du corps humain. Étant composées majoritairement de lipides physiologiques, les SLN sont moins toxiques que les nanoparticules polymériques.<sup>[140-141]</sup> Les SLN permettent d'encapsuler une grande variété de principes actifs, hydrophiles ou hydrophobes, ainsi que des peptides ou des protéines. Les nanoparticules obtenues sont souvent utilisées pour une

administration par voie orale, puisqu'ils améliorent l'absorption gastro-intestinale, aident à éviter l'effet de premier passage, et permettent une diffusion lente et continue du principe actif, selon la formulation.<sup>[142]</sup> Une des formulations ayant connu un succès commercial est la Mucosolvan retard capsule<sup>®</sup>, des SLN contenant de l'ambroxol dans le cadre du traitement de toux et bronchites chroniques.<sup>[140, 142]</sup>

Il existe plusieurs méthodes de synthèse de SLN. La principale technique est l'homogénéisation à haute pression, à chaud ou à froid. Dans le premier cas, les conjugués lipide-principe actif sont ajoutés à une phase aqueuse contenant les surfactants sous forte agitation, ce qui forme une émulsion. Le mélange est ensuite soumis à plusieurs cycles d'homogénéisation à haute pression (500-1500 bar), et donc à haute température. Un retour à température ambiante permet la solidification de la nanoémulsion obtenue pour donner des nanoparticules lipidiques solides. Dans le second cas, les conjugués lipide-principe actif sont gelés dans l'azote liquide, broyés (50-100 µm), puis ajoutés à une phase aqueuse contenant des surfactants. Après plusieurs cycles d'homogénéisation à haute pression et basse température, les SLN sont obtenues.<sup>[143]</sup>

L'homogénéisation à haute pression est la technique la plus fiable, et permet de produire les SLN à grande échelle (de l'ordre du kilogramme). L'utilisation de hautes pressions et températures peuvent cependant dégrader les principes actifs conjugués aux lipides.<sup>[7]</sup>

D'autres techniques sont décrites, telles que l'émulsion/évaporation. Les composés sont dissouts dans un solvant organique, puis le solvant est émulsifié dans l'eau. Le solvant organique est alors évaporé. Cette technique permet d'éviter tout stress thermique. En revanche, elle requiert l'utilisation de solvants organiques.<sup>[143]</sup>

Le principal désavantage des SLN concerne leur faible taux de chargement en principe actif. Celui-ci dépend fortement de la pureté des lipides utilisés pour la formulation et de la façon dont ils cristallisent. Idéalement, les principes actifs s'intercalent dans les défauts de la maille cristalline. Cependant, plus le lipide de départ est pur et plus le lipide cristallise lentement, moins il y a de défauts. De plus, une fois les SLN obtenus, principes actifs peuvent être expulsés de la maille lors du stockage des nanoparticules.

Afin de pallier à ce problème, les lipides nanostructurés (nanostructured lipid carriers, NLC, cf. Figure 20) ont été développés vers les années 2000.

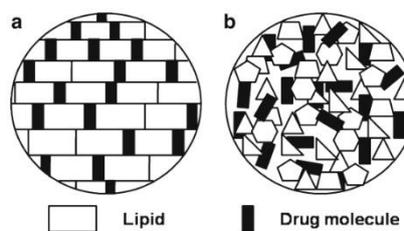


Figure 20 - a) SLN, b) NLC

En utilisant un mélange de lipides solides et liquides pour la formulation, il est possible d'obtenir une structure avec beaucoup de défauts, ce qui permet d'augmenter le taux de chargement en principe actif. Les NLC sont également plus stables lors du stockage.<sup>[142]</sup>

## 4.2 Nanoparticules polymériques

### 4.2.1 Dendrimères

Les dendrimères sont des macromolécules branchées, de 2 à 10 nm de diamètre, composées d'un cœur, de branches et de groupements fonctionnels à leurs extrémités.

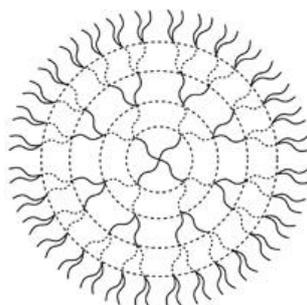


Figure 21 - Dendrimère

Ils peuvent être synthétisés en utilisant une synthèse divergente, en partant du cœur et en allant vers la surface, ou convergente, par la condensation de fragments.

Les dendrimères sont facilement fonctionnalisables et ont une taille monodisperse. Les principes actifs et/ou chromophores peuvent être soit liés de façon covalente au dendrimère soit piégés dans le cœur.<sup>[144]</sup>

La cytotoxicité augmente avec la taille du dendrimère.<sup>[145]</sup> Ils ne peuvent cependant pas être classés comme toxiques ou non toxiques, mais doivent être évalués au cas par cas.<sup>[146]</sup>

## 4.2.2 Polymères

### 4.2.2.1 Poly(alkyl cyanoacrylate)

Les poly(alkyl cyanoacrylates) (PACA) sont des polymères biodégradables utilisés dans le domaine médical.

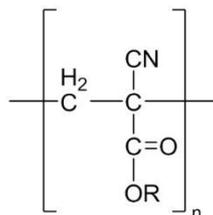


Figure 22 - Poly(alkyl cyanoacrylate)

Ils sont utilisés depuis les années 60 comme colle chirurgicale à cause de leur fort pouvoir collant, même sur les tissus humains. Ce sont les premiers polymères biodégradables utilisés pour la formation de NP.<sup>[147]</sup>

Les NPs de PACA ont été développées par Speiser et Couvreur à la fin des années 70. Ils ont décrit l'encapsulation d'agents anti-cancéreux dans ces NPs avec un taux de chargement en principe actif supérieur aux liposomes.<sup>[148]</sup> Ils ont ensuite rapporté que les NPs de PACA chargées en doxorubicine étaient plus efficaces et moins toxiques que la doxorubicine seule.<sup>[149]</sup> L'utilisation de ces nanoparticules permet en effet d'éviter l'effet de résistance des cellules, puisque le mécanisme d'internalisation de la doxorubicine seule est différent de celui de la doxorubicine encapsulée dans les NPs de PACA.<sup>[150-151]</sup> Ce composé, baptisé Livatag®, est actuellement en phase III d'essai clinique dans le cadre du traitement du cancer primitif du foie, et a reçu en mai 2014 le « fast track approval » de la FDA. Ce statut permet une procédure de revue accélérée du traitement.

Les NPs de PACA ont également été utilisées pour amener des principes actifs à travers la BHE<sup>[152]</sup>, mais aussi par voie orale, notamment pour l'insuline.<sup>[153]</sup>

### 4.2.2.2 Acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (cf. Figure 12) peut être utilisé comme matrice de nanoparticule. Choi *et al.* ont décrit en 2011 la formation de nanoparticules d'acide hyaluroniques PEGylées encapsulant de la doxorubicine, puis de la camptothécine. Ils ont ainsi pu synthétiser des NPs bénéficiant de l'effet EPR pour atteindre les nanoparticules mais aussi des récepteurs CD44 surexprimés à la surface d'un grand nombre de cellules tumorales. Après internalisation par

endocytose à récepteur, la matrice est dégradée par les hyaluronidases présentes dans ces cellules tumorales, ce qui conduit au relargage des principes actifs encapsulés.<sup>[50]</sup>

#### 4.2.2.3 Chitosane

La chitine est un polysaccharide naturel composé de N-acétylglucosamines liés par une liaison  $\beta(1\rightarrow4)$  (cf. Figure 23). C'est le polysaccharide le plus abondant sur terre, après la cellulose.

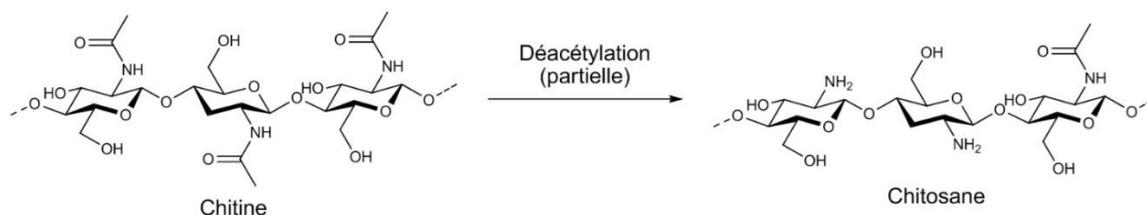


Figure 23 - Structure de la chitine et du chitosane

La principale source de chitine pour la production mondiale est la coquille de crabe et de crevette.<sup>[154]</sup> Le chitosane est obtenu par déacétylation (non totale) de la chitine, soit par traitement chimique, soit par traitement avec la chitine déacétylase.<sup>[155]</sup> La chitine est appelée chitosane lorsque le degré d'acétylation du polysaccharide passe en dessous de 50%. Le chitosane devient alors soluble dans l'eau.<sup>[154]</sup> Grâce à la présence de groupements amine, le chitosane peut interagir avec les entités chargées négativement telles que les résidus acides sialiques des glycoprotéines présentes dans les muqueuses.<sup>[156]</sup> Ainsi les formulations à base de chitosane peuvent être utilisées pour des applications locales (nasales, oculaires, pulmonaires, orales, vaginales, etc.)<sup>[157-158]</sup>. Mais le chitosane a aussi été utilisé comme matrice de NPs pour le transport de doxorubicine à la tumeur. Mitra *et al.* ont rapporté en 2001 une régression tumorale et un temps de survie augmenté des souris présentant une tumeur sous-cutanée plusieurs semaines après l'injection de NPs de chitosane encapsulant un conjugué dextran-doxorubicine par rapport au conjugué dextran-doxorubicine seul et à la doxorubicine libre.<sup>[159]</sup> Le laboratoire de Ick Chan Kwon en Corée a publié plusieurs travaux sur des nanoparticules de chitosane modifiées par des groupements glycol et acide cholanique (cf. Figure 24).<sup>[160-163]</sup>

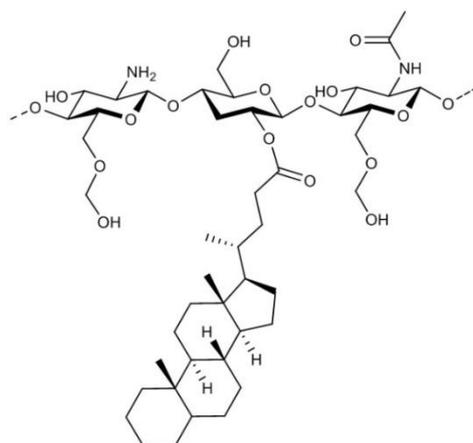


Figure 24 - Glycol chitosane hydrophobique (Hydrophobic Glycol Chitosan, HGC)

Ils ont obtenu des NPs de diamètres entre 300 nm et 500 nm, qu'ils ont ensuite chargées en paclitaxel, peptide RGD, cisplatine puis docetaxel. Ils ont alors observé dans chaque cas une efficacité améliorée et une diminution de la toxicité par rapport aux traitements à base de principes actifs libres.

#### 4.2.2.4 Acide lactique / glycolique

Le poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLGA) (cf. Figure 25) est un polymère biodégradable utilisé depuis plus de 30 ans en raison de sa biocompatibilité avec les tissus humains. En effet, les poly(acide lactique-co-acide glycolique) sont facilement hydrolysés en milieu *in vivo*, générant de l'acide lactique et de l'acide glycolique, deux monomères endogènes qui peuvent être métabolisés par le cycle de Krebs.<sup>[164]</sup>

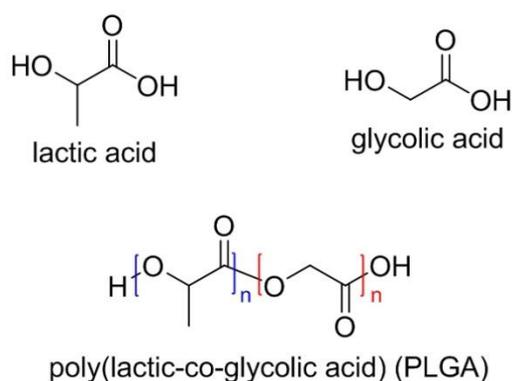


Figure 25 - Monomères d'acide lactique et glycolique - Copolymère PLGA

Le poly(acide lactique) (PLA) a été proposé en 1966 par Kulkarni *et al.* pour être utilisé comme fil de suture biodégradable, particulièrement utile pour les sutures internes.<sup>[165]</sup> Suit alors un

brevet déposé en 1967 par Schmitt *et al.* [166] qui donne lieu à la création de la marque Dexon® en 1970.[167]

En 1974, Wasserman *et al.* déposent un brevet concernant le rajout d'acide glycolique dans la formulation pour obtenir un copolymère, le PLGA. L'ajout d'acide glycolique permet d'accélérer la biodégradation et d'augmenter la flexibilité. En effet, les unités glycoliques étant moins hydrophobes que les unités lactiques, elles sont plus rapidement hydrolysées. Il est aussi désormais possible de teindre le fil pour mieux le visualiser lors de l'opération.[168] Ce polymère sera ensuite commercialisé sous le nom Vicryl®.[167]

Puisqu'il est approuvé par la FDA, biodégradable et étudié depuis longtemps, le PLGA est très largement utilisé dans le développement de nanoparticules pour le relargage de principes actifs, notamment en thérapie anticancéreuse.[87, 169-170] Comme évoqué précédemment, il est possible de moduler ses propriétés dont les cinétiques de relargage (de plusieurs jours à plusieurs mois) de la NP en variant la masse molaire du polymère et le ratio lactide/glycolide (cf. Figure 26).

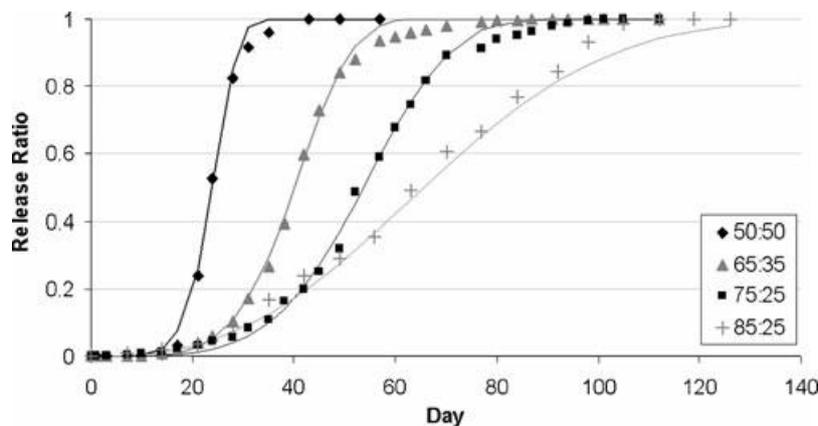


Figure 26 - Vitesse de biodégradation du PLGA en fonction du ratio LA:GA [171]

### 4.3 Nanoparticules inorganiques

#### 4.3.1 Or

L'utilisation de nanoparticules d'or, ou « or colloïdal » remonte au 5<sup>ème</sup> siècle avant J.-C., où il était utilisé pour donner une couleur rouge aux céramiques et aux verres. Plusieurs ouvrages du 17<sup>ème</sup> siècle rapportent également l'utilisation de solutions d'or colloïdales buvables pour soigner diverses maladies.[172]

Les NPs d'or peuvent avoir un diamètre allant de 2 à 200 nm et sont utilisées pour diverses applications biologiques, en imagerie et en photothérapie, grâce à leur résonance plasmon et à leur biocompatibilité.

Il existe de nombreuses façons de synthétiser les NPs d'or, mais la méthode de synthèse la plus répandue est la réduction d'un sel de tétrachloroaurate par du citrate de sodium dans l'eau à 100°C. Les ligands citrates stabilisent les nanoparticules d'or. Ils sont ensuite facilement remplaçables par des ligands thiolés. Des ligands hydrophiles sont nécessaires pour apporter de la stabilité aux NPs d'or et éviter l'agrégation.

En modifiant les paramètres de la synthèse (technique, additifs, etc.), il est possible d'obtenir des NPs d'or de différentes formes : sphères, bâtonnets, disques, cages, cubes, etc.<sup>[173]</sup> (cf. Figure 27)

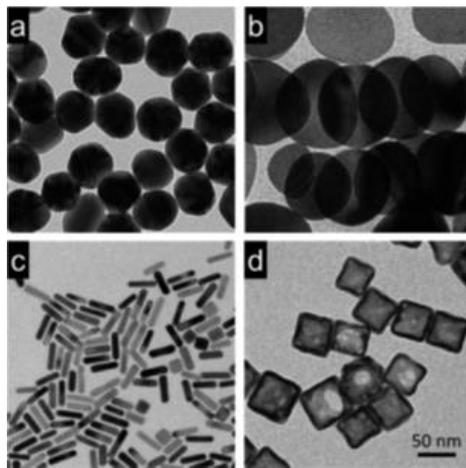


Figure 27 - Différentes formes de NPs d'or<sup>[174]</sup>

(a) nanosphères ; (b) nanodisques ; (c) nanobâtonnets ; (d) nanocages

La biodistribution des nanoparticules d'or varie en fonction de la taille et de la forme. Les nanosphères sont plus facilement internalisées, et possèdent un temps de circulation sanguine plus élevé. Cependant, ils sont observés uniquement en surface des tumeurs, alors que les nanobâtonnets et nanocages sont internalisés plus en profondeur dans la tumeur.<sup>[174]</sup>

Les NPs d'or possèdent des propriétés physiques intrinsèques aux nanoparticules métalliques. Lorsque la NP est exposée à la lumière, l'oscillation du champ électromagnétique de la lumière induit une oscillation du nuage d'électrons présent à la surface de la nanoparticule. Cette oscillation est appelée plasmon de surface. Lorsque l'amplitude de l'oscillation atteint son maximum à une certaine longueur d'onde, appelée résonance de plasmon de surface, la NP est capable d'absorber fortement la lumière incidente. La longueur d'onde à laquelle est absorbée l'énergie dépend de la forme et du diamètre de la nanoparticule et des ligands qui l'entourent. Des NPs de 20 nm de diamètre vont absorber à  $\lambda=520$  nm, c'est-à-dire dans le vert et donc émettre dans le rouge. Plus le diamètre augmente et plus l'absorbance est déplacée vers des

longueurs d'ondes élevées : la NP va alors absorber dans le rouge et émettre dans le bleu clair/violet (cf. Figure 28).

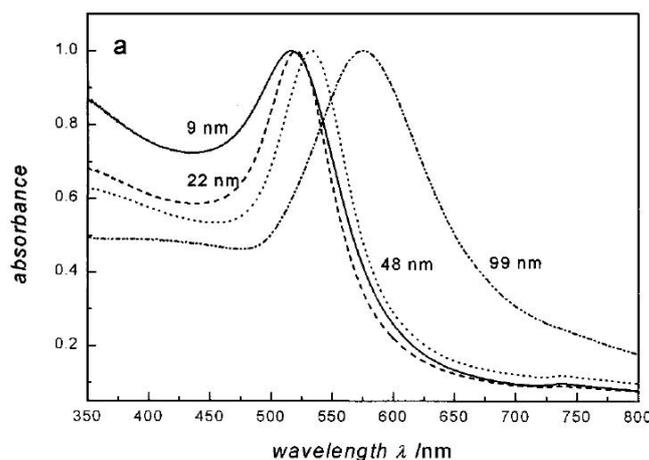


Figure 28 - Spectre d'absorption des plasmons de surface de nanosphères d'or de différents diamètres <sup>[175]</sup>

Plusieurs exemples d'applications ont été rapportés, dont l'utilisation d'une source lumineuse pour visualiser l'internalisation cellulaire de NPs d'or conjuguées à des anticorps anti-EGFR au microscope <sup>[176]</sup>, mais aussi avec un laser à 647 nm et un microscope. <sup>[177]</sup>

Pour les applications *in vivo*, il est préférable que la NP ait une absorbance dans le proche infrarouge, puisqu'à ces longueurs d'onde, l'autofluorescence des tissus est minimale. Afin de visualiser des NPs d'or avec un laser à 800 nm, il faudrait des NPs d'or de 160 nm de diamètre, ce qui peut poser des problèmes de fonctionnalisation. Une technique pour contourner ce problème est de modifier la forme de la NP : les NPs d'or creuses (nanocapsules et nanocages) possèdent une fréquence de résonance plasmonique dans le proche infrarouge grâce à l'hybridation des plasmons situés à l'extérieur et à l'intérieur de la NP. <sup>[178]</sup>

Loo *et al.* ont observé l'internalisation de nanocapsules d'or conjuguées à des anticorps anti HER2 par microscopie en chambre sombre grâce à un laser à 820 nm. <sup>[74]</sup>

Les NPs sont capables de produire de la chaleur lorsqu'elles sont exposées à des rayons de lumière de longueurs d'ondes entre 700 et 800 nm. Ce phénomène est utilisé en photothermie. <sup>[179]</sup>

#### 4.3.2 Oxyde de fer

Louis Néel montre en 1949 qu'en dessous d'une certaine taille, les nanoparticules magnétiques entrent dans un état appelé superparamagnétisme. Ce comportement concerne les NPs d'oxyde

de fer possédant un diamètre inférieur à 20 nm, et les NPs de fer pur ayant un diamètre inférieur à 3 nm. Lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique extérieur, les nanoparticules peuvent aligner leur moment magnétique dans la direction du champ. Lorsque le champ extérieur disparaît, les NPs perdent leur aimantation immédiatement, c'est-à-dire qu'elles ont un temps de relaxation nul. Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPION, pour « superparamagnetic iron oxide nanoparticles ») permettent donc de faire un contraste avec les tissus, qui possèdent différents temps de relaxation. Pour ces raisons, les SPION sont utilisées notamment en imagerie par résonance magnétique (IRM).

Les SPION peuvent être utilisées seules, pour l'imagerie. Elles peuvent également être fonctionnalisées par des ligands de ciblage ou être incorporées dans des NPs encapsulant un principe actif, afin de leur apporter un élément d'imagerie.<sup>[180]</sup>

Elles peuvent également être utilisées en hyperthermie, c'est-à-dire que la température des NP va augmenter lors de l'application d'un champ magnétique, détruisant ainsi les cellules tumorales à proximité.<sup>[181]</sup>

### 4.3.3 Quantum Dots

Les Quantum Dots (QD) sont des nanocristaux de semi-conducteurs de forme sphérique de quelques nanomètres de diamètre possédant des propriétés électro-optiques uniques qui les rendent très intéressants pour une utilisation en imagerie. Ils sont composés de deux semi-conducteurs : le cœur (typiquement CdS ou CdSe), et la coquille (typiquement ZnS), qui améliore leurs performances en corrigeant les défauts de surface, protège le cœur de l'oxydation et empêche les fuites de Cd/Se.<sup>[182-183]</sup>

Il existe deux voies de synthèse pour les QDs : une voie organique (orQDs) et une voie aqueuse (aqQDs). La première permet d'obtenir des QDs avec de très bons rendements quantiques. Cependant, les orQDs sont recouverts de ligands hydrophobes lors de la synthèse, et doivent être recouverts de ligands hydrophiles afin de pouvoir être utilisés pour des applications biomédicales. Cette étape supplémentaire augmente le diamètre hydrodynamique (de 8 à 20 nm) et peut diminuer le rendement quantique. De plus cette voie requiert l'utilisation de solvants organiques coûteux, de températures élevées (300°C) et de précurseurs de Cadmium sensibles à l'air qui nécessitent l'utilisation de boîtes à gants.

La voie de synthèse aqueuse permet d'obtenir des QDs avec de moins bons rendements quantiques mais avec un diamètre hydrodynamique plus faible (de 3 à 5 nm). Les aqQDs peuvent être de plus recouverts de ligands hydrophiles au moment de la synthèse, ce qui évite tout traitement ultérieur. De plus, cette voie requiert des températures de synthèse moins élevées

(<100°C) ainsi que des réactifs moins nocifs et moins sensibles à l'air. Elle est également plus simple à mettre en œuvre.<sup>[184-186]</sup>

Les QDs possèdent un coefficient d'absorption molaire jusqu'à 4 fois plus élevé que les fluorochromes organiques et une plus grande résistance au photoblanchiment <sup>[187]</sup>, ce qui les rend particulièrement adaptés à des manipulations longue durée (plusieurs heures), par exemple pour l'observation de cellules au microscope. La longueur d'onde d'émission varie en fonction du diamètre du QD. Ainsi, il est possible de visualiser simultanément différentes couleurs avec une longueur d'onde d'excitation unique (cf. Figure 29).<sup>[183]</sup>

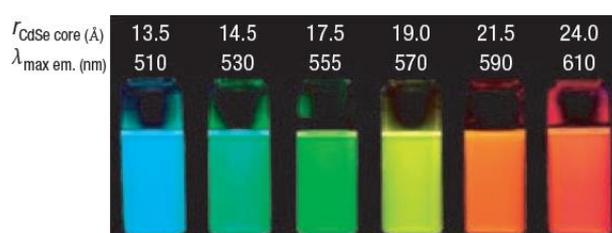


Figure 29 - QDs CdSe de différentes tailles sous une lampe à ultraviolets <sup>[183]</sup>

Le domaine d'excitation dépend également de la composition : les QDs possédant un cœur CdS ou ZnSe émettent du bleu au proche UV, les QDs avec un cœur CdSe émettent dans le spectre de la lumière visible, ceux en InP émettent dans le rouge et ceux en PbS et PbSe émettent dans le proche infra-rouge.<sup>[187-188]</sup>

Les QDs peuvent également être utilisés comme cargo. En effet, les ligands hydrophiles qui les recouvrent peuvent être utilisés comme points d'ancrage (par exemple : acide carboxylique). Ainsi, des biomolécules peuvent être accrochées à un QD. Il est cependant difficile de contrôler le degré de fonctionnalisation, ce qui peut avoir des incidences sur la stabilité du QD ainsi que sur l'efficacité de la biomolécule.

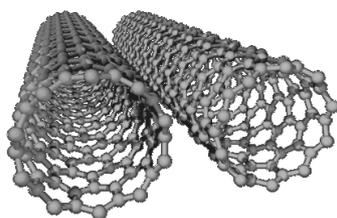
Le principal frein à l'utilisation des QDs est leur cytotoxicité, étant donné qu'ils peuvent relarguer des ions  $\text{Cd}^{2+}$  ou  $\text{Se}^{2-}$ , fortement toxiques. L'utilisation d'une coquille plus épaisse pourrait réduire la fuite des ions.<sup>[187]</sup>

Cependant les Quantum Dots ne sont ni moins bons ni meilleurs que les fluorochromes organiques, ils sont complémentaires. En effet les fluorochromes organiques sont globalement plus performants dans le domaine visible, mais les Quantum Dots sont pour l'instant plus adaptés à un usage dans le proche infrarouge. En effet, l'indocyanine green (ICG) - à ce jour le seul fluorochrome organique proche infrarouge à être autorisé par la FDA pour des applications cliniques <sup>[189]</sup> - possède un très faible rendement quantique <sup>[190]</sup>, et se lie rapidement aux

immunoglobulines <sup>[189]</sup>. Les QDs pourraient permettre de pallier à ces défauts, puisqu'ils possèdent de bien meilleurs rendements quantiques dans le proche infrarouge.<sup>[187]</sup>

#### 4.4 Nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone (CNTs) sont des tubes creux composés de feuillets de graphène possédant un diamètre interne de l'ordre du nanomètre et une longueur de l'ordre de quelques micromètres. Ils peuvent être concentriques (« multi-walled carbon nanotubes », ou MWCNT) ou simples (« single-walled carbon nanotubes »).



*Figure 30 - Nanotubes de carbonnes simples*

La découverte des MWCNTs daterait de 1889, mais les premières images au microscope électronique en transmission (MET) ont été publiées en 1952, lors de l'étude structurale du carbone formé pendant de la décomposition thermique du monoxyde de carbone sur une surface de fer.<sup>[191]</sup>

Les premiers SWCNTs quant à eux ont été décrits dans l'issue du 17 juin 1993 de *Nature* à la fois par une équipe japonaise <sup>[192]</sup> et une équipe californienne.<sup>[193]</sup> Les nanotubes de carbone ont connu un regain de popularité en 1991 lorsque Sumio Iijima a décrit sa synthèse de MWCNTs dans *Nature*.<sup>[194]</sup>

De par leur ressemblance avec les fibres d'amiante, les nanotubes de carbone ont rapidement été catalogués comme « toxiques » <sup>[195]</sup>, ce qui a probablement freiné les études sur leurs applications biomédicales. Cependant la plupart des études de toxicité sont effectuées en utilisant des nanotubes de carbone non fonctionnalisés (pristine). Les CNTs pristine sont insolubles dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, et ne peuvent donc pas être utilisés pour des applications biomédicales. En les fonctionnalisant avec des composés hydrophiles, leur biocompatibilité est augmentée. En effet, plusieurs études démontrent que les nanotubes de carbone fonctionnalisés possèdent une cytotoxicité fortement réduite <sup>[196-201]</sup> et leur biodégradabilité est également améliorée.<sup>[202]</sup> La toxicité des nanotubes de carbone dépendrait de plusieurs facteurs tels que leur concentration, leur pureté (présence de fer), leur

longueur, leur degré de fonctionnalisation, leur voie d'administration (IV ou sous cutané) <sup>[201]</sup>, leur rigidité. <sup>[203]</sup>

Concernant la proportion de fer contenue dans les CNTs, Krug *et al.* ont décrit la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS) dans des macrophages NR8383 après incubation avec des CNTs contenant du fer, mais pas avec des CNTs purifiés. <sup>[204]</sup>

Shvedova *et al.* n'ont pas observé de formation de ROS dans les macrophages RAW 264.7 avec des CNTs contenant différentes proportions de fer. Cependant, ils décrivent la formation de lipides peroxydés, ainsi que l'oxydation d'ascorbate et de glutathion dans ces macrophages. <sup>[205]</sup>

Les nanotubes de carbone sont particulièrement intéressants pour des applications en délivrance de principes actifs puisqu'ils peuvent s'échapper de l'endosome des cellules pour atteindre directement le cytoplasme. <sup>[206]</sup> Le piégeage des NPs dans l'endosome est un problème rencontré fréquemment en délivrance de principes actifs que les chercheurs essaient de résoudre par divers moyens. Le plus connu et efficace est probablement la technique de l'éponge à protons : une nanoparticule contenant un principe actif est recouverte d'un polymère fonctionnalisé par des groupements amine qui vont se protoner lors de leur entrée dans l'endosome. La nanoparticule va alors gonfler jusqu'à détruire l'endosome. <sup>[207]</sup>

Des principes actifs peuvent être greffés aux nanotubes de carbone, par liaison covalente ou non-covalente (*via* interactions hydrophobes ou aromatiques) à l'extérieur, ou encapsulées à l'intérieur. <sup>[208]</sup> Le principal désavantage de la fonctionnalisation non covalente est le potentiel décrochage des composés. <sup>[202]</sup>

Les CNTs peuvent également être utilisés en imagerie : soit en greffant des agents de contraste <sup>[201]</sup>, soit en utilisant leurs caractéristiques physiques. En effet les SWNTs peuvent être observés en spectroscopie Raman, et possèdent plusieurs bandes caractéristiques dont celles correspondant aux vibrations des carbones  $sp^2$  (bande G) et des carbones  $sp^3$  (bande D). L'avantage de cette technique est qu'il n'y a pas de risque de diminution du signal due à une dégradation de l'agent de contraste. L'imagerie Raman de SWNTs a été utilisée dans des cellules <sup>[209]</sup>, mais aussi *in vivo* en 2008 par le groupe de Gambhir : des nanotubes de carbone fonctionnalisés par des RGD ont été injectés dans une souris pour cibler les cellules U87MG surexprimant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , puis visualisés avec un microscope Raman. <sup>[210]</sup> Le même groupe a également décrit l'utilisation de ces mêmes nanotubes fonctionnalisés par des RGD pour une utilisation en imagerie photoacoustique. <sup>[211]</sup>

## 5 Objectifs des travaux

Cette introduction a permis de mettre en avant le manque de composés hautement efficaces pour la thérapie anticancéreuse. Dans le but de répondre à cette problématique, nous avons conçu et optimisé des vecteurs capables de cibler certaines tumeurs, que nous avons ensuite greffés sur des nano-objets, à savoir des polymères et des nanoparticules lipidiques.

Pour cela nous nous sommes basés sur les vecteurs peptidiques développés durant ces 15 dernières années au sein de notre laboratoire. Ces vecteurs sont constitués d'un châssis cyclodécapeptidique <sup>[212]</sup> comportant deux faces sélectivement fonctionnalisables : un domaine pour la reconnaissance, par exemple pour l'interaction avec des récepteurs à la surface d'une cellule, et d'un domaine effecteur, par exemple un fluorophore dans le cas d'une application en imagerie, ou un agent cytotoxique dans le cas d'une application en thérapie (cf. Figure 31).

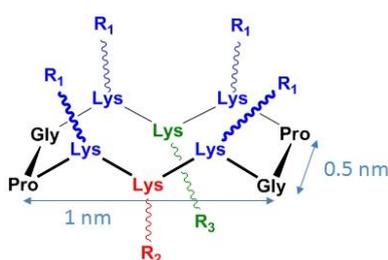


Figure 31 - Châssis cyclodécapeptidique

Dans notre cas, nous avons choisi de fonctionnaliser la face supérieure par 4 ligands c[-RGDfK-] afin de cibler les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , récepteurs surexprimés à la surface de certaines cellules cancéreuses (cf. Figure 32).

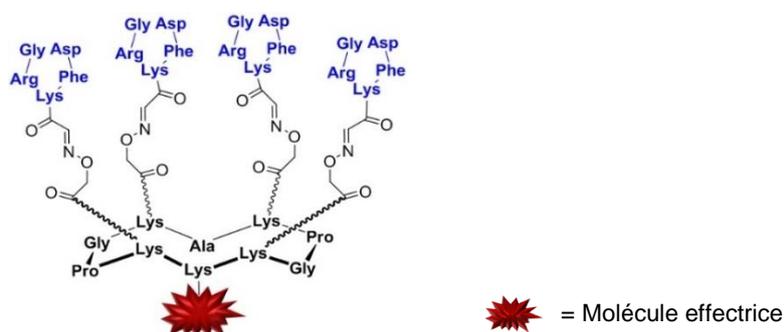


Figure 32 - Cluster de motifs RGD

Le fait de présenter 4 motifs RGD permet de bénéficier d'un effet de recombinaison statistique et de diviser l'IC<sub>50</sub> par 10 par rapport au mono-RGD. <sup>[213]</sup>

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de la longueur du bras espaceur entre le châssis et les ligands c[-RGDfK-]. Leur évaluation biologique suivie de simulation de dynamiques nous ont permis de sélectionner le vecteur RGD le plus affiné. Ceci fait l'objet du chapitre I.

Nous avons ensuite développé une réaction « one pot » combinant deux réactions orthogonales catalysées au cuivre permettant l'accès à des biomolécules sophistiquées avec de très bons rendements et en évitant une étape de purification intermédiaire. Ce type de stratégie peut être utilisé pour combiner différentes classes de biomolécules, notamment peptides et lipides. Cette étude est détaillée dans le chapitre II.

Puis, nous avons développé une formulation de nanoparticules de squalène pour la thérapie. Ces nanoparticules expriment des clusters de motifs RGD à leur surface et sont chargées en gemcitabine. Elles ont ensuite été caractérisées et évaluées *in vitro*. Ce point est décrit dans le chapitre III.

Finalement, nous avons conçu des macromolécules pour l'imagerie. À travers une collaboration avec A. Favier et M.T. Charreyre (Ingénierie des Matériaux Polymères - laboratoire Joliot Curie), nous avons fonctionnalisé des polymères hydrophiles avec des quantités variables de clusters de motifs RGD et de fluorophores. Leur évaluation biologique est rapportée dans le chapitre IV.

# **CHAPITRE I**

## **OPTIMISATION DU VECTEUR PEPTIDIQUE**

## 1 Introduction

### 1.1 L'interaction RGD-intégrine

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques régulant l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire (MEC) et sont impliquées dans la transduction de signaux de la MEC vers la cellule. Elles peuvent également interagir avec la surface d'autres cellules ainsi qu'avec des ligands solubles.

Elles sont composées de deux sous-unités :  $\alpha$  et  $\beta$ . Il existe 18 différentes sous-unités  $\alpha$ , et 8 différentes sous-unités  $\beta$ . Parmi les 24 intégrines connues à ce jour, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est surexprimée dans un grand nombre de types de cancers (cf. Tableau 2).

Tableau 2 - Expression des intégrines dans différents types de cancers

Types de cancer	Intégrines surexprimées
Mélanome	$\alpha_v\beta_3$ & $\alpha_5\beta_1$
Sein	$\alpha_6\beta_4$ & $\alpha_v\beta_3$
Prostate	$\alpha_v\beta_3$
Pancréas	$\alpha_v\beta_3$
Ovaires	$\alpha_4\beta_1$ & $\alpha_v\beta_3$
Col utérin	$\alpha_v\beta_3$ & $\alpha_v\beta_6$
Glioblastome	$\alpha_v\beta_3$ & $\alpha_v\beta_5$

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  apparait comme un régulateur critique de l'angiogénèse: le blocage de cette intégrine par de petites molécules, des peptides ou des anticorps interrompt la néovascularisation chez un certain nombre d'animaux.<sup>[214]</sup>

Erkki Ruoslahti identifie en 1984 la séquence -GRGDS- comme étant le site d'adhésion de la fibronectine, une protéine présente dans la matrice extracellulaire.<sup>[215]</sup> La séquence -RGD- est également retrouvée dans d'autres protéines de la matrice extracellulaire, notamment vitronectine, fibrinogène, facteur de von Willebrand, thrombospondine, laminine, entactine et la té nascine.

Le laboratoire du Prof. Hort Kessler à Munich a ensuite publié de nombreux articles sur l'amélioration de l'activité biologique du motif RGD. Ils ont produit le cyclopentapeptide c[-RGDfV-], possédant un acide aminé en série D apportant la conformation requise et facilitant la cyclisation. Ce peptide est jusqu'à 100 fois plus efficace que la séquence linéaire -GRGDS-

.<sup>[216]</sup> Ce composé sera ensuite amélioré en préparant le peptide c[-RGDf-N(Me)V-].<sup>[217]</sup> L'ajout d'un méthyle sur l'amine de la valine permet de modifier légèrement la forme du cycle et d'obtenir un conjugué jusqu'à 4 fois plus efficace que le peptide précédent.

Xiong *et al.* publient dans Science en 2002 <sup>[218]</sup> la structure cristalline de l'interaction entre c[-RGDf-N(Me)V-] et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (cf. Figure 33). Le motif RGD (en jaune) s'insère dans une cavité située entre l'hélice  $\alpha$  (en bleu) et le domaine  $\beta A$  (en rouge).

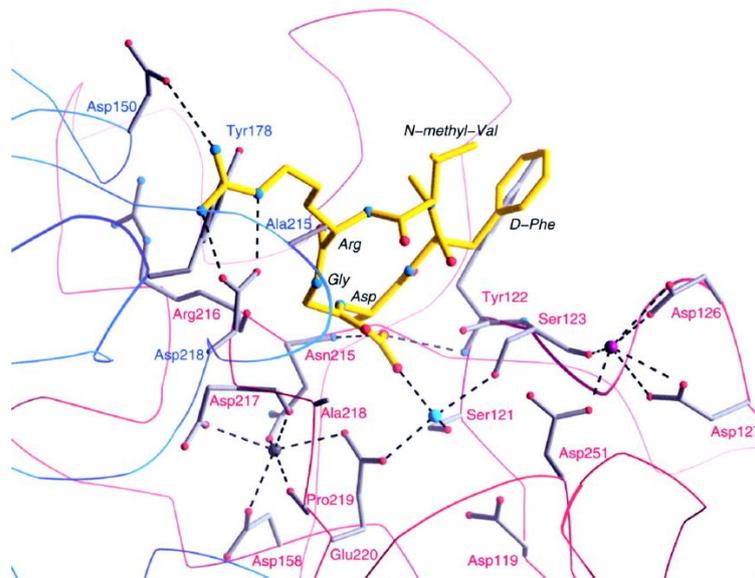


Figure 33 - Interactions entre c[-RGDf-N(Me)V-] et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$

Les chaînes latérales des acides aminés Arg et Asp interagissent respectivement avec des résidus de l'hélice  $\alpha$  et du domaine  $\beta A$ . L'acide aminé Gly se situe entre l'hélice et le domaine  $\beta A$ . Les acides aminés Val et D-Phe pointent à l'opposé des deux domaines et ne jouent pas un rôle clé.

Puisque la nature de l'acide aminé en 5ème position n'influe que très peu sur l'activité du peptide <sup>[219]</sup>, il est possible d'utiliser le peptide c[-RGDfK], qui sera facilement conjugué à d'autres molécules *via* l'amine de la chaîne latérale de la lysine.

## 1.2 Résultats antérieurs du laboratoire

Au sein du laboratoire, nous utilisons le cluster de peptides RGD depuis plusieurs années. Puisque la partie effectrice de ce composé est très facilement fonctionnalisable, les domaines

d'applications du cluster de peptides RGD ont été très variés. Ci-dessous une liste non exhaustive d'exemples :

- Fonctionnalisation de surface

Un système permettant la capture de cellules et leur relargage a été développé. Une surface fonctionnalisée par des cyclodextrines est ensuite recouverte par un châssis cyclopeptidique portant 4 molécules de ferrocènes sur la face supérieure et un motif RGD sur la face inférieure. Lorsqu'un flux d'une solution contenant des cellules surexprimant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est appliqué à la surface, ces cellules vont se fixer sur les châssis portant le motif RGD. Puis, en appliquant un champ électrique oxydant, il est possible d'oxyder le ferrocène en ferrocenium et de libérer les complexes vecteur peptidique-cellules.<sup>[220]</sup> Ce procédé peut être utile pour la purification de cellules souches ou la capture de cellules cancéreuses, ainsi que d'autres études cellulaires.

Un autre système a été développé pour étudier la façon dont les cellules se fixent et s'étalent sur la surface.<sup>[221]</sup>

- Agent de ciblage

En collaboration avec l'équipe de Bhattacharya, un vecteur portant 4 motifs RGD modifié par un acide palmitique a été inséré dans un liposome, afin d'amener une composante de ciblage. Ce liposome a été ensuite utilisé pour la transfection de gènes dans des cellules HeLa.<sup>[222]</sup>

- Thérapie

Des peptides interférant avec la mitochondrie ont été greffés au clusters de peptides RGD et ont montré l'utilité du vecteur pour la délivrance de principes actifs (cf. thèse Michael Claron).<sup>[223]</sup>

- Imagerie

Des vecteurs portant 4 peptides RGD, modifiés par des radiotraceurs (Tc, Cu,...) ont été développés en collaboration avec l'équipe du Prof. Fagret à Grenoble et du Dr. Jin à Chiba au Japon.<sup>[224-227]</sup> Ils sont utilisés pour l'imagerie tumorale.

Un cluster de ligands RGD modifié par un fluorophore proche infra-rouge a donné lieu à une licence utilisée par la startup grenobloise Fluoptics. Ce composé baptisé Angiostamp<sup>TM</sup> est utilisé avec une caméra (Fluobeam<sup>TM</sup>) pour guider le geste chirurgical. Après des essais précliniques concluants<sup>[228]</sup>, des essais cliniques chez l'Homme sont prévus courant 2015.

## 2 Conception et synthèse

Afin d'optimiser nos composés, nous avons étudié l'influence de la présentation du motif RGD lors de son interaction avec l'intégrine. Nous nous sommes donc proposé de modifier la longueur des bras espaceurs reliant le motif RGD au châssis peptidique.

Le composé de référence possède 4 lysines comme bras espaceurs qui lui confèrent une certaine rigidité et hydrophobie. Nous avons conçu 3 nouvelles molécules possédant des bras espaceurs de tailles différentes (cf. Figure 34) :

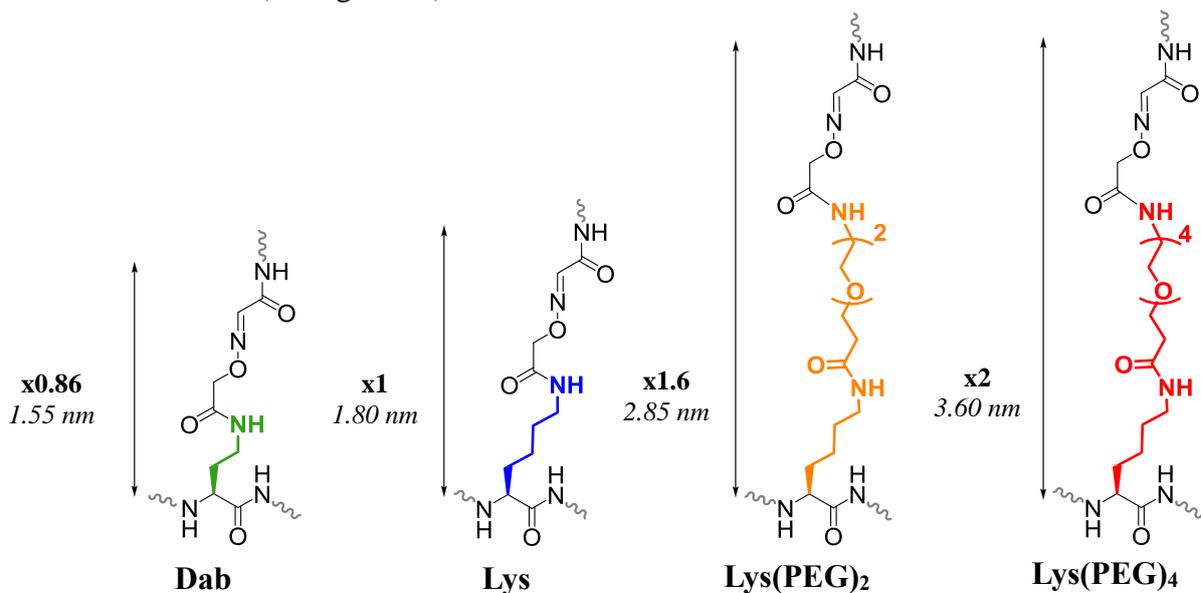


Figure 34 - Modification du bras espaceur reliant le châssis au motif RGD

La Figure 34 représente les différents bras espaceurs utilisés pour relier le châssis au peptide RGD. Les dimensions en nanomètres affichées représentent la longueur maximale étendue du bras espaceur. Elles ont été mesurées avec le logiciel Insight II.

Les bras espaceurs sont fonctionnalisés par des oxyamines, et le motif RGD par un résidu aldéhyde. Le lien qui résulte de la condensation de ces deux fonctions est un éther d'oxime.

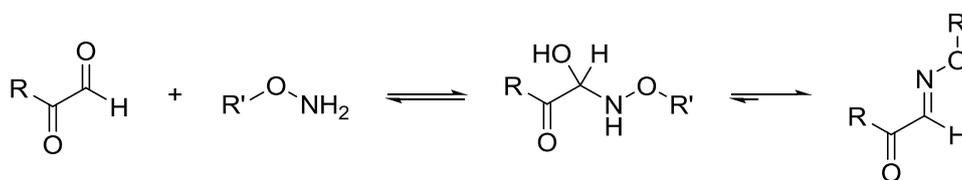


Figure 35 - Formation du lien éther d'oxime

Les éthers d'oximes sont bien plus stables que les imines ou les hydrazones, c'est-à-dire qu'elles sont moins sujettes à l'hydrolyse. La délocalisation du doublet non liant de l'atome d'oxygène diminue le caractère électrophile de l'atome de carbone, et le rend moins sensible à l'hydrolyse. De même, l'effet attracteur du groupement « -OR » diminue la basicité de l'atome d'azote, diminuant la possibilité d'hydrolyse en milieu acide.<sup>[229]</sup>

De plus, l'utilisation d'un aldéhyde glyoxylique renforce la stabilité du lien oxime en offrant plusieurs formes de résonance.

La première molécule possède une fonction Dab, pour « diaminobutyric acid » (analogue de « lysine à deux carbonnes »).

Pour créer les versions avec des bras espaceurs plus longs, nous avons choisi d'utiliser des groupements polyéthylène glycol (PEG) (cf. paragraphe 3.1.2). Le troisième composé utilise une lysine modifiée par un groupement PEG<sub>2</sub>, et le dernier composé, une lysine modifiée par un groupement PEG<sub>4</sub>. Ceci nous permet d'obtenir des bras espaceurs jusqu'à 2 fois plus longs que ceux du composé de référence.

Pour le composé de référence, nous avons inséré la fonction oxyamine (en rouge dans les schémas de synthèse ci-dessous) lors de la synthèse peptidique sur phase solide (SPPS, « solid phase peptide synthesis ») *via* une lysine modifiée par une fonction oxyamine protégée. Le choix du groupement 1-Ethoxyethylidène plutôt qu'un groupement Boc pour protéger la fonction oxyamine permet d'éviter des acylations potentielles sur l'amine de la chaîne latérale de la lysine.<sup>[230]</sup>

L'Ethyl acetohydroxamate est additionné à l'acide iodoacétique en milieux aqueux basique.

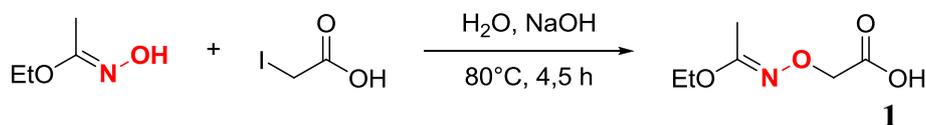


Figure 36 - Synthèse du composé **1**

Après 4,5 heures de réaction à 80°C, l'acide 1-Ethoxyethylidèneaminoxyacétique (Eei-Aoa) **1** obtenu est immédiatement converti en ester activé par ajout de N-Hydroxysuccinimide (NHS) et dicyclohexylcarbodiimide (DCC) pour donner le composé **2** après 15 heures de réaction à température ambiante.

L'ester activé correspondant **2** est alors ajouté à une solution de 1,3 équivalents de Fmoc-Lys-OH dans le DMF. La lysine modifiée **3** Fmoc-Lys(Eei-Aoa)-OH est obtenue avec une pureté satisfaisante après lavage de la phase organique avec une solution d'acide citrique, pour éliminer l'excès de lysine de départ.

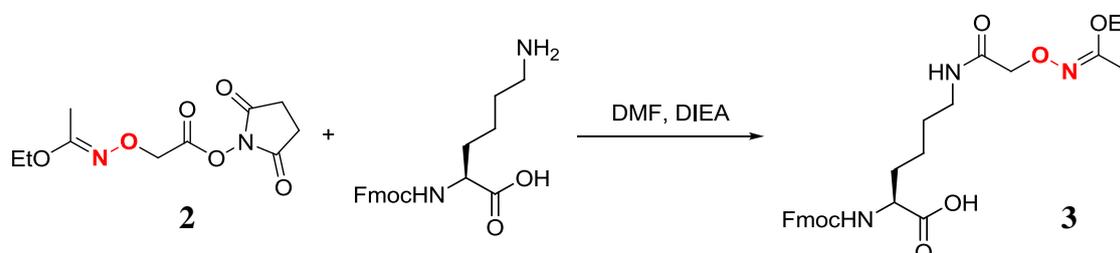


Figure 37 - Synthèse de la Lysine modifiée par une oxyamine protégée

Le cyclodécapeptide est assemblé sur une résine 2-chlorotrityl chloride<sup>®</sup> en utilisant la stratégie Fmoc/*t*-Bu et l'acide aminé modifié **3**. Les peptides sont généralement décrochés de la résine par un traitement acide à 1% d'acide trifluoroacétique, mais les groupements Eei-Aoa ne sont pas stables dans ces conditions. Nous avons donc utilisé une solution AcOH/TFE/DCM (2:1:7). Le composé **4** est ensuite cyclisé dans le DMF en milieu basique avec 1,3 équivalent de PyBOP pour donner le composé **5**. Il est important d'effectuer cette réaction en milieu fortement dilué (0,5 mM) afin d'éviter d'éventuelles oligomérisations. Enfin, il est nécessaire d'éliminer l'acide acétique résiduel avant l'étape de cyclisation afin d'empêcher une éventuelle réaction d'acétylation sur l'extrémité N-terminale.

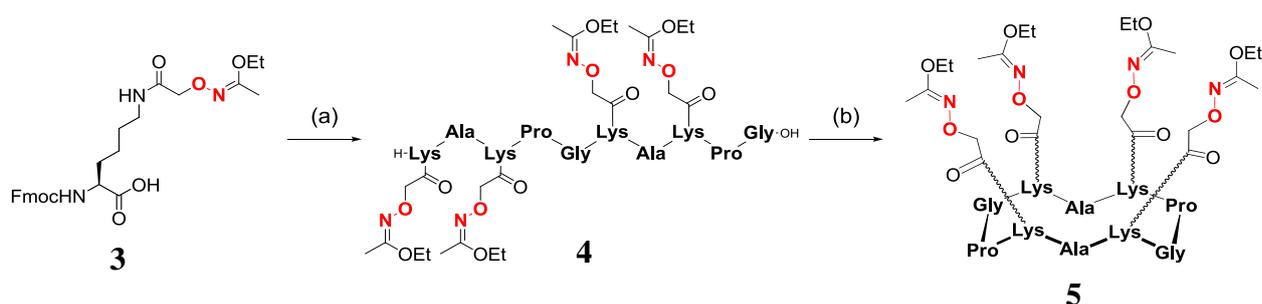


Figure 38 - Synthèse du composé **5**

(a) SPPS ; (b) 1,3 éq. PyBOP, DIEA, DMF

Nous avons ensuite préparé le motif RGD en insérant la fonction aldéhyde masqué *via* un autre building block, la Fmoc-Lys[(Boc)Ser(*t*-Bu)]-OH **7**. Après assemblage par synthèse sur

support solide, le peptide est décroché de la résine, puis cyclisé et déprotégé. La fonction aldéhyde est obtenue lors de la dernière étape par coupure oxydante en présence de  $\text{NaIO}_4$ , puis par hydrolyse de l'imine formée (cf. Figure 39).

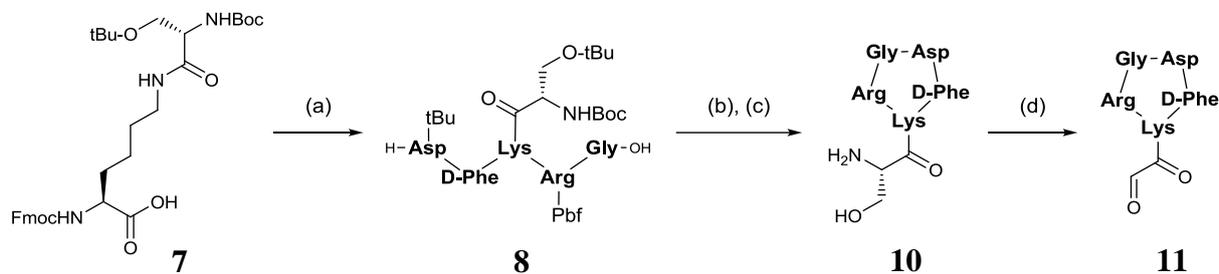


Figure 39 - Synthèse du RGD aldéhyde

(a) SPPS ; (b) 1,3 éq. PyBOP, DIEA, DMF ;

(c) TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /TIS (95 :2,5 :2,5) ; (d) 10 éq.  $\text{NaIO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$

L'assemblage du châssis **5** et du motif RGD **11** combine deux réactions « one-pot », à savoir la déprotection des oxyamines du châssis en milieu acide, suivie de la formation du lien oxime, pour donner le composé **12** avec un rendement de 47% après purification par HPLC préparative en phase inverse (cf. Figure 40).

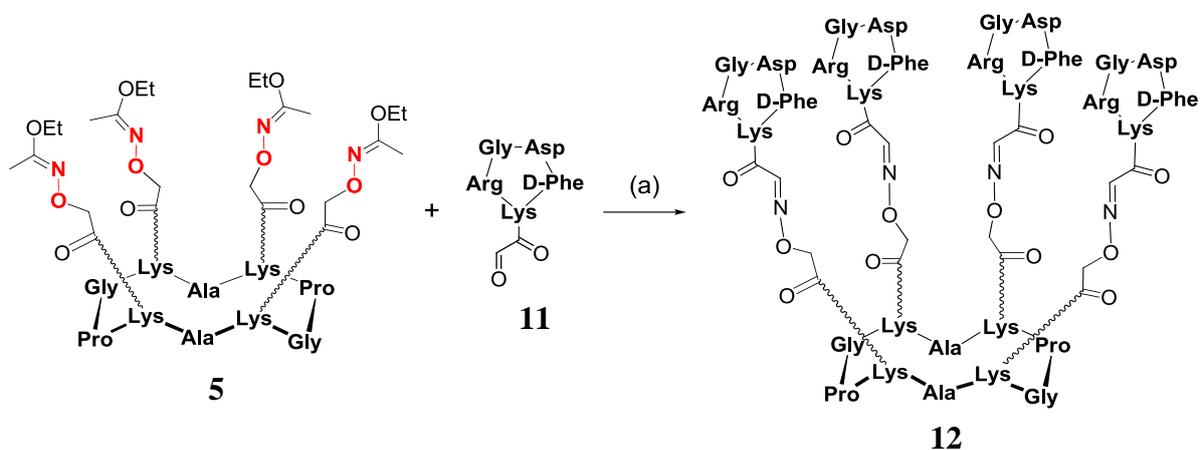


Figure 40 - Synthèse du composé **12**

(a) TFA/ $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  (70:15:15)

Le composé final a été caractérisé par HPLC analytique et par spectrométrie de masse.

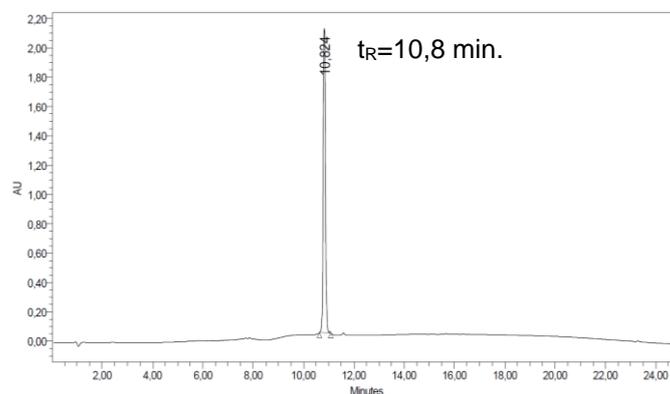


Figure 41 - Chromatogramme HPLC du composé **12** pur

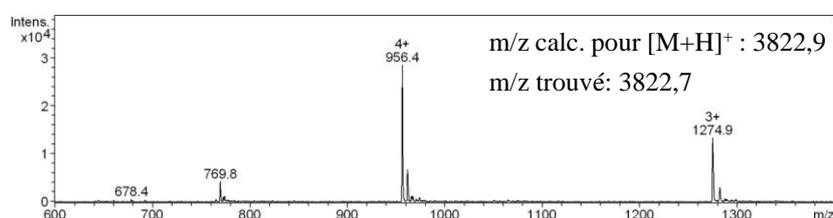


Figure 42 - Spectre de masse du composé **12** pur

Pour les composés possédant les bras espaceurs Dab, Lys(PEG)<sub>2</sub> et Lys(PEG)<sub>4</sub>, l'utilisation de building blocks a donné lieu à des réactions secondaires lors de la SPPS. Nous avons donc introduit les fonctions oxyamines après la SPPS.

Concernant le bras espaceur Dab, nous avons d'abord procédé à la synthèse supportée du composé **14** (cf. Figure 43), obtenu avec un rendement de 71% sur les deux étapes après purification par RP-HPLC.

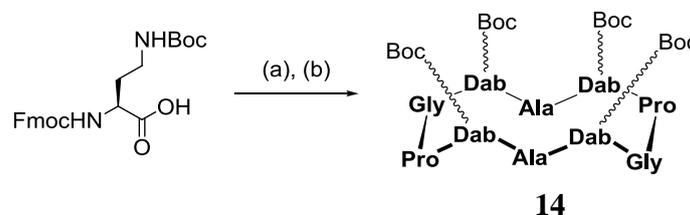


Figure 43 - Synthèse du composé **14**

(a) SPPS ; (b) 1,3 éq. PyBOP, DIEA, DMF

Après déprotection du châssis **14** par un traitement acide (50% de TFA), nous avons ajouté les fonctions oxyamines protégées en utilisant l'ester activé **2**. Le châssis obtenu **16** est alors purifié, puis immédiatement mis en présence du composé **11**. Après 2 heures de réaction à 37°C, le produit **17** est obtenu après purification par RP-HPLC, avec un rendement de 21% sur 3 étapes (cf. Figure 44).

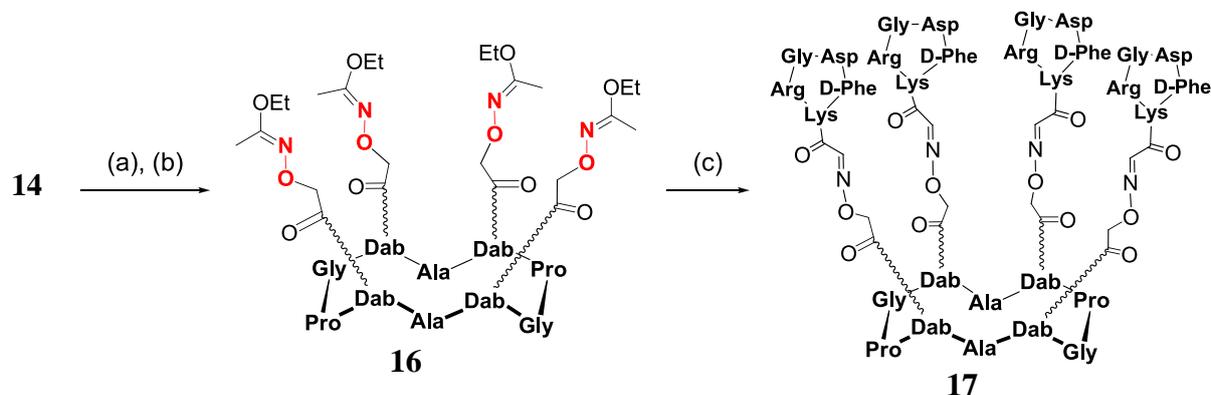


Figure 44 - Synthèse du composé **17**

(a) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50) ; (b) 1,3 éq. **2**, DIEA, DMF ; (c) **11** TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (70:15:15)

Le composé **17** a été caractérisé par HPLC et par spectrométrie de masse.

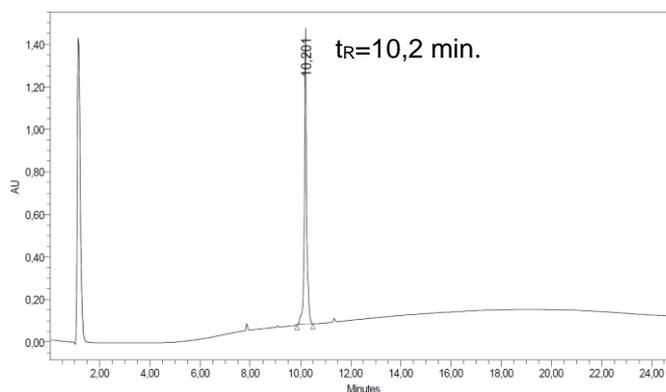


Figure 45 - Chromatogramme HPLC du composé **17** pur

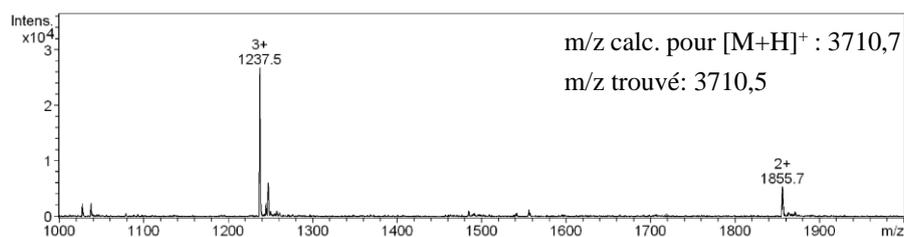


Figure 46 - Spectre de masse du composé **17** pur

Il est indispensable de purifier l'intermédiaire **16** pour éviter un mélange complexe de sous-produits extrêmement difficiles à séparer lors de l'étape suivante. Le groupement 1-Ethoxyldène protégeant les oxyamines est très sensible au pH acide des solvants HPLC. Afin d'éviter la formation de sous-produits issus de la réaction des oxyamines avec tous types d'aldéhydes présents dans l'air, les solvants ou les contenants en plastiques, les fractions collectées lors de la purification de l'intermédiaire **16** doivent immédiatement être mises en réaction avec le composé RGD aldéhyde **11**.

La même stratégie a été appliquée pour la synthèse des composés portant les bras espaceur PEG.

Nous avons tout d'abord synthétisé le composé **19** *via* la SPPS, obtenu avec un rendement de 82% sur deux étapes après purification par RP-HPLC (cf. Figure 47).

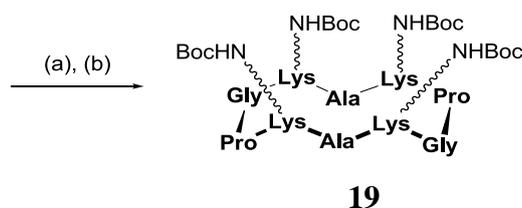


Figure 47 - Synthèse du composé **19**

(a) SPPS ; (b) 1,3 éq. PyBOP, DIEA, DMF

Nous avons ensuite préparé les bras espaceurs PEG-oxyamine correspondants :

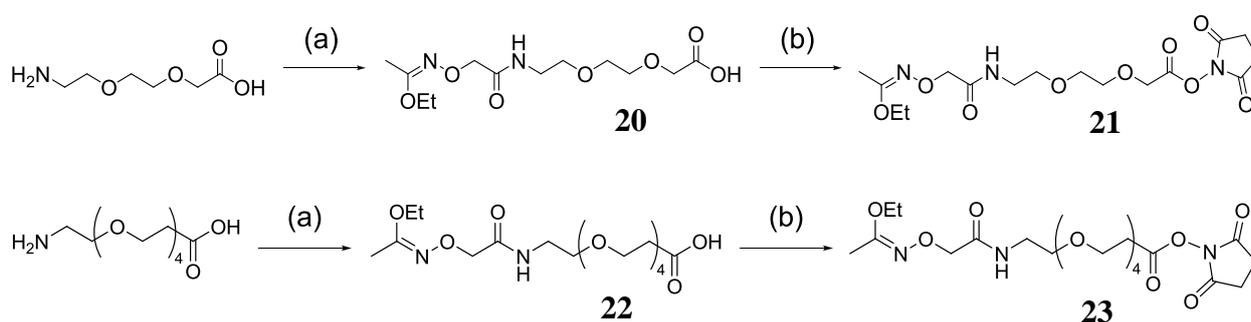


Figure 48 - Synthèse des bras espaceurs PEG-oxyamine

(a) 1,3 éq. **2**, DIEA, DMF ; NHS/DCC, Dioxane/AcOEt

La fonction oxyamine est introduite sur les composés H<sub>2</sub>N-PEG<sub>x</sub>-COOH en faisant réagir l'ester activé **2** sur l'amine, pour donner les acides carboxyliques **20** et **22**. Ces deux composés sont ensuite mis en présence de NHS/DCC pour donner les esters activés correspondants **21** et

**23**, obtenus avec un rendement de 45% et 53% respectivement après purification par chromatographie flash en phase inverse. Afin de ne pas décrocher les groupements protecteurs 1-Ethoxyldène acido-labiles, de l'acide citrique a été utilisé dans les solvants de purification au lieu du TFA usuel.

Après la déprotection du châssis **19** par un traitement acide à 50% de TFA, nous avons introduit les fonctions PEG<sub>x</sub>-oxyamines protégées en utilisant les esters activés **21** et **23**. Les châssis obtenus, respectivement **25** et **26** sont alors purifiés, puis immédiatement mis en présence de RGD aldéhyde **11**. Après 2 heures de réaction à 37°C, les produits **27** et **28** sont obtenus après purification par RP-HPLC, respectivement avec un rendement de 16% et 11% sur 3 étapes (cf. Figure 49).

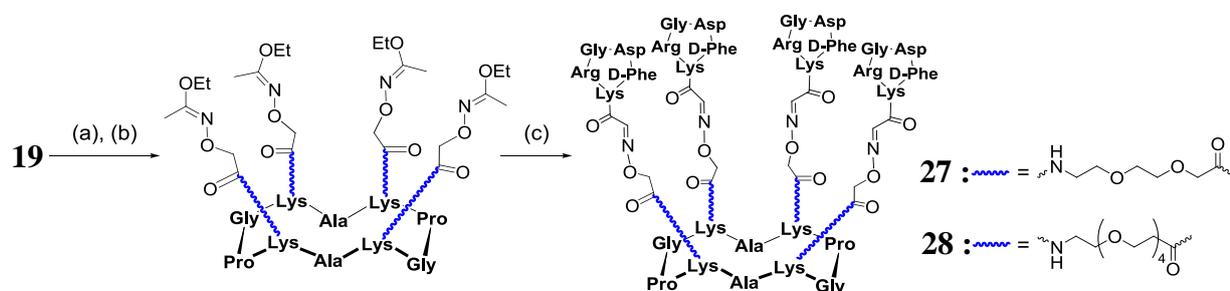


Figure 49 - Synthèse des composés **27** et **28**

Les composés **27** et **28** ont ensuite été caractérisés par HPLC et par spectrométrie de masse.

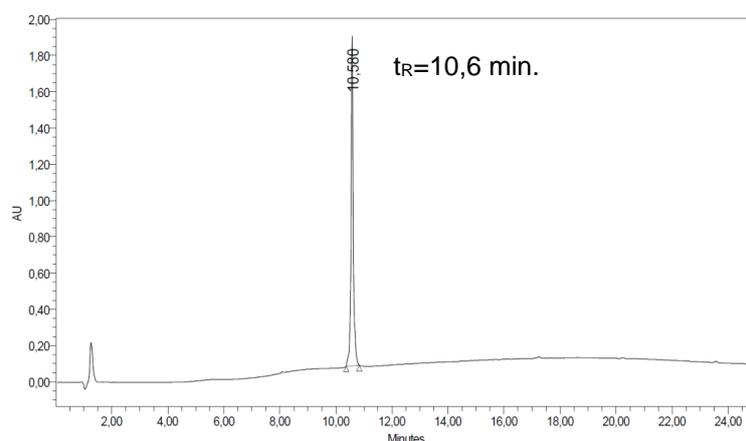


Figure 50 - Chromatogramme HPLC du composé **27** pur

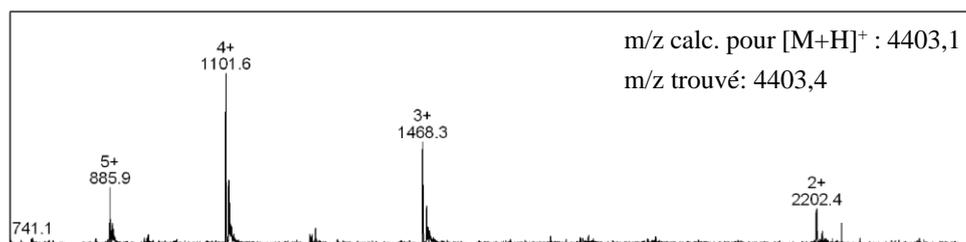


Figure 51 - Spectre de masse du composé 27 pur

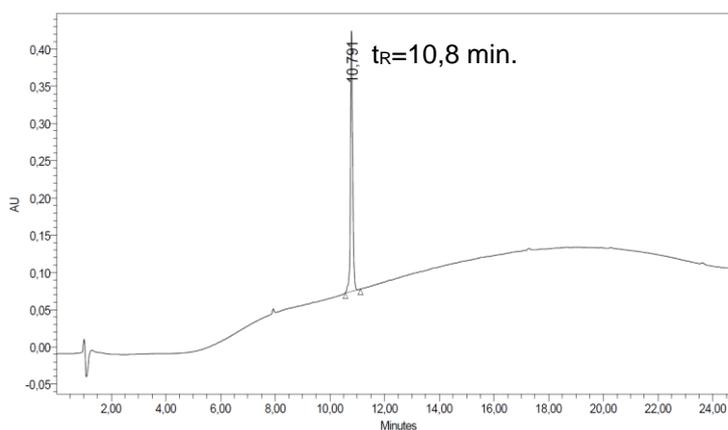


Figure 52 - Chromatogramme HPLC du composé 28 pur

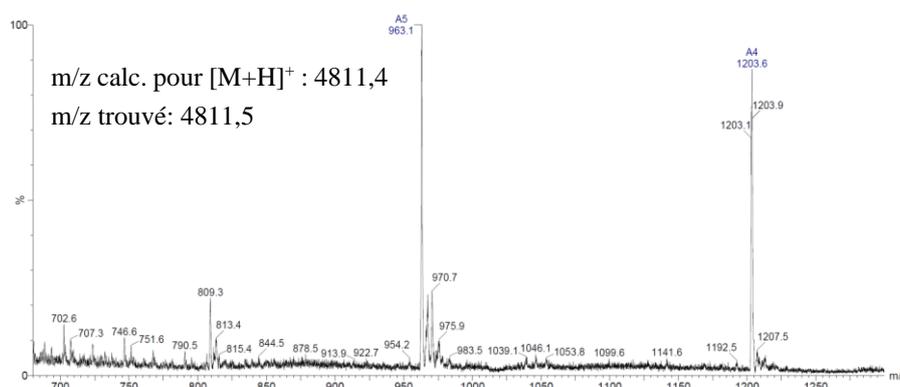


Figure 53 - Spectre de masse du composé 28 pur

Afin de vérifier qu'il n'y ait pas d'interactions non spécifiques avec l'intégrine, nous avons synthétisé une version inactive du peptide c[-RGDfK-], où la glycine est remplacée par une  $\beta$ -alanine en préparant le peptide c[-R $\beta$ ADfK-].<sup>[231]</sup> Le composé multivalent obtenu est un cluster de peptides RAD.

Une fois ces cinq molécules synthétisées, j'ai ensuite réalisé les tests biologiques à l'Institut Albert Bonniot de Grenoble.

### 3 Résultats et discussions

#### 3.1 Déroutement des tests biologiques

Le principe de cette évaluation est de mesurer la capacité des molécules synthétisées à lier l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  en compétition à l'un des ligands naturels de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Dans notre cas, nous avons choisi la vitronectine comme standard. L'efficacité des peptides dépend de leur capacité à lier les cellules surexprimant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

Cette évaluation nous permettra d'obtenir une efficacité relative pour chaque composé et donc de déterminer l'influence de la présentation des motifs RGD.

Pour ce test, la vitronectine est introduite à la surface de plaque « 96 puits ». Les peptides sont ensuite incubés à 37°C pendant 30 minutes avec des cellules HEK293- $\beta_3$ , cellules humaines embryonnaires du rein sur-exprimant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (25 000 cellules par puits).

Au bout de 30 minutes, les cellules et peptides en suspension sont alors éliminés avec une solution de PBS. Puis les cellules restantes, c'est-à-dire celles qui sont liées à la vitronectine, sont fixées avec de l'éthanol et colorées avec du bleu de méthylène.

Après séchage, les cellules sont lysées avec une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 M. La coloration bleue est proportionnelle à la quantité de cellules liées à la vitronectine. L'intensité du bleu est lue avec un lecteur de plaques et est convertie en pourcentage de cellules liées à la vitronectine.

Ces étapes sont résumées dans la Figure 54. Les expériences sont effectuées en triple et ont été répétées deux fois.

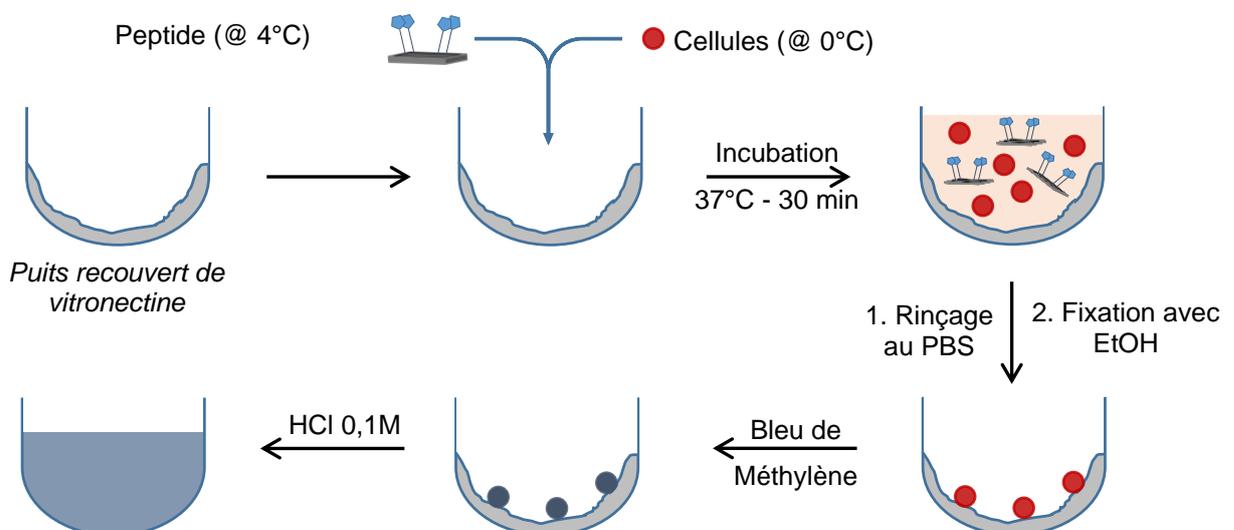


Figure 54 - Evaluation des différents composés RGD

Les points expérimentaux obtenus, c'est-à-dire les pourcentages de cellules liées à la vitronectine, sont tracés en fonction de la concentration en peptide. Ces points sont ensuite approchés par une fonction sigmoïde à 4 paramètres : [232]

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

x : concentration du peptide

A : Asymptote minimale

B : pente

C : point d'inflexion

D : Asymptote maximale

Le programme utilisé (Origin) va alors chercher les 4 paramètres A, B, C et D, de façon à ce que la somme des différences au carré des valeurs expérimentales et des valeurs théoriques soit la plus petite possible :

$$\min \left( \sum (V_e - V_t)^2 \right)$$

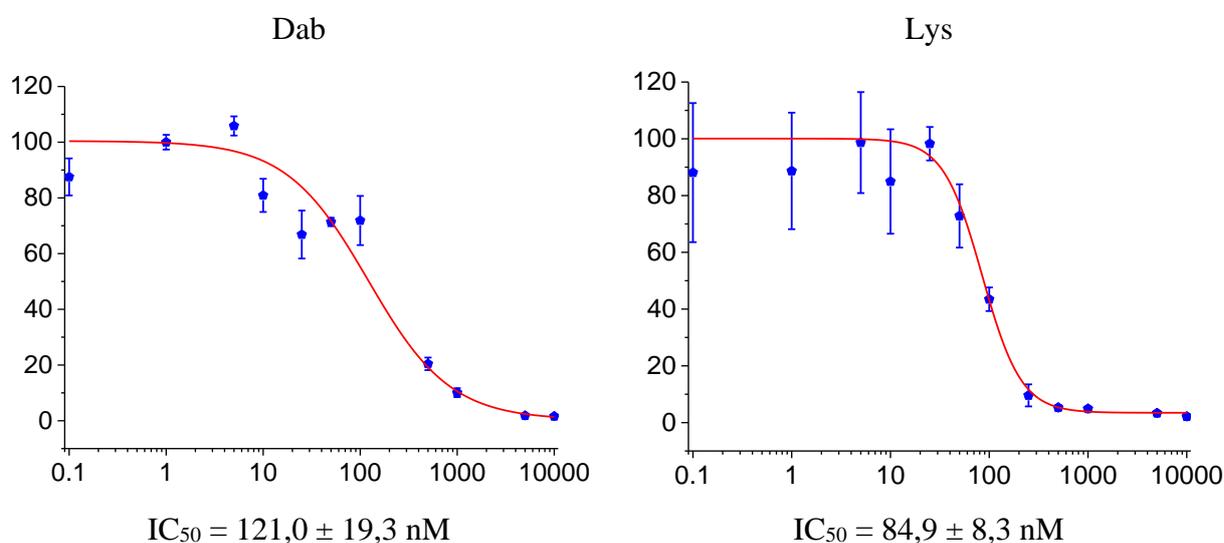
$V_e =$  Valeurs expérimentales  
 $V_t =$  Valeurs théoriques

Cette somme atteint 0 si les valeurs théoriques correspondent aux valeurs expérimentales.

Le point d'inflexion de la courbe obtenue correspond à la valeur d'IC<sub>50</sub> du composé en question.

### 3.2 Résultats

Les courbes obtenues après une série de mesures sont présentées ci-dessous. L'abscisse correspond à la concentration en peptide (nM) et l'ordonnée au pourcentage de cellules liées.



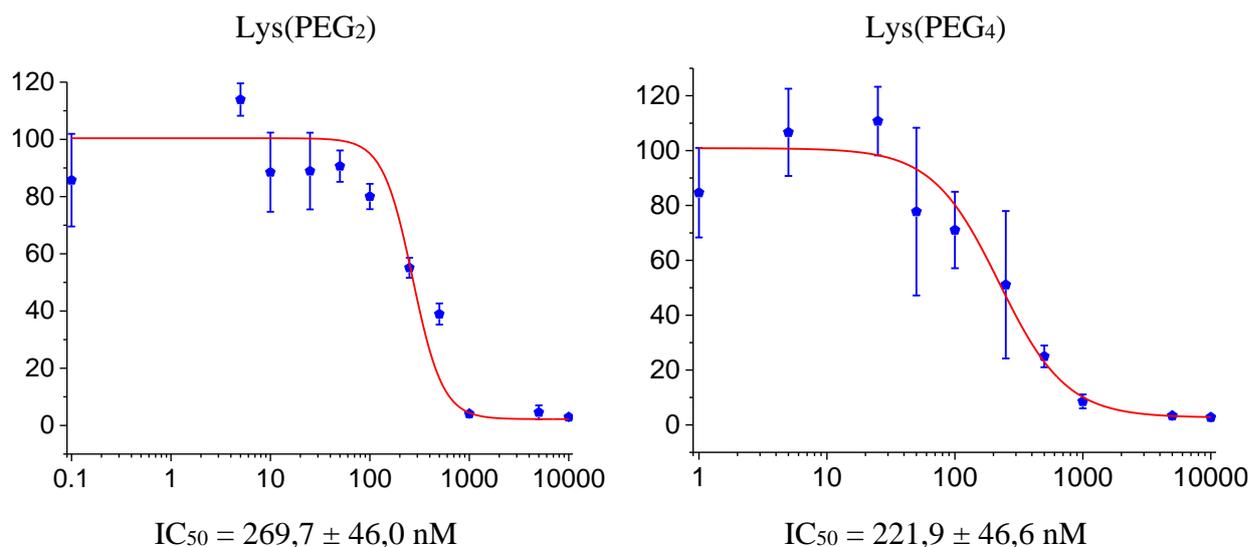


Figure 55 - Inhibition de l'adhésion des cellules HEK293-β<sub>3</sub> à la vitronectine

Nous avons ensuite répété cette expérience, ce qui nous a permis de confirmer la tendance obtenue avec les premiers résultats. Les IC<sub>50</sub> obtenus sont représentés sous forme d'histogramme dans la Figure 56.

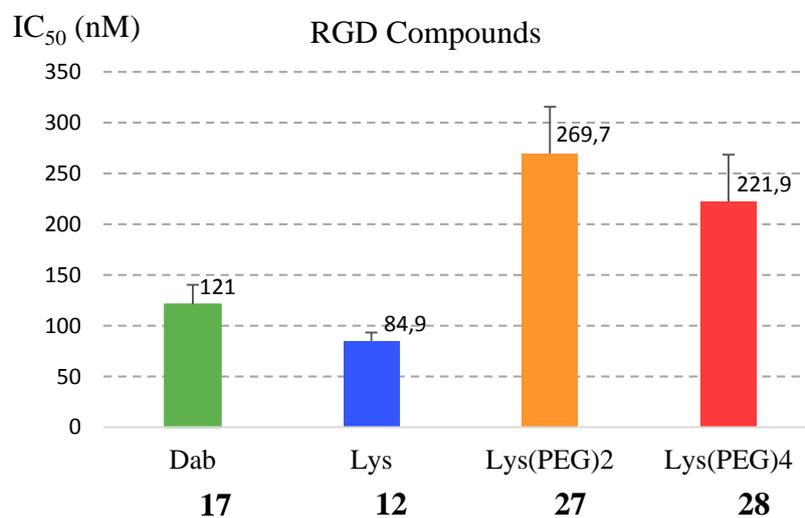


Figure 56 - Résumé des IC<sub>50</sub> obtenus pour chaque composé RGD

Le composé de référence **12** possède l'IC<sub>50</sub> le plus bas, c'est-à-dire qu'il lie l'intégrine de façon la plus efficace.

Le composé possédant les bras espaceurs Dab possède un  $IC_{50}$  environ 1,5 fois plus élevé que le composé de référence. Nous avons émis l'hypothèse d'un accès réduit aux ligands RGD, c'est-à-dire une gêne stérique accrue causée par la plus petite taille des bras espaceurs.

Les deux composés possédant des bras espaceurs PEG ont un  $IC_{50}$  proche, environ 3 fois plus élevé que le composé de référence. Nous avons supposé que ces valeurs sont le résultat d'une trop grande flexibilité des bras espaceurs. Ainsi, les motifs RGD peuvent être plus éloignés les uns des autres, et la concentration locale en ligands est diminuée, ce qui diminue l'effet de recombinaison statistique. En effet lorsque l'un des ligands RGD du cluster lié à l'intégrine se détache de celle-ci, il y a une forte probabilité que les autres motifs RGD du cluster se lient à la cible<sup>[233]</sup> (cf. Figure 57).

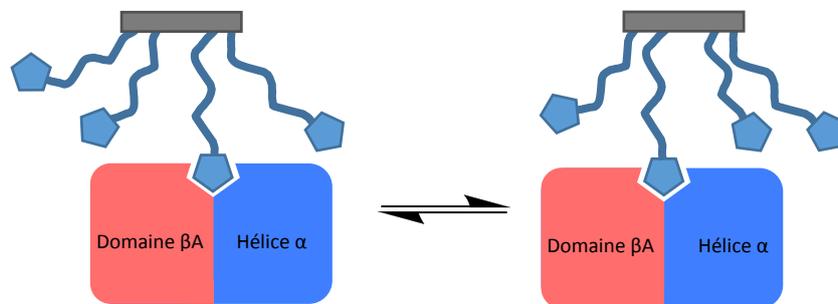


Figure 57 - Effet de recombinaison statistique

### 3.3 Modélisation moléculaire

#### 3.3.1 Introduction

Afin de mieux interpréter les résultats obtenus lors des tests d'adhésion cellulaires, nous avons effectué une simulation de dynamique de 1 nanoseconde *in vacuo* sous AMBER pour chaque composé synthétisé afin de déterminer leur structure spatiale. Cette étude a été effectuée avec l'aide du Dr Muriel Jourdan.

Après avoir construit les molécules avec le logiciel Insight II, nous avons utilisé le logiciel AMBER 10.1 pour effectuer cette étude. Les charges partielles sont calculées avec le module « antechamber » puis les coordonnées sont générées avec le module xLEaP.

Les molécules ont été placées dans une boîte d'eau cubique, et 1000 pas de minimisation sont appliqués à l'eau, suivis de 1000 pas de minimisation sur le système. Une simulation de dynamique de 20 picosecondes (ps) à volume constant et à 300 K est effectuée sur les molécules d'eau, tout en fixant les composés synthétisés. Puis, une simulation de dynamique de 1 nanoseconde (ns) à pression constante à 300 K est ensuite appliquée au système. La simulation

de dynamique est analysée avec le module PTRAJ, et les molécules sont visualisées avec VMD (visual molecular dynamics). Les images ont été produites avec le logiciel Chimera.

### 3.3.2 Résultats et discussions

Pendant la dynamique, le châssis cyclodécapeptidique reste assez bien structuré, puisqu'il est stabilisé par liaisons hydrogène (représentées en pointillés sur la Figure 58). De même, la structure du peptide c[-RGDfK-] est assez rigide et n'est pas trop modifiée.

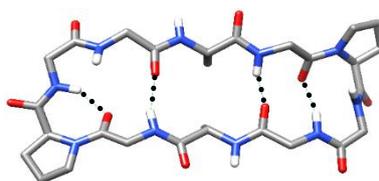
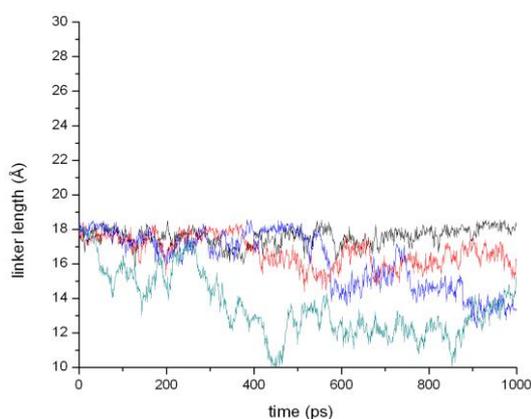


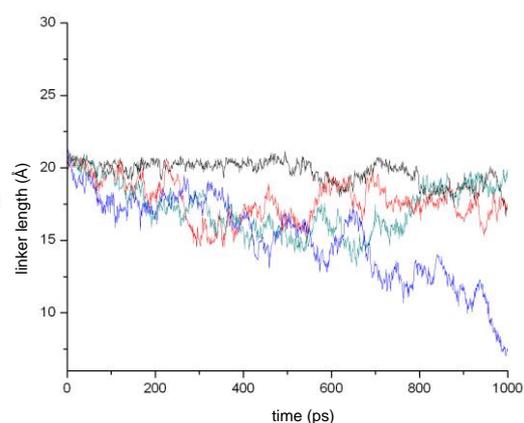
Figure 58 - Structure du châssis cyclodécapeptidique

Les différents bras espaceurs utilisés reliant le châssis aux ligands montrent en revanche des changements de structure importants :

- La longueur des bras espaceurs Dab et Lys ne varie pas de manière significative au cours de la dynamique. Elle est en moyenne de 16,0 Å (de 13,5 à 17,5 Å) et 17,4 Å (de 15,1 à 19,7 Å), respectivement. Dans la Figure 59 sont représentées les longueurs des quatre bras espaceurs en Ångström des deux composés, en fonction du temps en picosecondes.



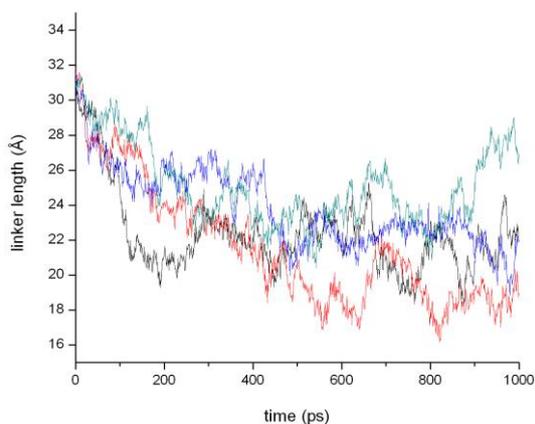
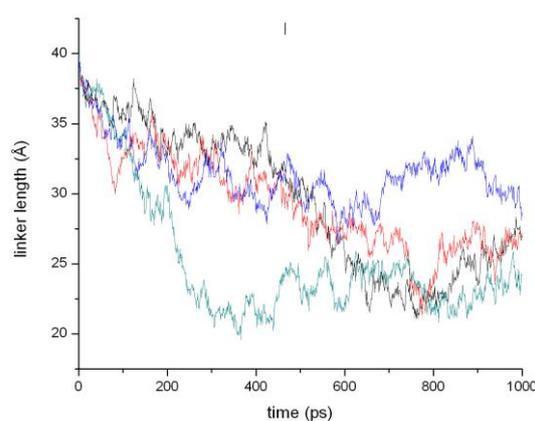
Bras espaceur Dab, composé **17**



Bras espaceur Lys, composé **12**

Figure 59 - Longueur (Å) de chaque bras espaceur en fonction du temps (ps)

- Les deux bras espaceurs Lys(PEG<sub>2</sub>) et Lys(PEG<sub>4</sub>), respectivement des composés **27** et **28**, sont étendus au début de la dynamique (31,0 Å et 40,0 Å respectivement). Ils se replient ensuite sur eux-mêmes, pour atteindre une longueur moyenne de 22,0 Å et 26,0 Å respectivement (cf. Figure 60).

Bras espaceur Lys(PEG<sub>2</sub>), composé **27**Bras espaceur Lys(PEG<sub>4</sub>), composé **28***Figure 60 - Longueur de chaque bras espaceur en fonction du temps*

Le comportement de ces bras espaceurs influence directement la présentation des motifs RGD, et notamment la distance entre chaque motif RGD. Pour le composé de référence **12** portant les bras espaceurs Lys, la plus faible distance entre chaque motif RGD est de 24,7 Å en moyenne (de 17,1 Å à 32,6 Å). Pour les 3 autres composés, **17**, **27**, **28**, cette valeur est bien plus faible (autour de 20 Å en moyenne) (cf. Tableau 3).

*Tableau 3 - Distances mesurées sous AMBER*

Composés	Distances inter-RGD	
	Moyenne	Minimale - Maximale
<b>12</b>	24,7	17,1 - 32,6
<b>17</b>	19,8	12,5 - 27,6
<b>27</b>	19,5	11,4 - 30,0
<b>28</b>	21,3	16,1 - 25,3

En observant les 4 Figures ci-dessous, on remarque que ces valeurs s'expliquent par la présence de regroupements de motifs RGD sur les composés **17**, **27** et **28**, ce qui n'est pas le cas pour le composé **12**.

## Composé 17, bras espaceur Dab

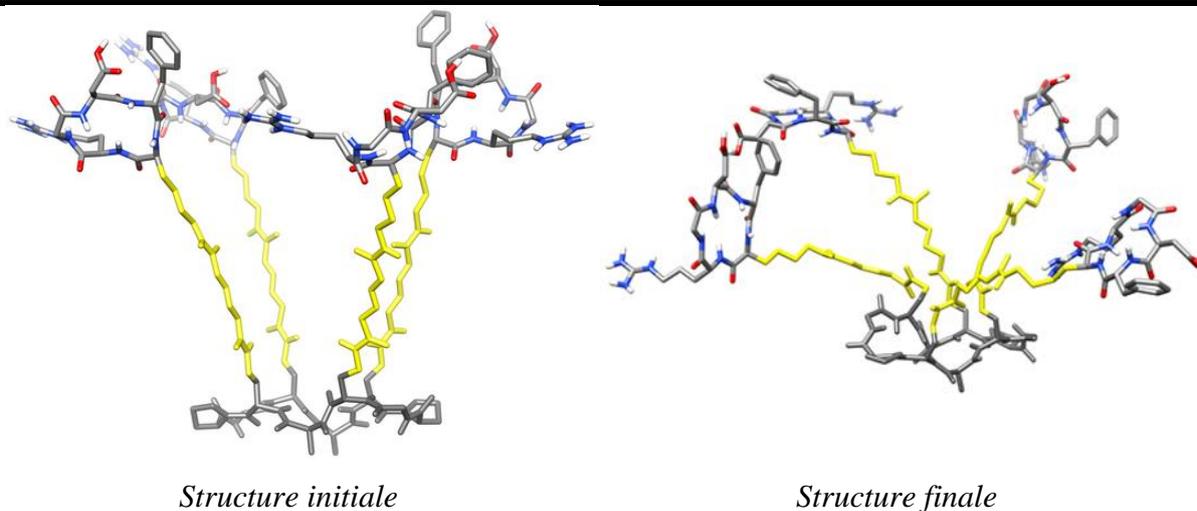


Figure 61 - Structures initiale et finale du composé 17

## Composé 12, bras espaceur Lys

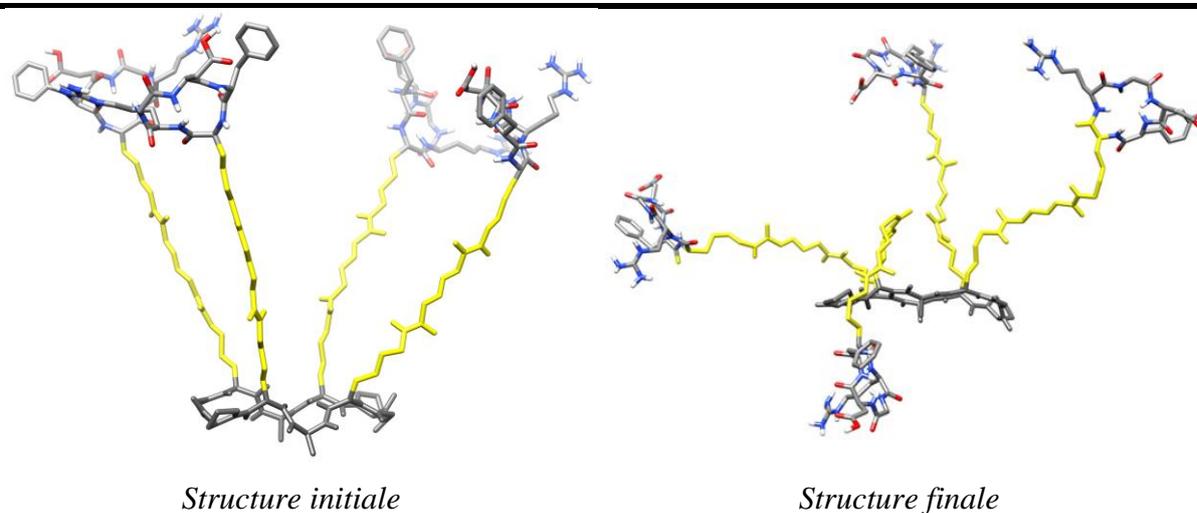
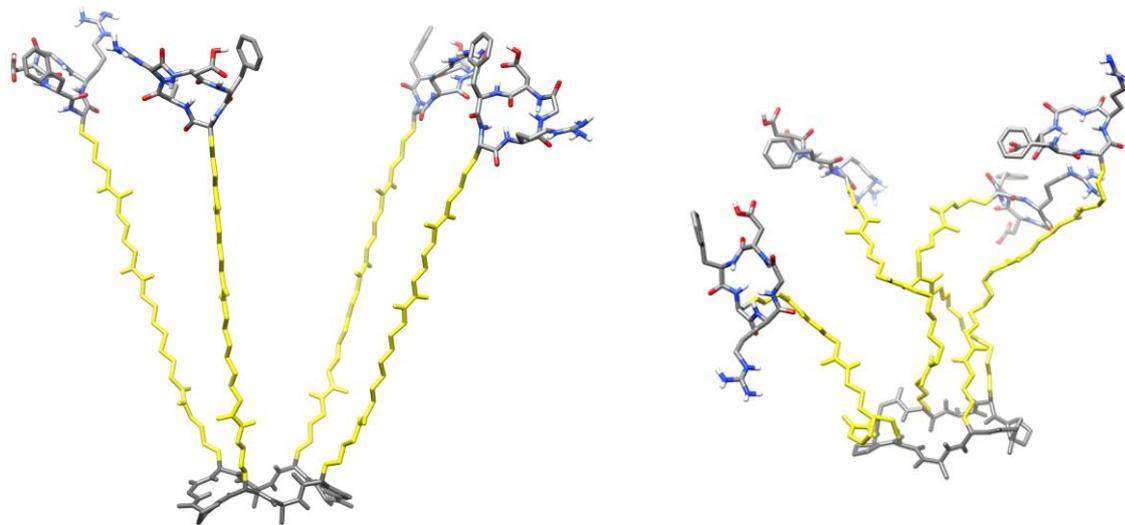
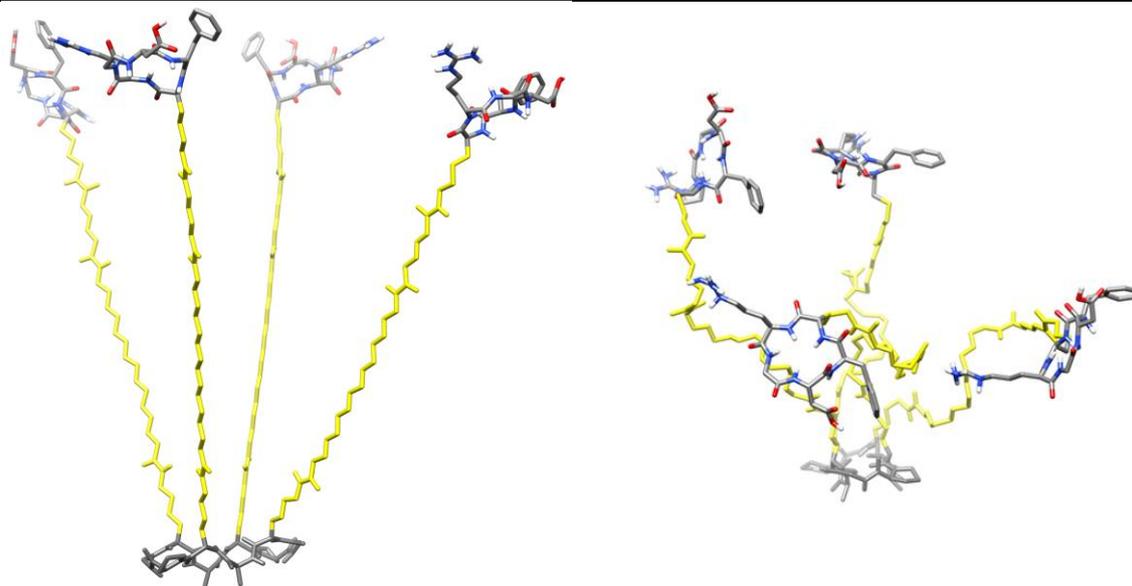


Figure 62 - Structures initiale et finale du composé 12

Composé **27**, bras espaceur Lys(PEG<sub>2</sub>)*Structure initiale**Structure finale**Figure 63 - Structures initiale et finale du composé 27*Composé **28**, bras espaceur Lys(PEG<sub>4</sub>)*Structure initiale**Structure finale**Figure 64 - Structures initiale et finale du composé 28*

Le composé **12** possède ses quatre motifs RGD espacés régulièrement, ce qui permettrait un accès facile et équivalent pour chaque peptide. Ceci favorise l'association à l'intégrine.

Les composés **17**, **27**, et **28**, présentent un motif RGD isolé, et trois motifs RGD regroupés. Ainsi, si le motif RGD isolé se lie à l'intégrine, les trois autres peptides seront moins accessibles pour relier l'intégrine à cause de l'encombrement stérique, ce qui peut expliquer leur activité biologique plus faible. Parmi ces trois composés, le composé **17** est le plus efficace. Cette observation est cohérente avec les résultats publiés en 2010 par Kubas *et al.*<sup>[234]</sup> Ils ont observé lors de l'évaluation sur cellules de clusters de motifs RGD (entre 2 et 4 ligands RGD) que l'affinité du composé pour l'intégrine était inversement proportionnelle à la longueur du bras espaceur. Un bras plus court permet un phénomène de recombinaison statistique plus rapide.

Un bras espaceur suffisamment court est nécessaire pour relier rapidement l'intégrine, mais il doit être suffisamment long pour éviter de présenter les motifs RGD de façon trop encombrée.

## 4 Conclusions et perspectives

Nous avons synthétisé des nouveaux composés « RGD » en faisant varier la longueur des bras espaceurs. L'évaluation de ces composés sur des cellules surexprimant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  nous a permis de déterminer que le composé de référence, portant des bras espaceurs Lys, était le plus affin envers l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

Nous avons ensuite effectué une simulation de dynamique de ces molécules. Cette étude nous a permis de déterminer une configuration géométrique préférentielle. En effet, nous avons pu constater que la molécule la plus affine était celle dont les distances inter-ligand étaient les plus grandes. Au contraire, les autres molécules possèdent des clusters de 2-3 ligands RGD qui génèrent sûrement une gêne stérique néfaste pour l'association ligand-récepteur. D'autre part, nos composés interagissent avec le récepteur *via* un effet de multivalence dû à une augmentation de la concentration locale en ligand RGD. À cet effet, les composés avec des bras espaceurs adéquats sont recommandés. Il est vraisemblable que des espaceurs trop longs ou trop courts peuvent diminuer l'effet de recombinaison statistique.

## **CHAPITRE II**

### **DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE DE REACTION « ONE-POT »**

## 1 Introduction

De nombreuses réactions sont utilisées pour permettre l'accès à des assemblages biomoléculaires complexes par l'union de deux composés. Ceux-ci peuvent être des molécules naturelles ou modifiées (protéines, peptides, glycopeptides, oligonucléotides, etc.) mais aussi des structures artificielles telles que des dendrimères, des nanoparticules, etc. La majorité des réactions présentées brièvement ci-dessous donnent lieu à un lien non naturel, à l'exception de la native chemical ligation (NCL), de la traceless Staudinger et de la ligation KAHA.

Une ligation idéale est chimiosélective, c'est-à-dire qu'elle ne va réagir qu'avec un seul type de groupement réactionnel et ne requiert donc pas l'utilisation de groupements protecteurs. Elle a idéalement lieu dans des conditions douces (milieu aqueux, pH aux environs de 7, faible concentration, etc.)

Tableau 4 - Résumé des réactions de ligation les plus communes

<b>CuAAC</b> [235-236]	$\text{R-N}_3 + \text{C}\equiv\text{C-R}' \xrightarrow[7,4]{\text{Cu(I)}} \text{R}'\text{-C}\equiv\text{N-N-R}$
<b>Strain induced cycloaddition</b> [237]	$\text{R-N}_3 + \text{F-C}_8\text{H}_{12}\text{-R}' \xrightarrow[7,4]{} \text{R}'\text{-C}_8\text{H}_{12}\text{-N-N-R}$
<b>Staudinger</b> [238]	$\text{R-N}_3 + \text{Ph}_2\text{P-C}_6\text{H}_4\text{-R}' \xrightarrow[7,4]{} \text{R}'\text{-N-C}_6\text{H}_4\text{-PPh}_2$
<b>Traceless Staudinger</b> [239]	$\text{R-N}_3 + \text{Ph}_2\text{P-CH}_2\text{-S-C(=O)-R}' \xrightarrow[7,4]{} \text{R}'\text{-N-C(=O)-R}'$
<b>Hydrazone</b> [240]	$\text{R-CHO} + \text{H}_2\text{N-NH-R}' \xrightarrow[5,7]{} \text{R-CH=N-NH-R}'$
<b>Oxime</b> [241]	$\text{R-CHO} + \text{H}_2\text{N-O-R}' \xrightarrow[4,5]{} \text{R-CH=N-O-R}'$
<b>KAHA ligation</b> [242]	$\text{R-C(=O)-COOH} + \text{HO-NH-R}' \xrightarrow[40^\circ\text{C}]{\text{DMSO}} \text{R-C(=O)-NH-R}'$

<b>Thiol maléimide</b> <sup>[243]</sup>	$\text{R-SH} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{N-R}' \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \xrightarrow{7,4} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R-S} \quad \text{N-R}' \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$
<b>Thiol-ene</b> <sup>[244-245]</sup>	$\text{R-SH} + \text{CH}_2=\text{CH-R}' \xrightarrow[\text{photoinitiator}]{h\nu} \text{R-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-R}'$
<b>Native chemical ligation (NCL)</b> <sup>[246]</sup>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-C-S-R} \end{array} + \begin{array}{c} \text{SH} \\   \\ \text{H}_2\text{N-CH} \\   \\ \text{C=O} \\   \\ \text{R}' \end{array} \xrightarrow{7,0} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-C-NH} \\   \\ \text{CH} \\   \\ \text{C=O} \\   \\ \text{R}' \\   \\ \text{SH} \end{array}$

Les ligations donnant lieu à la formation de liens amides peuvent être utilisées pour la synthèse totale de protéines.<sup>[246-247]</sup> Certaines protéines possèdent en effet de longues séquences ou des enchainements d'acides aminés qui posent problème en SPPS. Le but est donc de synthétiser plusieurs petits fragments de protéines puis de les assembler en utilisant l'une de ces ligations. L'intérêt de cette stratégie est l'obtention d'une protéine identique à la protéine naturelle, et qui possèdera son activité biologique.

Il est également possible de mimer certaines liaisons amides par des liaisons non natives.

Tam *et al.* ont rapporté en 2007 la synthèse d'une protéine, la ribonucléase pancréatique, en utilisant un lien 1,5-triazole pour remplacer une liaison *cis*-prolyl. La liaison obtenue est capable de former le même coude de type VIb que la liaison *cis*-prolyl. Les protéines obtenues possèdent une activité très proche de la protéine naturelle.<sup>[248]</sup>

Le groupe d'Agnès Delmas décrit en 2012 la synthèse de protéines *via* l'assemblage de fragments par CuAAC.<sup>[249]</sup> Le lien triazole est décrit comme un groupement mimant le lien amide. Ces protéines ont une activité biologique presque identique à la protéine naturelle.<sup>[250]</sup>

Les ligations ne donnant pas lieu à la formation de liens amides sont aussi utilisées pour la fonctionnalisation de structures artificielles, telles que des dendrimères, des nanoparticules organiques ou des assemblages sur un châssis (fullerène, adamantane, calixarène, etc.) ou une surface. Il est également possible d'utiliser plusieurs ligations orthogonales afin de fonctionnaliser ces structures par différents types de composés, sans utiliser de groupements protecteurs.<sup>[251-258]</sup> Cette voie de synthèse est intéressante pour une stratégie de double ciblage par exemple, ou bien pour combiner l'imagerie à la thérapie.

Au sein de l'équipe I2BM, Galibert *et al.* ont décrit en 2009 l'assemblage « one-pot » de différents peptides modifiés par une fonction azoture ou par une fonction aldéhyde, sur un châssis portant plusieurs groupements alcyne et oxyamine.<sup>[259]</sup>

Puis en 2011, une extension de la méthode a été décrite, notamment l'assemblage « one-pot » de trois composés différents sur un châssis cyclodécapeptidique *via* l'utilisation de trois ligations chimiosélectives (la ligation oxime, la CuAAC et le couplage thiol-maléimide).<sup>[260]</sup>

Ces stratégies permettent d'éviter de longues étapes de purification et de lyophilisation des intermédiaires, mais aussi d'augmenter le rendement total de la synthèse.

Dans la continuité de ces résultats, nous avons étudié l'assemblage « one-pot » de deux types de composés sur un châssis cyclodécapeptidique en combinant deux réactions catalysées par le cuivre, détaillées dans le paragraphe suivant.

### 1.1 CuAAC

Rapportée simultanément par Karl Barry Sharpless<sup>[236]</sup> et Morten Meldal<sup>[235]</sup> en 2002, la cycloaddition catalysée au cuivre entre un alcyne et un azoture est une des réactions les plus utilisées pour l'assemblage de macromolécules. Il s'agit d'une version améliorée de la cycloaddition de Huisgen, qui nécessite des températures et des temps de réactions élevés, et qui donne lieu à la formation de deux régioisomères, 1,4 et 1,5<sup>[261]</sup> (cf. Figure 65).

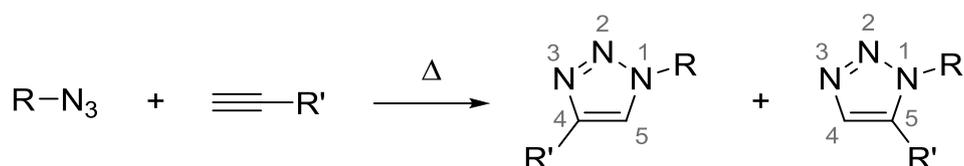


Figure 65 - Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen

Dans le cas des biomolécules, la CuAAC est le plus souvent effectuée dans un tampon aqueux (usuellement phosphate), qu'il est possible de diluer avec certains solvants organiques (usuellement DMF ou DMSO) pour les composés peu solubles dans l'eau.

Le Cu(I) est utilisé comme catalyseur (1% molaire à 5% molaire), et est le plus souvent obtenu par réduction *in situ* du Cu(II) par l'ascorbate de sodium. Il est également possible d'utiliser un sel de Cu(I), ou une nanopoudre de Cu(0).<sup>[262]</sup>

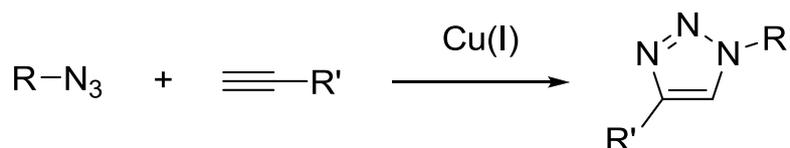


Figure 66 – Cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre

Le laboratoire de Sharpless a développé un grand nombre de ligands du Cu(I), qui permettent de stabiliser celui-ci et donc d'augmenter les rendements de réaction. Le plus utilisé dans les réactions en solvants organique est le TBTA (Tris-(benzyltriazolylmethyl)amine).<sup>[263]</sup> Un composé analogue existe pour les réactions en milieu aqueux, le THPTA (Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine) (cf. Figure 67).<sup>[264]</sup>

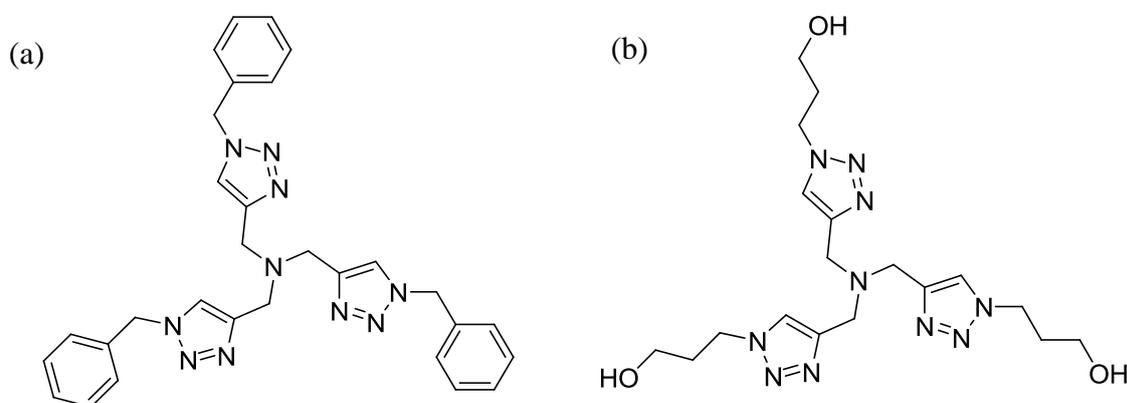


Figure 67 - (a) TBTA ; (b) THPTA

Ces ligands du Cu(I) empêchent son oxydation, ce qui le rendrait inactif. De plus, lors de l'utilisation de sels de Cu(I), le cuivre est présent sous forme de clusters. L'utilisation d'un tel ligand permet de dissocier les clusters et de former des espèces de cuivre plus réactives.

### 1.2 Thioacid-mediated amine acylation (TAA)

Gopi *et al.* ont rapporté en 2012 la formation de liens amides par réaction d'une amine sur un thioacide activé par un cation métallique (cf. Figure 68).<sup>[265]</sup>

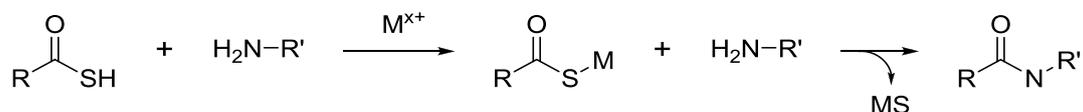


Figure 68 - Formation d'un lien amide entre un thioacide et une amine

Cette voie de synthèse avait été développée en 1981 par James Blake de l'Université de Californie à San Francisco en utilisant un sel de nitrate d'argent.<sup>[266]</sup> Il étend ensuite cette méthode à la synthèse d'un analogue de la  $\beta$ -endorphine humaine <sup>[267]</sup> puis à d'autres protéines.<sup>[268-271]</sup>

Gopi *et al.* démontrent que la réaction est compatible avec différents types de cations métalliques, tels que Ag(I), Cu (I), Cu (II), Fe (II), Fe (III), Au (III). Le Cu(II)SO<sub>4</sub> a cependant été identifié comme étant le catalyseur donnant les meilleurs rendements. Le catalyseur doit être introduit en plus grande quantité que pour la CuAAC (30 % molaire). Le CuS dégagé lors de la réaction peut aussi catalyser la réaction.

Cette réaction a été appliquée à l'assemblage de peptides constitués de 2, 3 et 4 acides aminés.<sup>[265]</sup>

Cette réaction est compatible en présence d'autres fonctions nucléophiles, telles que les alcools et les thiols, mais malheureusement la présence d'autres amines n'est pas possible.<sup>[272]</sup>

## 2 Optimisation de la TAA

La réaction TAA telle que rapportée par Gopi est effectuée dans des conditions de réaction différentes de celles de la CuAAC :

Tableau 5 – Conditions de réaction de la TAA et CuAAC

	TAA	CuAAC
<i>Concentration</i>	1 M	0,01 M - 0,001 M
<i>Catalyseur</i>	Cu(II)	Cu(I)
<i>Solvant</i>	MeOH	Solvant organique/Tampon

Dans un premier temps nous avons donc optimisé la réaction TAA pour qu'elle puisse être effectuée dans les mêmes conditions que la CuAAC.

## 2.1 Influence de la concentration

La réaction rapportée par Gopi est effectuée dans le méthanol à une concentration de 1M. Nous avons tout d'abord cherché à travailler à des concentrations plus faibles, pour pouvoir ensuite appliquer cette réaction à des composés peptidiques. Pour cette raison, nous avons donc décidé de changer le solvant, et d'utiliser le DMF, plus largement utilisé pour les couplages peptidiques.

Lorsque nous avons traité la Fmoc-Lys-OH·HCl par de l'acide thioacétique en présence de CuSO<sub>4</sub> dans le DMF à 0,2 M, nous n'avons pas observé la formation de produit (cf. Figure 69). Après avoir ajusté le pH à 8-9 par ajout de DIEA, nous avons observé une formation lente du produit (≈30% de conversion en 2 heures).

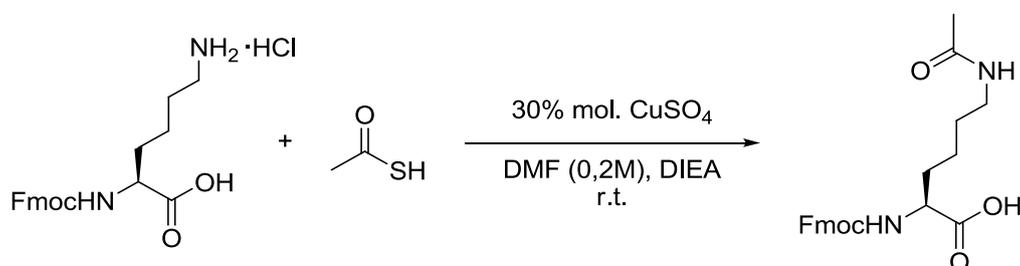


Figure 69 - Acétylation de la Fmoc-Lys-OH·HCl

En ajoutant 5 équivalents de THPTA et en chauffant à 37°C, nous avons pu observer 100% de conversion en une heure.

Nous avons ensuite décidé d'effectuer la réaction en milieu encore plus dilué, à 10<sup>-2</sup> M, concentration optimale pour travailler avec les peptides. Cependant à cette concentration, la conversion n'a pas dépassé les 30%. Nous avons émis l'hypothèse que la réaction était plus rapide lorsqu'elle était catalysée par Cu(II)SO<sub>4</sub> que par CuS. Cette hypothèse a été confirmée lorsque nous avons obtenu près de 100% de conversion en 5 minutes en utilisant 1 équivalent de Cu(II)SO<sub>4</sub>.

## 2.2 Effet du tampon

Puis nous avons voulu vérifier si cette réaction était compatible avec les solvants aqueux. Pour cela nous avons effectué un screening de tampons basiques, en faisant réagir l'acide thioacétique sur le châssis cyclodécapeptidique **33** portant une fonction amine et une fonction alcyne. L'accès au composé **33** sera détaillé dans le paragraphe 3.2.

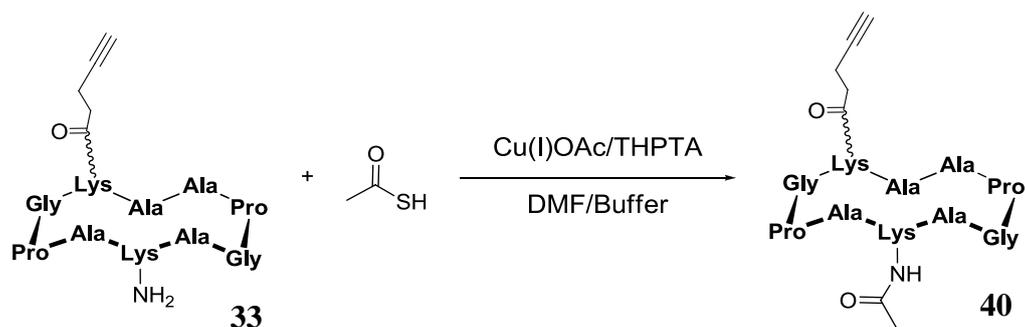


Figure 70 - Réaction utilisée pour l'étude de différents tampons

Nous avons sélectionné trois tampons, à savoir le tampon principalement utilisé pour la CuAAC, le tampon phosphate de sodium à pH 7,4 ; ainsi que deux tampons carbonate de sodium plus basiques, à pH 9,2 et pH 10,8. Les résultats obtenus sont résumés dans le graphique de la Figure 71.

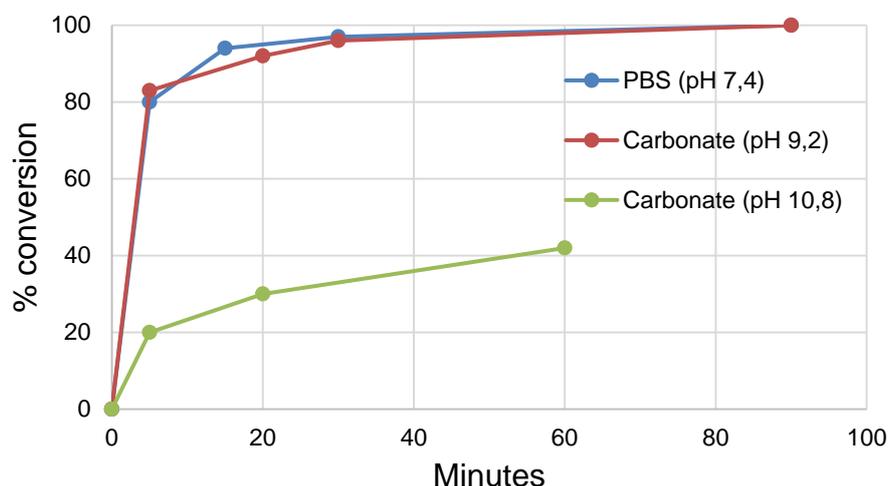


Figure 71 – Étude de différents tampons pour la TAA

Les tampons phosphate 7,4 et carbonate 9,2 donnent des résultats similaires, mais le tampon carbonate donne de meilleures solubilités en général et a donc été retenu pour la suite.

### 2.3 Effet du catalyseur

Nous avons ensuite effectué la réaction avec du Cu(I) en réduisant le Cu(II)SO<sub>4</sub> avec de l'ascorbate, puis nous avons aussi vérifié la compatibilité de la réaction avec d'autres sources de Cu(I) telles que Cu(I)OAc.

Tableau 6 - Résumé des différents catalyseurs utilisés

Catalyseur	TAA	CuAAC + TAA, simultanément
Cu(II)SO <sub>4</sub> + Ascorbate	Conversion partielle	Produit de CuAAC uniquement
Cu(I)OAc	Conversion totale	

L'utilisation de Cu(II)SO<sub>4</sub> en présence d'ascorbate de sodium ne permet d'obtenir qu'une conversion partielle dans le cas de la réaction TAA. Lorsque les réactions CuAAC et TAA sont effectuées simultanément, ce même catalyseur ne donne que le produit de cycloaddition.

Nous avons ensuite utilisé un sel de cuivre, le Cu(I)(OAc). Ce catalyseur donne le produit de TAA avec une conversion totale. Puis, lorsque l'on effectue la CuAAC et la TAA simultanément, le Cu(I)(OAc) permet d'obtenir le produit des deux réactions. Nous avons donc retenu ce catalyseur pour la suite de l'étude.

### 3 Étude de la réaction « one-pot » CuAAC + TAA

#### 3.1 Objectif

Afin d'étudier plus en profondeur les caractéristiques cinétiques et mécanistiques de cette réaction combinant la CuAAC et la TAA, nous avons synthétisé un châssis cyclodécapeptidique possédant une fonction alcyne sur la partie supérieure et une fonction amine sur la partie inférieure. La fonction alcyne a été insérée lors de la SPPS *via* l'acide aminé modifié **30**.

Nous avons ensuite synthétisé un motif RGD portant une fonction azoture, pour le greffer sur la face supérieure du châssis. Nous avons utilisé l'acide thioacétique commercial pour le fixer sur l'amine libre du châssis (cf. Figure 72).

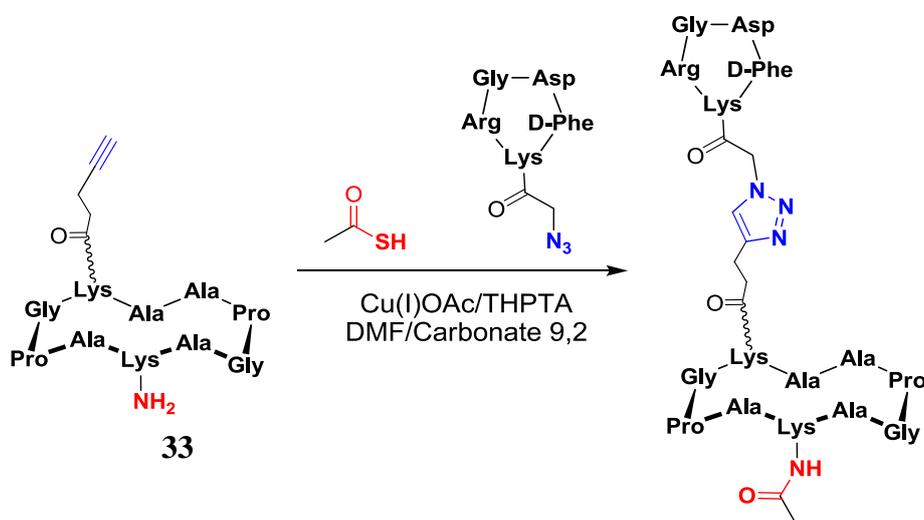


Figure 72 - Étude de la réaction « one-pot »

## 3.2 Synthèse des composés

Pour préparer la lysine modifiée par une fonction alcyne, nous avons tout d'abord préparé l'ester activé correspondant de l'acide 4-pentynoïque par ajout de NHS et DCC.

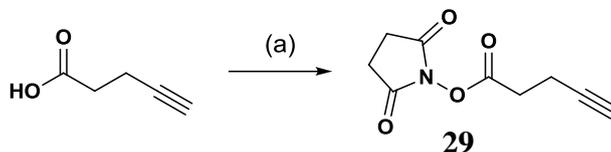


Figure 73 - Synthèse du composé 29

(a) NHS/DCC AcOEt/Dioxane (1:1), 15h à t.a.

Le composé 29 est ensuite greffé à la Fmoc-Lys-OH, pour donner la lysine modifiée 30 avec un excellent rendement de 90%

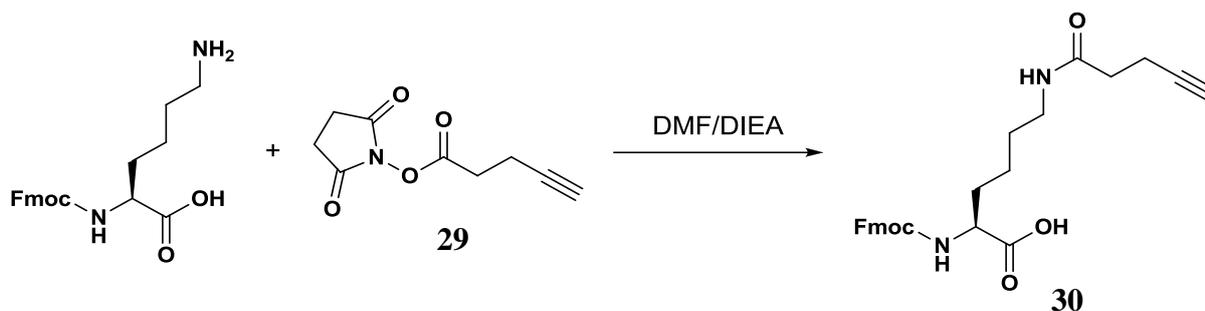


Figure 74 - Synthèse du composé 30

Nous avons ensuite procédé à l'assemblage du châssis cyclodécapeptidique 33 par SPPS. Après cyclisation, le groupement protecteur Boc a été enlevé par un traitement acide (cf. Figure 75).

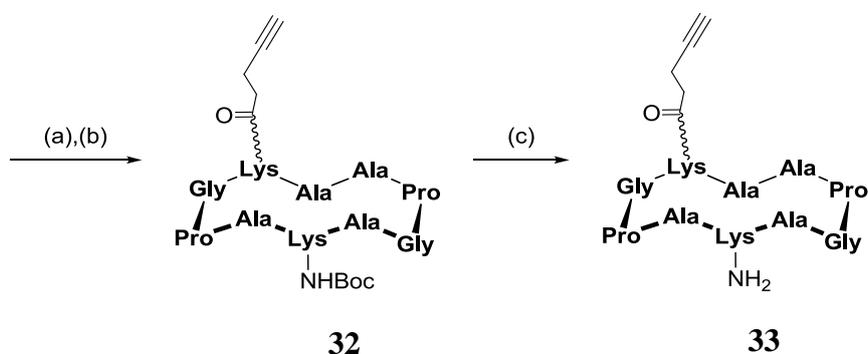


Figure 75 - Synthèse du composé 33

(a) SPPS ; (b) 1,3 éq. PyBOP, DIPEA, DMF ; (c) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50)

De même, le motif RGD **39** portant une fonction azoture a été synthétisé par SPPS en utilisant comme précurseur la Fmoc-Lys(Alloc)-OH. Après cyclisation, le groupement protecteur Alloc (allyloxycarbamate) a été enlevé par un traitement au Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> et PhSiH<sub>3</sub> sous atmosphère inerte. Nous avons alors introduit la fonction azoture en couplant l'acide carboxylique modifié **34** (cf. Figure 76) sur l'amine déprotégée. Puis nous avons déprotégé le reste des fonctions par un traitement acide fort (95% TFA) (cf. Figure 77).

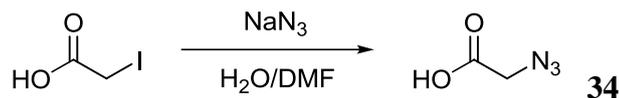


Figure 76 - Synthèse du bras azoture

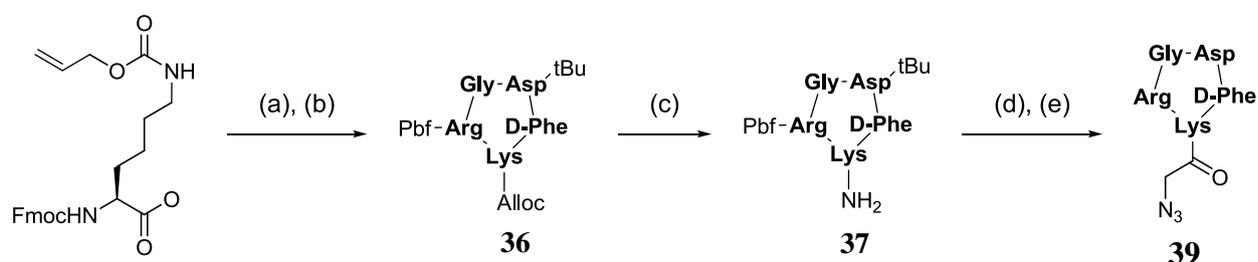


Figure 77 - Synthèse du composé **39**

- (a) SPPS ; (b) 1,3 éq. PyBOP, DIEA, DMF ; (c) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, PhSiH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF ;  
 (d) **34**, 1,3 éq. PyBOP, DMF, DIEA ; (e) TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95 :2,5 :2,5)

## 3.3 Cinétique

Nous avons décidé de procéder à l'assemblage de trois façons différentes en réalisant les réactions de façon séquentielle ou simultanément (cf. Figure 78) :

- CuAAC, puis TAA
- TAA, puis CuAAC
- les deux réactions simultanément.

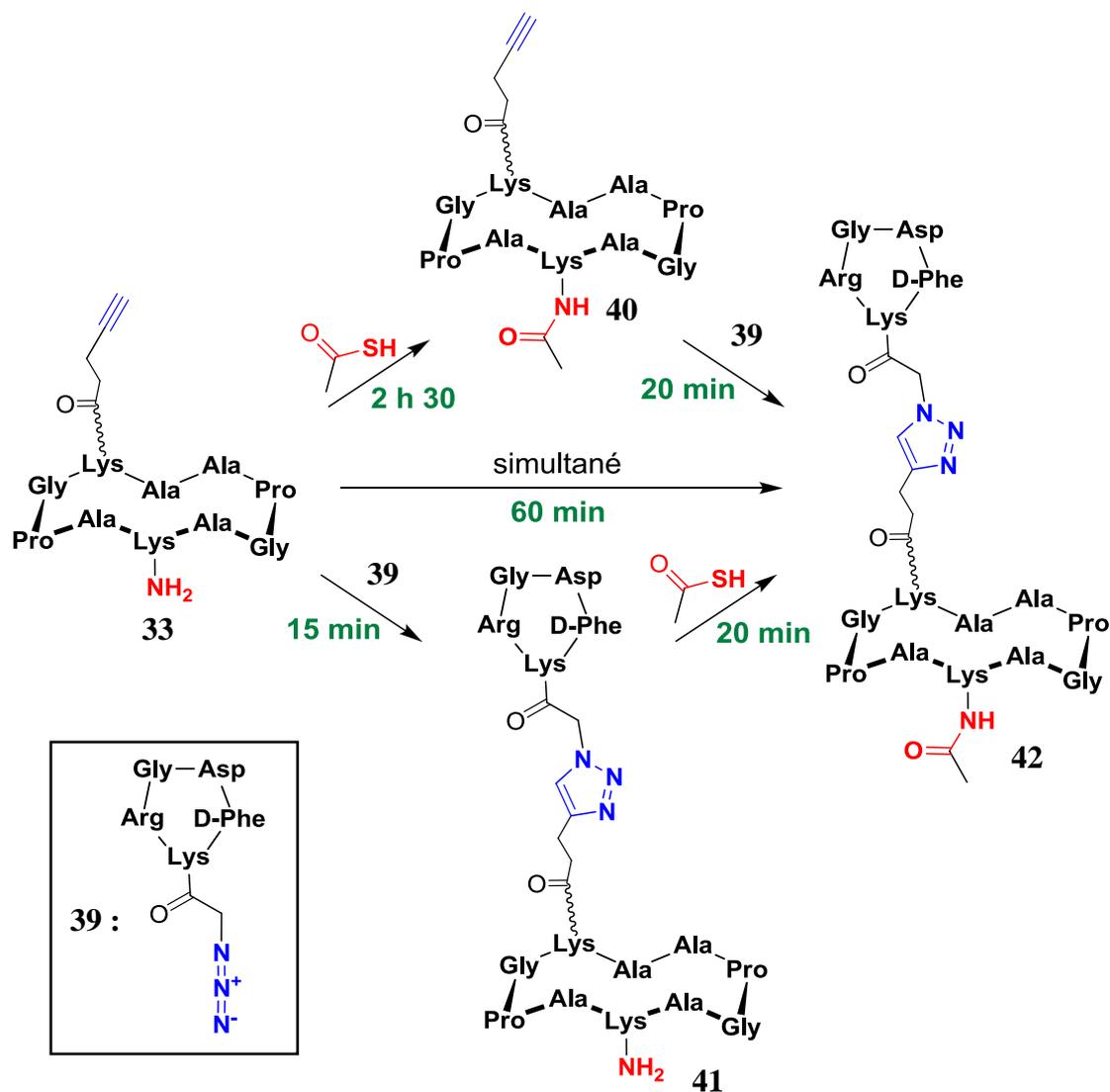


Figure 78 - TAA et CuAAC ; Séquentiel et simultané

1,1 éq. acide thioacétique, 1,1 éq. **39**, Cu(I)OAc (1,1 éq.), THPTA (5 éq.)

DMF/Tampon Carbonate (30:70, 10 mM, pH 9,2), 37°C

## 3.3.1 Réactions séquentielles CuAAC puis TAA

Lors de la première réaction, la CuAAC, nous obtenons le composé **41** en 15 min (cf. Figure 79).

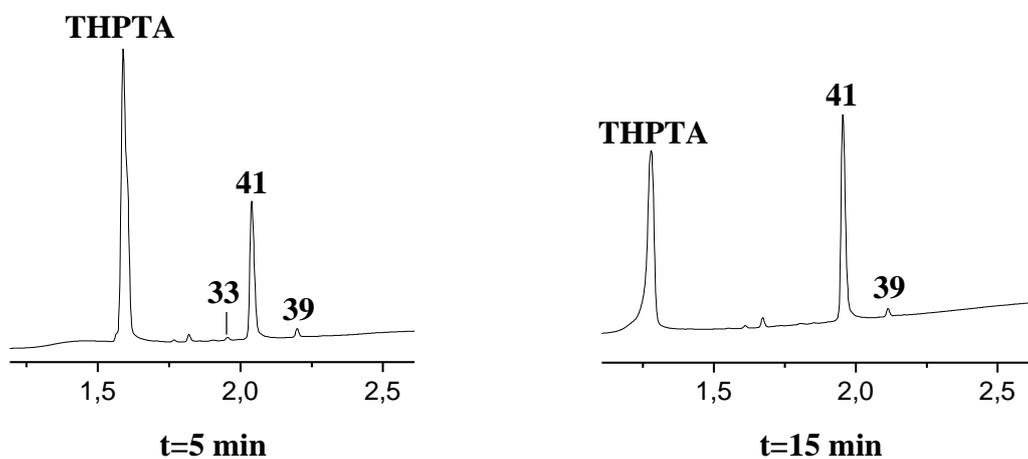


Figure 79 - Chromatogrammes HPLC de la conversion de **33** en **41** (CuAAC)

L'ajout de l'acide thioacétique dans le mélange réactionnel déclenche l'apparition du composé **42**. Au bout de 20 minutes, la réaction est terminée (cf. Figure 80).

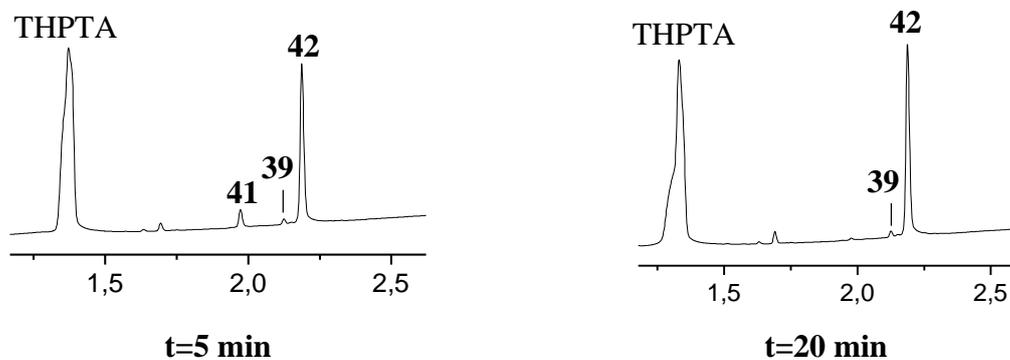


Figure 80 - Chromatogrammes HPLC de la conversion de **41** en **42** (TAA)

### 3.3.2 Réactions séquentielles TAA puis CuAAC

Dans le cas où la TAA est réalisée lors de la première étape, le composé **40** n'est obtenu qu'en 2h30 de réaction à partir du composé **33** (cf. Figure 81).

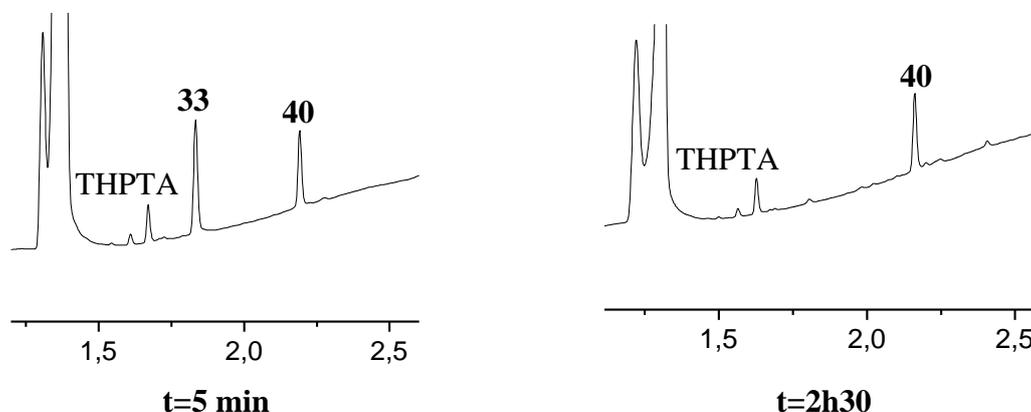


Figure 81 - Chromatogrammes HPLC de la conversion de **33** en **40** (TAA)

Lors de l'ajout du composé azoture **39**, la réaction CuAAC donne le produit **42** en 20 minutes (cf. Figure 82).

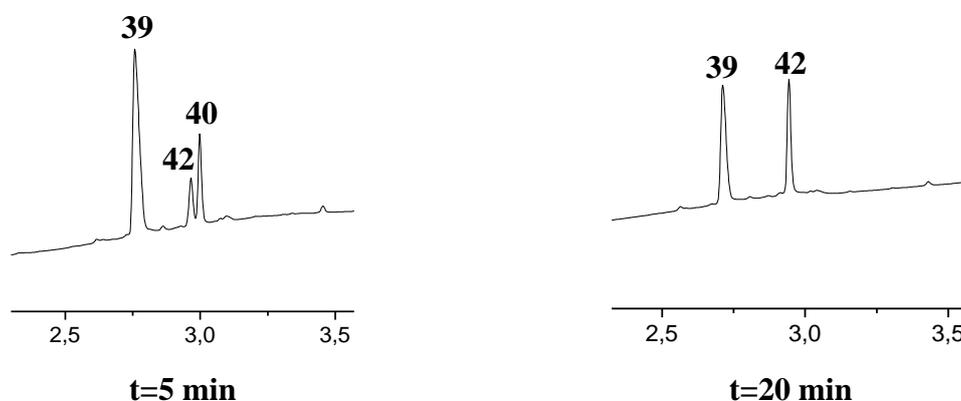


Figure 82 - Chromatogrammes HPLC de la conversion de **40** en **42** (CuAAC)

Alors que dans le cas précédent la TAA permettait l'acétylation de l'amine en 20 minutes, dans ce cas le produit est obtenu en 2h30. Nous avons supposé que la présence de la fonction alcyne sur le composé **33** diminuait la vitesse de réaction lors de la TAA. En effet, le Cu(I) peut former un complexe acétylure-cuivre et donc ne plus être disponible pour l'activation du thioacide. Le complexe acétylure-cuivre a pu être observé par spectrométrie de masse (cf. Figure 83).

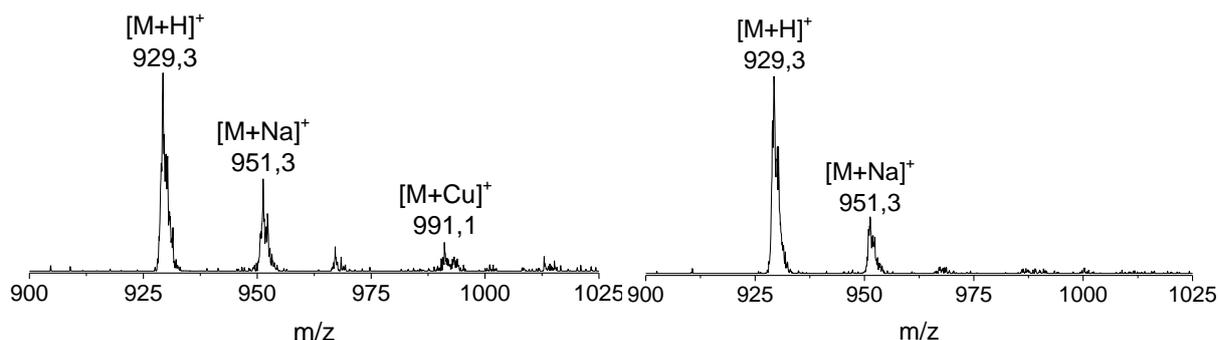


Figure 83 – Spectres de masse du composé **33** avec et sans cuivre

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons également fait réagir de l'acide thioacétique sur un châssis cyclodécapeptidique dont la Lys(Alcyne) a été remplacée par une alanine (cf. Figure 84).

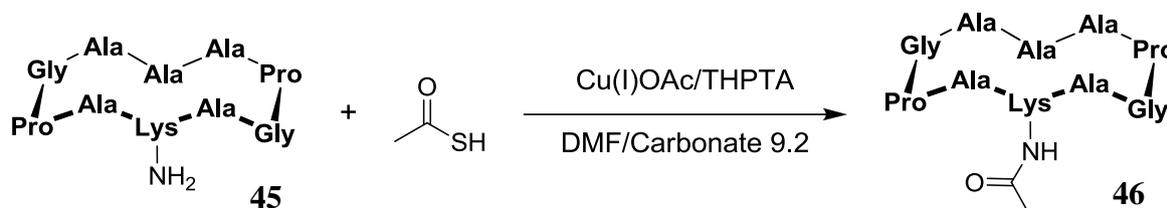


Figure 84 - TAA sur un châssis sans fonction alcyne

Le produit acétylé a alors été obtenu en 15 minutes (cf. Figure 85), confirmant que la présence d'alcyne sur le composé de départ engendre une diminution de la vitesse de réaction de la TAA.

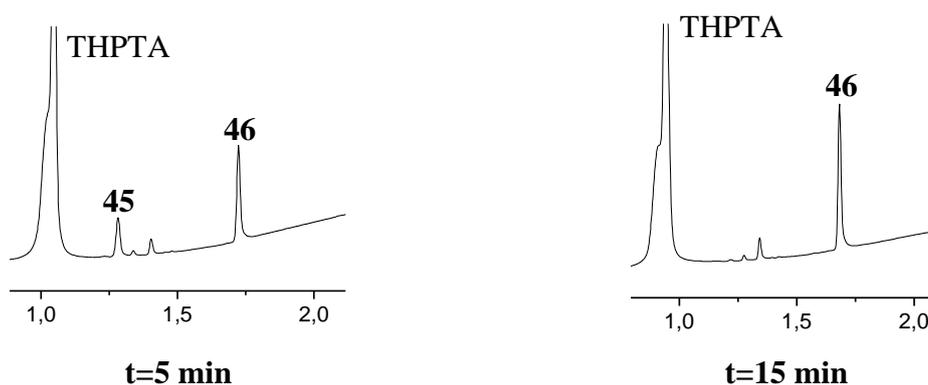


Figure 85 - Chromatogrammes HPLC de la conversion de **45** en **46**

### 3.3.3 Réactions CuAAC/TAA simultanément

Lorsque les réactifs azoture et thioacide sont ajoutés en même temps au châssis, les deux réactions se déroulent simultanément et le produit final est obtenu en 60 minutes. On peut remarquer que la TAA est ici également plus lente que la CuAAC, puisque le produit de réaction TAA **40** est très minoritaire (cf. Figure 86).

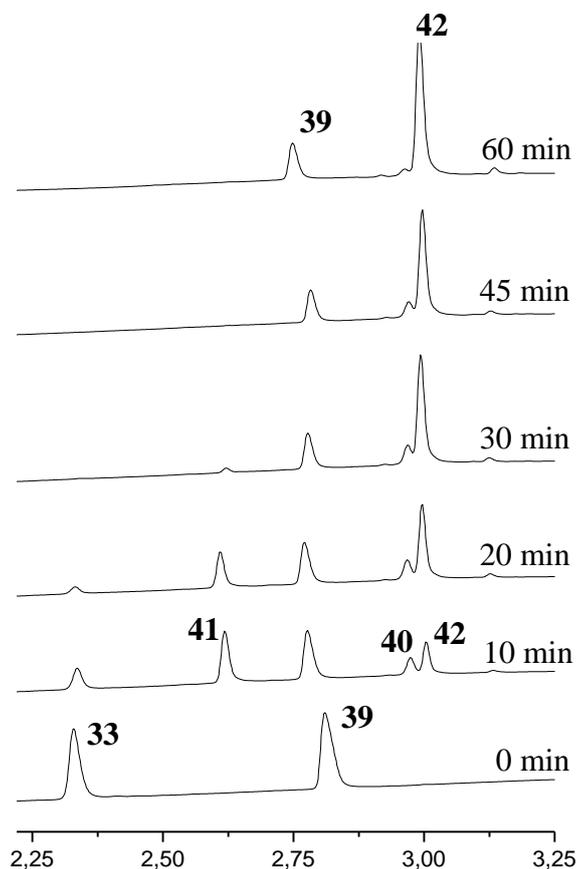


Figure 86 - Chromatogrammes HPLC de la CuAAC et TAA en « one-pot »

## 4 Couplage de composés d'intérêt biologique

Nous avons ensuite décidé d'appliquer cette méthode à la synthèse de composés d'intérêt biologique, à savoir des châssis fonctionnalisés par 4 motifs RGD sur la face supérieure et différents composés sur la face inférieure (cf. Figure 87).

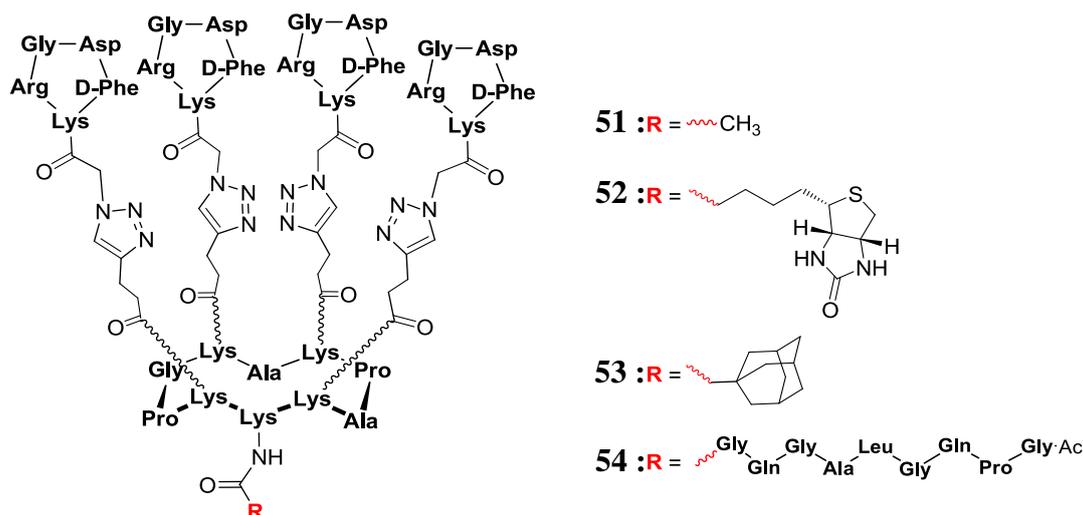


Figure 87 – Composés d'intérêt biologiques

La biotine et l'adamantane peuvent être utilisés comme motifs d'ancrage sur une surface, grâce aux interactions biotine/streptavidine ou adamantane/cyclodextrine.

Dans un autre contexte, une séquence peptidique sensible à des protéases peut être utilisée pour délivrer une substance au niveau du microenvironnement tumoral (cf. paragraphe 3.2.9). Nous avons ainsi introduit un peptide sensible à une protéase MMP sécrétée par les cellules tumorales.

Nous avons donc dans un premier temps synthétisé les thioacides correspondants. La synthèse de thioacides est similaire à la synthèse d'ester activés, et les thioacides sont stables plusieurs mois à 4°C. L'acide carboxylique est mis en présence d'un agent de couplage, dans ce cas l'HATU, puis un excès d'hydrogénosulfure de sodium est ajouté. Le thioacide correspondant est obtenu pur après extraction et lavages en milieu acide.

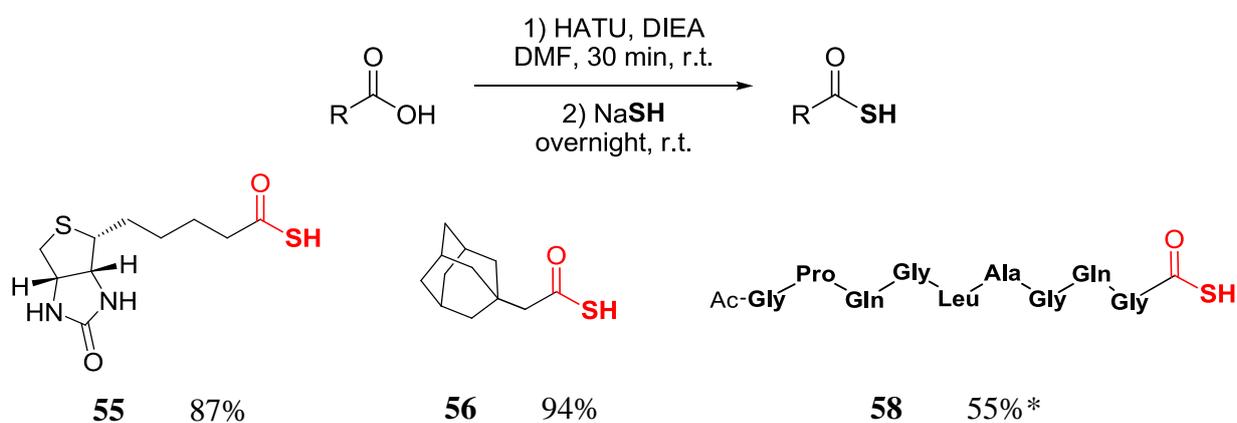


Figure 88 - Synthèse de thioacides

\*Pour le peptide MMP, le rendement de 55% est sur 2 étapes (Synthèse du thioacide puis déprotection).

Concernant la séquence peptidique, nous avons tout d'abord synthétisé le peptide protégé, que nous avons transformé en thioacide et immédiatement déprotégé, sans purification intermédiaire. Après purification, nous avons obtenu le thioacide correspondant avec une pureté excellente et avec un rendement de 55% sur deux étapes.

Nous avons ensuite synthétisé les composés **51-54** en utilisant la voie combinant la CuAAC et la TAA simultanément, puis en utilisant une voie classique, c'est-à-dire dans un premier temps la CuAAC suivie d'une purification, puis dans un second temps un couplage de l'ester activé correspondant, suivi d'une seconde étape de purification (cf. Figure 89).

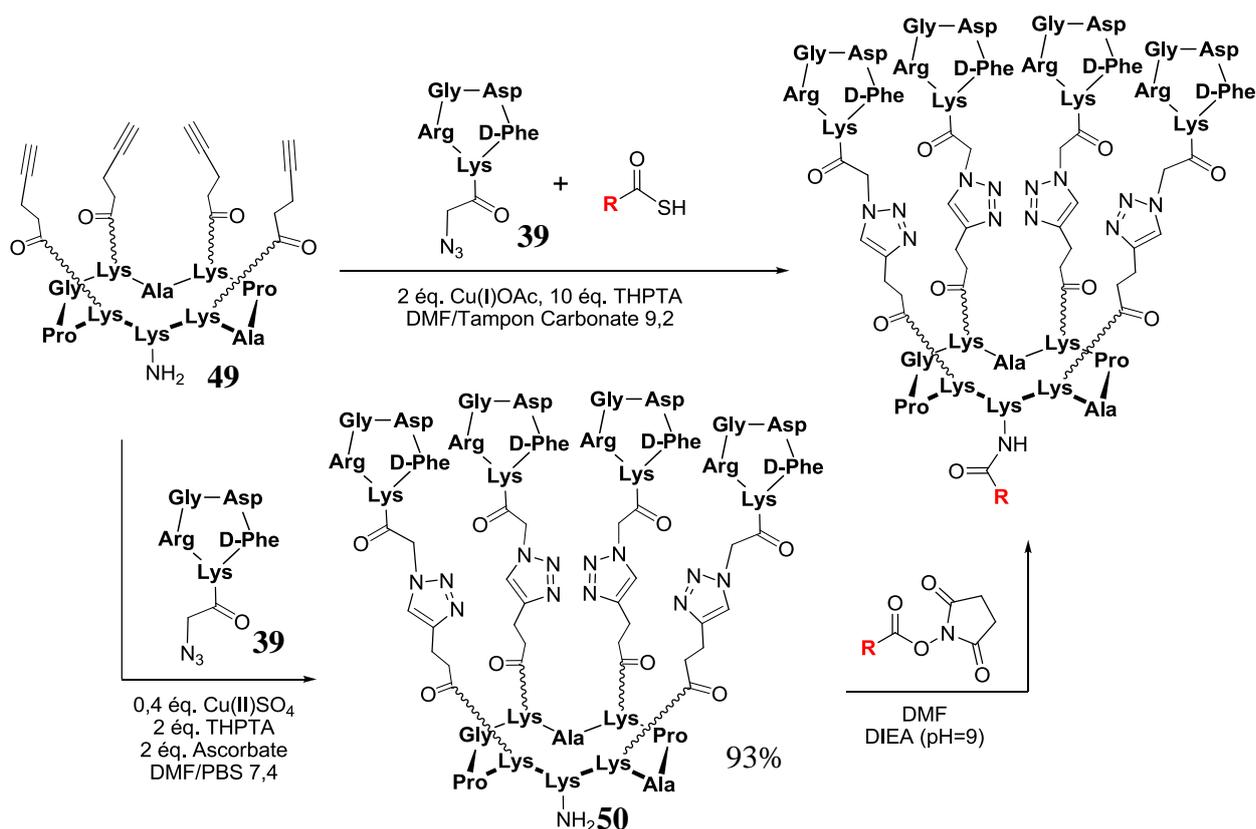


Figure 89 - Voies de synthèse utilisées pour l'accès aux composés **51-54**

Les rendements obtenus pour les deux méthodes sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7 - Rendements obtenus pour chaque méthode utilisée

Composé	« One-pot »	CuAAC ; Couplage NHS (rendement sur 2 étapes)
<b>52</b>	87%	76%
<b>53</b>	68%	55%
<b>54</b>	93%	ND*

\*Dans le cas de la séquence peptidique MMP, l'ester activé correspondant n'a pas pu être préparé.

Bien que la première étape de CuAAC donne le composé **50** avec un excellent rendement de 93% après purification, les couplages d'ester activés forment les composés finaux **52** et **53** avec des rendements respectifs de 81% et 59%. La stratégie « one-pot » permet donc d'obtenir des rendements plus élevés, mais procure également un gain de temps puisqu'une seule étape de purification est nécessaire.

## 5 Conclusion

Nous avons dans un premier temps adapté les conditions de la réaction TAA pour la rendre compatible avec la CuAAC. Nous avons ensuite étudié le déroulement des deux réactions de façon séquentielle, et de façon simultanée. Nous avons observé un ordre préférentiel des réactions : la réaction CuAAC est favorisée dans nos conditions.

Nous avons ensuite appliqué cette voie de synthèse à plusieurs composés d'intérêt biologique, ce qui nous a permis d'obtenir les biomolécules correspondantes avec des rendements meilleurs et avec un gain de temps par rapport à une voie de synthèse classique.

Enfin, nous avons prouvé la compatibilité des deux réactions en « one-pot » : nous n'avons jamais observé de réactions entre les thioacides et les azotures. En effet, il a été décrit une réactivité des azotures possédant en alpha un groupement électroattracteur envers les thioacides<sup>[273]</sup> Lors de nos réactions, aucune trace de RGD azoture ayant réagi avec l'acide thioacétique n'a été observée.

À ce jour, cette méthode de synthèse peut être appliquée à la combinaison de biomolécules quand les méthodes classiques sont peu efficaces comme par exemple la synthèse de lipopeptides.

## **CHAPITRE III**

### **SYNTHESE ET FONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES POUR LA THERAPIE**

## 1 Introduction

Dans ce chapitre, je développerai plus particulièrement la conception de NPs pouvant être utilisées pour la thérapie. Comme expliqué dans le préambule de ce manuscrit, il n'existe qu'une poignée de formulations de principes actifs à base de nanoparticules disponibles sur le marché. Ruenraroengsak *et al.* ont rapporté dans un article <sup>[11]</sup> leur opinion sur les caractéristiques indispensables qu'une nanoparticule doit combiner pour être efficace :

- Le taux de chargement en principe actif doit être élevé
- Le principe actif doit être contenu dans la nanoparticule jusqu'à son arrivée à la cible
- Le principe actif doit être relargué au niveau de la cible sur une période de temps approprié

La plupart des systèmes nanoparticulaires décrits dans la littérature ne possèdent pas ces 3 caractéristiques. Comme détaillé précédemment, à cause de problème de stabilité, il est impossible de charger la nanoparticule avec de grandes quantités de principes actifs. De même, une partie des principes actifs sont souvent relargués dès l'injection, un phénomène appelé le « burst release ».

Le laboratoire du Prof. Patrick Couvreur, à l'institut Galien de l'université Paris Sud (Paris XI) développe depuis environ 10 ans des nanoparticules de squalène qui permettent d'éviter ces inconvénients.

## 2 Antécédents

### 2.1 Nanoparticules « squalénées »

Ces nanoparticules sont basées sur une matrice de squalène, un triterpène de formule brute  $C_{30}H_{50}$ .

Les terpènes  $(C_5H_8)_n$  sont une classe d'hydrocarbures composés de plusieurs unités d'isoprène.

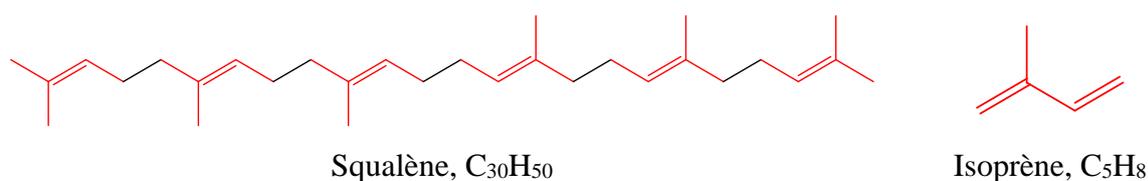


Figure 90 - Squalène et isoprène

L'approche consiste à coupler chimiquement une molécule biologiquement active à la molécule de squalène. Ce procédé est appelé « squalénisation ». Il est ainsi possible d'obtenir des nanoparticules contenant jusqu'à 50% de principe actif en masse par rapport au poids total de la nanoparticule, valeur bien supérieure aux taux de chargements obtenus avec d'autres types de nanoparticules (5% - 10%).<sup>[274]</sup>

Pour cela, le squalène (SQ) doit tout d'abord être transformé en acide squalénique (cf. Figure 98), puis le principe actif est lié par un lien amide ou ester.

Une fois le conjugué SQ-principe actif synthétisé, les nanoparticules sont obtenues par autoassemblage en milieu aqueux :

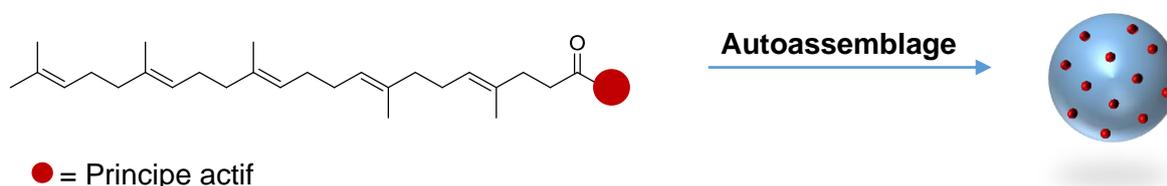


Figure 91 - Formation des nanoparticules de squalène

Bien que l'on obtienne dans la plupart des cas une molécule amphiphile, c'est-à-dire un principe actif hydrophile conjugué au squalène hydrophobe, il est également possible de former des nanoparticules en utilisant un principe actif hydrophobe. C'est le cas notamment du paclitaxel.<sup>[275]</sup>

Après administration, les nanoparticules vont ensuite se désassembler, dans la circulation sanguine et/ou au niveau de la tumeur, libérant le conjugué SQ-principe actif, qui possèdera une pharmacodynamique encore différente du principe actif libre, puisque modifié par une chaîne d'acide gras.

Le lien ester ou amide s'hydrolysera lentement après injection de la nanoparticule, évitant ainsi le phénomène de « burst release » du principe actif. Cette hydrolyse nécessite l'action d'enzymes et est donc dépendante de l'accessibilité du lien amide. Il est également possible de modifier la longueur du terpène afin de moduler la vitesse de dégradation de la nanoparticule.<sup>[276]</sup>

La squalénisation est un processus appliqué à de nombreux composés dont la gemcitabine, la doxorubicine, le paclitaxel, le sunitinib, le cisplatine, les oligonucléotides. Nous détaillerons ici

l'application avec la gemcitabine, puisque c'est le principe actif que nous avons sélectionné pour la formulation de nos nanoparticules.

Couvreur *et al.* ont démontré l'efficacité améliorée d'un traitement à base de nanoparticules de gemcitabine par rapport à un traitement classique avec de la gemcitabine libre, dans le cas d'une tumeur orthotopique du pancréas chez la souris.

La gemcitabine est un antimétabolite pyrimidique, qui inhibe la synthèse des acides nucléiques et entraîne la mort cellulaire. Elle possède un temps de demi-vie faible (1,6 h) et est rapidement transformée par déamination enzymatique en un composé inactif (cf. Figure 92). Cet inconvénient impose d'injecter de grandes doses de gemcitabine lors des traitements.

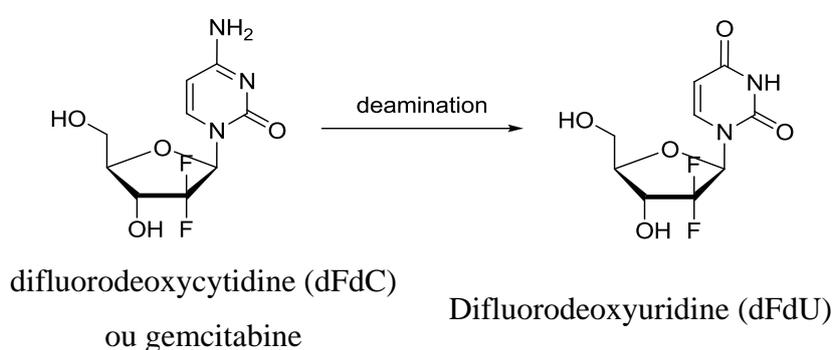


Figure 92 - Déamination enzymatique de la gemcitabine

En fonctionnalisant la gemcitabine avec une fonction squalène sur l'amine, Couvreur *et al.* ont obtenu un bioconjugué capable de s'autoassembler en nanoparticules.

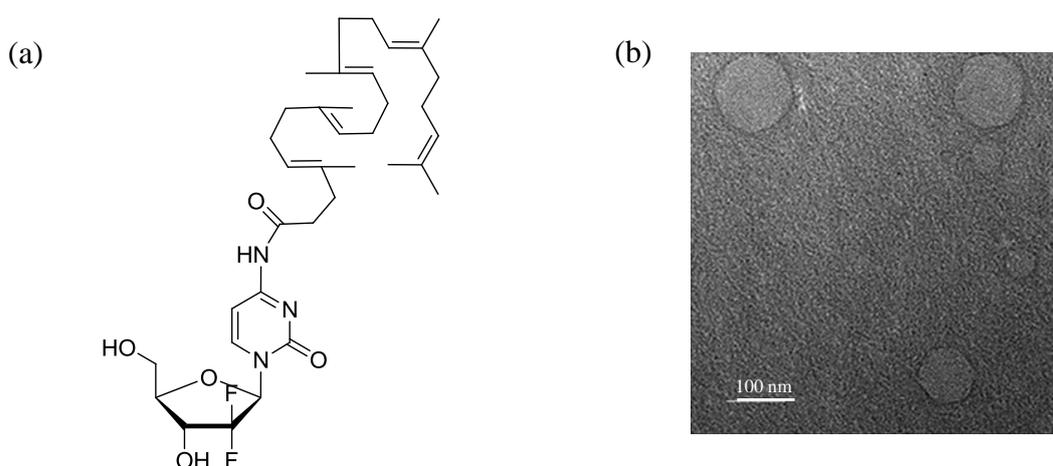


Figure 93 - (a) SQGemcitabine (SqdFdC, ou SQGem)

(b) Image TEM de NPs de SQGem.<sup>[277]</sup>

Le traitement à base de NPs de SQGem possède plusieurs avantages par rapport au traitement avec la gemcitabine libre. Après injection par intraveineuse, les NPs s'accumulent dans les organes du système réticulo-endothélial, ce qui peut lui conférer une efficacité accrue lors des cancers métastatiques. Puis les NPs relarguent lentement la SQGem, qui possède un temps de demi-vie 4 fois supérieur à celui de la gemcitabine libre. De par sa lipophilie augmentée, la SQGem peut plus facilement passer les membranes des cellules. Cette formulation est également efficace dans le cas de cancers résistants à la gemcitabine.<sup>[278-279]</sup>

Ainsi, chez la souris portant une tumeur orthotopique du pancréas (cellules Panc1), Couvreur *et al.* ont pu observer une inhibition de la croissance tumorale, ainsi qu'une amélioration de la survie. Parmi les souris traitées par les NPs de SQGem, 60% ont survécu après trois mois, et la moitié d'entre elles ne présentaient aucune trace de tumeur à l'autopsie.<sup>[277]</sup>

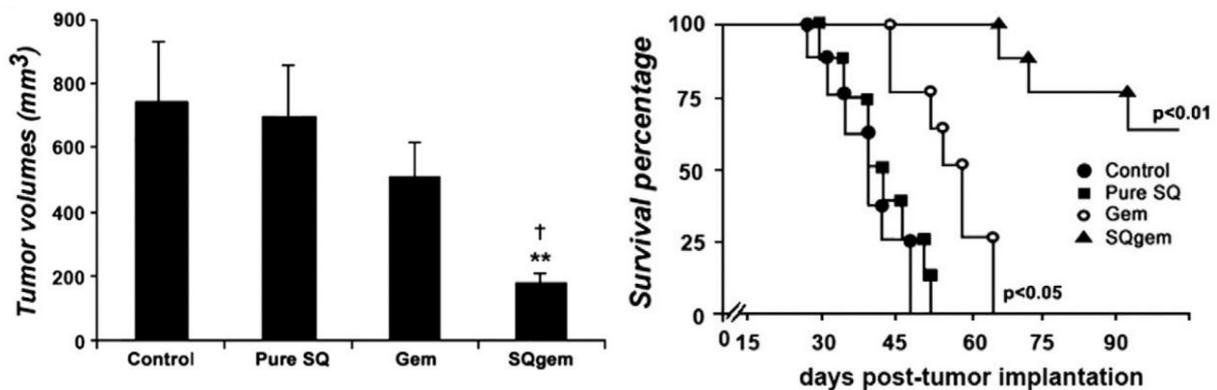


Figure 94 - Efficacité du traitement de NPs SQGem par rapport à la gemcitabine seule<sup>[277]</sup>

Une étude publiée récemment décrit l'utilisation de NPs de gemcitabine monophosphate, donnant de meilleurs résultats qu'avec les NPs de gemcitabine.<sup>[279]</sup>

Une seconde étude décrit l'utilisation des NPs de gemcitabine, décorées à leur surface par des peptides de séquence CKAAKN, ciblant les vaisseaux tumoraux dans les cancers des îlots pancréatiques. Ces NPs possèdent un mécanisme d'action différent, puisqu'elles agissent sur les cellules cancéreuses mais également sur les vaisseaux tumoraux. Elles contribuent à la normalisation des vaisseaux, améliorant ainsi la distribution des agents anti-cancéreux.<sup>[109]</sup>

Au vu de ces résultats très prometteurs, nous avons donc décidé d'ajouter à ces nanoparticules un élément de ciblage, afin d'améliorer le ciblage du microenvironnement tumoral et l'efficacité globale du traitement.

## 2.2 Lipopeptides

Au laboratoire, nous avons pu obtenir des vecteurs portant des motifs RGD, modifiés par des chaînes d'acides gras. Dans un cas, il a été greffé deux chaînes d'acide palmitique pour ensuite insérer le vecteur dans une bicouche lipidique, afin d'étudier le comportement de cellules surexprimant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .<sup>[221]</sup>

Dans un second cas, un cluster de motifs RGD modifié par un acide palmitique inséré à la surface d'un liposome a permis la transfection de gènes dans des cellules HeLa.<sup>[222]</sup>

## 3 Conception et Synthèse

En se basant sur les avancées des travaux du laboratoire du Prof. Couvreur et notre expérience avec les lipopeptides, nous avons décidé de synthétiser des nanoparticules de squalène fonctionnalisées par des clusters de ligands RGD, afin d'apporter un élément de ciblage.

Nous avons donc dans un premier temps fonctionnalisé le cluster de ligands RGD par un dérivé squalénique.

Un châssis portant 4 fonctions oxyamine et une fonction amine, toutes protégées, a été synthétisé par SPPS, suivi d'une cyclisation en milieu dilué.

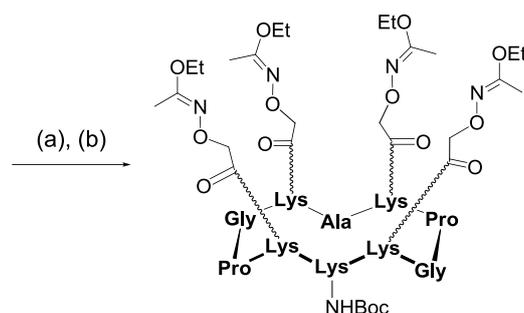
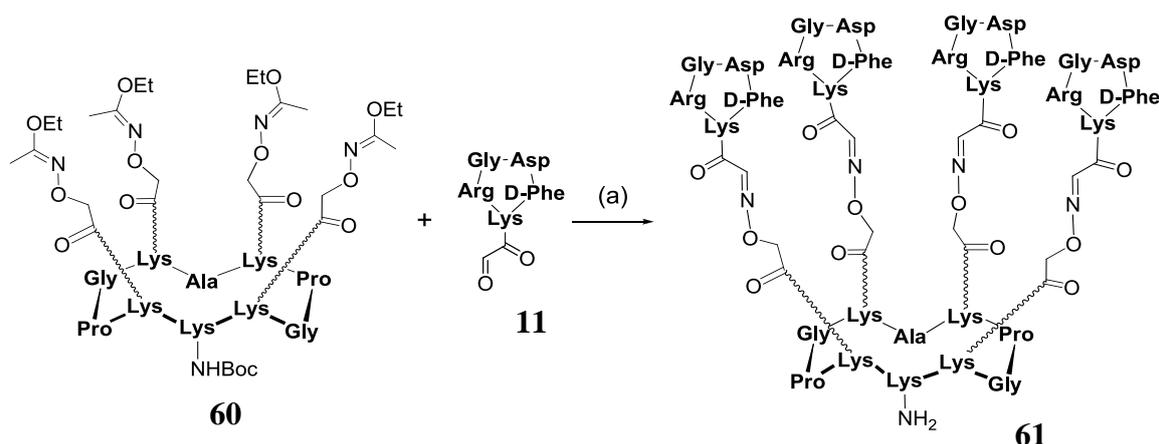
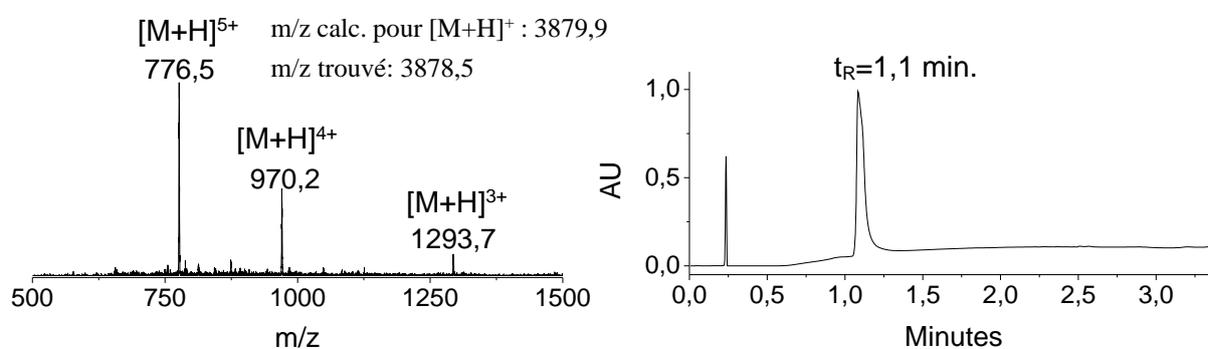


Figure 95 - Synthèse du châssis **60**

(a) SPPS ; (b) 1,3 éq. PyBOP, DIEA, DMF

L'assemblage avec les motifs RGD **11** et la déprotection de l'amine boc se fait en une réaction « one-pot », et donne le composé **61** avec un rendement de 33% après purification par RP-HPLC.

Figure 96 - Synthèse du composé **61**(a) TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (70:15:15)Figure 97 - Spectre de masse et chromatogramme du composé **61**

La synthèse de l'acide squalénique a été adaptée au sein du laboratoire du Prof. Couvreur suite aux travaux de Ceruti *et al.*<sup>[280]</sup> En partant du squalène disponible commercialement, un traitement à la N-Bromosuccinimide suivi d'un traitement basique permet d'obtenir sélectivement l'époxyde terminal. D'autres techniques d'époxydation donnent des mélanges de produits, par manque de sélectivité. Une coupure oxydante à l'acide periodique donne l'aldéhyde correspondant. Finalement, l'oxydation de Jones au chrome fournit l'acide squalénique (cf. Figure 98).<sup>[274]</sup>

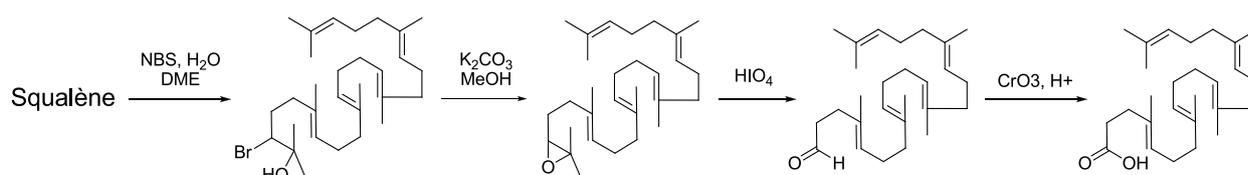


Figure 98 - Synthèse de l'acide squalénique

À Grenoble, nous avons ensuite formé l'ester activé de l'acide squalénique par l'ajout de NHS/DCC. L'ester activé **62** est obtenu après 16h de réaction et purifié par lavage de la phase organique avec un rendement de 57%.

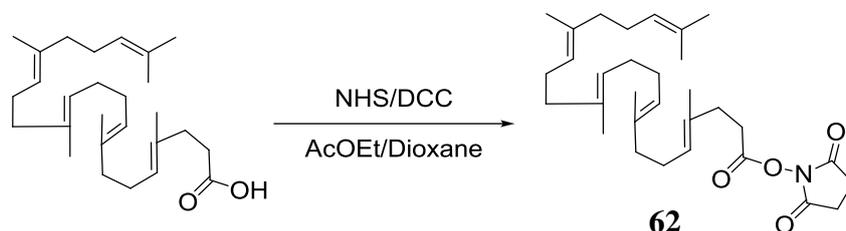


Figure 99 - Activation de l'acide squalénique

Le dérivé squalénique est ensuite couplé au composé **61** dans le DMF en milieu basique pendant une heure à température ambiante.

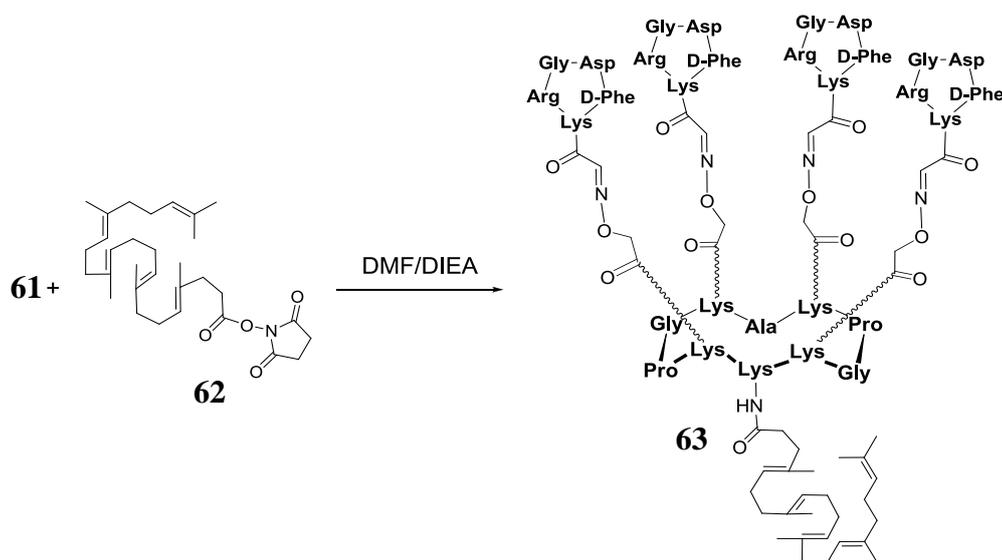


Figure 100 - Synthèse du composé **63**

Le composé obtenu **63** est ensuite purifié par RP-HPLC préparative. Plusieurs essais avec différents appareils et différentes colonnes ont donné des rendements de purification très faibles (entre 15% et 25%). Ceci est dû aux interactions entre le groupement squalène du composé et les chaînes C18 des colonnes HPLC. Des essais avec d'autres types de colonnes (C5, cyano, exclusion de taille) n'ont pas été concluants.

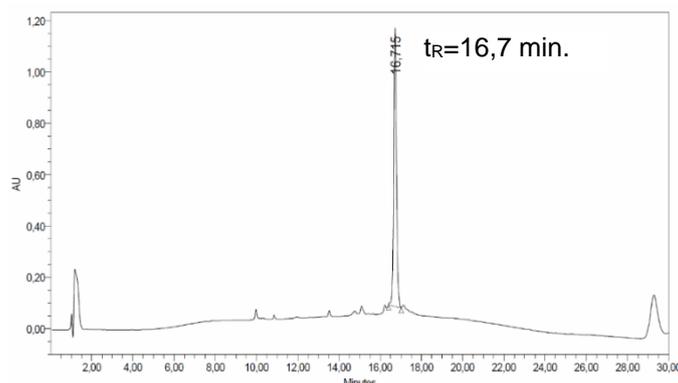


Figure 101 - Chromatogramme HPLC du composé **63** après purification

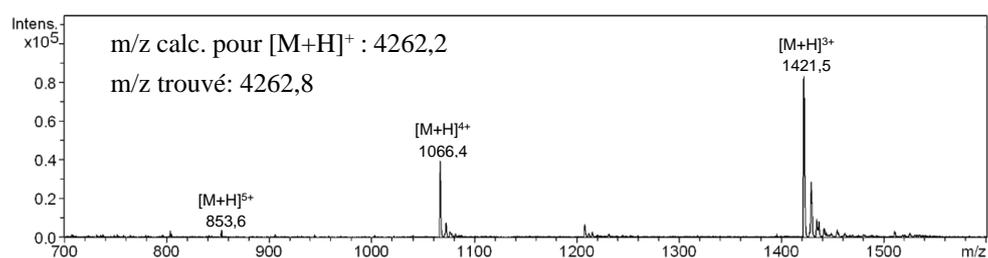


Figure 102 - Spectre de masse du composé **63** après purification

Après plusieurs essais préliminaires de formulation de nanoparticules avec le composé **63** et du Sq-Paclitaxel par l'équipe du Prof. Couvreur, aucune nanoparticule n'a été observée. Nous en avons conclu que le composé **63** n'était pas assez hydrophobe et empêchait la formation de NP. Nous avons donc proposé de synthétiser une version plus hydrophobe, possédant deux dérivés squaléniques.

Pour cela nous avons préparé un châssis possédant cette fois-ci deux fonctions amines protégées :

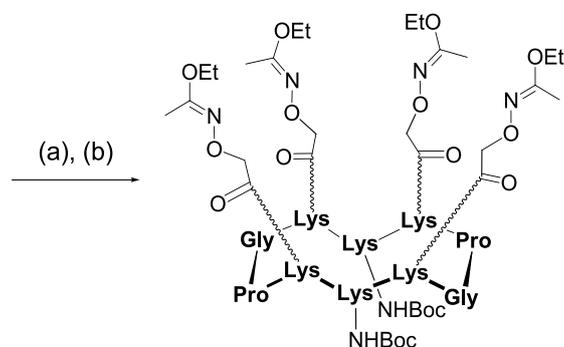


Figure 103 - Synthèse du châssis **65**

(a) SPPS ; (b) 1,3 éq. PyBOP, DIEA, DMF

L'assemblage des motifs RGD a été effectué en utilisant la même méthode que précédemment :

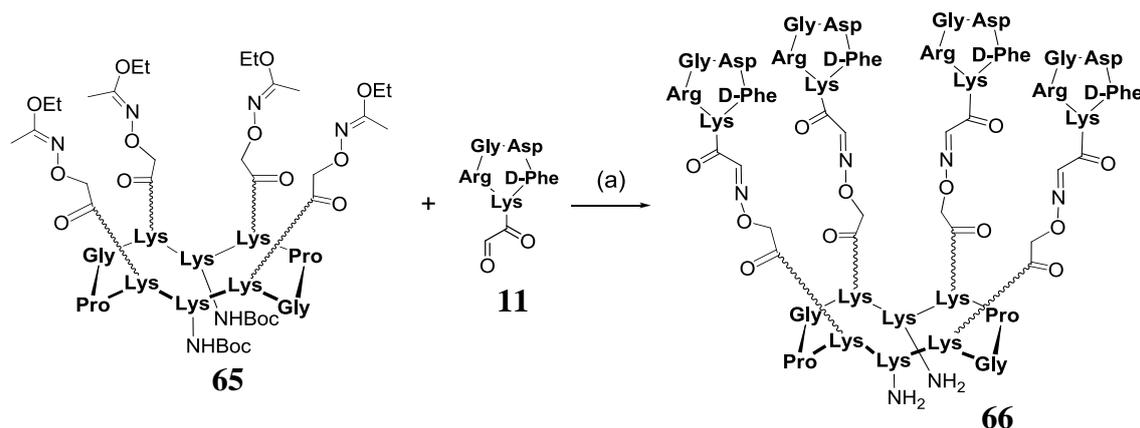


Figure 104 - Synthèse du composé 66

(a) TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (70:15:15)

Le composé 66 est obtenu avec un rendement de 31%

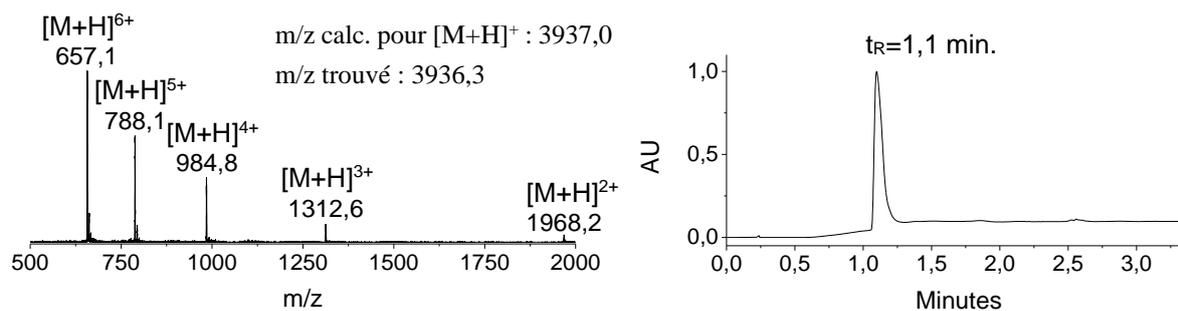


Figure 105 - Spectre de masse et chromatogramme du composé 66

Le composé 66 est ensuite fonctionnalisé par l'ester activé squalénique dans le DMF en milieu basique :

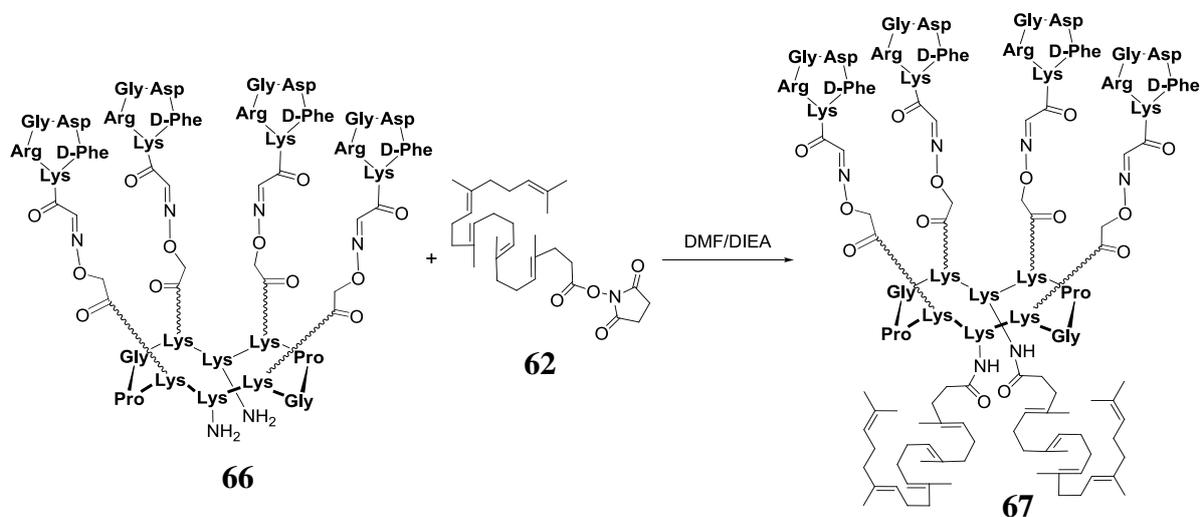


Figure 106 - Synthèse du composé 67

Cette réaction a été suivie par RP-UHPLC et par spectrométrie de masse. Le composé final **67** n'a pas été purifié par RP-HPLC. Pour éliminer les excès d'ester activé squalénique **62** et de produit de départ **66** n'ayant pas réagi, nous avons tiré parti des différentes solubilités de ces trois composés.

L'ester activé squalénique étant soluble dans l'éther diéthylique, il est éliminé par précipitation à l'éther suivie d'une centrifugation. On obtient alors un précipité contenant le produit de départ et le produit final.

Le produit de départ **66** n'ayant pas réagi est solubilisé dans une solution H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA (44,5:44,5:1). Après quelques secondes aux ultrasons, le mélange est centrifugé et le surnageant est enlevé. Le culot obtenu est lavé trois fois avec cette même solution, puis lyophilisé afin d'enlever l'eau et l'acétonitrile restants. Ces lavages à l'éther, eau et acétonitrile permettent également d'enlever le DMF et la DIEA.

Le composé **67** est alors obtenu avec un rendement de 56% et une pureté satisfaisante de 80%, déterminée par intégration des pics UHPLC. Le composé obtenu est soluble uniquement dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O (90:10). Il a été caractérisé par UHPLC et par spectrométrie de masse.

Sur la Figure 107, le pic annoté « BHT » correspond à l'hydroxytoluène butylé, un antioxydant présent dans le THF utilisé pour l'analyse UHPLC du composé **67**.

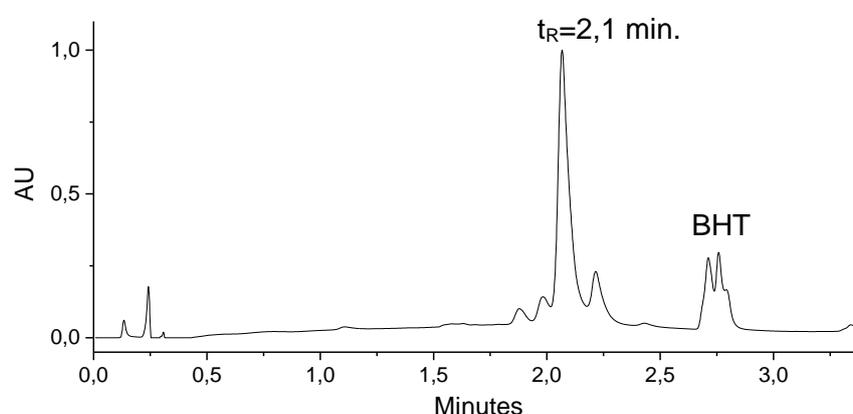


Figure 107 - Chromatogramme UPLC du composé **67**

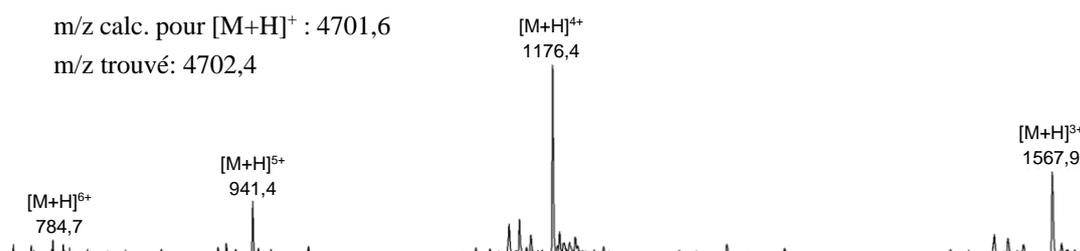


Figure 108 - Spectre de masse du composé **67**

Au vu de ces résultats, il aurait été plus judicieux d'insérer la chaîne d'acide gras en utilisant une lysine modifiée pendant la SPPS, comme nous l'avons fait lors des deux projets précédents évoqués en paragraphe 2.2. Il n'était cependant pas possible d'utiliser cette stratégie pour l'acide squalénique, puisque par opposition à l'acide palmitique, il n'est pas disponible commercialement, et non disponible en quantité suffisante.

Nous avons également tenté d'appliquer la réaction TAA (cf. Chapitre II) à la synthèse du composé **67**, afin d'améliorer la conversion. Après avoir préparé le dérivé thioacide squalénique, nous avons procédé au couplage en utilisant comme catalyseur le  $\text{Cu(II)SO}_4$ . Le produit **67** a pu être observé par UHPLC, mais puisqu'il nous est impossible de le purifier par HPLC, il n'est pas possible de séparer le  $\text{CuS}$  formé du produit final.

À la suite de cette synthèse, j'ai été amené à réaliser la suite du projet dans le laboratoire du Prof. Couvreur, notamment la formulation de NPs avec différentes quantités de clusters de motifs RGD, et leur évaluation biologique.

## 4 Formulation et évaluation biologique des NP

### 4.1 Formulation

Nous avons finalement décidé d'utiliser la gemcitabine plutôt que le paclitaxel comme principe actif, pour des raisons de facilité de synthèse et de formulation. Le procédé utilisé pour la formulation des nanoparticules est décrit dans le schéma ci-dessous.

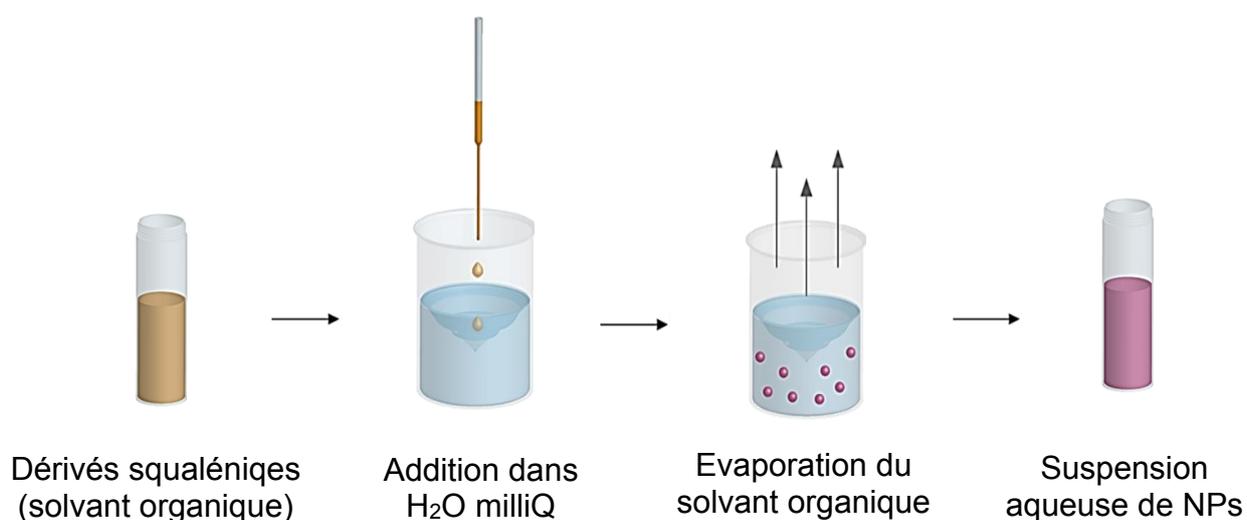


Figure 109 - Formulation de NPs de squalène

Les dérivés squaléniques sont dissouts dans un solvant organique (0,1 mL - 1 mL), idéalement de l'éthanol, et sont ensuite ajoutés goutte-à-goutte dans de l'eau ultrapure (1 mL). Après addition, le solvant organique est évaporé sous pression réduite. On obtient alors une suspension aqueuse de nanoparticules de squalène.

La formulation des nanoparticules est un procédé très sensible aux paramètres suivants :

- La concentration en dérivés squaléniques dans la solution aqueuse finale (entre 1 mg/mL et 4 mg/mL)
- La vitesse de rotation et la température du bain lors de l'évaporation (entre 25 rpm et 125 rpm ; t.a. - chauffage)
- La vitesse d'addition (entre 1 goutte par seconde et 1 goutte toutes les 4 secondes)

Nous avons préparé des nanoparticules de squalène-gemcitabine (SQGem) comportant entre 0,25% et 0,5% molaire de composé **67**.

Nous nous sommes donc basés sur la formulation utilisée habituellement pour les NPs de SQGem, puis nous y avons apporté quelques modifications :

*Tableau 8 - Paramètres utilisés pour la formulation de NPs de SQGem*

<b>Formulation SQGem</b>	<b>Formulation SQGem + composé 67</b>
<b>Dissolution de 4 mg de SQGem dans 500 µL d'EtOH</b>	Dissolution de 1 mg de SQGem dans 450 µL d'EtOH
	Dissolution de <b>67</b> dans 50 µL d'une solution THF/H <sub>2</sub> O (90:10)
	Mélange des deux phases organiques
<b>Addition dans 1 mL d'H<sub>2</sub>O milliQ, 1 goutte toutes les 4 secondes</b>	Addition dans 1 mL d'H <sub>2</sub> O milliQ 1 goutte toutes les 5 secondes
<b>Evaporation du solvant à t.a. rotation à 100 rpm</b>	Evaporation du solvant à 25°C rotation à 125 rpm

Étonnamment, lorsque nous ajoutons les 450 µL d'EtOH contenant la SQGem aux 50 µL de solution THF/H<sub>2</sub>O (90:10) contenant le composé **67**, nous n'observons pas de précipitation du peptide modifié, alors que celui-ci n'est pas soluble dans l'éthanol. Après ajout de la phase organique dans l'eau milliQ, on peut observer un léger effet Tyndall, c'est-à-dire une coloration rouge lorsqu'on regarde la solution à la lumière. L'effet Tyndall témoigne de la présence de

nanoparticules dans la solution. Après évaporation du solvant organique, le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta des NPs sont mesurés.

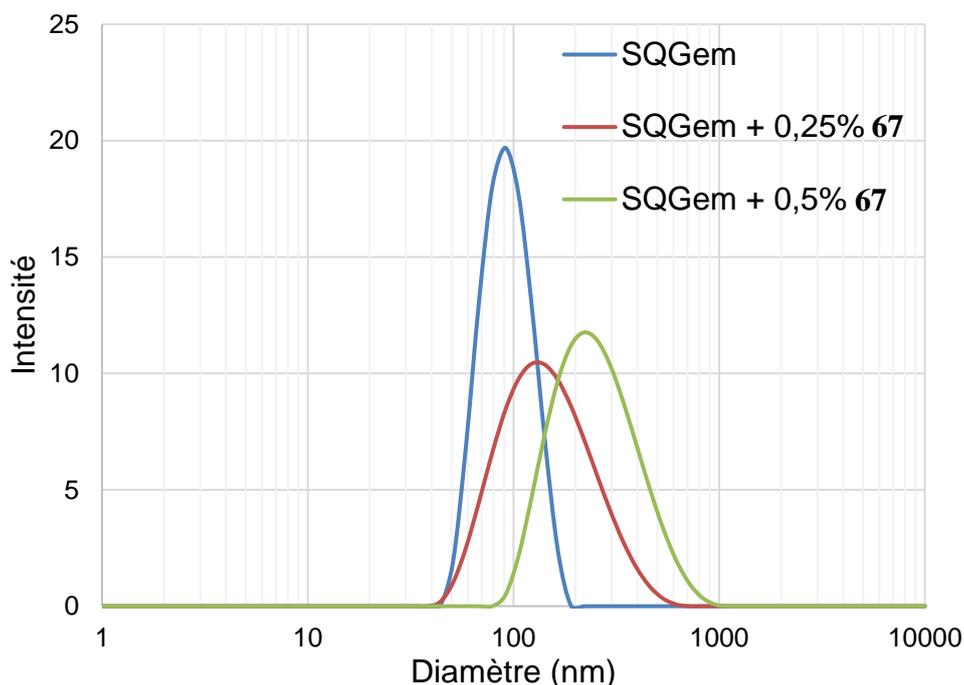


Figure 110 - Distribution de taille des NPs de SQGem, avec et sans clusters de ligands RGD

Les nanoparticules comportant les clusters de motifs RGD ont un diamètre et un indice de polydispersité (PdI, pour « polydispersity index ») plus importants que les NPs de gemcitabine seule. Le diamètre augmente avec la quantité de peptide incorporée dans la formulation.

Tableau 9 - Résumé des nanoparticules obtenues

	<b>PdI</b>	<b>Diamètre</b>	<b>Potentiel <math>\zeta</math></b>
<b>SQGem</b>	0,08	88 nm	-10 mV
<b>SQGem + 0,25% 67</b>	0,25	136 nm	N.D.
<b>SQGem + 0,5% 67</b>	0,2	235 nm	-16 mV

Les nanoparticules obtenues possèdent la même stabilité que les NPs de SQGemcitabine seule, c'est-à-dire 24 heures à température ambiante et plusieurs semaines à 37°C.

Il est important de préciser qu'il est assez difficile d'obtenir des lots similaires de NPs lors de la formulation avec notre vecteur peptidique. De nombreux paramètres peuvent entrer en jeu et les nanoparticules ont souvent des diamètres et des PdI variables. Nous espérons que plus nous

réduirons le taux de peptide, plus la formulation se rapprochera de celle de la NP de SQGem de base, et que nous pourrions ainsi obtenir des formulations plus reproductibles avec des Pdl plus faibles.

Une fois les nanoparticules obtenues, j'ai procédé à leur évaluation sur des cellules HUVEC, cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain. L'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a été vérifiée par cytométrie de flux.

Pour réaliser les tests, nous avons déposé les cellules (5 000 par puits) sur des plaques 96 puits. Après 24 heures à 37°C, 9 différentes concentrations de nanoparticules diluées dans du milieu de culture sont ajoutées aux cellules. Les plaques sont incubées pendant 72 heures à 37°C, puis le milieu est enlevé. Une solution de MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) est ajoutée à chaque puits et la plaque est incubée 1 heure à 37°C. Le MTT permet de déterminer indirectement la quantité de cellules vivantes : cette poudre jaune soluble dans l'eau est réduite en formazan, sous l'effet d'enzymes des cellules vivantes. Le formazan prend la forme de cristaux violets insolubles dans l'eau.

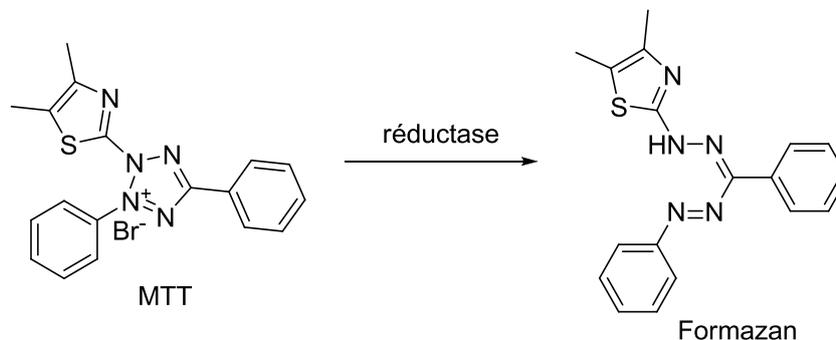


Figure 111 - Réduction du MTT en formazan

Le surnageant est enlevé et les cristaux violets de formazan sont dissouts dans le DMSO. Une lecture de la plaque à 570 nm donne ensuite les taux de viabilité des cellules en fonction des concentrations en nanoparticules.

Les expériences sont effectuées en sextuple, deux fois, et ont été refaites avec un second lot de nanoparticules. Les valeurs obtenues sont rapportées dans la Figure 112.

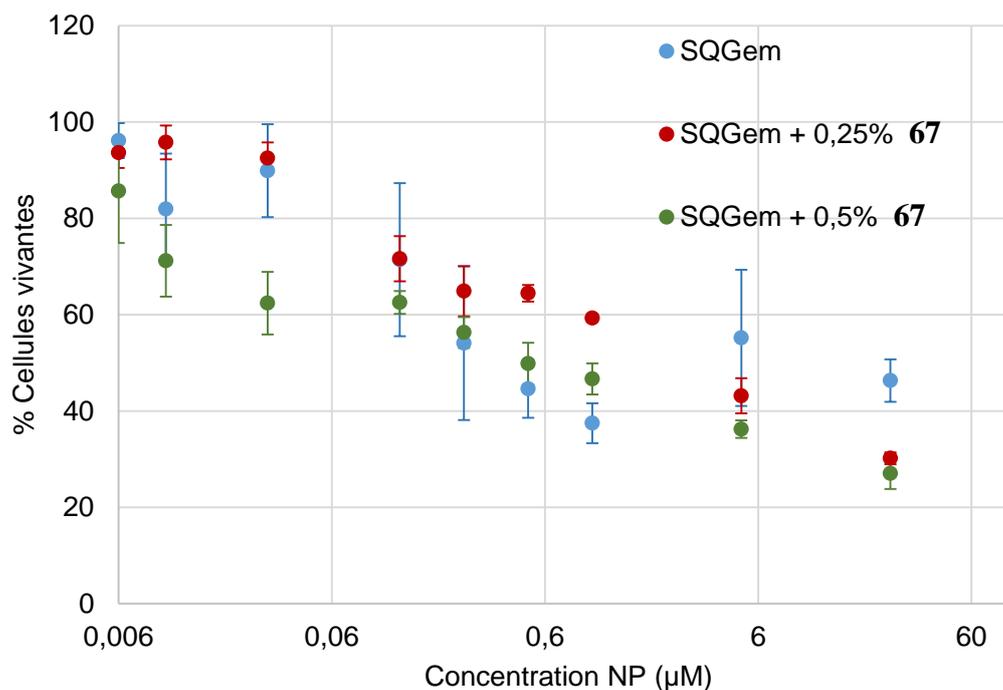


Figure 112 - Évaluation des nanoparticules par test MTT sur cellules HUVEC

Les nanoparticules de SQGem seule (en bleu) n'atteignent étrangement pas 0% de cellules vivantes, même avec des concentrations en nanoparticules élevées (10 µM).

Les nanoparticules de SQGem contenant les clusters de RGD, à hauteur de 0,25% ou 0,5%, présentent une tendance linéaire et il est donc impossible de déterminer une valeur d'IC<sub>50</sub>. Ce comportement pourrait provenir d'un décollement des cellules à forte concentration en composé RGD.

Nous avons donc décidé de diminuer les quantités de clusters de RGD pour constituer nos NPs et de les tester sur des cellules HEK β<sub>3</sub>, dont nous connaissons mieux le comportement. Ces tests sont actuellement en cours dans le laboratoire du Prof. Couvreur à Paris.

## 5 Conclusion et perspectives

Les nanoparticules de SQGem se sont montrées bien plus efficaces que la gemcitabine seule dans le traitement du cancer pancréatique chez la souris, même dans les cancers résistants à la gemcitabine. Afin d'encore augmenter l'internalisation cellulaire des nanoparticules de SQGem, nous nous sommes proposé d'apporter un élément de ciblage à ces NP.

Nous avons synthétisé deux dérivés squaléniques de notre vecteur peptidique portant 4 motifs RGD. Alors que nous n'avons pas pu insérer le premier dans les nanoparticules de SQGem, le second composé, plus hydrophobe a pu être utilisé pour former des NPs avec deux différents taux de fonctionnalisation.

Lors de l'évaluation de ces NPs, nous avons observé un comportement différent de celui des NPs de SQGem. En effet, les valeurs expérimentales obtenues ne correspondent pas aux valeurs attendues (courbe sigmoïde). Nous avons émis l'hypothèse d'une trop forte concentration en motifs RGD, qui causerait le décollement des cellules et fausserait les résultats de l'évaluation cytotoxique.

D'autres formulations seront testées prochainement sur d'autres lignées cellulaires.

## **CHAPITRE IV**

# **SYNTHESE ET FONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES POUR L'IMAGERIE**

## 1 Introduction

L'objectif de ce dernier chapitre est de concevoir des macromolécules constituées de polymères décorés par les châssis peptidiques comportant 4 motifs RGD et des fluorophores proches infrarouge, pour obtenir de nouveaux systèmes plus performants pour l'imagerie de l'angiogénèse *in vivo*, en ciblant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Pour ce projet, nous avons collaboré avec le Dr A. Favier et le Dr. M.T. Charreyre de l'IMP (INSA Lyon) et du laboratoire Joliot Curie (ENS Lyon). Cette collaboration se divise en deux étapes :

La première étape est d'utiliser les polymères linéaires développés par leur laboratoire comme châssis, pour les fonctionnaliser par plusieurs copies de clusters de motifs RGD d'une part, pour le ciblage des intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , et par plusieurs copies d'un fluorophore proche infrarouge d'autre part, afin d'être visualisable par imagerie optique après injection.

La seconde étape est de synthétiser des nanoparticules décorées par des clusters RGD à leur surface et concentrant des fluorophores dans leur cœur hydrophobe.

Après l'évaluation biologique de ces deux familles de conjugués polymères-RGD possédant différentes architectures, il sera possible de déterminer les composés les plus efficaces, et d'en extraire les conditions requises pour présenter les clusters de RGD de façon optimale.

## 2 Antécédents

### 2.1 Conjugués polymériques

#### 2.1.1 Polymérisation RAFT

Le copolymère utilisé pour ce projet est obtenu par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne, appelée polymérisation RAFT (« reversible addition fragmentation chain transfer »).<sup>[281]</sup> Cette technique possède de nombreux avantages puisqu'elle conduit à des chaînes de même composition et de même taille (masse molaire contrôlée et distribution des masses molaires étroite avec une dispersion inférieure à 1,2). Il est également possible de contrôler de la fonctionnalisation des extrémités de chaîne.

#### 2.1.2 Copolymères NAM/NAS

Les copolymères développés par Favier *et al.* comportent des groupements N-acryloylmorpholine (NAM), apportant un caractère hydrophile au polymère, et des

groupements N-acryloxysuccinimide (NAS), utilisés pour greffer des composés sur la chaîne polymérique par substitution nucléophile (cf. Figure 113).<sup>[282]</sup>

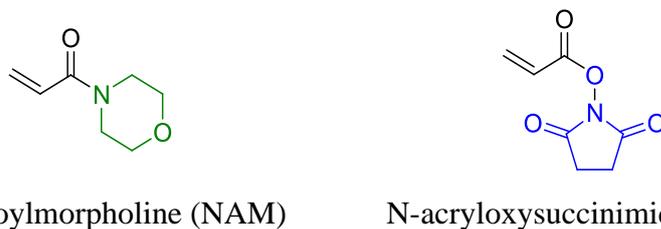


Figure 113 - Monomères utilisés pour la synthèse de copolymères Poly(NAM-stat-NAS)

L'agent de transfert de chaîne utilisé en polymérisation RAFT est en général un dithioester. Le *tert*-butyl dithiobenzoate (*t*BDB) a été déterminé par Favier *et al.* comme étant un agent de transfert de chaîne très efficace lors de la polymérisation de groupements NAM<sup>[283]</sup> mais aussi pour l'obtention de copolymères NAM/NAS.<sup>[282]</sup>

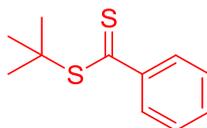


Figure 114 - *tert*-Butyl dithiobenzoate

L'utilisation d'un mélange de départ NAM/NAS 60:40 molaire, appelé mélange azéotropique, permet d'ajouter chaque monomère à la même vitesse, donnant ainsi des copolymères avec des fonctions NAS régulièrement espacées. Ils possèdent une dispersité faible inférieure à 1,2.

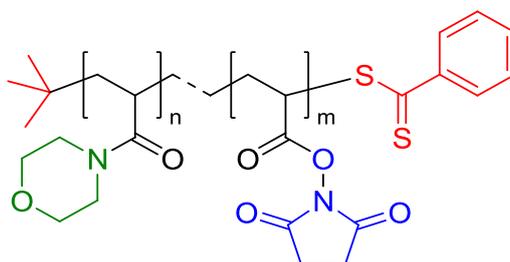


Figure 115 - Copolymère NAM/NAS

L'homopolymère Poly(NAM) non fonctionnalisé possède des propriétés similaires au PEG :

- très hydrophile
- neutre
- peu d'interactions électrostatiques ou hydrophobes
- soluble en milieu aqueux et dans les solvants organiques

Le polymère Poly(NAM-stat-NAS) utilisé ici possède une masse molaire moyenne en nombre  $M_n$  de 60 000 g.mol<sup>-1</sup> (dispersité = 1,11). Ces polymères auraient une longueur tout étendus d'environ 100 nm mais adoptent généralement une forme de pelote statistique plus ou moins expansée suivant leur fonctionnalisation latérale et terminale.

### 2.1.3 Applications en imagerie

Le laboratoire de Marie-Thérèse Charreyre décrit en 2013 des systèmes polymériques NAM/NAS linéaires combinant une biotine à leur extrémité et de 7 à 62 fluorophores (Lucifer Yellow) le long de la chaîne. Le choix de ce fluorophore anionique (présence de groupements sulfates) permet de favoriser les répulsions entre fluorophores et ainsi minimiser l'effet de « self-quenching ». La biotine peut être utilisée comme composé d'ancrage dans des systèmes streptavidine/biotine. Les conjugués copolymère-fluorophores ont une brillance entre 7 et 43 fois plus élevée que le fluorophore seul. [284]

Ce même laboratoire a également décrit la conjugaison du copolymère NAM/NAS avec des fluorophores (dérivés anthracènes, au nombre de 6) ou des agents photosensibilisateurs (dérivés dibromobenzène, au nombre de 4) le long de la chaîne pour l'imagerie et la thérapie photodynamique dans le cadre du traitement du cancer. Le polymère a permis dans ce cas d'augmenter la solubilité et l'efficacité des composés notamment en améliorant leur internalisation cellulaire. [285]

De même, la fonctionnalisation par un lipide à l'extrémité du polymère a permis d'améliorer l'internalisation cellulaire des conjugués d'une part, et leur insertion dans des liposomes d'autre part. [286]

Ces copolymères constituent donc des systèmes très bien contrôlés et versatiles, pouvant être utilisés pour des applications très variées. Le copolymère NAM/NAS apparaît donc comme un outil idéal pour des applications en imagerie et en thérapie anticancéreuse.

### 3 Conception et Synthèse

#### 3.1 Introduction

Comme nous l'avons précisé dans l'introduction (paragraphe 1), le premier objectif est de fonctionnaliser le copolymère NAM/NAS par plusieurs copies de clusters RGD et de fluorophores.

Concentrer plusieurs fluorophores sur un seul conjugué permet en général d'augmenter sa brillance, c'est-à-dire le produit du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique. Le coefficient d'extinction molaire est le rapport de l'absorbance sur la concentration à une longueur d'onde donnée. Ce paramètre augmente avec le nombre de fluorophores.

Le rendement quantique est défini comme le rapport entre les photons émis et ceux absorbés par la molécule. Ce paramètre est généralement diminué dans le composé final à cause du « self-quenching », phénomène induit par la proximité des fluorophores. Il est cependant possible de réduire le « self-quenching » en modulant la densité en fluorophores. De plus, le coefficient d'extinction molaire augmenté compense généralement la baisse du rendement quantique. Le conjugué avec plusieurs fluorophores possède une brillance plus élevée que le fluorophore seul lorsque le produit de ces deux paramètres est supérieur à celui du fluorophore seul.

#### 3.2 Polymères linéaires

Nous avons dans un premier temps fonctionnalisé les polymères linéaires par plusieurs copies de clusters RGD et de fluorophores (cf. Figure 116). Nous avons choisi la Cyanine 5.5 (Cy5.5), un fluorophore proche infrarouge, couramment utilisé pour l'imagerie chez le petit animal. En effet, aux longueurs d'ondes comprises entre 600 nm et 900 nm, l'autofluorescence des tissus (principalement l'hémoglobine, l'eau et la graisse) est minimale.

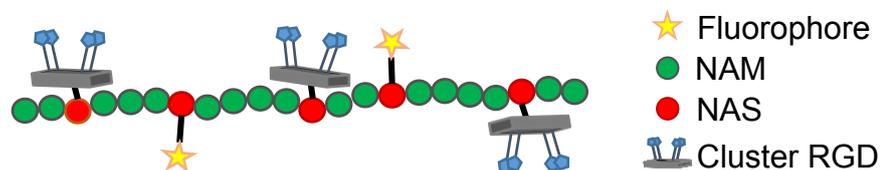


Figure 116 - Polymères linéaires ciblant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  pour l'imagerie

Les clusters de RGD et les Cy5.5 sont couplés sur les polymères par des réactions d'acylation en présence de groupements esters activés (NAS) présents au sein du polymère. Les synthèses de polymères et les couplages sur polymères ont été effectués au laboratoire Joliot Curie à Lyon par Damien Duret.

Nous avons tout d'abord procédé à la synthèse du composé **61** comme décrit dans le paragraphe 3 du chapitre III, en utilisant le lien oxime.

Dans un premier temps le composé **61** est couplé au copolymère NAM/NAS dans le DMF anhydre rendu basique par ajout de DIEA à 40°C pendant 5 jours (cf. Figure 117).

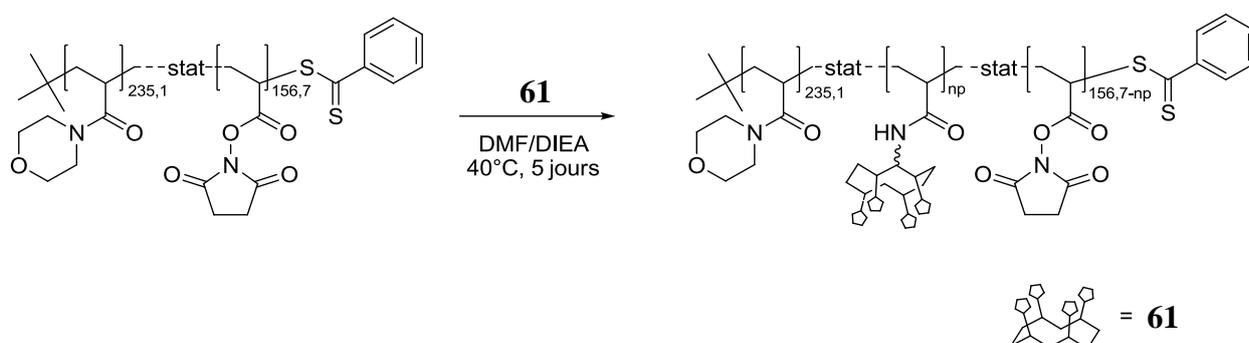


Figure 117 - Couplage du composé **61** sur le copolymère Poly(NAM-stat-NAS)

Le copolymère possède en moyenne 235,1 et 156,7 fonctions NAS. En faisant varier le nombre d'équivalents de peptide et de fluorophore, nous avons obtenu différents composés finaux avec des quantités croissantes de peptides (1,5 ; 4,2 et 5,9 clusters de motifs RGD en moyenne par chaîne). Dans un premier temps nous avons maintenu un nombre de peptides par chaîne inférieur à 10, afin d'éviter une gêne stérique trop importante. Les taux de fonctionnalisation des polymères ont été déterminés par RMN et sont résumés dans le Tableau 10. Le rendement de couplage a pu être augmenté suite à une modification des conditions de couplage.

Tableau 10 - Conditions de couplage

Équivalents de composé <b>61</b> introduits	Nombre moyen de composés <b>61</b> par chaîne	Rendement de couplage
4,4	1,5	34%
8,2	4,2	51%
9,5	5,9	62%

Pour obtenir les conjugués copolymère-RGD non fluorescents, on procède à un « capping », qui consiste à désactiver les fonctions NAS qui n'ont pas réagi pendant la synthèse. Pour cela, on met les polymères avec de la 4-(2-Aminoéthyl)morpholine (AEM) en excès pendant deux heures à température ambiante dans le DMF anhydre basique. Le choix de l'AEM permet d'obtenir un polymère hydrophile neutre, mais il est également possible d'obtenir un polymère chargé négativement en effectuant une simple hydrolyse (ions carboxylates), ou un polymère chargé positivement en utilisant des groupements possédant des amines primaires.

Pour obtenir les conjugués copolymère-RGD-Cy5.5, on fait réagir les Cy5.5 dans le DMF anhydre pendant deux heures à température ambiante, puis on procède ensuite au capping. Lors de l'étape de capping, le dithioester est réduit en thiol.

Les macromolécules obtenues sont ensuite purifiées par dialyse.

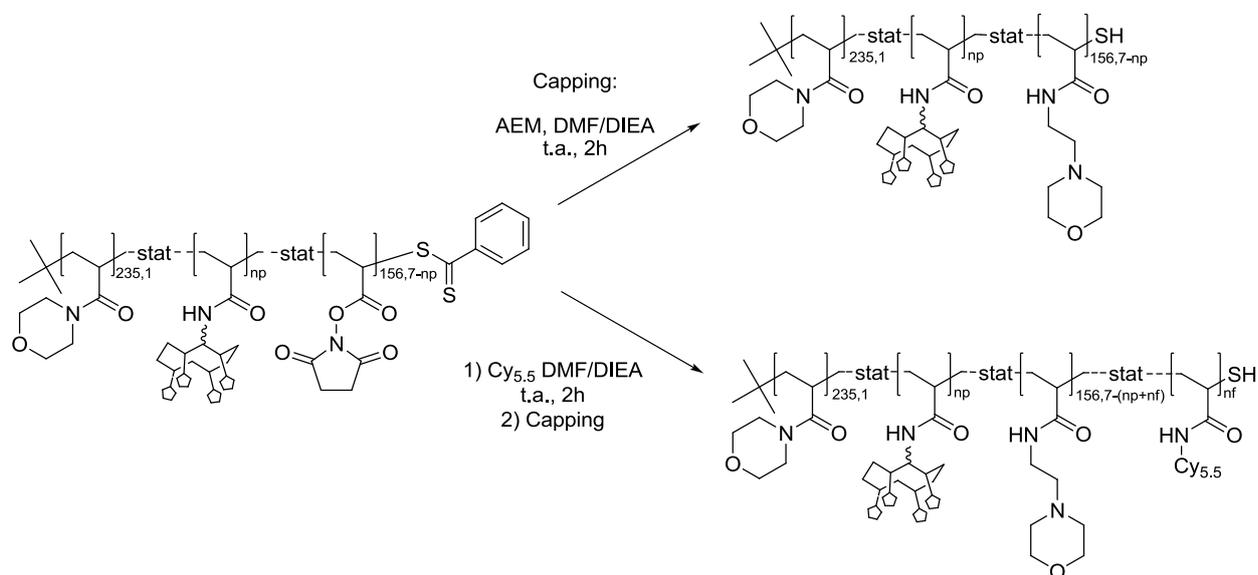


Figure 118 - Synthèse des conjugués copolymère-RGD-Cy5.5

Nous avons également synthétisé un polymère non fonctionnalisé et un polymère fonctionnalisé uniquement par des fluorophores (en moyenne 3,1 fluorophores par chaîne). Ces composés nous permettront de vérifier que le polymère et le fluorophore n'interagissent pas de façon non spécifique avec les cellules. Les composés synthétisés et leurs caractéristiques sont résumés dans le Tableau 11.

Tableau 11 - Résumé des macromolécules polymériques synthétisées

N°	Nombre moyen de RAFT 4 RGD / chaîne	Nombre moyen de Cy <sub>5.5</sub> / chaîne	M <sub>n</sub> (g.mol <sup>-1</sup> )
68	1,5	0	76 500
69	4,2	0	77 900
70	5,9	0	84 300
71	4,2	5	80 700
72	0	3,1	63 900
73	0	0	62 100

J'ai ensuite effectué à l'évaluation biologique de ces composés à l'Institut Albert Bonniot de Grenoble, selon le protocole décrit en chapitre 1 (paragraphe 3.1).

### 3.3 Nanoparticules polymériques

#### 3.3.1 Conception

Une seconde approche à l'utilisation de ces polymères fonctionnalisés par des clusters de ligands RGD est également étudiée. L'objectif est de synthétiser une chaîne polymérique amphiphile qui pourra s'auto-assembler lors de la polymérisation en milieu aqueux afin de former des nanoparticules. Cette technique est appelé PISA, pour auto-assemblage induit par polymérisation (« polymerization induced self assembly »).<sup>[287]</sup>

Pour cela nous avons choisi de greffer l'agent de transfert de chaîne directement au composé **61**, puis de procéder à la polymérisation donnant un polymère hydrophile. Puis, au fur et à mesure que les monomères hydrophobes sont ajoutés à la chaîne hydrophile, le composé initialement hydrophile devient amphiphile et peut alors s'auto-assembler pour former des nano-objets de diverses formes (cf. Figure 119). La forme de la nanostructure peut être contrôlée en modifiant la concentration en monomère hydrophobe.

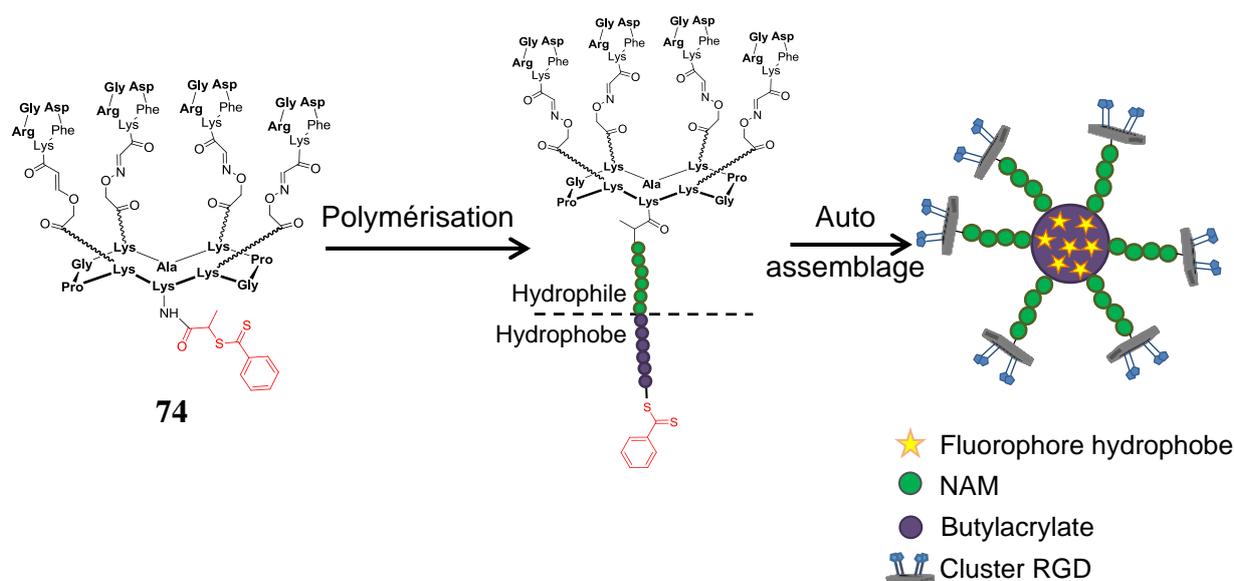


Figure 119 - Accès aux nanoparticules polymériques bi-fonctionnalisées

La partie hydrophile est constituée de N-acryloylmorpholine, et la partie hydrophobe de *n*-butylacrylate. Les fluorophores peuvent être incorporés dans le cœur de la nanoparticule par interactions hydrophobes, ou de façon covalente en utilisant des fluorophores hydrophobes polymérisables. De plus, si ces fluorophores sont multifonctionnels, il est alors possible de réticuler le cœur de la nanoparticule, de stabiliser la particule et ainsi d'éviter d'éventuels relargages de fluorophores après injection.

### 3.3.2 Avancement et perspectives

Le composé **74**, le cluster portant 4 motifs RGD fonctionnalisé par l'agent de transfert de chaîne a été synthétisé et isolé. Nous travaillons actuellement sur la polymérisation à partir de ce composé.

## 4 Résultats

L'évaluation des conjugués copolymère-RGD a été effectuée en réalisant 3 expériences différentes, en triple. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> présentées ci-dessous correspondent à une seule expérience, et la concentration exprimée correspond à la concentration en peptide. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur du calcul de l'IC<sub>50</sub> et sont obtenues avec le logiciel Origin 9.0 (cf. Figure 120).

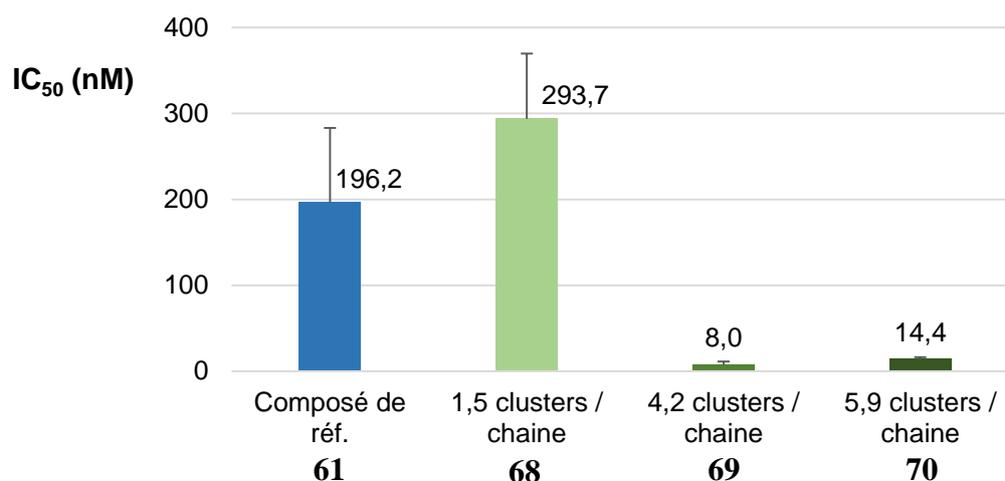


Figure 120 - Évaluation des conjugués Polymère - RGD

Le conjugué **68**, comportant 1,5 clusters de ligands RGD en moyenne par chaîne est 1,5 fois moins efficace (IC<sub>50</sub> autour de 300 nM) que le composé de référence **61** (IC<sub>50</sub> autour de 200 nM). Les conjugués **69** et **70**, portant respectivement 4,2 et 5,9 clusters de ligands RGD en moyenne par chaîne ont un IC<sub>50</sub> bien plus faible, autour de 10 nM. Le composé **69** (IC<sub>50</sub> : 8,0 nM) est cependant presque 2 fois plus efficace que le composé **70** (IC<sub>50</sub> : 14,4 nM). Le composé **69** possède une activité biologique environ 25 fois plus élevée que le composé de référence **61**. Dans le Tableau 12 sont présentés les IC<sub>50</sub> de chaque conjugué synthétisé. L'IC<sub>50</sub> lu correspond à l'IC<sub>50</sub> du conjugué polymère-RGD, et l'efficacité relative correspond à l'efficacité comparée au cluster de référence **61**. Enfin, l'efficacité relative ramenée au nombre de clusters correspond à l'efficacité de chaque cluster de RGD présent sur la chaîne polymérique.

Tableau 12 - IC<sub>50</sub> des différents composés polymère-RGD évalués

	<b>61</b>	<b>68</b>	<b>69</b>	<b>70</b>
<b>IC<sub>50</sub> lu (nM)</b>	196,2	440,6	8,0	14,4
<b>Efficacité relative*</b>	1	0,7	24,5	13,6
<b>Efficacité relative ramenée au nombre de cluster**</b>	1	0,44	5,9	2,3

\*L'efficacité relative correspond à l'IC<sub>50</sub> divisé par l'IC<sub>50</sub> du composé **61**

\*\*L'efficacité relative ramenée au nombre de clusters correspond à l'efficacité relative divisée par le nombre de clusters RGD présents sur le composé correspondant.

Ceci nous permet de constater que chaque cluster sur le composé **68** est environ 2 fois moins efficace que le cluster de référence. Ceci pourrait s'expliquer par le fait d'avoir un composé final de poids moléculaire plus important, ce qui diminue fortement son entropie.

Dans le cas du composé **69**, chaque cluster est environ 6 fois plus efficace que le composé de référence. Cette efficacité pourrait provenir de sa capacité à lier plusieurs intégrines par un effet chélate additionnel.<sup>[233]</sup>

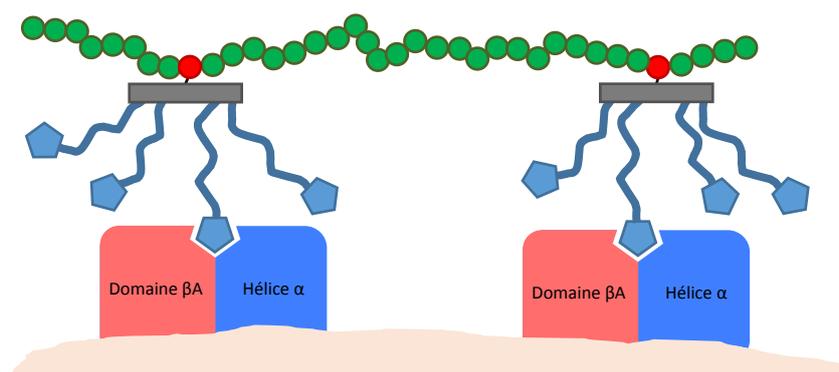


Figure 121 - Conjugué Polymère-RGD liant plusieurs intégrines par effet chélate

Enfin, concernant le composé **70**, chaque cluster n'est qu'environ 2 fois plus efficace que le composé de référence. Nous pouvons émettre l'hypothèse d'une trop proche proximité des unités RGD dans l'espace, certains motifs n'étant pas liés à des récepteurs.

Nous avons ensuite évalué le polymère portant 4,2 clusters de ligands RGD et 5 Cy5.5 en moyenne. Étonnamment, ce composé ne possède plus d'activité biologique.

Ces résultats pourraient provenir de la Cy5.5 utilisée, de nature hydrophobe, qui causerait un repliement du polymère par interactions hydrophobes, masquant ainsi le peptide et l'empêchant d'interagir avec les intégrines.

Nous avons également vérifié que le polymère non fonctionnalisé n'interagissait pas avec les cellules.

## 5 Conclusions et perspectives

Nous avons synthétisé et évalué différents conjugués polymériques ciblant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . L'un de ces composés possède une efficacité plus élevée que le composé de référence.

Néanmoins, l'ajout de fluorophores du type Cy5.5 semble empêcher l'activité biologique du conjugué. À ce jour, d'autres études biologiques sont en cours.

Tout comme la conception des NPs, il est vraisemblable qu'il faudra aussi optimiser nos composés en faisant varier le taux de peptides « RGD » sur les polymères et aussi s'assurer qu'ils soient accessibles aux récepteurs ciblés.

**CONCLUSIONS GENERALES  
ET PERSPECTIVES**

Ces travaux de thèse ont été consacrés au développement de nano-objets pour la thérapie et l'imagerie dans le cadre du traitement du cancer. Pour cela nous avons cherché à combiner notre expérience issue du développement d'un vecteur peptidique utilisé depuis plus de 10 ans au sein de l'équipe I2BM, avec celle de deux équipes de recherche, spécialisées dans les nanoparticules.

Le vecteur peptidique que nous utilisons est basé sur un châssis cyclodécapeptidique permettant de présenter des ligands de ciblage pouvant interagir avec des récepteurs surexprimés à la surface des cellules du microenvironnement tumoral. Il est constitué de 4 cyclopentapeptides c[-RGDfK-]. Cette séquence peptidique lie sélectivement et avec une forte affinité l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , protéine transmembranaire surexprimée à la surface de cellules du microenvironnement tumoral d'un grand nombre de cancers.

Ce vecteur peptidique a fait l'objet de nombreuses publications, dans différents domaines d'applications. Il a également donné lieu à une licence utilisée par une société grenobloise Fluoptics, qui exploite cette technologie pour guider le geste chirurgical.

Dans un premier temps nous avons cherché à améliorer l'affinité de ce vecteur peptidique en étudiant l'influence de la longueur du bras espaceur reliant le châssis peptidique aux motifs RGD. Après avoir synthétisé trois nouveaux composés, nous avons procédé à leur évaluation biologique sur des cellules surexprimant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Nous avons mesuré l'efficacité des molécules lors d'essais d'inhibition d'adhésion cellulaire, en les comparant à une protéine naturelle, la vitronectine. Le composé de référence possède la meilleure affinité, tandis que les composés portant des bras espaceurs plus longs ou plus courts exhibent tous des activités biologiques diminuées.

Cette évaluation a été complétée par une simulation de dynamique des molécules synthétisées. Cette étude nous a permis d'attribuer l'efficacité du composé de référence à la présentation spatiale des motifs RGD. Les ligands sont à la fois suffisamment espacés pour lier l'intégrine sans gêne stérique, et suffisamment proches pour bénéficier d'un effet de recombinaison statistique élevé.

Nous avons ensuite développé une voie de synthèse permettant l'accès à des biomolécules complexes de façon plus efficace et plus rapide que par une voie de synthèse classique. Cette approche combine deux réactions catalysées au cuivre en « one-pot », à savoir la CuAAC combinant un azoture et un alcyne, et la TAA, combinant un thioacide et une amine.

Nous avons pour cela optimisé la réaction TAA en sélectionnant les conditions de réactions idéales. Nous avons ensuite étudié la cinétique de réaction, et avons déterminé un ordre préférentiel d'addition des composés.

Enfin, nous avons appliqué cette stratégie à la synthèse de produits d'intérêt biologique, en greffant 4 ligands RGD sur la face supérieure du châssis, et diverses molécules fonctionnelles sur la face inférieure du châssis. Nous avons alors prouvé l'efficacité de notre méthode en comparant les rendements obtenus avec ceux d'une approche classique.

Dans un second temps, nous avons poursuivi nos études pour développer des NPs en collaboration avec deux laboratoires, celui du Prof Patrick Couvreur, de l'Institut Galien, à l'université Paris Sud, spécialisé dans le développement de nanoparticules pour le traitement du cancer, et celui du Dr Marie Thérèse Charreyre, développant des copolymères hydrophiles et facilement fonctionnalisables. À travers ces deux collaborations, nous avons cherché à concevoir de nouveaux nano-objets équipés d'un élément de ciblage, pour des applications en thérapie anticancéreuse.

Après avoir préparé des conjugués macromoléculaires constitués du vecteur peptidique RGD et de deux résidus squalène, nous avons élaboré des NPs encapsulant de la gemcitabine décorées par différents taux de ligands RGD. Nous avons évalué les NPs obtenues à travers des tests cellulaires. Malheureusement cette évaluation s'est révélée peu concluante, et de nouveaux essais sont en cours sur plusieurs lignées cellulaires.

Enfin, différents conjugués polymère-peptide contenant plusieurs copies de notre cluster de motifs RGD sur un copolymère NAM/NAS ont été évalués *in vitro* sur des cellules surexprimant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Nous avons obtenu un conjugué polymère-peptide possédant une activité biologique plus élevée que notre vecteur peptidique de référence. Cependant, l'évaluation de conjugués fluorescents a donné des résultats inattendus. D'autres conjugués sont en cours de préparation.

Une autre approche est également en cours de développement, à savoir la formation de nanoparticules polymériques par autoassemblage pendant la polymérisation, exprimant à leur surface des clusters de ligands RGD.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse nous ont permis de voir l'importance du positionnement des ligands RGD sur le châssis moléculaire. Il est vraisemblable que le positionnement et la densité des clusters sur les nanoparticules soient aussi des paramètres primordiaux pour obtenir un effet chélate optimum.

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

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.

## General procedures

### Reagents and material

All Fmoc amino acid derivatives and resins were purchased from Advanced ChemTech Europe (Brussels, Belgium), Bachem Biochimie SARL (Voisins-Les-Bretonneux, France) and France Biochem S.A. (Meudon, France). PyBOP was purchased from France Biochem and other reagents were obtained from either Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) or Acros (Noisy-Le-Grand, France).

RP-HPLC analyses were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller, a Waters 2487 Dual Absorbance Detector and a Waters In-Line Degasser. The analytical column used was a Nucleosil 120 Å 3 µm C18 particles, 125 × 4 mm operated at 1 mL/min with linear gradient programs in 20 min run time (routine program: 5% to 100 % B in 20 min). UV monitoring was performed most of the time at 214 nm and 250 nm. Solvent A consisted of H<sub>2</sub>O containing 0.1% TFA and solvent B consisted of CH<sub>3</sub>CN containing 9.9% H<sub>2</sub>O and 0.1% TFA. Water was of Milli-Q quality. CH<sub>3</sub>CN and TFA were of HPLC use quality.

RP-UHPLC analyses were performed on Waters equipment consisting of a Waters Acquity H-Class Bio UPLC combined to a Waters SQ Detector 2 mass spectrometer. The analytical column used was a ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm operated at 0.6 mL/min with linear gradient programs in 2.20 min run time (routine program: 5% to 100 % B in 2.20min). UV monitoring was performed at 214 nm. Solvent A consisted of H<sub>2</sub>O containing 0.1% formic acid (FA) and solvent B consisted of CH<sub>3</sub>CN containing 0.1% FA. Water was of Milli-Q quality. CH<sub>3</sub>CN and FA were LC-MS grade.

RP-HPLC purifications were either performed on Gilson GX-281 (high quantities, hundreds of mg, starting material) or GX-271 equipment (low quantities, few mg, molecular assemblies). For GX-281, the preparative column, Macherey-Nagel 100 Å 7 µm C18 particles, 250 × 21 mm was operated at 20.84 mL/min. For GX-271, the preparative column, Macherey-Nagel 300 Å 7 µm C18 particles, 250 × 10 mm was operated at 4.65 mL/min. For hydrophobic compounds (compounds containing an adamantane moiety), a C5 column was used: Discovery BIO 300 Å

10 $\mu$ m C5 particles, D. 250  $\times$  10 mm. Linear gradient programs in 30 min run time were used and solvents A and B were the same as 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 400 spectrometers. Chemical shifts are expressed in ppm and calculated taking the solvent peak as an internal reference.

### **General Procedure for Solid-Phase Peptide Synthesis**

Assembly of all protected peptides was carried out using the Fmoc/*t*-Bu strategy manually in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit or automatically on a peptide synthesizer using 2-chlorotritylchloride®. Coupling reactions were performed manually by using 2 eq. of *N*-Fmoc-protected amino acid (relative to the resin loading) activated in situ with 2 eq. of PyBOP and 3-5 eq. of diisopropylethylamine (DIPEA) in DMF (10 mL/g resin) for 30 min. The coupling efficiency in manual synthesis was assessed by TNBS tests. *N*-Fmoc protecting groups were removed by treatment with a piperidine/DMF solution (1:4) for 10 min (10 mL/g resin). The process was repeated three times and the deprotection was verified by reading the absorbance of the piperidine washings at 299 nm. The linear peptides were then released from the resin by treatments with a solution of trifluoroacetic acid/methylene chloride (1:99, 10 mL/mg resin, 2 $\times$ 30 min). After evaporation, diethyl ether was added to precipitate peptides. Then they were triturated and washed three times with diethyl ether to obtain crude materials.

### **General Procedure for Cyclization Reactions**

All linear peptides were dissolved in DMF (0.5 mM) and the pH values were adjusted to 8-9 by addition of DIPEA. PyBOP (1.3 eq.) was added and the solution stirred at room temperature for 1 h. Solvent was removed under reduced pressure and the residue dissolved in a minimum of methylene chloride. Diethyl ether was added to precipitate peptides. They were then triturated and washed three times with diethyl ether to obtain crude materials.

### **General procedure for thioacid synthesis**

To a carboxylic acid (1 eq.) and HATU (1 eq.) in DMF (0.1 M for small molecules, 0.01M for peptides) was added DIPEA (2 eq.). After 1 hour at room temperature, NaSH (10 eq.) was added and the solution was stirred overnight. The mixture was centrifuged and the residue washed with DMF. After solvent evaporation the mixture was dissolved in DCM or AcOEt, washed 3

times with 1M HCl solution and once with brine. The organic layers were combined and dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum. The corresponding thioacid was obtained as a white solid.

#### **General procedure for one-pot double-click ligation**

For multivalent compounds:

Alkyne-containing decapeptide scaffold (1 eq.), peptide **6** (5 eq.) and thioacid (1 eq.) were dissolved in DMF to give solution A. Copper(I) acetate (2 eq.) and THPTA (10 eq.) were dissolved in carbonate buffer (pH = 9.2) to give solution B. Both solutions were degassed for 3 minutes under argon. Solution B was then added to solution A (final peptide concentration: 5 mM). After 1 hour at 37°C the mixture was centrifuged and the residue was washed with DMF. Pure compound was obtained after purification by RP-HPLC.

#### **General procedure for NHS ester coupling**

Carboxylic acid (1 eq.) and NHS ester (1.3 eq.) were dissolved in DMF (50 µL, 5 mM) and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. After 10 minutes of reaction at room temperature, the solvent was evaporated. Pure compound was obtained after purification by RP-HPLC.

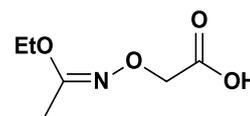
#### **General procedure for purification**

After solvent evaporation the mixture was dissolved in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (80:20) and purified using a 30 min linear gradient: from 20% to 80 % in solvent B. Pure compounds were obtained after freeze-drying.

#### **Competitive cell adhesion assay**

96-well assay plates were coated for 1 h at room temperature with 5 mg mL<sup>-1</sup> vitronectin in PBS and blocked for 30 min with 3% bovine serum albumin (BSA). Varying amounts of peptides followed by 25,000 trypsinated HEK293(β<sub>3</sub>) were added to the wells and the plate was incubated for 30 min at 37°C. Wells were rinsed three times with 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 IC<sub>50</sub> values (concentration of peptide necessary to inhibit 50% of cell attachment to the vitronectin substrate) and determined from triplicates in two separate experiments.

To a stirred solution of iodoacetic acid (9.00 g, 48.4 mmol, 1 equiv.) 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 and ethyl acetohydroxamate (6.0 g, 58.3 mmol, 1.2 equiv.) was added, followed by aqueous NaOH (4.5 mL, 40% w/w) and water (19 mL) (pH > 12). After 4.5 h of stirring at 80°C and cooling to room temperature, the aqueous mixture was washed with DCM (3 x 50 mL). The water phase was cooled down to 0°C and was brought to pH 2-3 with a 1 M hydrochloride solution. The acidified water phase was then extracted with AcOEt (4 x 50 mL) (NB: After each extraction the pH was adjusted to 2-3 with a 1 M hydrochloride solution, at 0°C), and the combined organic phases from this last extraction was washed with brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under vacuum, providing compound **1** as a yellow oil (5.69 g, 35.3 mmol, 73% yield).



**Yield: 73%**

**ESI-MS:**

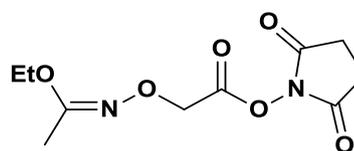
m/z calcd for: C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>4</sub>  
160.1 [M-H]<sup>-</sup>

found: 160.0

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

δ 4.48 (s, 2H), 4.00 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.27 (t, 3H, J = 7.2 Hz)

To a stirred solution of compound **1** (5.69 g, 35.3 mmol, 1 equiv.) and *N*-hydroxysuccinimide (4.06 g, 35.3 mmol, 1 equiv.) in AcOEt/dioxane (120 mL, 1:1) at 0°C was added DCC (7.28 g, 35.3 mmol, 1 equiv.). The resulting mixture was stirred at room temperature overnight. The formed DCU was filtered off and the filtrate was concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (200 mL), and the solution was washed with 5% aqueous NaHCO<sub>3</sub> (2x75 mL), water (75 mL), and brine (75 mL). The organic solution was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum to yield **2** as a yellow solid (8.69 g, 33.7 mmol, 95% yield) which was used without further purification.



**Yield: 95%**

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: 259,1  
[M+H]<sup>+</sup>

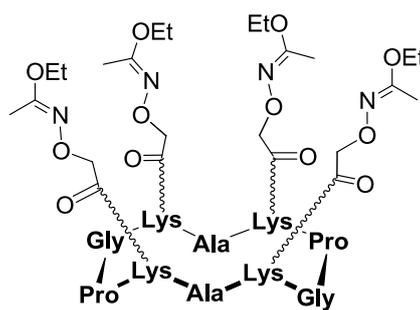
found: 259.3

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

δ 4.78 (s, 2H), 4.02 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.84 (s, 4H), 1.98 (s, 3H), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 3H).



The cyclic protected peptide was obtained from compound **4** (1.08g, 696  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) and PyBOP (470 mg, 905  $\mu\text{mol}$ , 1.3 equiv.) following the general procedure for peptide cyclization. Compound **5** was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (939 mg, 612  $\mu\text{mol}$ , 88% yield) and was used in the next step without further purification.



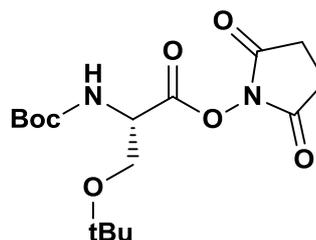
**Yield: 88%**

**RP-UHPLC:** RT = 1.94 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>68</sub>H<sub>115</sub>N<sub>18</sub>O<sub>22</sub>: 1535.8 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 1536.3

To a stirred solution of Boc-Ser(*t*-Bu)-OH (2.8 g, 10 mmol, 1 equiv.) and N-hydroxysuccinimide (1.2 g, 10.7 mmol, 1.07 equiv.) in AcOEt/dioxane (1:1, 100 mL) cooled in an ice bath was added DCC (2.2 g, 10.7 mmol, 1.07 equiv.). After 5 h stirring at room temperature, the reaction mixture was filtered through a pad of celite and washed with AcOEt and the collected filtrate was concentrated under vacuum. The obtained oily residue was taken into 150 mL ethyl acetate and washed with 5 % aqueous NaHCO<sub>3</sub> (2 x 70 mL), water (2 x 70 mL) and brine (2 x 70 mL). The organic fraction was then dried over MgSO<sub>4</sub>. Compound **6** was obtained as a white solid after solvent evaporation (3.5 g, 9.8 mmol, 98% yield).



**Yield: 98%**

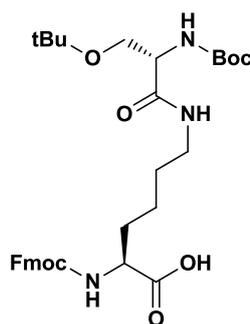
**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: 359.2 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 360.3

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  5.41 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.78 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 2.82 (s, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.20 (s, 9H)

Compound **6** (8.00 g, 22.3 mmol, 1 equiv.) in DMF (75 mL) was added dropwise over 30 min to a stirred suspension of Fmoc-Lys-OH.HCl (9.13 g, 29.0 mmol, 1.3 equiv.) DMF (130 mL). The pH was adjusted to 9 with DIPEA. After 1 h of reaction, the solvent was evaporated under vacuum and the remaining residue was dissolved in AcOEt (200 ml), followed by washing with 10% citric acid aqueous solution (70 ml), water (2 x 100 ml), and finally brine (100 mL). The organic fraction was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporation under vacuum gave **7**, a white solid (11.85 g, 19.4mmol, 87% yield).



**Yield: 87 %**

**RP-HPLC:** RT = 15.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

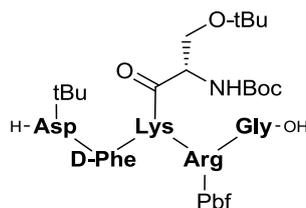
m/z calcd for C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>: 612.3 [M+H]<sup>+</sup>

found: 612.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

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)

Linear decapeptide H-Asp(*t*-Bu)-D-Phe-Lys[(Boc)Ser(*t*-Bu)]-Arg(Pbf)-Gly-OH was assembled according to the general procedure for solid phase peptide synthesis (1 g, loading of 0.79 mmol/g). The linear protected peptide was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (881 mg, 751 μmol, 95% yield) and was used in the next step without further purification.



**Yield: 95%**

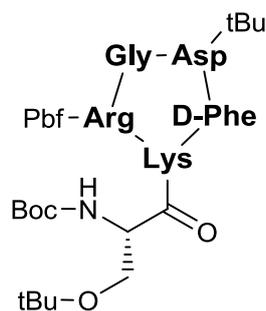
**RP-UHPLC:** RT = 1.92 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>56</sub>H<sub>89</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub>S: 1174.5 [M+H]<sup>+</sup>

found: 1174.5

The cyclic protected peptide was obtained from compound **8** (881 mg, 751  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) and PyBOP (507 mg, 976  $\mu\text{mol}$ , 1.3 equiv.) following the general procedure for peptide cyclization. Compound **9** was obtained after precipitation with  $\text{Et}_2\text{O}$  (824 mg, 713  $\mu\text{mol}$ , 87% yield) and was used in the next step without further purification.



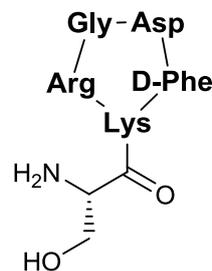
**Yield: 95%**

**RP-UHPLC:** RT = 2.38 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for  $\text{C}_{56}\text{H}_{87}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{S}$ : 1156.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$   
found: 1156.2

Cyclopeptide **9** (824 mg, 713  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in 30 mL of a TFA/TIS/ $\text{H}_2\text{O}$  (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 the precipitation with  $\text{Et}_2\text{O}$  afforded peptide **10** as a white solid powder (453 mg, 655  $\mu\text{mol}$ , 92%). This crude material was used without further purification.



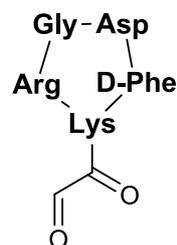
**Yield: 92%**

**RP-UHPLC:** RT = 0.93 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_{10}\text{O}_9$ : 691.8  $[\text{M}+\text{H}]^+$   
found: 691.8

Peptide **10** (453 mg, 655  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) and  $\text{NaIO}_4$  (1.39 g, 6.5 mmol, 10 equiv.) were dissolved in water at  $10^{-2}$  M. The mixture was stirred for 30 min at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclopeptide **11** as a white powder (251 mg, 379  $\mu\text{mol}$ , 58% yield).



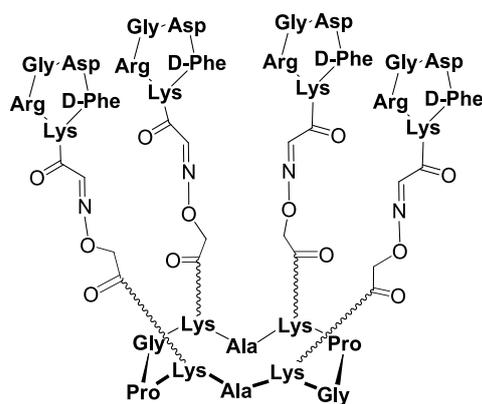
**Yield: 58%**

**RP-UHPLC:** RT = 0.85 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_9\text{O}_9$ : 660.7  $[\text{M}+\text{H}]^+$   
found: 660.4

To a solution of cyclic decapeptide **5** (10 mg, 6.5  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ / $\text{CH}_3\text{CN}$  (70:15:15, 650  $\mu\text{L}$ ) was added compound **11** (21.5 mg, 32.5  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.). After 1 hour at room temperature, the mixture was purified by RP-HPLC to give **12** as a white powder (11.7 mg, 3.1  $\mu\text{mol}$ , 47 % yield).



**Yield: 47%**

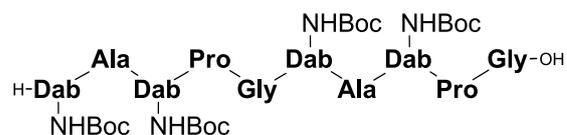
**RP-HPLC:** RT = 10.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for  $\text{C}_{168}\text{H}_{247}\text{N}_{54}\text{O}_{50}$ : 3822.9  $[\text{M}+\text{H}]^+$   
found: 3822.7

13

Linear decapeptide H-Dab(Boc)-Ala-Dab(Boc)-Pro-Gly-Dab(Boc)-Ala-Dab(Boc)-Pro-Gly-OH was assembled according to the general procedure for solid phase peptide synthesis (1 g, loading of 0.42 mmol/g). The linear protected peptide was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (448 mg, 353 μmol, 84% yield) and was used in the next step without further purification.



**Yield: 84%**

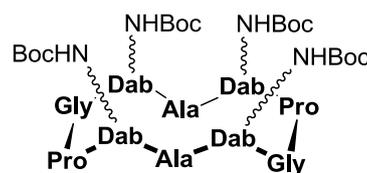
**RP-HPLC:** RT = 14.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>56</sub>H<sub>97</sub>N<sub>14</sub>O<sub>19</sub>: 1269.7 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 1269.9

14

The cyclic protected peptide was obtained from compound **13** (448 mg, 353 μmol, 1 equiv.) and PyBOP (239 mg, 459 μmol, 1.3 equiv.) following the general procedure for peptide cyclization. Compound **14** was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (402 mg, 321 μmol, 91% yield) and was used in the next step without further purification.



**Yield: 91%**

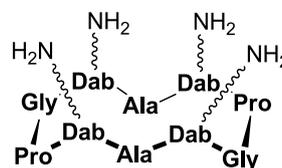
**RP-HPLC:** RT = 16.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>56</sub>H<sub>95</sub>N<sub>14</sub>O<sub>18</sub>: 1251.7 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 1251.8

15

Boc-protected cyclodecapeptidic scaffold **14** (10 mg, 8 μmol) was dissolved in DCM/TFA (50:50). After stirring for 10 minutes the solvent was evaporated under vacuum to give amine bearing scaffold **15**, which was used without further purification.



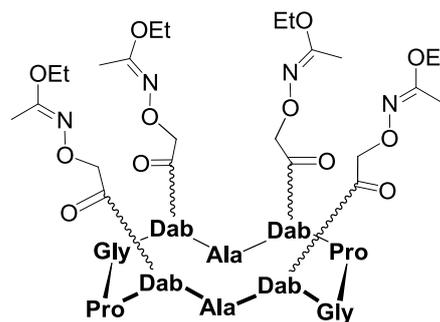
**Compound not isolated**

**RP-UHPLC:** RT = 0.17 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>36</sub>H<sub>63</sub>N<sub>14</sub>O<sub>10</sub>: 851.5 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 852.1

To the deprotected scaffold **15** was added a solution of NHS ester **13** (10.3 mg, 40  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.) in DMF (0.01 M) and pH was adjusted to 9. After stirring for 5 minutes the solvent was removed under vacuum. The obtained intermediate **16** was purified by RP-HPLC and immediately used in the next step without freeze-drying, since the Eei-Aoa protecting group is very sensitive to the acidic conditions used for purification.



### Compound not isolated

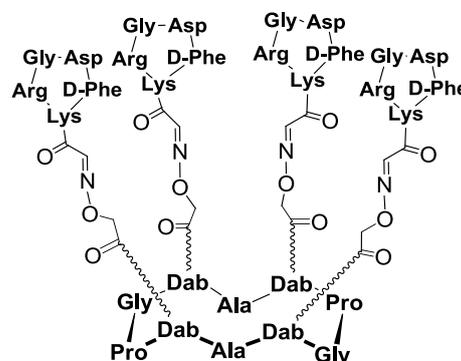
**RP-UHPLC:** RT = 1.91 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

### ESI<sup>+</sup>-MS:

m/z calcd for C<sub>60</sub>H<sub>99</sub>N<sub>18</sub>O<sub>22</sub>: 1423.7 [M+H]<sup>+</sup>

found: 1424.0

To a solution of intermediate **16** in water/acetonitrile was added compound **7** (26.4 mg, 40  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.). After 2 hours at 37°C, the mixture was lyophilized and then dissolved in a minimum of H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (80:20) to be purified by RP-HPLC to give the final compound as a white powder (6.2 mg, 1.7  $\mu\text{mol}$ , 21% yield over 3 steps).



**Yield :** 21 % over 3 steps

**RP-HPLC:** RT = 10.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

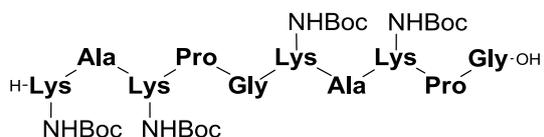
### ESI<sup>+</sup>-MS:

m/z calcd for C<sub>160</sub>H<sub>230</sub>N<sub>55</sub>O<sub>50</sub>: 3710.7 [M+H]<sup>+</sup>

found: 3710.5

18

Linear decapeptide H-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-OH was assembled according to the general procedure for solid phase peptide synthesis (1 g, loading of 0.8 mmol/g). The linear protected peptide was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (973 mg, 704 μmol, 88% yield) and was used in the next step without further purification.



**Yield: 88%**

**RP-UHPLC:** RT = 1.62 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

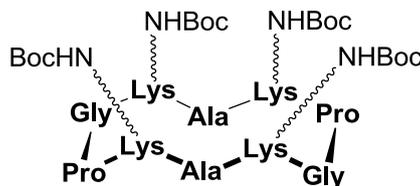
**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>64</sub>H<sub>113</sub>N<sub>14</sub>O<sub>19</sub>: 1381.8 [M+H]<sup>+</sup>

found: 1382.7

19

The cyclic protected peptide was obtained from compound **18** (973 mg, 704 μmol, 1 equiv.) and PyBOP (476 mg, 915 μmol, 1.3 equiv.) following the general procedure for peptide cyclization. Compound **19** was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (893 mg, 655 μmol, 93% yield) and was used in the next step without further purification.



**Yield: 93%**

**RP-UHPLC:** RT = 2.13 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

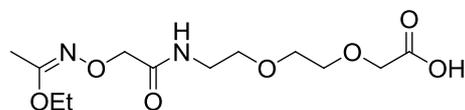
**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>64</sub>H<sub>111</sub>N<sub>14</sub>O<sub>18</sub>: 1363.8 [M+H]<sup>+</sup>

found: 1364.1

20

To a solution of H<sub>2</sub>N-PEG<sub>2</sub>-COOH (20 mg, 123 μmol, 1 equiv.) in DMF (1.2 mL, 0.1M) was added NHS ester **2** (41.1 mg, 159 μmol, 1.3 equiv.) and pH was adjusted to 8-9 with DIPEA. After 5 minutes at r.t. the solvent was removed under vacuum and the oily residue was used in the next step without further purification.



**Compound not isolated**

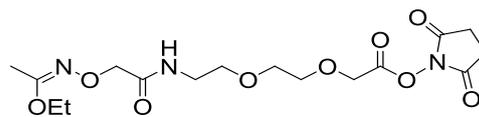
**RP-UHPLC:** RT = 1.37 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: 307.2 [M+H]<sup>+</sup>

found: 307.3

The aforementioned crude **20** (123  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) was dissolved in AcOEt/Dioxane (50:50, 1.2 mL) at 0°C. N-Hydroxysuccinimide (16.9 mg, 159  $\mu\text{mol}$ , 1.3 equiv.) and DCC (25.1 mg, 123  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) were added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The formed DCU was removed by filtration and the filtrate concentrated under vacuum providing an oily residue. The compound was purified by reverse phase flash chromatography using Water/Acetonitrile (both with 0.1% citric acid) to yield **21** as a white solid (22 mg, 55  $\mu\text{mol}$ , 45% yield over 2 steps).



**Yield:** 45% over 2 steps

**RP-UHPLC:** RT = 1.54 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

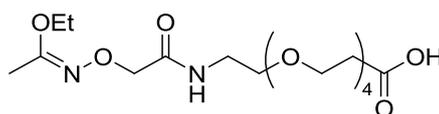
m/z calcd for C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>: 404.2 [M+H]<sup>+</sup>

found: 404.1

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  6.73 (s, 1H), 4.49 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.98 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.80 – 3.75 (m, 2H), 3.68 – 3.64 (m, 2H), 3.60 – 3.56 (m, 2H), 3.55 – 3.49 (m, 2H), 2.85 (s, 4H), 1.98 (s, 3H), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

To a solution of H<sub>2</sub>N-PEG<sub>4</sub>-COOH (20 mg, 75  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in DMF (1.2 mL, 0.1M) was added NHS ester **2** (25.3 mg, 98  $\mu\text{mol}$ , 1.3 equiv.) and pH was adjusted to 8-9 with DIPEA. After 5 minutes at r.t. the solvent was removed under vacuum and the oily residue was used in the next step without further purification.



Not isolated

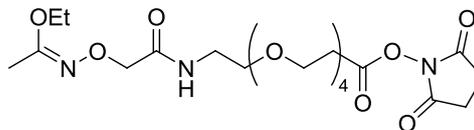
**RP-UHPLC:** RT = 1.45 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>: 409.2 [M+H]<sup>+</sup>

found: 409.0

The aforementioned crude **22** (75  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) was dissolved in AcOEt/Dioxane (50:50, 1.2 mL) at 0°C. N-Hydroxysuccinimide (10.4 mg, 98  $\mu\text{mol}$ , 1.3 equiv.) and DCC (15.5 mg, 75  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) were added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The formed DCU was removed by filtration and the filtrate concentrated under vacuum providing an oily residue. The compound was purified by reverse phase flash chromatography using Water/Acetonitrile (both with 0.1% citric acid) to yield **23** as a white solid (20 mg, 39  $\mu\text{mol}$ , 53% yield over 2 steps).



**Yield:** 53% over 2 steps

**RP-UHPLC:** RT = 1.60 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

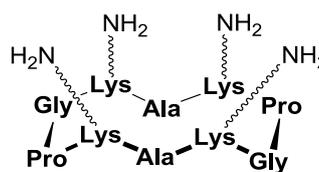
**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>: 506.2 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 506.1

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  6.83 (s, 1H), 4.38 (s, 1H), 3.98 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.84 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.67 – 3.61 (m, 12H), 3.59 – 3.55 (m, 2H), 3.51 (dd, J = 10.3, 5.4 Hz, 2H), 2.90 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.83 (s, 4H), 1.98 (s, 2H), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

Boc-protected cyclodecapeptidic scaffold **19** (10 mg, 7.3  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in DCM/TFA (50:50). After stirring for 10 minutes the solvent was evaporated under vacuum to give amine bearing scaffold **24**, which was used without further purification.



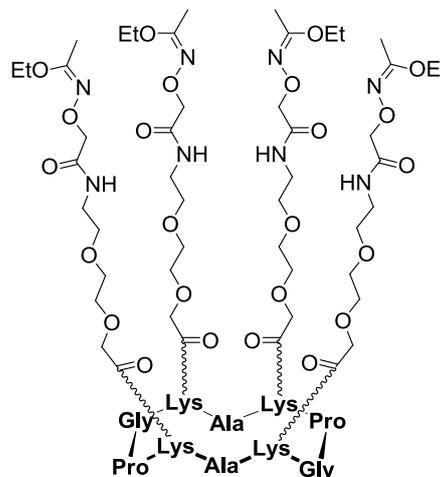
**Compound not isolated**

**RP-UHPLC:** RT = 0.18 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>44</sub>H<sub>79</sub>N<sub>14</sub>O<sub>10</sub>: 963.6 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 963.5

To the obtained deprotected scaffold **24** (7.3  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) was added a solution of NHS ester **21** (14.8 mg, 36.7  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.) in DMF (0.01 M) and pH was adjusted to 9 with DIPEA. After stirring for 5 minutes the solvent was removed under vacuum. The obtained intermediate **25** was purified by RP-HPLC and immediately used in the next step without freeze-drying, since the Eei-Aoa protecting group is very sensitive to the acidic conditions used for purification.



**Compound not isolated**

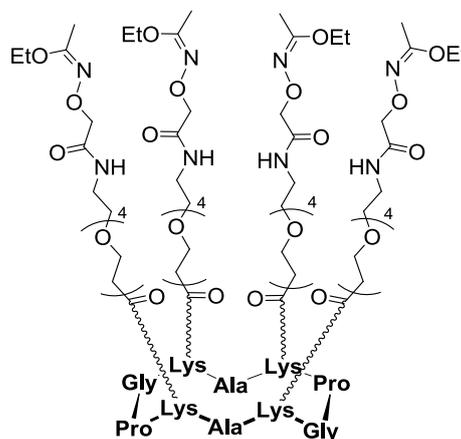
**RP-UHPLC:** RT = 1.80 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>92</sub>H<sub>159</sub>N<sub>22</sub>O<sub>34</sub>: 2117.1 [M+H]<sup>+</sup>

found: 2117.4

To the obtained deprotected scaffold **24** (7.3  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) was added a solution of NHS ester **23** (18.5 mg, 36.7  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.) in DMF (0.01 M) and pH was adjusted to 9. After stirring for 5 minutes the solvent was removed under vacuum. The obtained intermediate **26** was purified by RP-HPLC and immediately used in the next step without freeze-drying, since the Eei-Aoa protecting group is very sensitive to the acidic conditions used for purification.



**Compound not isolated**

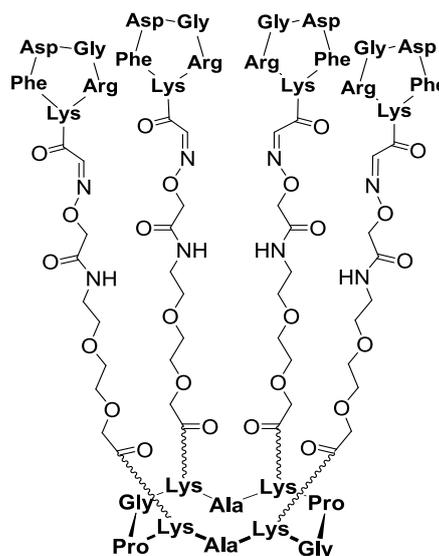
**RP-UHPLC:** RT = 1.83 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>112</sub>H<sub>199</sub>N<sub>22</sub>O<sub>42</sub>: 2525.4 [M+H]<sup>+</sup>

found: 2525.9

To a solution of intermediate **25** (7.3  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in water/acetonitrile was added compound **11** (24.2 mg, 36.5  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.). After 2 hours at 37°C, the mixture was lyophilized and then dissolved in a minimum of H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (80:20) to be purified by RP-HPLC to give final compound **27** as a white powder (5.2 mg, 1.2  $\mu\text{mol}$ , 16% yield over 3 steps).



**Yield: 16% over 3 steps**

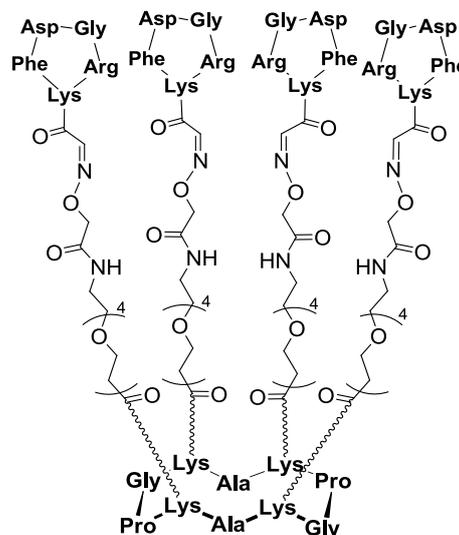
**RP-HPLC:** RT = 10.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>192</sub>H<sub>291</sub>N<sub>58</sub>O<sub>62</sub>: 4403.1 [M+H]<sup>+</sup>

found: 4403.4

To a solution of intermediate **25** (7.3  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in water/acetonitrile was added compound **11** (24.2 mg, 36.7  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.). After 2 hours at 37°C, the mixture was lyophilized and then dissolved in a minimum of H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (80:20) to be purified by RP-HPLC to give final compound **28** as a white powder (3.9 mg, 0.8  $\mu\text{mol}$ , 11% yield over 3 steps).



**Yield: 11% over 3 steps**

**RP-UHPLC:** RT = 10.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

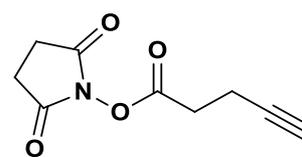
**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>212</sub>H<sub>331</sub>N<sub>58</sub>O<sub>70</sub>: 4811.4

[M+H]<sup>+</sup>

found: 4811.4

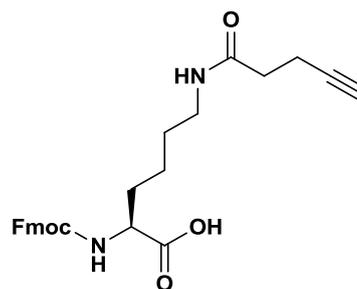
To a stirred solution of 4-pentynoic acid (1 g, 10.2 mmol, 1 equiv.) and N-hydroxysuccinimide (1.18 g, 10.2 mmol, 1 equiv.) in ethyl acetate/dioxane (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (2.10 g, 10.2 mmol, 1 equiv.) in one portion. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The formed DCU was filtered off and the filtrate was concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (300 mL), and the solution was washed with 5% aqueous NaHCO<sub>3</sub> (2 x 75 mL), water (75 mL), and brine (75 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to give **29** as a white solid that was used without further purification (1.95 g, 10 mmol, 98% yield).



**Yield: 98%**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  
 $\delta$  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)

Fmoc-Lys-OH (4.04 g, 10 mmol, 1 equiv.) DMF (50 mL) at room temperature was added dropwise over 10 min a solution of **29** (1.95 g, 10 mmol, 1 equiv.) in dimethylformamide (20 mL). The pH of the resulting mixture was adjusted to pH 8-9 by further additions of DIPEA. After 1 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 MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to yield **30** as a white solid which was used without further purification (4 g, 9 mmol, 90% yield).



**Yield: 90%**

**RP-HPLC:** RT = 13.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

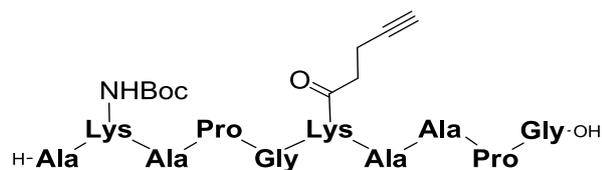
**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 449.2 [M+H]<sup>+</sup>  
 found: 449.1

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  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)

Linear decapeptide H-Ala-Lys(Boc)-Ala-Pro-Gly-Lys(Alc)-Ala-Ala-Pro-Gly-OH was assembled according to the general procedure for solid phase peptide synthesis (500 mg, loading of 0.44 mmol/g). Linear protected peptide **31** was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (207 mg, 200 μmol, 91% yield) and was used in the next step without further purification.



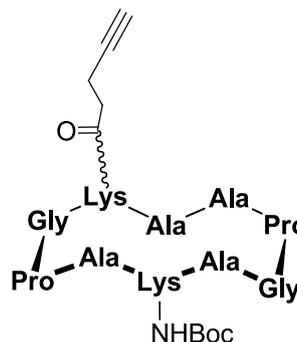
**Yield: 91%**

**RP-UHPLC:** RT = 1.58 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>48</sub>H<sub>78</sub>N<sub>11</sub>O<sub>14</sub>: 1032.6 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 1032.4

Cyclic protected peptide was obtained from compound **31** (207 mg, 200 μmol, 1 equiv.) and PyBOP (135 mg, 260 μmol, 1.3 equiv.) following the general procedure for peptide cyclization. Compound **32** was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (185 mg, 182 μmol, 91% yield) and was used in the next step without further purification.



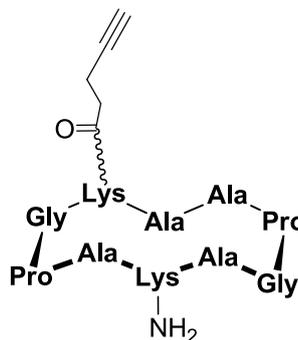
**Yield: 91%**

**RP-UHPLC:** RT = 1.93 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>48</sub>H<sub>76</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub>: 1014.6 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 1014.1

Compound **32** (185 mg, 182  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in a TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50) solution. After 1 h of reaction, the reaction mixture was concentrated under vacuum providing an oily residue. Pure compound **33** was obtained as a white powder after purification using preparative RP-HPLC (156 mg, 167  $\mu\text{mol}$ , 92% yield).



**Yield: 92%**

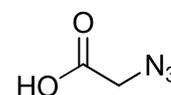
**RP-UHPLC:** RT = 0.92 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>43</sub>H<sub>69</sub>N<sub>12</sub>O<sub>11</sub>: 929.5 [M+H]<sup>+</sup>

found: 929.4

A solution of bromoacetic acid (1.00 g, 7.2 mmol) and 2 equiv. of NaN<sub>3</sub> (0.93 g, 14.3 mmol) in H<sub>2</sub>O/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 washed with brine, dried with MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give compound **34** as a yellow-brown oil (0.62 g, 6.0 mmol, 83% yield).



**Yield: 83%**

**ESI-MS:**

m/z calcd for: C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 100.0 [M-H]<sup>-</sup>

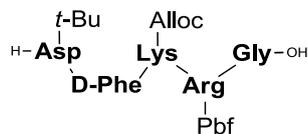
found: 100.9

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ 3.89 (2H,s)

35

Linear pentapeptide H-Asp(*t*-Bu)-Phe-Lys(Alloc)-Arg(Pbf)-Gly-OH was assembled according to the general procedure for solid phase peptide synthesis (500 mg, loading of 0.43 mmol/g). Linear protected peptide **35** was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (192 mg, 189 μmol, 88% yield) and was used in the next step without further purification.



**Yield: 88%**

**RP-UHPLC:** RT = 1.85 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

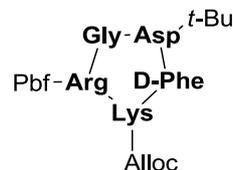
**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>48</sub>H<sub>72</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub>S: 1014.5 [M+H]<sup>+</sup>

found: 1014.4

36

Cyclic protected peptide **36** was obtained from **35** (192 mg, 189 μmol, 1 equiv.) and PyBOP (124 mg, 238 μmol, 1.3 equiv.) following the general procedure for peptide cyclization after precipitation with Et<sub>2</sub>O (181 mg, 182 μmol, 96% yield) and was used in the next step without further purification.



**Yield: 96%**

**RP-UHPLC:** RT = 2.21 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

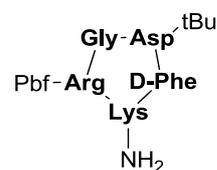
**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>48</sub>H<sub>70</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>S: 996.5 [M+H]<sup>+</sup>

found: 996.5

37

To cyclopentapeptide **36** (181 mg, 182 μmol, 1 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (3:1, 0.01M, 18.2 mL) was added under argon phenylsilane (1.97 g, 18.2 mmol, 100 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (42 mg, 36 μmol, 0.2 equiv.). 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. Cyclic protected peptide **37** was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (126 mg, 138 μmol, 76% yield) and was used without further purification.



**Yield: 76%**

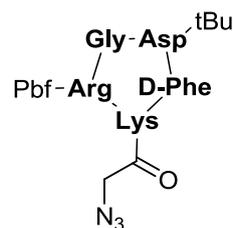
**RP-UHPLC:** RT = 1.65 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>44</sub>H<sub>66</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub>S: 912.5 [M+H]<sup>+</sup>

found: 912.4

To a solution of crude peptide **37** (126 mg, 138  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in 30 mL of DMF was added azide bearing compound **34** (18 mg, 179  $\mu\text{mol}$ , 1.3 equiv.) and PyBOP (93 mg, 179  $\mu\text{mol}$ , 1.3 equiv.) and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. The reaction was stirred for 30 min at room temperature and the solvent was removed under vacuum. Compound **38** was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (113 mg, 113  $\mu\text{mol}$ , 82% yield) and was used without further purification.



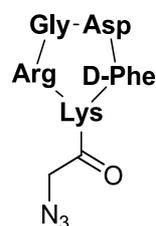
**Yield: 82%**

**RP-UHPLC:** RT = 2.12 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>46</sub>H<sub>67</sub>N<sub>12</sub>O<sub>11</sub>S: 995.5 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 995.3

Compound **38** was treated with a TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) solution for 1 hour to give **39** after purification by RP-HPLC as a white powder (71 mg, 103  $\mu\text{mol}$ , 91% yield).



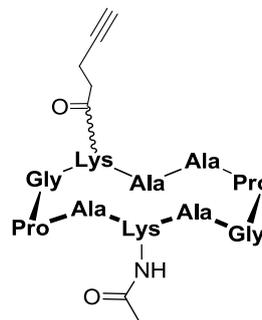
**Yield: 91%**

**RP-UHPLC:** RT = 1.13 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>29</sub>H<sub>43</sub>N<sub>12</sub>O<sub>8</sub>: 687.3 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 687.4

To compound **33** (0.93 mg, 1  $\mu$ mol, 1 equiv.) in DMF/Carbonate buffer (pH 9.2, final peptide concentration: 5 mM, final DMF/buffer ratio: 30:70, final buffer concentration: 100 mM) was added thioacetic acid (0.07  $\mu$ L, 1  $\mu$ mol, 1 equiv.), copper(I) acetate (0.13 mg, 1  $\mu$ mol, 1 equiv.) and THPTA (2.18 mg, 5  $\mu$ mol, 5 equiv.). The reaction gave compound **40** after 2h30 at 37°C.

**Compound not isolated**

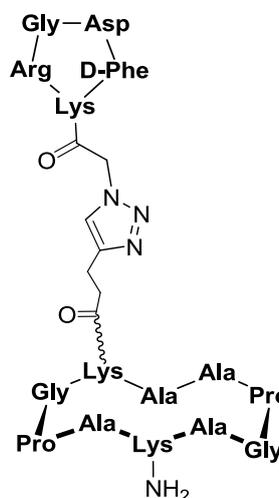
**RP-UHPLC:** RT = 2.11 min (C18, 214 nm, 5-40% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>45</sub>H<sub>71</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub>: 971.5 [M+H]<sup>+</sup>

found: 971.7

To compound **33** (0.93 mg, 1  $\mu$ mol, 1 equiv.) in DMF/Carbonate buffer (pH 9.2, final peptide concentration: 5 mM, final DMF/buffer ratio: 30:70, final buffer concentration: 100 mM) was added RGD peptide **39** (0.68 mg, 1  $\mu$ mol, 1 equiv.), copper(I) acetate (0.13 mg, 1  $\mu$ mol, 1 equiv.) and THPTA (2.18 mg, 5  $\mu$ mol, 5 equiv.). The reaction gave compound **41** in 15 minutes at 37°C.

**Compound not isolated**

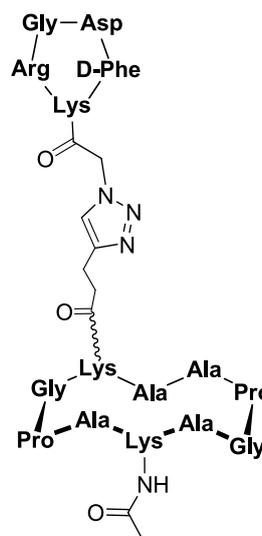
**RP-UHPLC:** RT = 2.04 min (C18, 214 nm, 5-40% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>72</sub>H<sub>111</sub>N<sub>24</sub>O<sub>19</sub>: 1615.8 [M+H]<sup>+</sup>

found: 1615.3

To a solution of compound **41** (1  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in DMF/Carbonate buffer (pH 9.2, final peptide concentration: 5 mM, final DMF/buffer ratio: 30:70, final buffer concentration: 100 mM) with copper(I) acetate (0.13 mg, 1  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) and THPTA (2.18 mg, 5  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.) was added thioacetic acid (0.07  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.). The reaction gave compound **42** in 20 minutes at 37°C.



### Compound not isolated

**RP-UHPLC:** RT = 2.18 min (C18, 214 nm, 5-40% B in 2.20 min)

### ESI<sup>+</sup>-MS:

m/z calcd for C<sub>74</sub>H<sub>113</sub>N<sub>24</sub>O<sub>20</sub>: 1657.9 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 1657.8

The linear decapeptide H-Ala-Lys(Boc)-Ala-Pro-Gly-Ala-Ala-Ala-Pro-Gly-OH was assembled according to the general procedure for solid phase peptide synthesis (500 mg, loading of 0.43 mmol/g). The linear protected peptide was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (174 mg, 191  $\mu\text{mol}$ , 89% yield) and was used in the next step without further purification.



**Yield: 89%**

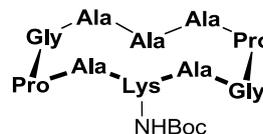
**RP-UHPLC:** RT = 1.24 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

### ESI<sup>+</sup>-MS:

m/z calcd for C<sub>40</sub>H<sub>68</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub>: 910.5 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 910.3

44

Cyclic protected peptide was obtained from compound **43** (174 mg, 191  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) and PyBOP (129 mg, 248  $\mu\text{mol}$ , 1.3 equiv.) following the general procedure for peptide cyclization. Compound **44** was obtained after precipitation with  $\text{Et}_2\text{O}$  (157 mg, 176  $\mu\text{mol}$ , 92% yield) and was used in the next step without further purification.



**Yield: 92%**

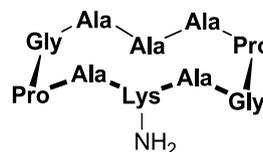
**RP-UHPLC:** RT = 1.48 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for  $\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$ : 892.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$   
found: 892.3

45

Compound **44** (157 mg, 176  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in a TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50:50) solution. After 1 h of reaction, the reaction mixture was concentrated under vacuum providing an oily residue. Pure compound **45** was obtained as a white powder after purification using preparative RP-HPLC (131 mg, 165  $\mu\text{mol}$ , 94% yield).



**Yield: 94%**

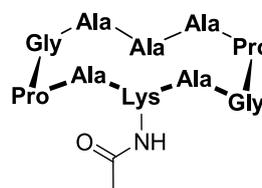
**RP-UHPLC:** RT = 1.02 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for  $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{N}_{11}\text{O}_{10}$ : 792.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$   
found: 792.3

46

To compound **45** (0.79 mg, 1  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in DMF/Carbonate 9.2 buffer (final peptide concentration: 5 mM, final DMF/buffer ratio: 30:70, final buffer concentration: 100 mM) was added, thioacetic acid (0.07  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), copper(I) acetate (0.12 mg, 1  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) and THPTA (2.17 mg, 5  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.). The reaction gave compound **46** after 15 minutes at 37°C.



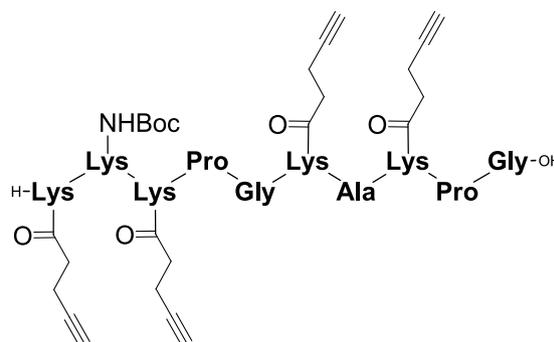
**Compound not isolated**

**RP-UHPLC:** RT = 1.68 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{60}\text{N}_{11}\text{O}_{11}$ : 834.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$   
found: 834.4

The linear decapeptide H- Lys(Alc)-Lys(Boc)- Lys(Alc)-Pro-Gly-Lys(Alc)-Ala-Lys(Alc)-Pro-Gly-OH was assembled according to the general procedure for solid phase peptide synthesis (500 mg, loading of 0.41 mmol/g). The linear protected peptide was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (248 mg, 170 μmol, 83% yield) and was used in the next step without further purification.



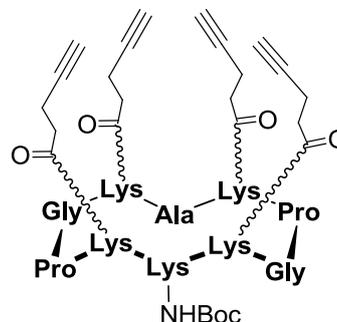
**Yield: 83%**

**RP-UHPLC:** RT = 1.85 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>72</sub>H<sub>112</sub>N<sub>15</sub>O<sub>17</sub>: 1458.8 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 1458.7

Cyclic protected peptide was obtained from compound **47** (248 mg, 170 μmol, 1 equiv.) and PyBOP (115 mg, 221 μmol, 1.3 equiv.) following the general procedure for peptide cyclization. Compound **48** was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (215 mg, 150 μmol, 88% yield) and was used in the next step without further purification.



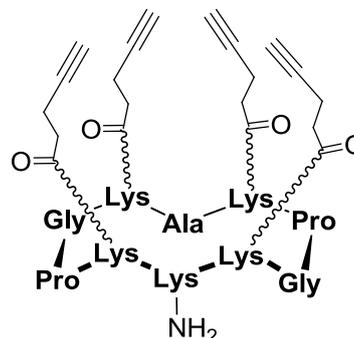
**Yield: 88%**

**RP-UHPLC:** RT = 2.24 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>72</sub>H<sub>110</sub>N<sub>15</sub>O<sub>16</sub>: 1440.8 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 1440.6

Compound **48** (215 mg, 150  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in a TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50:50) solution. After 1 h of reaction, the reaction mixture was concentrated under vacuum providing an oily residue. Pure compound **10** was obtained after purification using preparative RP-HPLC (187 mg, 140  $\mu\text{mol}$ , 93% yield).



**Yield: 93%**

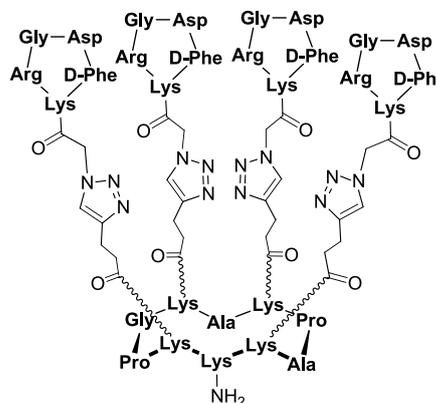
**RP-HPLC:** RT = 1.17 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for  $\text{C}_{67}\text{H}_{102}\text{N}_{15}\text{O}_{14}$ : 1340.8  $[\text{M}+\text{H}]^+$

found: 1340.7

Compound **50** was obtained from **49** (1.34 mg, 1  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), **39** (3.43 mg, 5  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.), copper(II) sulfate (0.10 mg, 0.4  $\mu\text{mol}$ , 0.4 equiv.), THPTA (0.87 mg, 2  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) and sodium ascorbate (0.99 mg, 5  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.) following general procedure for CuAAC ligation after purification and freeze-drying as a white powder (3.80 mg, 0.93  $\mu\text{mol}$ , 93% yield).



**Yield: 93%**

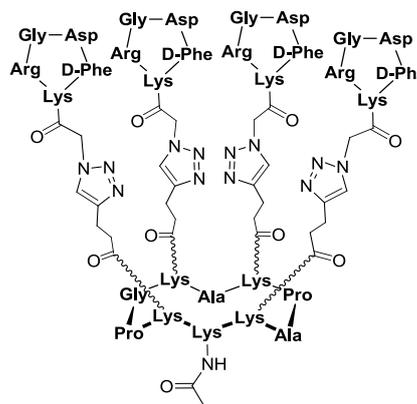
**RP-UHPLC:** RT = 1.24 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for  $\text{C}_{183}\text{H}_{270}\text{N}_{63}\text{O}_{46}$ : 4088.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$

found: 4088.6

Compound **51** was obtained from **49** (1.34 mg, 1  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), **11** (3.43 mg, 5  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.), thioacetic acid (0.07  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), copper(I) acetate (0.25 mg, 2  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) and THPTA (4.35 mg, 10  $\mu\text{mol}$ , 10 equiv.) following general procedure for double-click ligation (DMF/Buffer ratio: 50:50, final buffer concentration: 50 mM) after purification and freeze-drying as a white powder (3.41 mg, 0.83  $\mu\text{mol}$ , 83% yield).



**Yield: 83%**

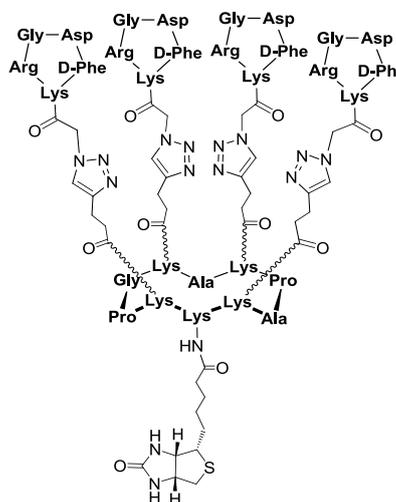
**RP-UHPLC:** RT = 1.19 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for: C<sub>185</sub>H<sub>272</sub>N<sub>63</sub>O<sub>47</sub> 4130.1 [M+H]<sup>+</sup>

found: 4130.1

Compound **52** was obtained from **49** (1.34 mg, 1  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), **11** (3.43 mg, 5  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.), **55** (0.26 mg, 1  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), copper(I) acetate (0.25 mg, 2  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) and THPTA (4.35 mg, 10  $\mu\text{mol}$ , 10 equiv.) following general procedure for double-click ligation (DMF/Buffer ratio: 50:50, final buffer concentration: 50 mM) after purification and freeze-drying as a white powder (3.77 mg, 0.87  $\mu\text{mol}$ , 87% yield).



**Yield: 87%**

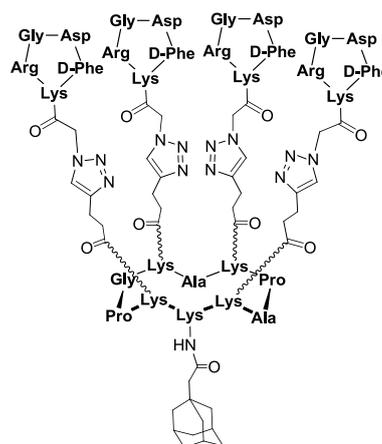
**RP-UHPLC:** RT = 1.33 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>193</sub>H<sub>284</sub>N<sub>65</sub>O<sub>48</sub>S: 4314.1 [M+H]<sup>+</sup>

found: 4315.0

Compound **53** was obtained from **49** (1.34 mg, 1  $\mu$ mol, 1 equiv.), **11** (3.43 mg, 5  $\mu$ mol, 5 equiv.), **56** (0.21 mg, 1  $\mu$ mol, 1 equiv.), copper(I) acetate (0.25 mg, 2  $\mu$ mol, 2 equiv.) and THPTA (4.35 mg, 10  $\mu$ mol, 10 equiv.) following general procedure for double-click ligation (DMF/Buffer ratio: 80:20, final buffer concentration: 20 mM) after purification (C5 column) and freeze-drying as a white powder (2.86 mg, 0.67  $\mu$ mol, 67% yield).



**Yield: 67%**

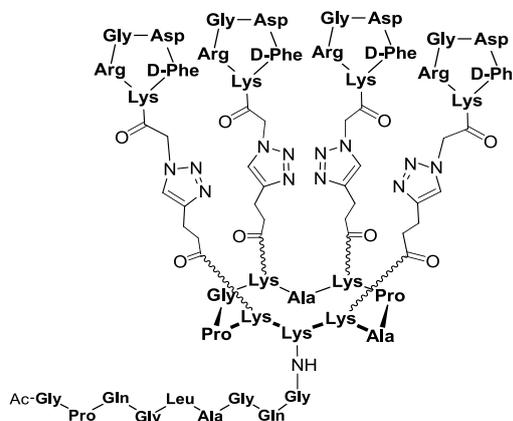
**RP-UHPLC:** RT = 1.43 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>195</sub>H<sub>286</sub>N<sub>63</sub>O<sub>47</sub>: 4264.2 [M+H]<sup>+</sup>

found: 4265.4

Compound **54** was obtained from **49** (1.34 mg, 1  $\mu$ mol, 1 equiv.), **11** (3.43 mg, 5  $\mu$ mol, 5 equiv.), **58** (0.84 mg, 1  $\mu$ mol, 1 equiv.), copper(I) acetate (0.25 mg, 2  $\mu$ mol, 2 equiv.) and THPTA (4.35 mg, 10  $\mu$ mol, 10 equiv.) following general procedure for double-click ligation (DMF/Buffer ratio: 50:50, final buffer concentration: 50 mM) after purification and freeze-drying as a white powder (4.55 mg, 0.93  $\mu$ mol, 93% yield).



**Yield: 93%**

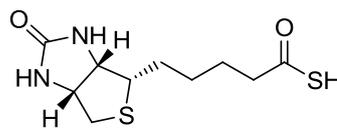
**RP-UHPLC:** RT = 1.52 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>217</sub>H<sub>323</sub>N<sub>74</sub>O<sub>58</sub>: 4895.5 [M+H]<sup>+</sup>

found: 4895.6

Compound **55** was obtained from biotin (10 mg, 41  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), HATU (15.6 mg, 41  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), NaSH (41 mg, 410  $\mu\text{mol}$ , 10 equiv.) and DIPEA (14.25  $\mu\text{L}$ , 82  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) following the general procedure for thioacid synthesis as a white solid (9.3 mg, 36  $\mu\text{mol}$ , 87% yield).



**Yield: 87%**

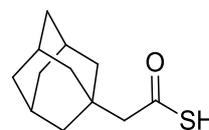
**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ : 261.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$   
found: 261.0

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

$\delta$  6.37 (d,  $J = 25.3$  Hz, 2H), 4.30 (dd,  $J = 7.6, 5.0$  Hz, 1H), 4.14 (dd,  $J = 7.5, 4.4$  Hz, 1H), 3.10 (dd,  $J = 12.4, 6.5$  Hz, 1H), 2.90 – 2.77 (m, 2H), 2.61 – 2.52 (m, 2H), 1.70 – 1.27 (m, 6H)

Compound **56** was obtained from 1-adamantaneacetic acid (10 mg, 51  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), HATU (19.4 mg, 51  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), NaSH (51 mg, 510  $\mu\text{mol}$ , 10 equiv.) and DIPEA (17.7  $\mu\text{L}$ , 102  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) following the general procedure for thioacid synthesis as a white solid (10.1 mg, 48  $\mu\text{mol}$ , 94% yield).

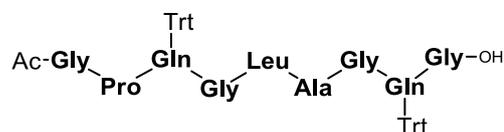


**Yield: 94%**

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  2.50 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-SH), 1.99 (m, 3H, -CH-CH<sub>2</sub>), 1.67 (m, 12H, -CH<sub>2</sub>-CH)

Peptide Ac-Gly-Pro-Gln(Trt)-Gly-Leu-Ala-Gly-Gln(Trt)-Gly-OH was obtained following general procedure for SPPS (1 g, 0.42 mmol/g) after purification by RP-HPLC as a white powder (358 mg, 0.273 mmol, 65% yield).



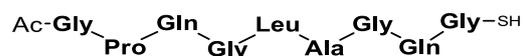
**Yield: 65%**

**RP-HPLC:** RT = 2.34 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS :**

m/z calcd for  $\text{C}_{72}\text{H}_{84}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$ : 1310.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$   
found: 1309.4

Peptide thioacid **58** was obtained from protected peptide **57** (10 mg, 7.6  $\mu$ mol, 1 equiv.), HATU (2.9 mg, 7.6  $\mu$ mol, 1 equiv.), NaSH (7.6 mg, 76  $\mu$ mol, 10 equiv.) following the general procedure for thioacid synthesis. After removing the DMF under vacuum, a TFA/TIS (95:5) solution was added and the mixture was stirred for 5 minutes. Compound **58** was obtained after purification by RP-HPLC as a white powder (3.5 mg, 4.2  $\mu$ mol, 55% yield over 2 steps).



**Yield: 55% over 2 steps**

**RP-HPLC:** RT = 1.09 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

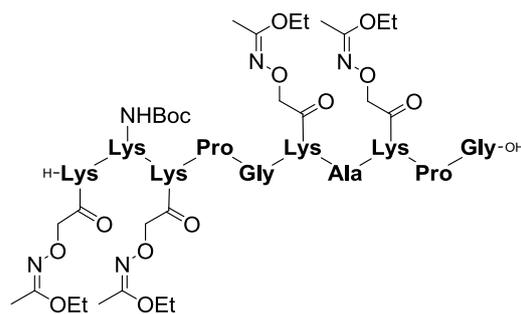
**ESI<sup>+</sup>-MS:**

m/z calcd for C<sub>34</sub>H<sub>56</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>S: 842.4

[M+H]<sup>+</sup>

found: 842.7

Linear decapeptide H-Lys(Eei-Aoa)-Lys(Boc)-Lys(Eei-Aoa)-Pro-Gly-Lys(Eei-Aoa)-Ala-Lys(Eei-Aoa)-Pro-Gly-OH was assembled according to the general procedure for solid phase peptide synthesis (1 g, loading of 0.83 mmol/g). Compound **59** was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (1.11 g, 647 μmol, 78% yield) and was used in the next step without further purification.



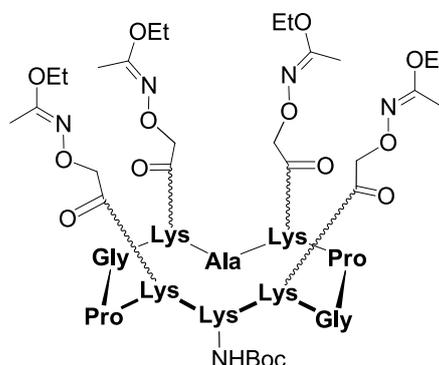
**Yield: 78%**

**RP-UHPLC:** RT = 1.69 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS :**

m/z calcd for C<sub>76</sub>H<sub>132</sub>N<sub>19</sub>O<sub>25</sub>: 1711.0 [M+H]<sup>+</sup>  
found:1711.0

Cyclic protected peptide was obtained from compound **59** (1.11 g, 647 μmol, 1 equiv.) and PyBOP (437 mg, 841 μmol, 1.3 equiv.) following the general procedure for peptide cyclization. Compound **65** was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (974 mg, 576 μmol, 89 % yield) and was used in the next step without further purification.



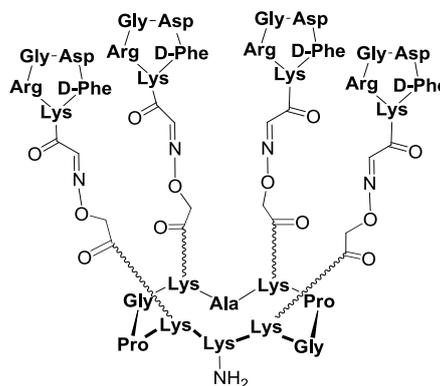
**Yield: 89%**

**RP-UHPLC:** RT = 2.09min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS :**

m/z calcd for C<sub>76</sub>H<sub>130</sub>N<sub>19</sub>O<sub>24</sub>: 1693.0[M+H]<sup>+</sup>  
found: 1692.9

Scaffold **60** (10 mg, 5.9  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) and compound **11** (19.5 mg, 29.5  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.) were dissolved in 1 mL of a TFA/H<sub>2</sub>O (7:3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **61** as a white powder (7.4 mg, 1.9  $\mu\text{mol}$ , 33% yield).



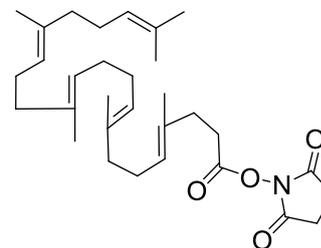
**Yield: 33%**

**RP-HPLC:** RT = 1.10 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS :**

m/z calcd for C<sub>171</sub>H<sub>254</sub>N<sub>55</sub>O<sub>50</sub>: 3879.9 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 3878.5

To a stirred solution of 1,1',2-trisnorsqualenic acid (62.5 mg, 156  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) and N-hydroxysuccinimide (19.7 mg, 172  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in AcOEt/dioxan (1:1, 600  $\mu\text{L}$ ) at 0°C was added DCC (32.2 mg, 156  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite and washed with AcOEt. The collected filtrate was concentrated under vacuum. The obtained oily residue was taken into 10 mL ethyl acetate and washed with 5 % aqueous NaHCO<sub>3</sub> (2 x 5 mL), water (2 x 5 mL) and brine (2 x 5 mL). The organic fraction was then dried over MgSO<sub>4</sub>. N-hydroxysuccinimidyl 1,1',2-trisnorsqualenate **62** was obtained as a white solid after solvent evaporation (44.3 mg, 89  $\mu\text{mol}$ , 57% yield).

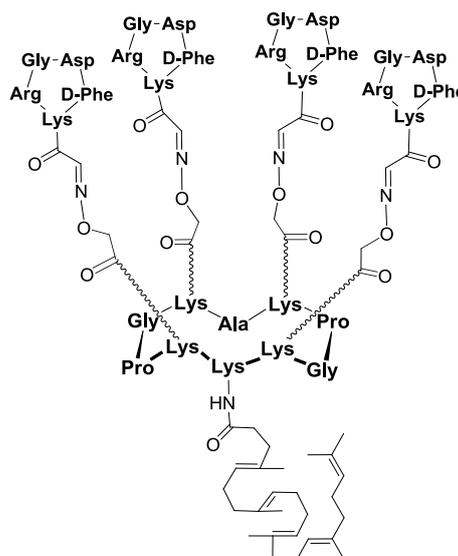


**Yield: 57%**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**

$\delta$  5.26 – 5.05 (m, 5H), 2.83 (s, 4H),  
2.70 (t, 2H), 2.40 (t, 2H), 2.15 –  
1.89 (m, 16H), 1.68 (s, 3H), 1.64 (s,  
3H), 1.60 (s, 12H).

To compound **61** (11.5 mg, 3.0  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) was added N-hydroxysuccinimidyl 1,1',2-trisnorsqualenate **62** (3.0 mg, 6.0  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) in 300  $\mu\text{L}$  anhydrous DMF and the pH was adjusted to 8-9 with DIPEA. The mixture was stirred for 1 h. The product was concentrated under reduced pressure and precipitated with Et<sub>2</sub>O to yield **63** as a white solid powder (2.9 mg, 0.7  $\mu\text{mol}$ , 23% yield) after purification by RP-HPLC.



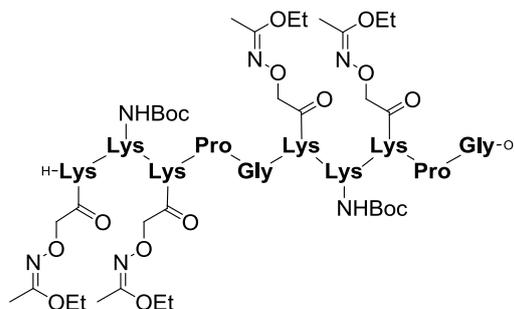
**Yield: 23%**

**RP-HPLC:** RT = 16.7 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS :**

m/z calcd for C<sub>198</sub>H<sub>296</sub>N<sub>55</sub>O<sub>51</sub>: 4262.2 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 4262.8

Linear decapeptide H-Lys(Eei-Aoa)-Lys(Boc)-Lys(Eei-Aoa)-Pro-Gly-Lys(Eei-Aoa)-Lys(Boc)-Lys(Eei-Aoa)-Pro-Gly-OH was assembled according to the general procedure for solid phase peptide synthesis (1 g, loading of 0.81 mmol/g). Linear protected peptide **64** was obtained after precipitation with Et<sub>2</sub>O (1.17 g, 624  $\mu\text{mol}$ , 77% yield) and was used in the next step without further purification.



**Yield: 77%**

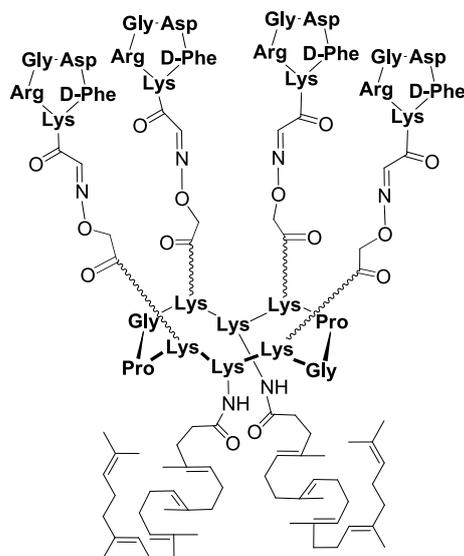
**RP-UHPLC:** RT = 1.72 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS :**

m/z calcd for C<sub>84</sub>H<sub>147</sub>N<sub>20</sub>O<sub>27</sub>: 1869.1 [M+H]<sup>+</sup>  
found: 1869.0



Compound **66** (3 mg, 0.76  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) and **62** (1.52 mg, 3.8  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv.) were dissolved in anhydrous DMF and the pH was adjusted to 9 with DIEA. After vigorously stirring for one hour at room temperature, peptide **67** was precipitated with  $\text{Et}_2\text{O}$ , washed three times with a  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$  (44.5:44.5:1) solution and obtained as a white powder after freeze-drying (1.99 mg, 0.42  $\mu\text{mol}$ , 56% yield).



**Yield: 56%**

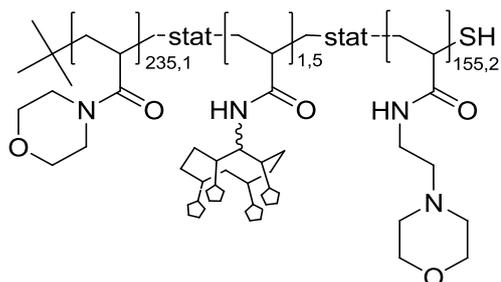
**RP-UHPLC:** RT = 2.06 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS :**

m/z calcd for  $\text{C}_{228}\text{H}_{345}\text{N}_{56}\text{O}_{52}$ : 4701.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$

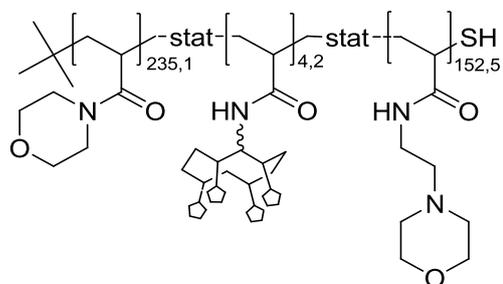
found: 4702.4

Compound synthesized by M.T. Charreyre's lab



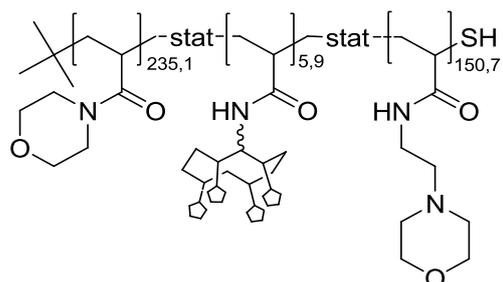
**Molecular Weight:** 76 500 g/mol

Compound synthesized by M.T. Charreyre's lab



**Molecular Weight:** 77 900 g/mol

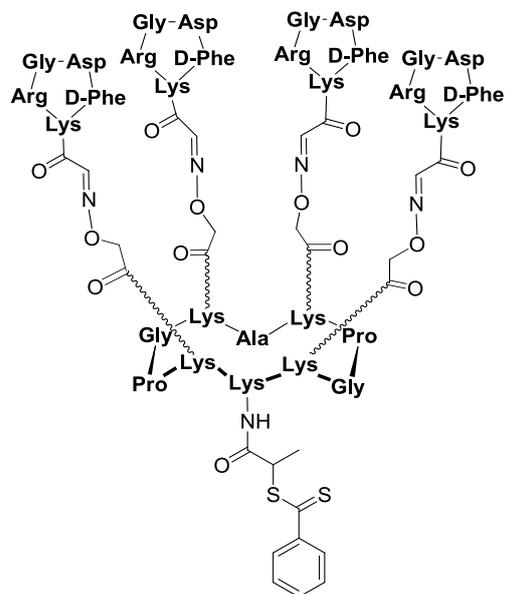
Compound synthesized by M.T. Charreyre's lab



**Molecular weight:** 84 300 g/mol



To compound **61** (49 mg, 12.6  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) in DMF (2 mL) was added succinimidoxycarbonyl ethyldithiobenzoate (8.2 mg, 25.3  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) and DIPEA (131  $\mu\text{L}$ , 75.6  $\mu\text{mol}$ , 6 equiv.) and the mixture was stirred for 2 h at 40°C. Pure compound **74** was obtained after purification by RP-HPLC and freeze-drying (17.4 mg, 4.26  $\mu\text{mol}$ , 34% yield).



**Yield: 34%**

**RP-UHPLC:** RT = 1.26 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

**ESI<sup>+</sup>-MS :**

m/z calcd for C<sub>181</sub>H<sub>262</sub>N<sub>55</sub>O<sub>51</sub>S<sub>2</sub>: 4087.9

[M+H]<sup>+</sup>

found: 4087.9

# **BIBLIOGRAPHIE**

- 
- [1] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, *CA: a cancer journal for clinicians* **2011**, *61*, 69-90
- [2] K. Strebhardt, A. Ullrich, *Nature reviews. Cancer* **2008**, *8*, 473-480
- [3] A. Piro, A. Tagarelli, G. Tagarelli, P. Lagonia, A. Quattrone, *International Reviews of Immunology* **2008**, *27*, 1-17
- [4] J. Kreuter, *International journal of pharmaceutics* **2007**, *331*, 1-10
- [5] C. Y. Ang, S. Y. Tan, Y. Zhao, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, *12*, 4776-4806
- [6] B. Romberg, J. M. Metselaar, T. de Vringer, K. Motonaga, J. J. Kettenes-van den Bosch, C. Oussoren, G. Storm, W. E. Hennink, *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 767-774
- [7] L. Feng, R. J. Mumper, *Cancer Letters* **2013**, *334*, 157-175
- [8] V. J. Venditto, F. C. Szoka, Jr., *Advanced drug delivery reviews* **2013**, *65*, 80-88
- [9] T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink, G. Storm, *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*, 175-187
- [10] S. Tinkle, S. E. McNeil, S. Mühlebach, R. Bawa, G. Borchard, Y. Barenholz, L. Tamarkin, N. Desai, *Annals of the New York Academy of Sciences* **2014**, *1313*, 35-56
- [11] P. Ruenraroengsak, J. M. Cook, A. T. Florence, *Journal of Controlled Release* **2010**, *141*, 265-276
- [12] W. R. Sanhai, J. H. Sakamoto, R. Canady, M. Ferrari, *Nature nanotechnology* **2008**, *3*, 242-244
- [13] T. Lammers, S. Aime, W. E. Hennink, G. Storm, F. Kiessling, *Accounts of chemical research* **2011**, *44*, 1029-1038
- [14] A. Schroeder, D. A. Heller, M. M. Winslow, J. E. Dahlman, G. W. Pratt, R. Langer, T. Jacks, D. G. Anderson, *Nature reviews. Cancer* **2012**, *12*, 39-50
- [15] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O. C. Farokhzad, *Advanced drug delivery reviews* **2014**, *66*, 2-25
- [16] R. Duncan, R. Gaspar, *Molecular pharmaceutics* **2011**, *8*, 2101-2141
- [17] J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda, *Advanced drug delivery reviews* **2011**, *63*, 136-151
- [18] T. P. Padera, B. R. Stoll, J. B. Tooredman, D. Capen, E. d. Tomaso, R. K. Jain, *Nature* **2004**, *427*, 695-695
- [19] T. P. Padera, A. Kadambi, E. di Tomaso, C. M. Carreira, E. B. Brown, Y. Boucher, N. C. Choi, D. Mathisen, J. Wain, E. J. Mark, L. L. Munn, R. K. Jain, *Science* **2002**, *296*, 1883-1886
- [20] H. Kobayashi, R. Watanabe, P. L. Choyke, *Theranostics* **2013**, *4*, 81-89
- [21] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Research* **1986**, *46*, 6387-6392
- [22] A. T. Florence, *Journal of Controlled Release* **2012**, *164*, 115-124
- [23] F. Marcucci, A. Corti, *Advanced drug delivery reviews* **2012**, *64*, 53-68
- [24] A. Abuchowski, T. van Es, N. C. Palczuk, F. F. Davis, *Journal of Biological Chemistry* **1977**, *252*, 3578-3581
- [25] A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. van Es, F. F. Davis, *Journal of Biological Chemistry* **1977**, *252*, 3582-3586
- [26] S. Jevševar, M. Kunstelj, V. G. Porekar, *Biotechnology Journal* **2010**, *5*, 113-128
- [27] T. M. Allen, A. Chonn, *FEBS Letters* **1987**, *223*, 42-46
- [28] T. M. Allen, *Trends in Pharmacological Sciences* **1994**, *15*, 215-220
- [29] T. M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann, A. Yau-Young, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1991**, *1066*, 29-36
- [30] J. M. Harris, N. E. Martin, M. Modi, *Clinical pharmacokinetics* **2001**, *40*, 539-551
- [31] A. A. Gabizon, *Clinical Cancer Research* **2001**, *7*, 223-225
- [32] Z. Liu, W. Cai, L. He, N. Nakayama, K. Chen, X. Sun, X. Chen, H. Dai, *Nature nanotechnology* **2007**, *2*, 47-52

- [33] S. T. Yang, K. A. Fernando, J. H. Liu, J. Wang, H. F. Sun, Y. Liu, M. Chen, Y. Huang, X. Wang, H. Wang, Y. P. Sun, *Small* **2008**, *4*, 940-944
- [34] D. E. Owens, 3rd, N. A. Peppas, *International journal of pharmaceutics* **2006**, *307*, 93-102
- [35] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nature reviews. Drug discovery* **2003**, *2*, 214-221
- [36] M. T. Peracchia, E. Fattal, D. Desmaële, M. Besnard, J. P. Noël, J. M. Gomis, M. Appel, J. d'Angelo, P. Couvreur, *Journal of Controlled Release* **1999**, *60*, 121-128
- [37] T. Ishida, R. Maeda, M. Ichihara, K. Irimura, H. Kiwada, *Journal of Controlled Release* **2003**, *88*, 35-42
- [38] T. Ishida, H. Kiwada, *International journal of pharmaceutics* **2008**, *354*, 56-62
- [39] A. S. Abu Lila, H. Kiwada, T. Ishida, *Journal of Controlled Release* **2013**, *172*, 38-47
- [40] J. Cui, C. Li, C. Wang, Y. Li, L. Zhang, L. Zhang, H. Yang, *The Journal of pharmacy and pharmacology* **2008**, *60*, 1651-1657
- [41] T. Ishida, K. Atobe, X. Wang, H. Kiwada, *Journal of Controlled Release* **2006**, *115*, 251-258
- [42] P. Laverman, M. G. Carstens, O. C. Boerman, E. Th. M. Dams, W. J. G. Oyen, N. van Rooijen, F. H. M. Corstens, G. Storm, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, *298*, 607-612
- [43] Y. Ma, Q. Yang, L. Wang, X. Zhou, Y. Zhao, Y. Deng, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, *45*, 539-545
- [44] E. Gregory Gregoriadis, D. Neerunjun, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1975**, *65*, 537-544
- [45] A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* **1988**, *55*, 1189-1193
- [46] M. Green, P. M. Loewenstein, *Cell* **1988**, *55*, 1179-1188
- [47] E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 16010-16017
- [48] G. Russell-Jones, K. McTavish, J. McEwan, J. Rice, D. Nowotnik, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2004**, *98*, 1625-1633
- [49] A. R. Hilgenbrink, P. S. Low, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, *94*, 2135-2146
- [50] S. D. Weitman, R. H. Lark, L. R. Coney, D. W. Fort, V. Frasca, V. R. Zurawski, B. A. Kamen, *Cancer Research* **1992**, *52*, 3396-3401
- [51] J. F. Ross, P. K. Chaudhuri, M. Ratnam, *Cancer* **1994**, *73*, 2432-2443
- [52] Y. Lu, P. S. Low, *Advanced drug delivery reviews* **2012**, *64*, Supplement, 342-352
- [53] R. J. Lee, P. S. Low, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 3198-3204
- [54] S. Wang, R. J. Lee, G. Cauchon, D. G. Gorenstein, P. S. Low, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 3318-3322
- [55] J.-P. Borel, A. Randoux, F.-X. Maquart, P. Gillery, C. Le Peuch, G. Bellon, J.-C. Monboisse, *Biochimie dynamique*, De Boeck & Larcier, **1997**
- [56] D. Voet, J. Voet, *Biochimie*, De Boeck, **2005**
- [57] M. de la Fuente, B. Seijo, M. J. Alonso, *Investigative ophthalmology & visual science* **2008**, *49*, 2016-2024
- [58] H. J. Cho, I. S. Yoon, H. Y. Yoon, H. Koo, Y. J. Jin, S. H. Ko, J. S. Shim, K. Kim, I. C. Kwon, D. D. Kim, *Biomaterials* **2012**, *33*, 1190-1200
- [59] H. Y. Yoon, H. Koo, K. Y. Choi, S. J. Lee, K. Kim, I. C. Kwon, J. F. Leary, K. Park, S. H. Yuk, J. H. Park, K. Choi, *Biomaterials* **2012**, *33*, 3980-3989
- [60] A. K. Yadav, P. Mishra, A. K. Mishra, P. Mishra, S. Jain, G. P. Agrawal, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **2007**, *3*, 246-257
- [61] M. He, Z. Zhao, L. Yin, C. Tang, C. Yin, *International journal of pharmaceutics* **2009**, *373*, 165-173
- [62] H. Yamaguchi, A. Harada, *Topics in current chemistry* **2003**, *228*, 237-258

- [63] G. Kohler, C. Milstein, *Nature* **1975**, 256, 495-497
- [64] R. Miller, D. Maloney, J. McKillop, R. Levy, *Blood* **1981**, 58, 78-86
- [65] R. Miller, A. Oseroff, P. Stratte, R. Levy, *Blood* **1983**, 62, 988-995
- [66] K. Sang Jick, P. Youngwoo, H. Hyo Jeong, *Molecules and Cells* **2005**, 20, 17-29
- [67] S. L. Morrison, M. J. Johnson, L. A. Herzenberg, V. T. Oi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1984**, 81, 6851-6855
- [68] P. T. Jones, P. H. Dear, J. Foote, M. S. Neuberger, G. Winter, *Nature* **1986**, 321, 522-525
- [69] G. F. Rowland, G. J. O'Neill, D. A. L. Davies, *Nature* **1975**, 255, 487-488
- [70] J. F. Haeuw, V. Caussanel, A. Beck, *Medecine sciences : M/S* **2009**, 25, 1046-1052
- [71] L. X. Tiefenauer, G. Kuehne, R. Y. Andres, *Bioconjugate Chemistry* **1993**, 4, 347-352
- [72] K. Sokolov, J. Aaron, S. Kumar, V. Mack, T. Collier, L. Coghlan, A. Gillenwater, K. A. Storthz, M. Follen, R. R. Kortum, in *Engineering in Medicine and Biology Society, 2004. IEMBS '04. 26th Annual International Conference of the IEEE, Vol. 2*, **2004**, pp. 5292-5295
- [73] T. Soukka, H. Härmä, J. Paukkunen, T. Lövgren, *Analytical Chemistry* **2001**, 73, 2254-2260
- [74] C. Loo, A. Lowery, N. Halas, J. West, R. Drezek, *Nano letters* **2005**, 5, 709-711
- [75] L. Wang, W. Su, Z. Liu, M. Zhou, S. Chen, Y. Chen, D. Lu, Y. Liu, Y. Fan, Y. Zheng, Z. Han, D. Kong, J. C. Wu, R. Xiang, Z. Li, *Biomaterials* **2012**, 33, 5107-5114
- [76] A. Friedman, S. Claypool, R. Liu, *Current Pharmaceutical Design* **2013**, 19, 6315-6329
- [77] A. D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, *Nature reviews. Drug discovery* **2010**, 9, 537-550
- [78] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, 249, 505-510
- [79] D. Irvine, C. Tuerk, L. Gold, *Journal of Molecular Biology* **1991**, 222, 739-761
- [80] R. Jenison, S. Gill, A. Pardi, B. Polisky, *Science* **1994**, 263, 1425-1429
- [81] H. Sun, X. Zhu, P. Y. Lu, R. R. Rosato, W. Tan, Y. Zu, *Molecular therapy. Nucleic acids* **2014**, 3, e182
- [82] O. C. Farokhzad, J. M. Karp, R. Langer, *Expert opinion on drug delivery* **2006**, 3, 311-324
- [83] O. C. Farokhzad, S. Jon, A. Khademhosseini, T. N. Tran, D. A. Lavan, R. Langer, *Cancer Research* **2004**, 64, 7668-7672
- [84] O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, R. Langer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 6315-6320
- [85] C. Yu, Y. Hu, J. Duan, W. Yuan, C. Wang, H. Xu, X. D. Yang, *PloS one* **2011**, 6, e24077
- [86] A. Aravind, P. Jeyamohan, R. Nair, S. Veerananarayanan, Y. Nagaoka, Y. Yoshida, T. Maekawa, D. S. Kumar, *Biotechnology and bioengineering* **2012**, 109, 2920-2931
- [87] S. Dhar, F. X. Gu, R. Langer, O. C. Farokhzad, S. J. Lippard, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, 105, 17356-17361
- [88] Y. Wu, K. Sefah, H. Liu, R. Wang, W. Tan, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107, 5-10
- [89] W. Xu, I. A. Siddiqui, M. Nihal, S. Pilla, K. Rosenthal, H. Mukhtar, S. Gong, *Biomaterials* **2013**, 34, 5244-5253
- [90] S. H. Jalalian, S. M. Taghdisi, N. Shahidi Hamedani, S. A. Kalat, P. Lavaee, M. Zandkarimi, N. Ghows, M. R. Jaafari, S. Naghibi, N. M. Danesh, M. Ramezani, K. Abnous, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2013**, 50, 191-197
- [91] A. Z. Wang, V. Bagalkot, C. C. Vasilliou, F. Gu, F. Alexis, L. Zhang, M. Shaikh, K. Yuet, M. J. Cima, R. Langer, P. W. Kantoff, N. H. Bander, S. Jon, O. C. Farokhzad, *ChemMedChem* **2008**, 3, 1311-1315

- [92] D. Kim, Y. Y. Jeong, S. Jon, *ACS nano* **2010**, *4*, 3689-3696
- [93] D. J. Javier, N. Nitin, M. Levy, A. Ellington, R. Richards-Kortum, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 1309-1312
- [94] H. Ghazarian, B. Itoni, S. B. Oppenheimer, *Acta histochemica* **2011**, *113*, 236-247
- [95] S. I. van Kasteren, S. J. Campbell, S. Serres, D. C. Anthony, N. R. Sibson, B. G. Davis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 18-23
- [96] Y. Ohya, H. Oue, K. Nagatomi, T. Ouchi, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 927-933
- [97] C.-S. Cho, A. Kobayashi, R. Takei, T. Ishihara, A. Maruyama, T. Akaike, *Biomaterials* **2000**, *22*, 45-51
- [98] R. Kikkeri, B. Lepenies, A. Adibekian, P. Laurino, P. H. Seeberger, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 2110-2112
- [99] T. R. Daniels, T. Delgado, J. A. Rodriguez, G. Helguera, M. L. Penichet, *Clinical immunology* **2006**, *121*, 144-158
- [100] Z. Cheng, A. Al Zaki, J. Z. Hui, V. R. Muzykantov, A. Tsourkas, *Science* **2012**, *338*, 903-910
- [101] R. van der Meel, L. J. Vehmeijer, R. J. Kok, G. Storm, E. V. van Gaal, *Advanced drug delivery reviews* **2013**, *65*, 1284-1298
- [102] T. R. Daniels, E. Bernabeu, J. A. Rodriguez, S. Patel, M. Kozman, D. A. Chiappetta, E. Holler, J. Y. Ljubimova, G. Helguera, M. L. Penichet, *Biochimica et biophysica acta* **2012**, *1820*, 291-317
- [103] R. Pasqualini, E. Ruoslahti, *Nature* **1996**, *380*, 364-366
- [104] H. Benachour, A. Sève, T. Bastogne, C. Frochot, R. Vanderesse, J. Jasniewski, I. Miladi, C. Billotey, O. Tillement, F. Lux, M. Barberi-Heyob, *Theranostics* **2012**, *2*, 889-904
- [105] P. Laakkonen, K. Porkka, J. A. Hoffman, E. Ruoslahti, *Nature medicine* **2002**, *8*, 751-755
- [106] V. Fogal, L. Zhang, S. Krajewski, E. Ruoslahti, *Cancer Research* **2008**, *68*, 7210-7218
- [107] G. Luo, X. Yu, C. Jin, F. Yang, D. Fu, J. Long, J. Xu, C. Zhan, W. Lu, *International journal of pharmaceutics* **2010**, *385*, 150-156
- [108] Z. Yan, F. Wang, Z. Wen, C. Zhan, L. Feng, Y. Liu, X. Wei, C. Xie, W. Lu, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2012**, *157*, 118-125
- [109] S. Valetti, F. Maione, S. Mura, B. Stella, D. Desmaele, M. Noiray, J. Vergnaud, C. Vauthier, L. Cattel, E. Giraudo, P. Couvreur, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2014**, *192*, 29-39
- [110] J. A. Joyce, P. Laakkonen, M. Bernasconi, G. Bergers, E. Ruoslahti, D. Hanahan, *Cancer cell* **2003**, *4*, 393-403
- [111] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson, *Science* **2009**, *324*, 1029-1033
- [112] F. Li, H. Wu, H. Zhang, F. Li, C.-h. Gu, Q. Yang, *Carbohydrate Polymers* **2009**, *77*, 773-778
- [113] S. Yu, G. Wu, X. Gu, J. Wang, Y. Wang, H. Gao, J. Ma, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *103*, 15-22
- [114] R. Liu, D. Li, B. He, X. Xu, M. Sheng, Y. Lai, G. Wang, Z. Gu, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2011**, *152*, 49-56
- [115] K. Na, E. Seong Lee, Y. H. Bae, *Journal of Controlled Release* **2003**, *87*, 3-13
- [116] J. Z. Du, X. J. Du, C. Q. Mao, J. Wang, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 17560-17563
- [117] K. T. Oh, H. Yin, E. S. Lee, Y. H. Bae, *Journal of Materials Chemistry* **2007**, *17*, 3987-4001
- [118] V. A. Sethuraman, M. C. Lee, Y. H. Bae, *Pharmaceutical research* **2008**, *25*, 657-666

- [119] J. Gu, W. P. Cheng, J. Liu, S. Y. Lo, D. Smith, X. Qu, Z. Yang, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 255-262
- [120] R. M. Sawant, J. P. Hurley, S. Salmaso, A. Kale, E. Tolcheva, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin, *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 943-949
- [121] M. Egeblad, Z. Werb, *Nature reviews. Cancer* **2002**, *2*, 161-174
- [122] E. S. Olson, T. Jiang, T. A. Aguilera, Q. T. Nguyen, L. G. Ellies, M. Scadeng, R. Y. Tsien, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 4311-4316
- [123] *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 6335-6335
- [124] S. Lee, J. H. Ryu, K. Park, A. Lee, S. Y. Lee, I. C. Youn, C. H. Ahn, S. M. Yoon, S. J. Myung, D. H. Moon, X. Chen, K. Choi, I. C. Kwon, K. Kim, *Nano letters* **2009**, *9*, 4412-4416
- [125] T. J. Harris, G. von Maltzahn, M. E. Lord, J. H. Park, A. Agrawal, D. H. Min, M. J. Sailor, S. N. Bhatia, *Small* **2008**, *4*, 1307-1312
- [126] T. Gerhardt, H. Gerhardt, *Progrès en Urologie* **1993**, *3*, 385-392
- [127] D. Kerboeuf, M. Riou, *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France* **2011**, 257-264
- [128] M. F. Ullah, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **2008**, *9*, 1-6
- [129] Z. J. Li, C. H. Cho, *Journal of translational medicine* **2012**, *10 Suppl 1*, S1
- [130] I. Saiki, J. Murata, K. Matsuno, R. Ogawa, N. Nishi, S. Tokura, I. Azuma, *Cancer Science* **1990**, *81*, 660-667
- [131] M. A. Buerkle, S. A. Pahernik, A. Sutter, A. Jonczyk, K. Messmer, M. Dellian, *British journal of cancer* **2002**, *86*, 788-795
- [132] M. Humphries, K. Olden, K. Yamada, *Science* **1986**, *233*, 467-470
- [133] N. Oku, Y. Tokudome, C. Koike, N. Nishikawa, H. Mori, I. Saiki, S. Okada, *Life Sciences* **1996**, *58*, 2263-2270
- [134] E. A. Murphy, B. K. Majeti, L. A. Barnes, M. Makale, S. M. Weis, K. Lutu-Fuga, W. Wrasidlo, D. A. Cheresch, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 9343-9348
- [135] S. D. Steichen, M. Caldorera-Moore, N. A. Peppas, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2012**, *48*, 416-427
- [136] A. D. Bangham, R. W. Horne, *Journal of Molecular Biology* **1964**, *8*, 660-668
- [137] Y. Barenholz, *Journal of Controlled Release* **2012**, *160*, 117-134
- [138] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, *Journal of Colloid Science and Biotechnology* **2012**, *1*, 147-168
- [139] E. Mabrouk, D. Cuvelier, F. Brochard-Wyart, M.-H. Li, P. Nassoy, *Images de la physique* **2009**, 18-26
- [140] P. Severino, T. Andreani, A. S. Macedo, J. F. Fangueiro, M. H. Santana, A. M. Silva, E. B. Souto, *Journal of drug delivery* **2012**, *2012*, 750891
- [141] R. H. Müller, K. Mäder, S. Gohla, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, *50*, 161-177
- [142] S. Das, A. Chaudhury, *AAPS PharmSciTech* **2011**, *12*, 62-76
- [143] W. Mehnert, K. Mäder, *Advanced drug delivery reviews* **2001**, *47*, 165-196
- [144] S. Sultana, M. R. Khan, M. Kumar, S. Kumar, M. Ali, *Journal of drug targeting* **2013**, *21*, 107-125
- [145] U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chemical Society reviews* **2004**, *33*, 43-63
- [146] S. Naahidi, M. Jafari, F. Edalat, K. Raymond, A. Khademhosseini, P. Chen, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2013**, *166*, 182-194

- [147] L. S. Nair, C. T. Laurencin, *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 762-798
- [148] P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, P. Speiser, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1979**, *68*, 1521-1524
- [149] P. Couvreur, B. Kante, L. Grislain, M. Roland, P. Speiser, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1982**, *71*, 790-792
- [150] A. C. de Verdière, C. Dubernet, F. Némati, E. Soma, M. Appel, J. Ferté, S. Bernard, F. Puisieux, P. Couvreur, *British journal of cancer* **1997**, *76*, 198-205
- [151] C. Vauthier, *Journal of Controlled Release* **2003**, *93*, 151-160
- [152] E. Garcia-Garcia, K. Andrieux, S. Gil, P. Couvreur, *International journal of pharmaceutics* **2005**, *298*, 274-292
- [153] C. Vauthier, C. Dubernet, E. Fattal, H. Pinto-Alphandary, P. Couvreur, *Advanced drug delivery reviews* **2003**, *55*, 519-548
- [154] M. Rinaudo, *Progress in Polymer Science* **2006**, *31*, 603-632
- [155] D. L. Tran, G. D. Pham, X. P. Nguyen, D. H. Vu, N. T. Nguyen, V. H. Tran, T. T. T. Mai, H. B. Nguyen, Q. D. Le, T. N. Nguyen, T. C. Ba, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **2011**, *2*, 045004
- [156] P. He, S. S. Davis, L. Illum, *International journal of pharmaceutics* **1998**, *166*, 75-88
- [157] A. Rampino, M. Borgogna, P. Blasi, B. Bellich, A. Cesaro, *International journal of pharmaceutics* **2013**, *455*, 219-228
- [158] A. M. De Campos, A. Sánchez, M. a. J. Alonso, *International journal of pharmaceutics* **2001**, *224*, 159-168
- [159] S. Mitra, U. Gaur, P. C. Ghosh, A. N. Maitra, *Journal of Controlled Release* **2001**, *74*, 317-323
- [160] J. H. Kim, Y. S. Kim, S. Kim, J. H. Park, K. Kim, K. Choi, H. Chung, S. Y. Jeong, R. W. Park, I. S. Kim, I. C. Kwon, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2006**, *111*, 228-234
- [161] H. Y. Hwang, I. S. Kim, I. C. Kwon, Y. H. Kim, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2008**, *128*, 23-31
- [162] J. H. Kim, Y. S. Kim, K. Park, E. Kang, S. Lee, H. Y. Nam, K. Kim, J. H. Park, D. Y. Chi, R. W. Park, I. S. Kim, K. Choi, I. Chan Kwon, *Biomaterials* **2008**, *29*, 1920-1930
- [163] J. H. Kim, Y. S. Kim, K. Park, S. Lee, H. Y. Nam, K. H. Min, H. G. Jo, J. H. Park, K. Choi, S. Y. Jeong, R. W. Park, I. S. Kim, K. Kim, I. C. Kwon, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2008**, *127*, 41-49
- [164] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Préat, *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*, 505-522
- [165] R. K. Kulkarni, K. C. Pani, C. C. Neuman, F. F. Leonard, *Archives of Surgery* **1966**, *93*, 839-843
- [166] E. E. Schmitt, R. A. Polistina, US Patent n°3297033, *Surgical sutures*, **1967**
- [167] S. Vainionpää, P. Rokkanen, P. Törmälä, *Progress in Polymer Science* **1989**, *14*, 679-716
- [168] C. C. Versfelt, D. Wasserman, US Patent n°3839297, *Use of stannous octoate catalyst in the manufacture of l(-)lactide-glycolide copolymer sutures*, **1974**
- [169] P. Kocbek, N. Obermajer, M. Cegnar, J. Kos, J. Kristl, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2007**, *120*, 18-26
- [170] E. C. Gryparis, M. Hatziapostolou, E. Papadimitriou, K. Avgoustakis, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **2007**, *67*, 1-8
- [171] L. Amann, M. Gandal, R. Lin, Y. Liang, S. Siegel, *Pharmaceutical research* **2010**, *27*, 1730-1737
- [172] M. C. Daniel, D. Astruc, *Chemical reviews* **2004**, *104*, 293-346

- [173] A. Llevot, D. Astruc, *Chemical Society reviews* **2012**, *41*, 242-257
- [174] K. C. Black, Y. Wang, H. P. Luehmann, X. Cai, W. Xing, B. Pang, Y. Zhao, C. S. Cutler, L. V. Wang, Y. Liu, Y. Xia, *ACS nano* **2014**, *8*, 4385-4394
- [175] S. Link, M. A. El-Sayed, *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 4212-4217
- [176] I. H. El-Sayed, X. Huang, M. A. El-Sayed, *Nano letters* **2005**, *5*, 829-834
- [177] K. Sokolov, M. Follen, J. Aaron, I. Pavlova, A. Malpica, R. Lotan, R. Richards-Kortum, *Cancer Research* **2003**, *63*, 1999-2004
- [178] E. Prodan, C. Radloff, N. J. Halas, P. Nordlander, *Science* **2003**, *302*, 419-422
- [179] L. R. Hirsch, R. J. Stafford, J. A. Bankson, S. R. Sershen, B. Rivera, R. E. Price, J. D. Hazle, N. J. Halas, J. L. West, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 13549-13554
- [180] J. H. Maeng, D. H. Lee, K. H. Jung, Y. H. Bae, I. S. Park, S. Jeong, Y. S. Jeon, C. K. Shim, W. Kim, J. Kim, J. Lee, Y. M. Lee, J. H. Kim, W. H. Kim, S. S. Hong, *Biomaterials* **2010**, *31*, 4995-5006
- [181] S. Laurent, S. Dutz, U. O. Hafeli, M. Mahmoudi, *Advances in colloid and interface science* **2011**, *166*, 8-23
- [182] W. R. Algar, A. J. Tavares, U. J. Krull, *Analytica Chimica Acta* **2010**, *673*, 1-25
- [183] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, H. Mattoussi, *Nature materials* **2005**, *4*, 435-446
- [184] K.-T. Yong, W.-C. Law, I. Roy, Z. Jing, H. Huang, M. T. Swihart, P. N. Prasad, *Journal of Biophotonics* **2011**, *4*, 9-20
- [185] N. Chen, Y. He, Y. Su, X. Li, Q. Huang, H. Wang, X. Zhang, R. Tai, C. Fan, *Biomaterials* **2012**, *33*, 1238-1244
- [186] F. Aldeek, *Synthèse et fonctionnalisation de nanocristaux fluorescents (Quantum Dots) pour l'imagerie et la caractérisation des propriétés hydrophobes/hydrophiles de biofilms bactériens*, **2010**
- [187] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nature methods* **2008**, *5*, 763-775
- [188] W. C. W. Chan, D. J. Maxwell, X. Gao, R. E. Bailey, M. Han, S. Nie, *Current opinion in biotechnology* **2002**, *13*, 40-46
- [189] F. R. Verbeek, S. Troyan, J. S. Mieog, G.-J. Liefers, L. Moffitt, M. Rosenberg, J. Hirshfield-Bartek, S. Gioux, C. H. van de Velde, A. Vahrmeijer, J. Frangioni, *Breast Cancer Res Treat* **2014**, *143*, 333-342
- [190] S. A. Soper, Q. L. Mattingly, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 3744-3752
- [191] L. V. Raduškevič, V. M. Luk'janovič, *Žurnal fizičeskoj chimii* **1952**, *26*, 88-95
- [192] S. Iijima, T. Ichihashi, *Nature* **1993**, *363*, 603-605
- [193] D. S. Bethune, C. H. Klang, M. S. de Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, R. Beyers, *Nature* **1993**, *363*, 605-607
- [194] S. Iijima, *Nature* **1991**, *354*, 56-58
- [195] K. Sanderson, *Nature* **2008**
- [196] C. M. Sayes, F. Liang, J. L. Hudson, J. Mendez, W. Guo, J. M. Beach, V. C. Moore, C. D. Doyle, J. L. West, W. E. Billups, K. D. Ausman, V. L. Colvin, *Toxicology Letters* **2006**, *161*, 135-142
- [197] H. Dumortier, S. Lacotte, G. Pastorin, R. Marega, W. Wu, D. Bonifazi, J.-P. Briand, M. Prato, S. Muller, A. Bianco, *Nano letters* **2006**, *6*, 1522-1528
- [198] D. Pantarotto, R. Singh, D. McCarthy, M. Erhardt, J.-P. Briand, M. Prato, K. Kostarelos, A. Bianco, *Angewandte Chemie* **2004**, *116*, 5354-5358
- [199] S. Jain, V. S. Thakare, M. Das, C. Godugu, A. K. Jain, R. Mathur, K. Chuttani, A. K. Mishra, *Chemical Research in Toxicology* **2011**, *24*, 2028-2039

- [200] H. Ali-Boucetta, K. T. Al-Jamal, K. H. Müller, S. Li, A. E. Porter, A. Eddaoudi, M. Prato, A. Bianco, K. Kostarelos, *Small* **2011**, *7*, 3230-3238
- [201] K. Kostarelos, A. Bianco, M. Prato, *Nature nanotechnology* **2009**, *4*, 627-633
- [202] S. Marchesan, K. Kostarelos, A. Bianco, M. Prato, *Materials Today* **2015**, *18*, 12-19
- [203] Y. D. Kuang, X. Q. He, *Composites Science and Technology* **2009**, *69*, 169-175
- [204] K. Pulskamp, S. Diabaté, H. F. Krug, *Toxicology Letters* **2007**, *168*, 58-74
- [205] V. E. Kagan, Y. Y. Tyurina, V. A. Tyurin, N. V. Konduru, A. I. Potapovich, A. N. Osipov, E. R. Kisin, D. Schwegler-Berry, R. Mercer, V. Castranova, A. A. Shvedova, *Toxicology Letters* **2006**, *165*, 88-100
- [206] H. Ali-Boucetta, A. Nunes, R. Sainz, M. A. Herrero, B. Tian, M. Prato, A. Bianco, K. Kostarelos, *Angewandte Chemie* **2013**, *125*, 2330-2334
- [207] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, *Journal of Controlled Release* **2011**, *151*, 220-228
- [208] S. K. Vashist, D. Zheng, G. Pastorin, K. Al-Rubeaan, J. H. T. Luong, F.-S. Sheu, *Carbon* **2011**, *49*, 4077-4097
- [209] D. A. Heller, S. Baik, T. E. Eurell, M. S. Strano, *Advanced Materials* **2005**, *17*, 2793-2799
- [210] C. Zavaleta, A. de la Zerda, Z. Liu, S. Keren, Z. Cheng, M. Schipper, X. Chen, H. Dai, S. S. Gambhir, *Nano letters* **2008**, *8*, 2800-2805
- [211] A. De La Zerda, C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaithilingam, S. Bodapati, Z. Liu, J. Levi, B. R. Smith, T.-J. Ma, O. Oralkan, Z. Cheng, X. Chen, H. Dai, B. T. Khuri-Yakub, S. S. Gambhir, *Nature nanotechnology* **2008**, *3*, 557-562
- [212] P. Dumy, I. M. Eggleston, S. Cervigni, U. Sila, X. Sun, M. Mutter, *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 1255-1258
- [213] L. Sancey, E. Garanger, S. Foillard, G. Schoehn, A. Hurbin, C. Albiges-Rizo, D. Boturyn, C. Souchier, A. Grichine, P. Dumy, J. L. Coll, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2009**, *17*, 837-843
- [214] P. Brooks, R. Clark, D. Cheresch, *Science* **1994**, *264*, 569-571
- [215] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30-33
- [216] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Letters* **1991**, *291*, 50-54
- [217] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 3033-3040
- [218] J. P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151-155
- [219] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 7461-7472
- [220] D. Thakar, L. Coche-Guerente, M. Claron, C. H. Wenk, J. Dejeu, P. Dumy, P. Labbe, D. Boturyn, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2014**, *15*, 377-381
- [221] L. Sandrin, L. Coche-Guerente, A. Bernstein, H. Basit, P. Labbe, P. Dumy, D. Boturyn, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 1531-1534
- [222] S. K. Misra, P. Kondaiah, S. Bhattacharya, D. Boturyn, P. Dumy, *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2*, 5758-5767
- [223] M. Claron, *Synthèse de vecteurs peptidiques non-viraux : vectorisation et ciblage tumoral*, **2013**
- [224] M. Galibert, Z. H. Jin, T. Furukawa, T. Fukumura, T. Saga, Y. Fujibayashi, P. Dumy, D. Boturyn, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2010**, *20*, 5422-5425
- [225] Z. H. Jin, T. Furukawa, M. Galibert, D. Boturyn, J. L. Coll, T. Fukumura, T. Saga, P. Dumy, Y. Fujibayashi, *Nuclear medicine and biology* **2011**, *38*, 529-540

- [226] Z. H. Jin, T. Furukawa, M. Claron, D. Boturyn, J. L. Coll, T. Fukumura, Y. Fujibayashi, P. Dumy, T. Saga, *Angiogenesis* **2012**, *15*, 569-580
- [227] Z. H. Jin, T. Furukawa, C. Sogawa, M. Claron, W. Aung, A. B. Tsuji, H. Wakizaka, M. R. Zhang, D. Boturyn, P. Dumy, Y. Fujibayashi, T. Saga, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **2014**, *86*, 478-486
- [228] C. H. Wenk, F. Ponce, S. Guillermet, C. Tenaud, D. Boturyn, P. Dumy, D. Watrelot-Virieux, C. Carozzo, V. Josserand, J. L. Coll, *Cancer Lett* **2013**, *334*, 188-195
- [229] S. Ulrich, D. Boturyn, A. Marra, O. Renaudet, P. Dumy, *Chemistry* **2014**, *20*, 34-41
- [230] S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn, P. Dumy, *The Journal of organic chemistry* **2008**, *73*, 983-991
- [231] A. Hautanen, J. Gailit, D. M. Mann, E. Ruoslahti, *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 1437-1442
- [232] H. E. Grotjan, E. Steinberger, *Computers in Biology and Medicine* **1977**, *7*, 159-163
- [233] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 14922-14933
- [234] H. Kubas, M. Schafer, U. Bauder-Wust, M. Eder, D. Oltmanns, U. Haberkorn, W. Mier, M. Eisenhut, *Nuclear medicine and biology* **2010**, *37*, 885-891
- [235] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *The Journal of organic chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064
- [236] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie* **2002**, *41*, 2596-2599
- [237] M. F. Debets, S. S. van Berkel, J. Dommerholt, A. T. Dirks, F. P. Rutjes, F. L. van Delft, *Accounts of chemical research* **2011**, *44*, 805-815
- [238] H. Staudinger, J. Meyer, *Helvetica Chimica Acta* **1919**, *2*, 635-646
- [239] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Organic letters* **2000**, *2*, 2141-2143
- [240] T. P. King, S. W. Zhao, T. Lam, *Biochemistry* **1986**, *25*, 5774-5779
- [241] K. Rose, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 30-33
- [242] J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angewandte Chemie* **2006**, *45*, 1248-1252
- [243] F. M. Veronese, *Biomaterials* **2001**, *22*, 405-417
- [244] A. Dondoni, *Angewandte Chemie* **2008**, *47*, 8995-8997
- [245] T. Posner, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1905**, *38*, 646-657
- [246] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779
- [247] S. B. Kent, *Chemical Society reviews* **2009**, *38*, 338-351
- [248] A. Tam, U. Arnold, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 12670-12671
- [249] V. Aucagne, I. E. Valverde, P. Marceau, M. Galibert, N. Dendane, A. F. Delmas, *Angewandte Chemie* **2012**, *51*, 11320-11324
- [250] I. E. Valverde, F. Lecaille, G. Lalmanach, V. Aucagne, A. F. Delmas, *Angewandte Chemie* **2012**, *51*, 718-722
- [251] C. Grandjean, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *Chemistry* **2001**, *7*, 230-239
- [252] A. T. Dickschat, F. Behrends, M. Buhner, J. Ren, M. Weiss, H. Eckert, A. Studer, *Chemistry* **2012**, *18*, 16689-16697
- [253] C. A. DeForest, B. D. Polizzotti, K. S. Anseth, *Nature materials* **2009**, *8*, 659-664
- [254] C. A. DeForest, K. S. Anseth, *Nature chemistry* **2011**, *3*, 925-931
- [255] H. Su, J. Zheng, Z. Wang, F. Lin, X. Feng, X.-H. Dong, M. L. Becker, S. Z. D. Cheng, W.-B. Zhang, Y. Li, *ACS Macro Letters* **2013**, *2*, 645-650
- [256] D. M. Beal, V. E. Albrow, G. Burslem, L. Hitchen, C. Fernandes, C. Laphorn, L. R. Roberts, M. D. Selby, L. H. Jones, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10*, 548-554

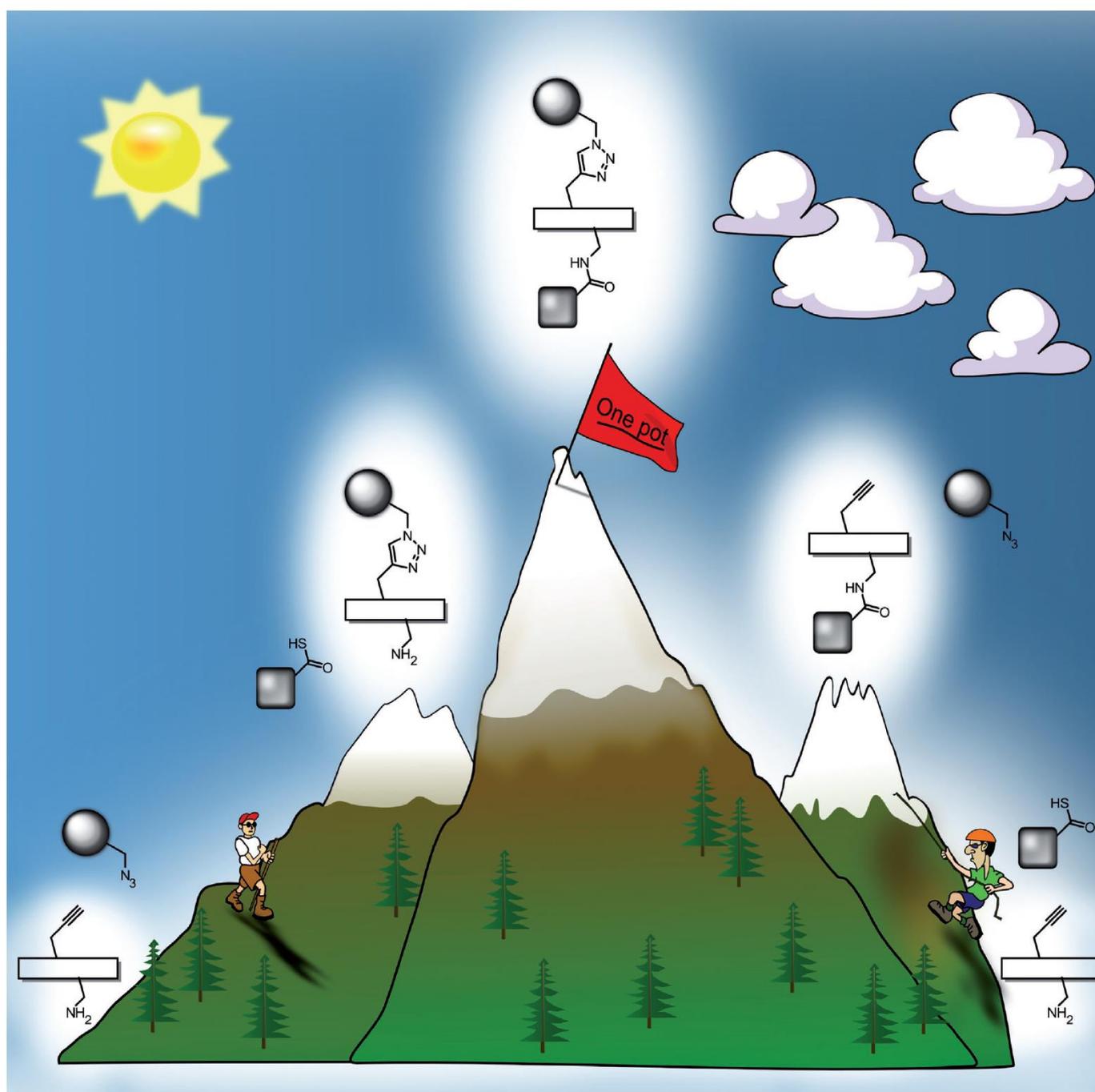
- [257] S. Arumugam, V. V. Popik, *The Journal of organic chemistry* **2014**, 79, 2702-2708
- [258] B. Ditmangklo, C. Boonlua, C. Suparpprom, T. Vilaivan, *Bioconjugate Chemistry* **2013**, 24, 614-625
- [259] M. Galibert, P. Dumy, D. Boturyn, *Angewandte Chemie* **2009**, 48, 2576-2579
- [260] M. Galibert, O. Renaudet, P. Dumy, D. Boturyn, *Angewandte Chemie* **2011**, 50, 1901-1904
- [261] R. Huisgen, *Angewandte Chemie* **1963**, 2, 565-598
- [262] M. Meldal, C. W. Tornoe, *Chemical reviews* **2008**, 108, 2952-3015
- [263] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Organic letters* **2004**, 6, 2853-2855
- [264] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angewandte Chemie* **2009**, 48, 9879-9883
- [265] S. M. Mali, S. V. Jadhav, H. N. Gopi, *Chemical communications* **2012**, 48, 7085-7087
- [266] J. Blake, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1981**, 17, 273-274
- [267] J. Blake, C. H. Li, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1981**, 78, 4055-4058
- [268] J. Blake, C. H. Li, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1983**, 80, 1556-1559
- [269] J. Blake, M. Westphal, C. H. Li, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1984**, 24, 498-504
- [270] J. Blake, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1986**, 27, 191-200
- [271] J. Blake, D. Yamashiro, K. Ramasharma, C. H. Li, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1986**, 28, 468-476
- [272] S. M. Mali, R. D. Bhaire, H. N. Gopi, *The Journal of organic chemistry* **2013**, 78, 5550-5555
- [273] N. Shangguan, S. Katukojvala, R. Greenberg, L. J. Williams, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 7754-7755
- [274] D. Desmaele, R. Gref, P. Couvreur, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2012**, 161, 609-618
- [275] F. Dosio, L. H. Reddy, A. Ferrero, B. Stella, L. Cattel, P. Couvreur, *Bioconjugate Chemistry* **2010**, 21, 1349-1361
- [276] A. Maksimenko, J. Mougin, S. Mura, E. Sliwinski, E. Lepeltier, C. Bourgaux, S. Lepetre, F. Zouhiri, D. Desmaele, P. Couvreur, *Cancer Lett* **2013**, 334, 346-353
- [277] S. Rejiba, L. H. Reddy, C. Bigand, C. Parmentier, P. Couvreur, A. Hajri, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **2011**, 7, 841-849
- [278] L. H. Reddy, H. Khoury, A. Paci, A. Deroussent, H. Ferreira, C. Dubernet, X. Decleves, M. Besnard, H. Chacun, S. Lepetre-Mouelhi, D. Desmaele, B. Rousseau, C. Laugier, J. C. Cintrat, G. Vassal, P. Couvreur, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2008**, 36, 1570-1577
- [279] A. Maksimenko, J. Caron, J. Mougin, D. Desmaele, P. Couvreur, *International journal of pharmaceutics* **2015**, 482, 38-46
- [280] M. Ceruti, G. Balliano, F. Viola, G. Grosa, F. Rocco, L. Cattel, *Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, 35, 3050-3058
- [281] J. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* **1998**, 31, 5559-5562
- [282] A. Favier, F. D'Agosto, M.-T. Charreyre, C. Pichot, *Polymer* **2004**, 45, 7821-7830
- [283] A. Favier, M.-T. Charreyre, P. Chaumont, C. Pichot, *Macromolecules* **2002**, 35, 8271-8280

- [284] P. Religio, M. Bathfield, Z. Haftek-Terreau, M. Beija, A. Favier, M.-J. Giraud-Panis, F. D'Agosto, B. Mandrand, J. P. S. Farinha, M.-T. Charreyre, J. M. G. Martinho, *Polymer Chemistry* **2013**, *4*, 2968-2981
- [285] C. Cepraga, T. Gallavardin, S. Marotte, P.-H. Lanoë, J.-C. Mulatier, F. Lerouge, S. Parola, M. Lindgren, P. L. Baldeck, J. Marvel, O. Maury, C. Monnereau, A. Favier, C. Andraud, Y. Leverrier, M.-T. Charreyre, *Polymer Chemistry* **2013**, *4*, 61-67
- [286] S. Adjili, A. Favier, J. Massin, Y. Bretonnière, W. Lacour, Y.-C. Lin, E. Chatre, C. Place, C. Favard, D. Muriaux, C. Andraud, M.-T. Charreyre, *RSC Advances* **2014**, *4*, 15569-15578
- [287] B. Karagoz, L. Esser, H. T. Duong, J. S. Basuki, C. Boyer, T. P. Davis, *Polymer Chemistry* **2014**, *5*, 350-355

# **ANNEXES**

## Click Chemistry

## Biomolecular Assemblies Combining Two Orthogonal Copper-Mediated Ligations in a One-Pot Reaction

Adrien Grassin, Michaël Claron, and Didier Boturyn\*<sup>[a]</sup>

**Abstract:** The access to multifunctional biomolecular compounds involves multistep reactions usually with a complicated protection scheme and lengthy separation processes. The development of a strategy combining several orthogonal ligations is highly desirable. Herein, we introduce a new method that involves two orthogonal copper-mediated ligations of azide with alkyne, and amine with thioacid. We established compatible conditions to carry out molecular assemblies of three different chemical components in a single one-pot reaction. The effectiveness of the method was demonstrated in the synthesis of biomolecular compounds that are known to target tumor tissue. The simple reaction conditions suggest that this strategy of combining several orthogonal ligations could have wide potential for the chemical synthesis of complex macromolecules.

Advances in biomolecular assemblies are essential to construct macromolecules encompassing several biorelevant functions. The major barriers to the chemical synthesis of these systems result from their high molecular weight and from the tricky purification of their intermediates. Although the use of orthogonal “click” reactions has proved to be particularly useful,<sup>[1]</sup> the subject remains topical. In this regard, the copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition (CuAAC)<sup>[2]</sup> is extensively exploited to prepare a wide range of macromolecules.<sup>[3]</sup> To increase access to sophisticated architecture, synthetic methodologies were successfully improved using sequential orthogonal click reactions.<sup>[4]</sup> Inherent limitations of these methods include a lengthy separation process and purification of the intermediates, providing low yields. Alternatively, one-pot approaches combining the CuAAC with Diels-Alder reactions,<sup>[5]</sup> the oxime ligation,<sup>[6]</sup> or the native chemical ligation (NCL),<sup>[7]</sup> provided efficient and rapid syntheses of biomolecular compounds without intervening isolations. Ideally, these methods require compatible conditions with both reactions. Recently, a thioacid-mediated amide-bond formation involving copper(II) as catalyst was developed and used for the synthesis of peptide derivatives.<sup>[8]</sup> Previous work showed that other metal ions such as mercurous and silver ions can promote the thioacid-mediated amide bond formation.<sup>[9]</sup> For instance, this method was used to prepare relevant proteins.<sup>[10]</sup> The limitation of this reaction is that no competing nucleophile such as an additional amino group within the compound is permitted, whereas other nucleophiles such as alcohol and thiol were found to be unreactive toward thioacid.<sup>[11]</sup>

During our continuing work in developing sophisticated macromolecules,<sup>[6]</sup> we decided to exploit this feature to devel-

op a novel strategy combining this chemistry with CuAAC. To date, only a few reports describe the combination of Cu<sup>I</sup>- and Cu<sup>II</sup>-assisted reactions. For example, syntheses of neoglycopeptides were performed using a Cu<sup>II</sup>-triggered aminolysis of peptide hydrazide resin and CuAAC.<sup>[12]</sup>

Herein, we describe a novel chemical procedure exploiting a Cu<sup>II</sup>/Cu<sup>I</sup> pair to access one-pot molecular assemblies through amide bond formation and CuAAC. To illustrate this strategy, we decided to synthesize bifunctional Arg-Gly-Asp (RGD)-containing biomolecular compounds that are known to specifically target tumor tissue through the  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin receptor. These macromolecules are composed of a cyclodecapeptide scaffold endowed with a cluster of four RGD units and a lysin residue devoted to a supplementary function (cancer monitoring, drug delivery, anchoring device; see Figure 1). Very recently, the benefit of these compounds encompassing a near-infrared fluorophore was demonstrated for optical guided surgery of tumors in cats.<sup>[13]</sup>

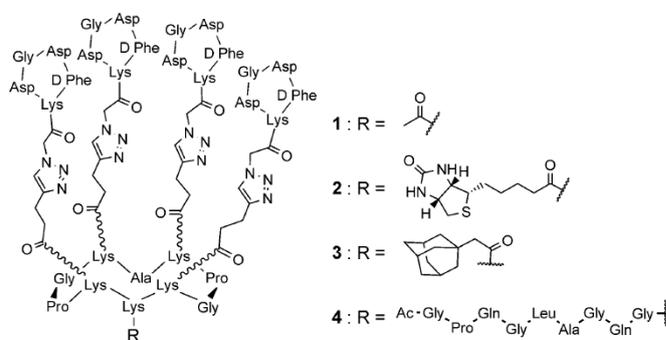


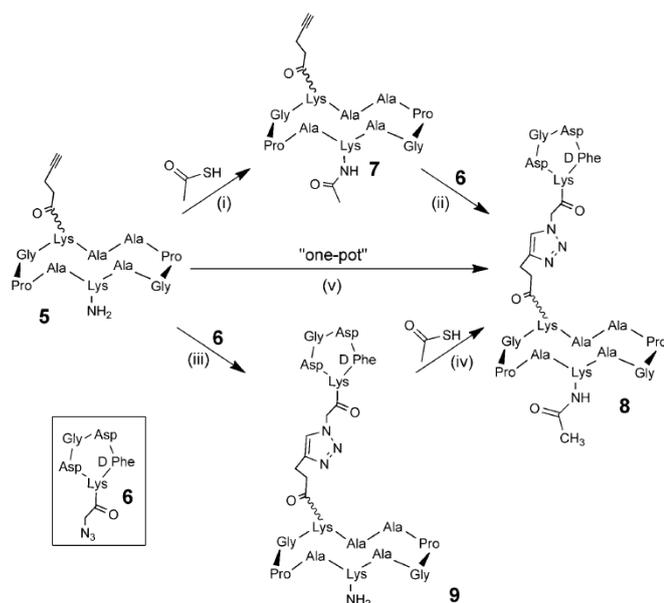
Figure 1. Structure of the RGD-containing biomolecular system.

We first turned our attention to the suitable conditions required for the one-pot reaction. For this purpose, we chose to prepare model cyclopeptide **5** bearing the prerequisite alkyne and amino functions, and cyclic RGD peptide **6** containing the azide group (Scheme 1). Syntheses were carried out through a combination of solid and solution-phase syntheses.<sup>[6a]</sup> The incorporation of building blocks such as N-Fmoc-Lys[CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C≡CH] into growing peptide **5** was preferred, because it reduces the number of steps involved for the synthesis of functionalized cyclodecapeptides, significantly increasing the yields (see the Supporting Information). Peptides were isolated in satisfactory purity to carry out the subsequent chemoselective assembly.

We first examined if the conversion of cyclopeptide **5** through thioacid-mediated amide-bond formation was compatible with CuAAC reaction conditions (Scheme 1i). It is important to note that the use of Cu<sup>I</sup> for the thioacid-mediated amidation gave very low yields.<sup>[8a]</sup> To date, a variety of CuAAC reaction conditions have been reported.<sup>[14]</sup> The most universal conditions are undoubtedly the use of CuSO<sub>4</sub> together with a reducing agent (usually sodium ascorbate), or a copper(II) salt (CuBr or CuOAc) with a reducing agent in order to inhibit aerobic oxidation to Cu<sup>II</sup>. Additionally, water-soluble ligands such as

[a] A. Grassin, Dr. M. Claron, Dr. D. Boturyn  
Univ. Grenoble Alpes, DCM UMR 5250, 38000 Grenoble (France)  
CNRS, DCM UMR 5250, 38000 Grenoble (France)  
Fax: (+33) 4-56-52-08-03  
E-mail: didier.boturyn@ujf-grenoble.fr

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201500293>.



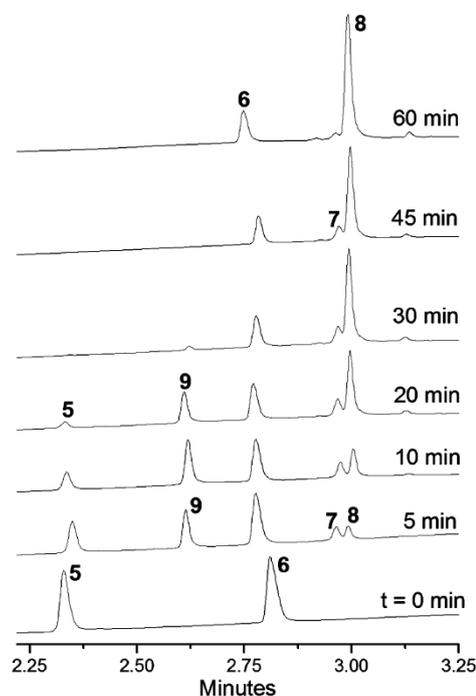
**Scheme 1.** One-pot and sequential chemical assemblies of peptides **5**, **6**, and thioacetic acid. Reagents and conditions for the synthesis of **8**: peptide **5** (1 equiv), Cu<sup>I</sup>OAc (1.1 equiv), THPTA (5 equiv) in DMF/carbonate-buffered solution (30:70, 100 mM, pH 9.2) at 37 °C. Peptide **6** (1.1 equiv) and CH<sub>3</sub>–CO–SH (1.1 equiv) were sequentially (i–ii, iii–iv) or simultaneously added (v).

tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine (THPTA) were developed and were shown to be powerful stabilizing ligands for copper(I), improving the CuAAC reaction rates.<sup>[15]</sup> We therefore selected Cu<sup>I</sup>OAc as copper catalyst for the synthesis of peptide derivative **7**, with or without sodium ascorbate. In parallel, the thioacid mediated amide bond formation using CuSO<sub>4</sub> was also carried out under classical conditions.<sup>[8]</sup> All reactions were carefully monitored by HPLC analyses (see Figures S11–S14 in the Supporting Information).

As expected using CuSO<sub>4</sub>, the desired amide bond formation providing peptide **7** proceeded cleanly within 5 min at 37 °C (see Figure S7 in the Supporting Information). When standard CuAAC conditions were adopted, using Cu<sup>I</sup>OAc (1.1 equiv), sodium ascorbate (5 equiv), and THPTA (5 equiv), the reaction was not quantitative, confirming the requirement of Cu<sup>II</sup> for the thioacid-mediated amide-bond formation (see Figure S9 in the Supporting Information). Interestingly, this reaction was found to be efficient using these conditions in the absence of the reducing agent, with a quantitative conversion of compound **5** over 150 min (see Figure S12 in the Supporting Information). Although there is a stabilizing effect such as a π-acceptor orbital on the THPTA ligand,<sup>[16]</sup> a minor amount of Cu<sup>I</sup> presumably undergoes disproportionation to Cu<sup>0</sup> and Cu<sup>II</sup>. Notwithstanding these conditions, the following CuAAC ligation was carried out by adding cyclopeptide **6** to the reaction mixture, then providing successfully within 20 min the expected conjugate **8** (Scheme 1 ii; Figure S14 in the Supporting Information). This approach permitted the sequential one-pot assembly of three different partners by using the combination of copper-assisted amidation and cycloaddition.

To ensure the versatility of our chemical strategy, a reverse method was performed under the same conditions (Scheme 1 iii, iv; see also Figures S16–S20 in the Supporting Information). Starting with peptide **5**, ligation of cyclopeptide **6** was effectively achieved, affording intermediate **9**. Surprisingly, the subsequent addition of thioacetic acid to the reaction mixture gave compound **8** within 15 min. The thioacid-mediated amide bond formation was found to be slower when the starting material contained an alkyne function. This result was confirmed by using a variant of cyclodecapeptide **5** for which Lys[–CO–(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C≡CH] was replaced with an alanine residue (see Figures S21–S22 in the Supporting Information). We therefore postulated that the formation of copper(I) acetylide from free alkyne and Cu<sup>I</sup><sup>[17]</sup> slows down the rate of the amide bond formation. As expected, we observed the copper(I) acetylide-containing compound by mass spectroscopy (see Figure S43 in the Supporting Information).

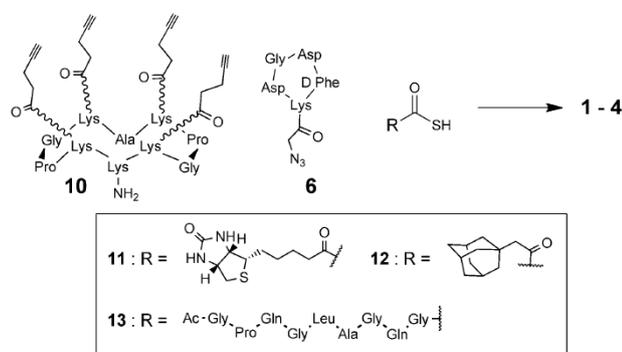
To test whether both reactions are orthogonal, we then performed the biomolecular assembly of compounds **5**, **6**, and thioacetic acid in a single one-pot reaction (Scheme 1 v). As shown in Figure 2, at first the conversion of **5** principally yielded intermediate **9** with a small amount of intermediate **7**. We then observed the rapid reaction of peptide **9** with thioacetic acid within 15 min, producing final compound **8**. The formation of intermediate **7** was found to be negligible during the molecular assemblies, signifying that the one-pot assembly occurs principally through the formation of peptide intermediate **9** (iii–iv in Scheme 1). We definitively point out the influence of copper acetylide species that have a strong effect on the outcome of the reaction. After 1 h, we observed exclusive formation of the expected compound **8**, indicating the com-



**Figure 2.** UPLC traces (214 nm) for the one-pot biomolecular assembly of peptides **5**, **6**, and thioacetic acid.

patibility of the reaction conditions for the CuAAC and copper-mediated amidation. Previously, it has been shown that azide compounds bearing electron-withdrawing functionality can easily react with thioacid in the presence of 2,6-lutidine, whereas heating and long reaction time were necessary for the addition of alkyl azides.<sup>[18]</sup> It is worth noting that we did not observe any reaction between azide derivative **6** and the thioacid function in the presence of copper salts at 37 °C under buffered conditions (optimum pH between 7 and 9, see Figure S10 in the Supporting Information). We argue that the presence of copper salts promotes the selective CuAAC reaction between the azido and the alkyne derivatives.

To demonstrate the broad utility of our method, we decided to extend the scope of this approach to more sophisticated compounds (Figure 1). We then performed the regioselective ligation of biologically relevant RGD peptides in combination with anchoring structures (biotin, adamantane) or matrix metalloproteinase (MMP) peptidic substrate by means of bifunctional cyclopeptide scaffold (**Scheme 2**). For this purpose, we pre-



**Scheme 2.** One-pot chemical assemblies of peptides **10** with thioacid derivatives. Reagents and conditions for the syntheses: peptide **10** (1 equiv), peptide **6** (5 equiv), R–CO–SH (1.1 equiv), Cu<sup>I</sup>OAc (2 equiv), THPTA (10 equiv) in DMF/carbonate-buffered solution (pH 9.2) at 37 °C.

pared cyclodecapeptide scaffold **10** containing four alkyne functions and one amino group. In parallel, compounds **11–13** bearing the prerequisite thioacid function were prepared as described.<sup>[19]</sup>

The first attempt of one-pot molecular assembly of peptides **10** and **6** was carried out with model thioacetic acid. The expected RGD-containing compound **1** was isolated in a satisfying 83% yield after purification. The use of a solution containing both Cu<sup>II</sup>SO<sub>4</sub> and Cu<sup>I</sup>OAc gave similar results (see Figure S32 in the Supporting Information). Encouraged by these results, we performed the one-pot ligations of relevant compounds (i.e., biotin, adamantane, MMP peptidic substrate) in comparison with a classical method involving CuAAC, followed by amidation via activated N-hydroxysuccinimide (NHS) esters. The latter were prepared by using the conventional dicyclohexylcarbodiimide along with NHS (see the Supporting Information). The overall yields for the syntheses of compounds **2–4** are reported in Table 1. When the assemblies were carried out, the compounds **2** and **3** were isolated from reversed-phase HPLC

**Table 1.** Overall yields for the syntheses of compounds **2–4**.

Entry	Product	One-pot method <sup>[a]</sup>	Sequential CuAAC/NHS method <sup>[b]</sup>
1	<b>2</b>	87%	76%
2	<b>3</b>	68%	54%
3	<b>4</b>	93%	ND <sup>[c]</sup>

[a] One-pot reaction then RP-HPLC purification. [b] (i) CuAAC then RP-HPLC purification; (ii) NHS-mediated amidation then RP-HPLC purification. [c] We were unable to provide the activated ester of the MMP peptidic substrate in sufficient yield. ND=not determined; RP-HPLC=reversed-phase high-performance liquid chromatography.

in higher yields, especially for the adamantane derivative. These results emphasize the utility of this approach for the synthesis of complex biomolecular assemblies. It avoids arduous and lengthy purification of intermediates while increasing overall chemical yields. Interestingly, the one-pot ligation of peptides **6**, **10**, and **13** gave the desired peptidic compound **4** in excellent 93% yield. All compounds were readily purified by reversed-phase HPLC methods and characterized by mass spectrometry (see the Supporting Information).

In conclusion, we have shown for the first time that the combination of two copper-assisted ligations, namely CuAAC and thioacid-mediated amidation, could be carried out in a single one-pot reaction. The simple reaction conditions suggest that this strategy of combining two orthogonal ligations could have wide potential for the chemical synthesis of more complex systems. Nevertheless, limitation of the method arises from the need to protect competing nucleophiles such as additional amines. An extension of the method combining other biomolecules such as carbohydrates and lipids is in progress and will be reported in due course.

## Acknowledgements

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche, “Blanc SIMI 7” (ANR-13-BS07-0014), “Arcane” LabEx (ANR-11-LABX-0003-01), and the Région Rhône-Alpes for a PhD scholarship to A.G. The authors wish to acknowledge the support from the ICMG Chemistry Nanobio Platform, Grenoble, on which the peptide synthesis has been performed.

**Keywords:** amidation · click chemistry · copper · CuAAC · one-pot reaction

- [1] D. M. Beal, L. H. Jones, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6320; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6426.  
 [2] a) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708.  
 [3] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952.  
 [4] W. Tanga, M. L. Becker, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7013.  
 [5] a) J. Schoch, M. Staudt, A. Samanta, M. Wiessler, A. Jäschke, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1382; b) H. Durmaz, A. Dag, O. Altintas, T. Erdogan, G. Hizal, U. Tunca, *Macromolecules* **2007**, *40*, 191.  
 [6] a) M. Galibert, P. Dumy, D. Boturyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2576; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2614; b) M. Galibert, O. Renaudet, P.

- Dumy, D. Boturyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1901; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1941.
- [7] D. Jun Lee, K. Mandal, P. W. R. Harris, M. A. Brimble, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5270.
- [8] a) S. M. Mali, S. V. Jadhav, H. N. Gopi, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 7085; b) R. Joseph, F. B. Dyer, P. Garner, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 732.
- [9] J. Blake, *Int. J. Pept. Protein Res.* **2009**, *17*, 273.
- [10] a) J. Blake, C. H. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4055; b) J. Blake, C. H. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 1556.
- [11] S. M. Mali, R. D. Bhaisare, H. N. Gopi, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5550.
- [12] J.-P. Ebran, N. Dendane, O. Melnyk, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4336.
- [13] C. H. F. Wenk, F. Ponce, S. Guillermet, C. Tenaud, D. Boturyn, P. Dumy, D. Watrelot-Virieux, C. Carozzo, V. Josserand, J.-L. Coll, *Cancer Lett.* **2013**, *334*, 188.
- [14] L. Liang, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2933.
- [15] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853.
- [16] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 10063.
- [17] J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302.
- [18] a) N. Shangquan, S. Katukojvala, R. Greenberg, L. J. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7754; b) M. Mühlberg, K. D. Siebertz, B. Schlegel, P. Schmieder, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4603.
- [19] A. S. Goldstein, M. H. Gelb, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2797.

Received: January 22, 2015

Published online on ■ ■ ■ ■, 0000



## Résumé :

La recherche sur le cancer se tourne vers le développement de la nanomédecine, c'est-à-dire l'utilisation de nanoparticules pour augmenter l'efficacité thérapeutique et réduire la toxicité du traitement. Dans ce contexte, ces travaux ont été consacrés à la conception de nano objets pour des applications en thérapie anticancéreuse. Ces systèmes ont été élaborés à partir d'un châssis moléculaire cyclodécapeptidique présentant plusieurs ligands peptidiques RGD ciblant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , récepteur transmembranaire jouant un rôle clé dans l'angiogenèse. Dans un premier temps, nous avons synthétisé plusieurs composés en faisant varier la structure du châssis peptidique afin de moduler la présentation des ligands RGD lors de leur interaction avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . L'évaluation biologique *in vitro* des différents composés synthétisés suivi d'une étape de simulation de dynamique nous a permis de déterminer une présentation optimale des ligands RGD. Nous avons ensuite développé une nouvelle voie de synthèse combinant deux réactions orthogonales catalysées au cuivre permettant l'accès à ces vecteurs peptidiques avec de meilleurs rendements et avec un temps de synthèse réduit par rapport à la voie classique. Finalement, nous avons greffé les clusters de RGD sur des nanoparticules lipidiques, puis polymériques, afin d'apporter un élément de ciblage. Ces deux projets ont été réalisés à travers des collaborations, respectivement avec le laboratoire du Prof. Patrick Couvreur (nanoparticules de squalène) et avec le laboratoire du Dr Marie-Thérèse Charreyre (nanoparticules de copolymères NAM/NAS). Ces systèmes ont ensuite été étudiés *in vitro* pour des applications en thérapie et en imagerie.