



HAL
open science

Synthèse de vecteurs peptidiques non-viraux : vectorisation et ciblage tumoral

Michaël Claron

► **To cite this version:**

Michaël Claron. Synthèse de vecteurs peptidiques non-viraux : vectorisation et ciblage tumoral. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV036 . tel-01552853

HAL Id: tel-01552853

<https://theses.hal.science/tel-01552853>

Submitted on 3 Jul 2017

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 DE GRENOBLE

Spécialité : **CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Michaël CLARON

Thèse dirigée par **didier Boturyn**

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

Synthèse de vecteurs peptidiques non-viraux : vectorisation et ciblage tumoral

Thèse soutenue publiquement le **29 novembre 2013**
devant le jury composé de :

Mme, Fabienne, BURLINA

Chargé de recherche, Université de Paris 6, Rapporteur

Mr, Gilles, SUBRA

Professeur, Université de Montpellier 2, Rapporteur

Mme, Pascale, DELANGLE

Ingénieur CEA, CEA Grenoble, Présidente

Mr, Pascal, DUMY

Professeur, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, Membre

Mr, Didier, BOTURYN

Directeur de recherche, Université de Grenoble, Membre



TABLE DES MATIÈRES

Abréviations	i
Liste des acides aminés protéinogènes	i
INTRODUCTION	1
I. La vectorisation en cancérologie	1
I.1. Généralités sur le cancer	1
I.2. Méthodes actuelles de détection et de traitements des cancers	5
I.3. Les cibles potentielles et leurs ligands spécifiques	7
I.3.1. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la néoangiogenèse	9
I.3.2. Les récepteurs aux facteurs de croissance	17
I.3.3. La protéine transmembranaire CD20	23
I.3.4. La membrane cellulaire d'une cellule cancéreuse.....	30
I.4. Les vecteurs cellulaires	30
I.4.1. Les nanoparticules	31
I.4.2. Peptides et protéines de translocations	32
I.4.3. Les vecteurs viraux.....	33
I.4.4. Effet de multivalence	33
I.5. Méthode de conjugaison pour l'assemblage de biomolécules.....	36
I.5.1. Couplage peptidique traditionnel : le lien amide.....	36
I.5.2. Couplage par lien chimiosélectif	36
I.6. Objectifs des travaux réalisés.....	42
RESULTATS ET DISCUSSIONS	44
II. Le vecteur peptidique possédant la séquence RGD sous forme multivalente	45
II.1. Etat de l'art	45
II.1.1. Le châssis cyclodécapeptidique	45
II.1.2. Conception et synthèse du vecteur multivalent pour la cancérologie	46
II.1.3. La fluorescence un outil de détection tumorale comme aide à la chirurgie	48

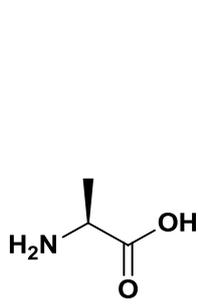
III.	Synthèse et caractérisation de vecteurs multivalents de ligand RGD pour la détection tumorale	51
III.1.	Conception de vecteurs pour l'imagerie	51
III.1.1.	Les radiotraceurs et l'imagerie oncologique PET	51
III.1.2.	Synthèse des vecteurs multivalents pour la tomographie à émission de positron	51
III.1.3.	Localisation des tumeurs in vivo par Tomographie à émission de positron, avancés technologiques	55
III.2.	Détection, capture et relargage de cellules tumorales	57
III.2.1.	Principe et objectifs	57
III.2.2.	Les différentes méthodes de caractérisations à l'interface solide/liquide	60
III.2.3.	Stratégie redox pour l'attachement réversible de biomolécules	61
III.2.4.	Caractérisations physicochimiques des surfaces biofonctionnalisées et évaluation de leurs propriétés à reconnaître, capturer et relarguer des cellules tumorales	67
III.3.	Bilan des travaux et perspectives	74
IV.	Outils pour la thérapie.	76
IV.1.	Conjugué vecteur-peptide cytotoxique.	76
IV.1.1.	Etat de l'art	76
IV.1.2.	La protéine pro-apoptotique Bax	78
IV.1.3.	Synthèse des composés cytotoxiques « porocombo »	81
IV.1.4.	Evaluation biologique	85
IV.2.	Conjugué vecteur peptidique –oligonucléotide	88
IV.2.1.	Role des dBait	88
IV.2.2.	Synthèse du conjugué médicament	89
IV.2.3.	Evaluation biologique in vitro	90
IV.3.	Bilan des travaux	92
V.	Amélioration de la capacité de ciblage : double targeting	93
V.1.	Etat de l'art et nouveaux ligands peptidiques	93
V.2.	Principe et objectifs du double ciblage tumorales	94
V.3.	Synthèse des composés	95

V.3.1.	Synthèse des conjugués ciblant EGFR.....	96
V.3.2.	Synthèse des conjugués ciblant NRP-1	99
V.4.	Evaluation biologique	103
V.4.1.	Evaluation biologique des composés ciblant EGFR	103
V.4.2.	Evaluation biologique des composés ciblant NRP-1.....	104
V.5.	Bilan des travaux	106
VI.	Conception de mimes d'anticorps thérapeutiques _	107
VI.1.	Modèle choisi : Le rituximab	107
VI.1.1.	Etude de l'interaction Rituximab CD-20	107
VI.1.2.	Travaux antérieurs : Recherche de fragments interagissant avec l'épitope CD20	109
VI.1.3.	Synthèse des composés multivalents par ligation CuAAC	113
VI.1.4.	Evaluation des différents assemblages	125
VI.2.	Bilan des travaux.....	133
	Conclusion et perspectives _____	135
VII.	Partie Expérimentale _____	140
VII.1.	Materials and Equipments.....	140
VII.1.1.	Reagents	140
VII.1.2.	Equipments	140
VII.2.	General Procedures for Peptides Syntheses	141
VII.2.1.	Syntheses of linear protected peptides by SPPS.....	141
VII.2.2.	General Procedure for Cyclization Reactions.	141
VII.2.3.	Synthesis protocols.....	142
VII.3.	Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring	194
VII.3.1.	Materials and methods.....	194
VII.3.2.	Reagents used for QCM-D measurements	194
VII.3.3.	Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring: technique	194
VII.3.4.	QCM-D measurements on PEG-SAM: Protocol.....	194

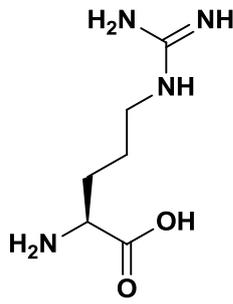
Abréviations

Ac	Acétyl	IR	Infrarouge
AcOEt	Acetate d'éthyle	IRM	Imagerie par résonance magnétique
AcOH	Acide acétique	IGF	Insulin-like growth factor
AcONa	Acétate de sodium	i.v.	Intraveineuse
AcONH₄	Acétate d'ammonium	K_D	Constante de dissociation
OAl	Allyl ester	MeOH	Méthanol
ADN	Acide désoxyribonucléique	NHS	N-hydroxysuccinimide
Alloc	Allyloxycarbonyl	PBS	Phosphate buffer saline
ARN	Acide ribonucléique	PET	Positron emission tomography
Boc	<i>Tertio</i> -butyloxycarbonyl	PyAOP	(7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
BSA	Bovine serum albumine	PyBOP®	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
CD	Cell differentiation	RAFT	Regioselectively addressable functionalized template
CDR	Complementary determining region	RMN	Résonance magnétique nucléaire
CuAAC	Copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition	RP-HPLC	Reverse phase high-performance liquid chromatography
HPLC	Chromatographie liquide haute performance	r.t.	Room temperature
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide	RT	Retention time
Dde	1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidène)éthyle	SAM	self assembled monolayer
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine	SASRIN	Super acid sensitive resin
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	SAv	Stréptavidine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide	s.c.	Sous-cutanée
DMSO	Diméthylsulfoxyde	siRNA	Small interfering RNA
EDT	Ethanedithiol	SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
EGF	Endothelial growth factor	Succ	Succinimide
EPR	Enhanced permeability and retention	t.a.	Température ambiante
equiv	Equivalent molaire	TASP	Template assembled synthetic protein
ESI	Electrospray ionisation	<i>t</i>Bu	<i>Tertio</i> -butyl
Et₂O	Ether diéthylique	TEP	Tomographie à émission de positron
EtOH	Ethanol	TFA	Acide trifluoroacétique
Fc	Ferrocène	TIS	Triisopropylsilane
FDA	Food and Drug Administration	TNBS	Acide trinitrobenzènesulfonique
FGF	Fibroblast Growth Factor	TNFα	Tumour necrosis factor α
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine	tr	Temps de rétention
Fmoc	9-Fluorénylméthoxyoxycarbonyl	Trt	Triphénylméthyl (ou trityl)
FRET	Förster resonance energy transfer	UV	Ultraviolet
HEK(293)	Lignée de cellules épithéliales de rein embryonnaire humain	VEGF	Vascular endothelial growth factor
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole		
IC₅₀	Concentration inhibant de 50% un paramètre		
ID	Dose injectée		

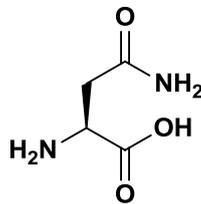
Liste des acides aminés protéinogènes



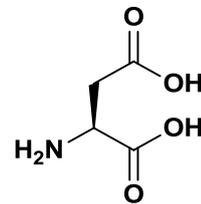
L-Alanine
(Ala / A)



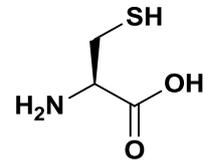
L-Arginine
(Arg / R)



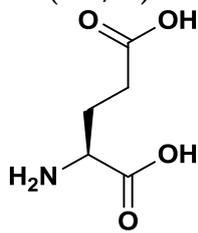
L-Asparagine
(Asn / N)



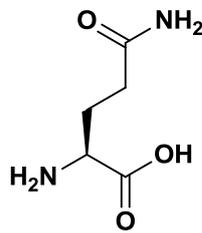
Acide L-aspartique
(Asp / D)



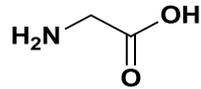
L-Cystéine
(Cys / C)



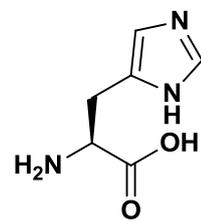
Acide L-glutamique
(Glu / E)



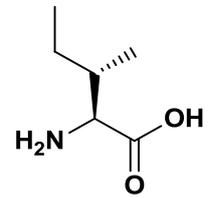
L-Glutamine
(Gln / Q)



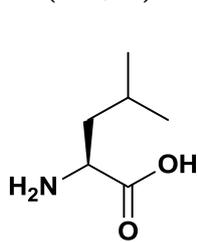
Glycine
(Gly / G)



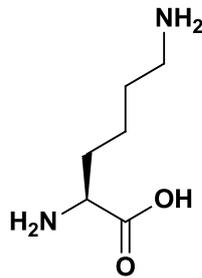
L-Histidine
(His / H)



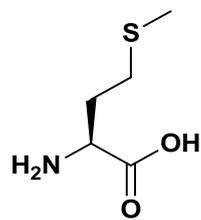
L-Isoleucine
(Ile / I)



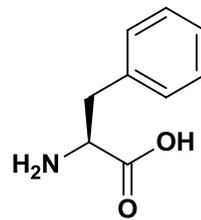
L-Leucine
(Leu / L)



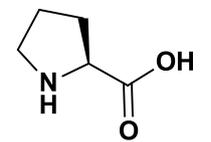
L-Lysine
(Lys / K)



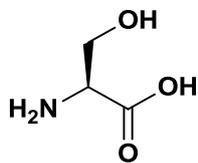
L-Méthionine
(Met / M)



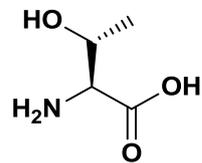
L-Phénylalanine
(Phe / F)



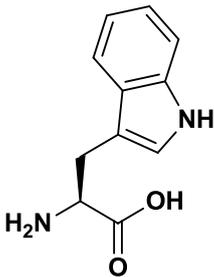
L-Proline
(Pro / P)



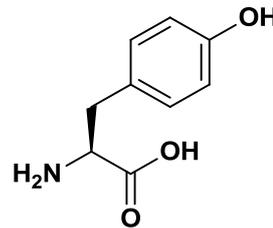
L-Sérine
(Ser / S)



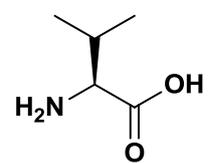
L-Thréonine
(Thr / T)



L-Tryptophane
(Trp / W)



L-Tyrosine
(Tyr / Y)



L-Valine
(Val / V)

INTRODUCTION

I. La vectorisation en cancérologie

I.1. Généralités sur le cancer

Le cancer est un terme utilisé pour des maladies pour lesquelles des cellules se divisent de façon non contrôlée et sont capables d'envahir les autres tissus sains. Les cellules cancéreuses ont la capacité de se répandre dans les autres parties du corps par l'intermédiaire du système circulatoire et lymphatique. Elles échappent aussi aux mécanismes de régulation comme l'apoptose et la croissance cellulaire. Le cancer n'est pas une maladie unique puisqu'il existe à ce jour plus de 100 différentes sortes de cancers diagnostiqués. L'Organisation mondiale de la santé (selon la base GLOBOCAN) avait estimé 12,7 millions de nouveaux cas dans le monde en 2008. Le cancer du poumon (1.6 million, 12.7% du total pour les hommes et les femmes), du sein (1.4 million, 10.9% du total chez la femme), colorectal (1.2 million, 9.7% du total pour les hommes et les femmes) et de l'estomac (1 million, 7.8% du total pour les hommes et les femmes) sont les plus communs et représentent plus de 40% des cancers diagnostiqués (Figure 1).

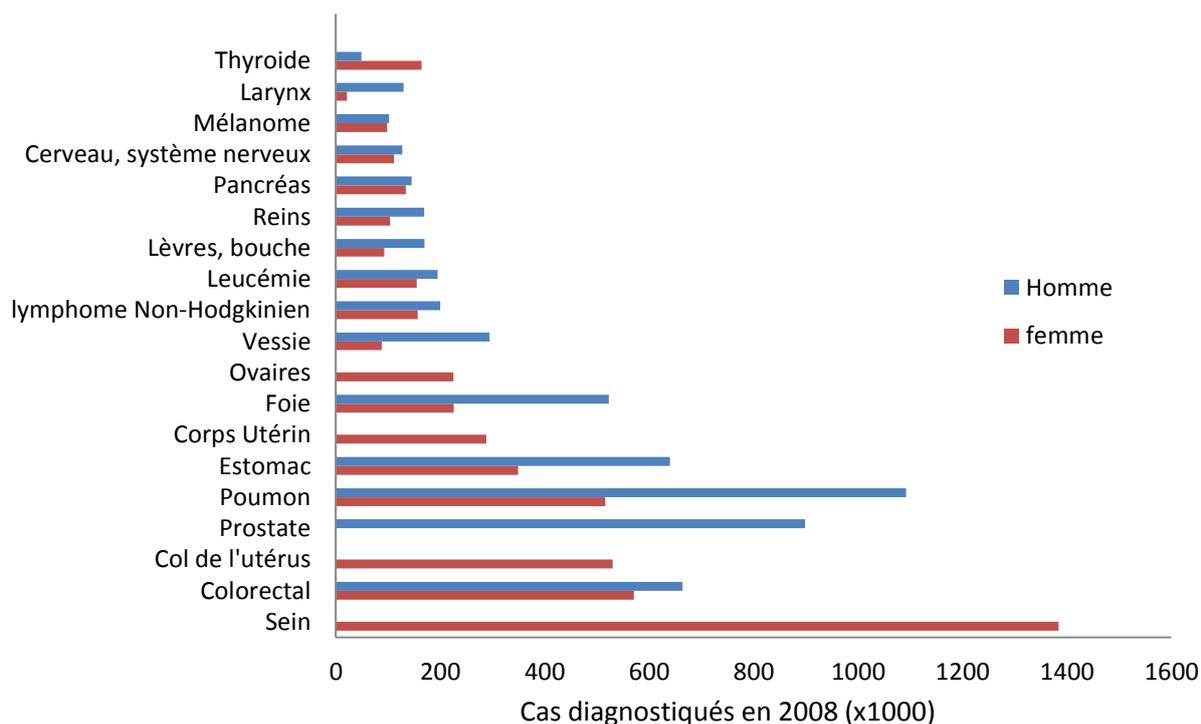


Figure 1 : Nombre de cancer les plus communs diagnostiqués dans le monde en 2008.

La plupart des cancers sont appelés par le nom du premier organe ou de la lignée cellulaire atteint. Les différents types de cancer sont regroupés en cinq grandes catégories :

- **Les carcinomes** ou cancers des tissus épithéliaux
- **Les sarcomes** ou cancers des tissus conjonctifs.
- **Les leucémies** : cancers de la moelle osseuse créant un large nombre de cellules hématopoïétiques anormales

- **Les lymphomes** : ou cancers des cellules du système immunitaire.
- **Le cancer du système nerveux central** qui touche les cellules du système nerveux comme le cerveau par exemple.

On distingue deux types de tumeurs : bénignes et malignes. Les tumeurs bénignes ne sont pas cancéreuses, elles pourront souvent être enlevées et dans la plupart des cas, sans risque de récurrence. Les cellules des tumeurs bénignes sont de plus non envahissantes. Ce qui n'est pas le cas pour les tumeurs malignes dont les cellules peuvent envahir les tissus périphériques et se répandre dans les autres parties du corps : elles métastasent.

Après plus d'un quart de siècle d'avancées scientifiques, la recherche a généré un riche répertoire de connaissances sur le sujet, révélant que le cancer est une maladie impliquant des modifications dynamiques du génome. La tumorigénèse chez l'humain est un procédé en plusieurs étapes. Ces étapes reflètent des altérations génétiques entraînant la transformation progressive des cellules saines en cellules hautement malignes. Hanahan et Weinberg ont recensé six caractéristiques spécifiques acquises par les cellules cancéreuses illustrées dans la figure ci-dessous (Figure 2)¹.

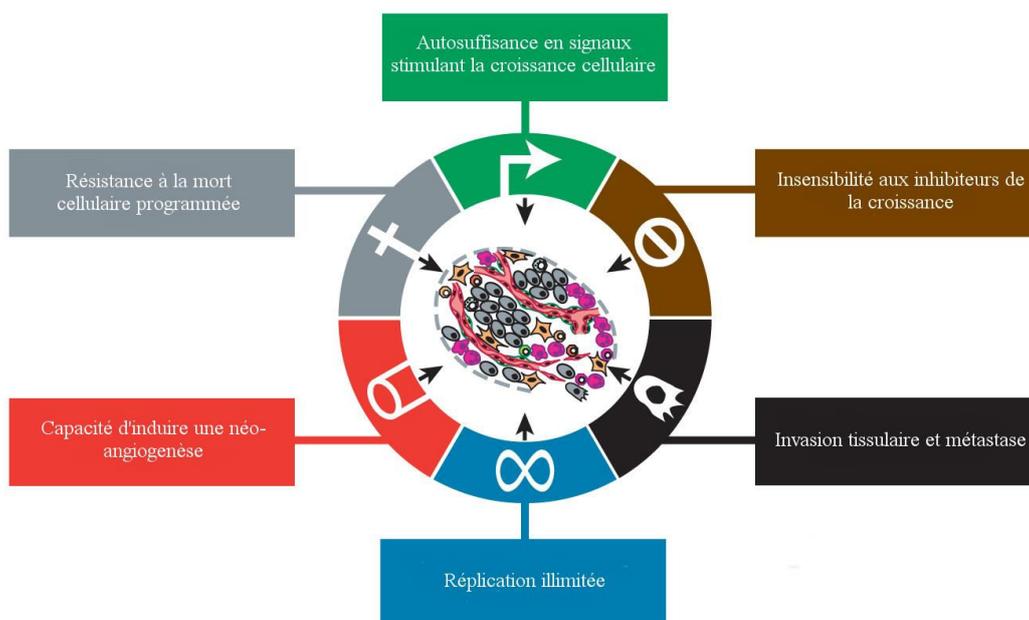


Figure 2 : Caractéristiques spécifiques acquises par les cellules cancéreuses

Le corps est constitué de nombreux types de cellules différentes. Ces cellules croissent et se divisent de façon contrôlée afin de garder l'organisme en bonne santé. Quand elles deviennent vieilles ou abimés, elles meurent et sont remplacées par de nouvelles. Cependant, parfois, ce mécanisme peut se dérégler. Le matériel génétique de la cellule si il est endommagé, peut produire des mutations qui peuvent affecter la croissance et la division cellulaire. La capacité fondamentale acquise par les cellules cancéreuses est une capacité de croissance excessive (Figure 3).

1. (a) Hanahan, D.; Weinberg, Robert A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646-674; (b) Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Ibid.* **2000**, *100*, 57-70.

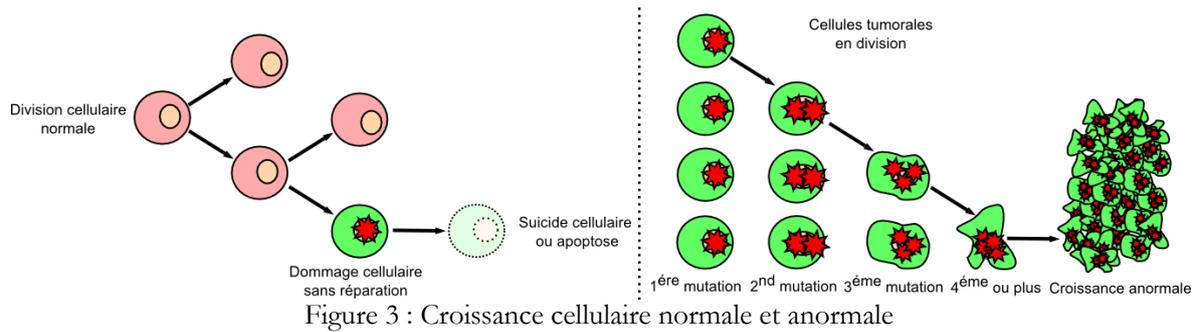


Figure 3 : Croissance cellulaire normale et anormale

Afin de stimuler son développement, et ainsi devenir auto-suffisante, la cellule maligne va acquérir la capacité de générer ses propres signaux de croissance (« transforming growth factor alpha » TGF α , « platelet-derived growth factor » PDGF...). Elle va sur-exprimer certains récepteurs aux facteurs de croissance, induisant ainsi une hypersensibilité à ceux-ci, selon un mécanisme de stimulation autocrine. Cette boucle de rétroaction positive est retrouvée entre autres dans les sarcomes et les carcinomes qui produisent du TGF α (tumor growth factor α)².

La cellule maligne, *via* la sécrétion de facteurs de survie, va de plus acquérir la capacité de résister à l'apoptose (mort cellulaire programmée). La vie d'une cellule dépend d'un équilibre entre des facteurs moléculaires qui favorisent la survie cellulaire et des facteurs qui provoquent sa mort. Une cellule cancéreuse endure de nombreux stress et dommages qui menacent directement sa survie. Les cellules cancéreuses subissent d'une part beaucoup de mutations et d'anomalies chromosomiques. D'autre part, au sein de la tumeur, ces cellules sont soumises à de forts stress, comme une répartition hétérogène des nutriments et de l'oxygène, ou encore un pH acide. L'ensemble de ces phénomènes devraient normalement induire leur mort. Pour résister à la mort cellulaire, les cellules cancéreuses diminuent l'action des facteurs de mort, augmentent l'action des facteurs de survie ou effectuent ces deux actions simultanément (Figure 4). Par exemple, la prolifération cellulaire intense des cellules cancéreuses favorise la survie de la cellule en stimulant l'expression de facteurs de survie : comme Bcl-2.

En dérégulant en leur faveur les voies de signalisation de la prolifération, les cellules cancéreuses peuvent donc bénéficier d'un double avantage : une forte prolifération et une résistance accrue à la mort cellulaire. La protéine p53 est capable d'induire l'apoptose des cellules qui présentent trop d'anomalies ou de stress. Par conséquent, l'inactivation de p53 confère aux cellules cancéreuses un fort avantage de survie. D'autres protéines qui déclenchent l'apoptose sont inactivées ou leur expression est diminuée dans les cellules cancéreuses pour augmenter leur capacité à survivre face aux stress et aux dommages qu'elles subissent en permanence. Ces caractéristiques permettent aux cellules tumorales de se multiplier de manière illimitée.

2. Kohler, M.; Bauknecht, T.; Grimm, M.; Birmelin, G.; Kommos, F.; Wagner, E., Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in human ovarian carcinomas. *Eur J Cancer* **1992**, *28A* (8-9), 1432-7.

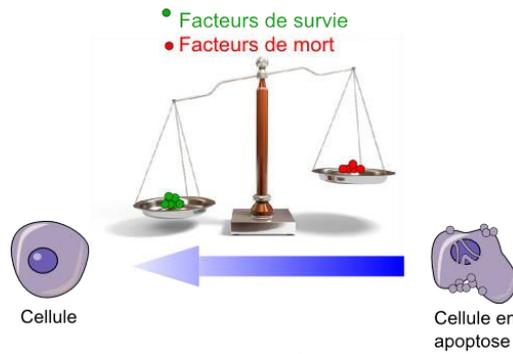


Figure 4 : balance des facteurs de survie

Le processus d'invasion des tissus et la formation des métastases représentent un caractère important dans le développement du cancer. L'invasion tissulaire et le phénomène de métastase sont des composants essentiels afin que les cellules tumorales envahissent les milieux périphériques et les organes à partir d'un site primaire. Ce procédé d'invasion fait intervenir des changements dans l'adhésion des cellules entre elles et avec le milieu extracellulaire. Il comporte plusieurs étapes incluant (Figure 5) :

- une invasion tissulaire locale
- une intravasation
- un transport par le système circulatoire et lymphatique
- une colonisation des tissus périphériques ou lointains.

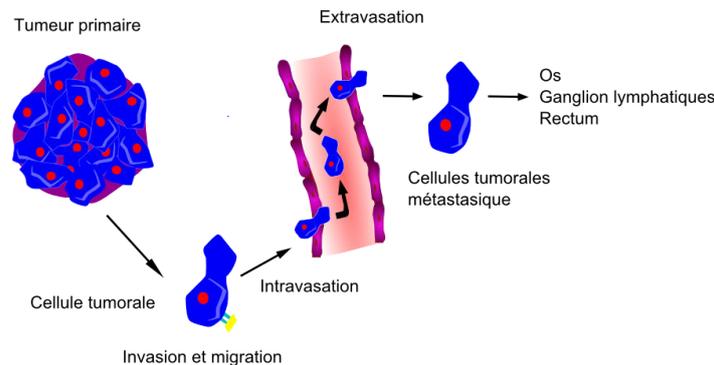


Figure 5 : invasion tumorale

La communication intercellulaire entre les cellules tumorales et le stroma suggère que les métastases ne proviennent pas d'une cellule autonome mais requiert l'intervention du tissu environnant. En particulier, les macrophages associés aux tumeurs par exemple, (tumor associated macrophage ou TAMs) fournissent les cellules tumorales en facteur de croissance (EGF) et en facteurs de colonisation (CSF-1) et assistent à l'intravasation.

Enfin une dernière capacité acquise par les cellules cancéreuses réside dans leur aptitude à induire une néoangiogénèse ou néovascularisation, nécessaire à l'apport en oxygène et en nutriments, permettant la survie de la tumeur. Ce phénomène est un processus clé dans le développement de la tumeur.

I.2. Méthodes actuelles de détection et de traitements des cancers

- **Méthodes de détection**

Le dépistage des cancers reste de nos jours un enjeu clé dans la lutte contre cette maladie. En effet la détection à un stade précoce de la maladie permet au patient d'augmenter fortement ces chances de guérison. Le rôle du médecin reste important puisque c'est après un bilan médical qu'il pourra demander de faire des examens plus approfondis au patient. Actuellement les techniques de détection des cancers sont essentiellement des techniques d'imagerie ou un examen de tissus prélevés chez le patient (biopsie). Les techniques de détection sont nombreuses et diffèrent selon les cancers, organes, ou parties du corps à examiner. Lorsque que cela est possible les techniques d'imagerie médicale restent les examens les plus faciles à mettre en œuvre. Elles comprennent, la radiographie, l'échographie, l'IRM (résonance magnétique nucléaire) et les techniques nucléaires (utilisation de radiotraceurs). Ces dernières années, de nombreuses avancées ont permis d'augmenter la résolution de ces techniques grâce à l'injection d'agents de contraste comme le gadolinium pour l'IRM ou le couplage d'éléments radioactifs à des agents de ciblage pour la scintigraphie.

- **Les différents traitements utilisés**

La technique actuellement la plus utilisée pour traiter le cancer est la chirurgie. Les cellules malignes peuvent être retirées de l'organisme *via* une opération. Tous les types de cancer ne peuvent cependant pas être traités par cette technique (organes vitaux, cancer des cellules hématopoïétiques...). De plus, de nombreux cancers sont détectés alors qu'ils sont à un stade trop avancé. On a alors recours à d'autres méthodes comme la radiothérapie ou la chimiothérapie.

La radiothérapie (radio-oncologie) est un traitement assez efficace (guérissant environ 30% des cancers) qui utilise les rayons X (ou les rayons gamma) pour endommager le noyau de la cellule cancéreuse *via* une destruction de son matériel génétique. L'appareil utilisé doit être capable de diriger les rayons de façon très précise pour ne pas endommager les cellules saines. Les cellules saines sont cependant capables de se régénérer si elles sont atteintes brièvement. Plus la tumeur est logée profondément dans le corps (dans l'abdomen par exemple) plus la technique doit être puissante. Ce traitement comporte néanmoins de nombreux effets secondaires : maux de tête, vomissements, rougeurs de la peau et diarrhées.

Une autre méthode très répandue pour soigner un cancer est la chimiothérapie. Ce traitement consiste en l'injection d'une substance médicamenteuse par voie intraveineuse :

- Agents alkylants (Cyclophosphamide, Oxaliplatine, Carboplatine, Chlorambucile, Mechloethamine, Melphalane)
- Agents antimétabolites (antagonistes du folate, Methotrexate, Fludarabine, Cytarabine)
- Alcaloïdes et terpénoïdes (Doxorubicine, Vinca-alkaloïdes, Taxanes, Camptothécine)
- Antibiotiques anti-tumoraux (Dactinomycine, Daunorubicine, Doxorubicine, Idarubicine, Mitoxantrone)

Cette méthode est le plus souvent utilisée en combinaison avec d'autres traitements. Elle est de plus choisie lorsque le patient est inopérable ou si le traitement par radio-oncologie est inefficace. La chimiothérapie a pour but d'empêcher les cellules cancéreuses de se multiplier. Pour agir correctement, la substance doit être correctement dosée pour détruire uniquement les cellules défectueuses et non les tissus sains. La chimiothérapie provoque plusieurs effets secondaires dus principalement à la forte toxicité du traitement envers les cellules saines.

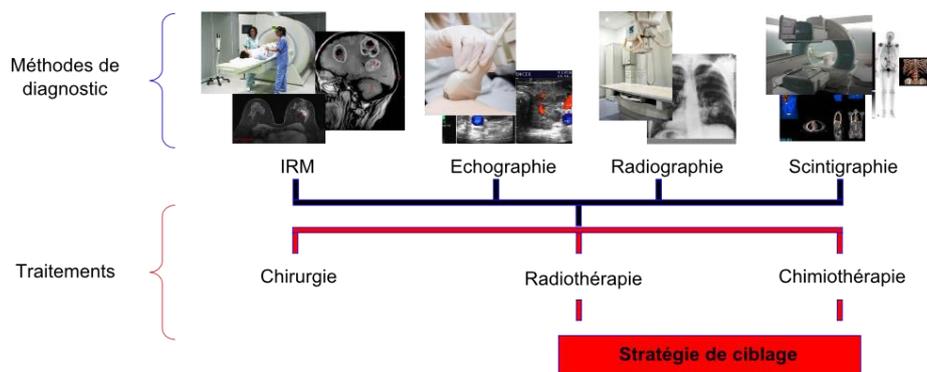


Figure 6 : Méthodes de diagnostic et de traitements du cancer

Le cancer est causé principalement par nos habitudes de vie. Le tabagisme, une alimentation riche en graisse ou de longues expositions au soleil augmentent le risque de cancer. De nombreux facteurs génétiques peuvent de plus conduire le patient à développer un cancer. Cette maladie reste difficile à diagnostiquer et à traiter, et les traitements actuels ne sont pas toujours efficaces à 100% et engendrent de nombreux effets secondaires.

Afin de palier à cela, depuis une cinquantaine d'années, de nombreuses études se sont portées sur la thérapie ciblée et notamment sur la vectorisation des composés actifs déjà utilisés sur les cellules tumorales. Le but étant d'augmenter l'efficacité du traitement, puisque la totalité du principe actif serait délivré à la tumeur et non dispersé dans l'organisme. En conséquence, une réduction de la toxicité envers les autres cellules serait observée.

I.3. Les cibles potentielles et leurs ligands spécifiques

La vectorisation est l'opération par laquelle on associe des médicaments à des structures moléculaires capables d'acheminer le principe actif vers une cible : un organe, un tissu ou une cellule (dans notre cas, la tumeur). Il y a deux types de vectorisation : passive ou active. Le ciblage passif se base sur le fait que la tumeur possède des variations physiologiques et/ou morphologique par rapport à un tissu sain en raison de sa croissance rapide et désordonnée. Il est possible d'acheminer préférentiellement un composé actif vers la tumeur en choisissant un vecteur (nanoparticules (NPs), liposomes, biopolymères...) de tailles adéquate. Un exemple de vectorisation passive a été largement décrit dans la littérature : il concerne l'accumulation passive de NPs dans les tumeurs solides en raison de l'effet « EPR » (Enhanced Permeability and Retention effect)³. Après accumulation des NPs à proximité de la tumeur, les composés actifs peuvent atteindre plus facilement leur cible. Cependant, malgré une richesse d'informations sur le sujet, l'effet EPR devient de plus en plus controversé chez l'homme⁴.

Le ciblage actif utilise le fait que les cellules tumorales possèdent de nombreuses modifications sur leurs membranes, notamment une surexpression de différentes protéines (intégrines, récepteurs aux facteurs de croissance, antigènes...). Dans ce contexte, on peut greffer sur le cargo ou directement sur le principe actif un ligand de ciblage reconnaissant spécifiquement une protéine surexprimée à la surface de la cellule tumorale. Ce composé pourra alors être reconnu par la cellule et pourra être le cas échéant incorporé à l'intérieur de celle-ci avec une libération du principe actif (Figure 7).

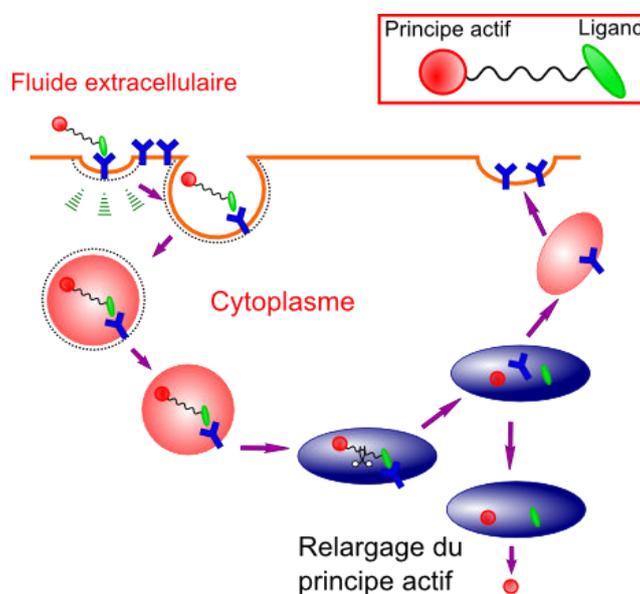


Figure 7 : Reconnaissance *via* le ligand de ciblage et endocytose du principe actif

3. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* **2000**, *65* (1–2), 271-284.

4. (a) Matsumura, Y.; Maeda, H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy - Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. *Cancer Res* **1986**, *46* (12), 6387-6392; (b) Maeda, H., Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. *J Control Release* **2012**, *164* (2), 138-144.

Introduction

De nombreux ligands (peptides, sucres, protéines...) ont été développés et permettent le ciblage des cellules tumorales présentant des antigènes ou des récepteurs membranaires spécifiques surexprimés à la surface des cellules cancéreuses (Tableau 1). Une classe très prometteuse pour le ciblage est le développement d'anticorps monoclonaux.

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

Tableau 1 : Exemples de ligands et d'anticorps utilisés pour cibler les marqueurs tumoraux⁵

5. Allen, T. M., Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2002**, 2 (10), 750-763.

I.3.1. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la néoangiogénèse

Le développement de nouveaux vaisseaux sanguins est un processus dynamique et hautement régulé qui dépend de nombreux signaux complémentaires comme les facteurs de croissance et l'adhésion cellulaire. Le développement de vaisseaux sanguins peut être scindé en deux voies : la vascularisation et l'angiogénèse. La vascularisation est le procédé par lequel de nouveaux vaisseaux vont être créés à partir d'un angioblaste sur un noyau naissant, suite à une différenciation cellulaire de cellules mésodermes précurseurs. Au contraire le terme angiogénèse est employé lors de la création de nouveaux vaisseaux (neovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants : « sprouting ».

L'angiogénèse apparaît comme un mécanisme finement régulé durant le développement cellulaire ou la cicatrisation et est donc un processus normal et vital. Par exemple le fœtus a besoin de créer son propre réseau d'artères, veines et capillaires. Pour cela la vascularisation intervient afin de créer le réseau primaire de cellules endothéliales vasculaires. Par la suite le mécanisme de l'angiogénèse va remodeler ce réseau en nouveaux petits vaisseaux ou capillaires afin de compléter le système circulatoire. La paroi des vaisseaux sanguins est formée de cellules endothéliales vasculaires. Ces cellules ne se divisent que rarement chez l'adulte, tous les trois ans en moyenne. Cependant quand la situation le requiert l'angiogénèse peut stimuler leurs divisions.

Dans le cas de l'angiogénèse pathologique liée au cancer ou aux maladies inflammatoires, celle-ci semble considérablement moins bien régulée. Alors que les vaisseaux sanguins normaux ou inactifs chez l'adulte sont dormants et non prolifératifs, les cellules endothéliales stimulées par des facteurs angiogéniques (comme les facteurs endothéliaux de croissance cellulaire (VEGF) ou les facteurs de croissance des fibroblastes basiques (bFGF)), deviennent hautement prolifératives.

L'angiogénèse tumorale apparaît alors comme la prolifération d'un réseau de vaisseaux sanguins qui va pénétrer dans la tumeur en expansion pour lui apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires à sa croissance. L'angiogénèse tumorale est initié à partir d'un noyau cellulaire cancéreux qui va envoyer des signaux aux tissus environnants. Ces signaux activent alors certains gènes sur les tissus hôtes qui vont synthétiser des protéines pour encourager la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (Figure 8).

Simultanément à cette prolifération accélérée, la synthèse de protéines et la transcription démarrent afin que les cellules endothéliales se préparent pour une migration cellulaire et une croissance des néovaisseaux. Physiologiquement, les cellules endothéliales angiogéniques montrent une capacité importante à proliférer et envahir les tissus extérieurs.

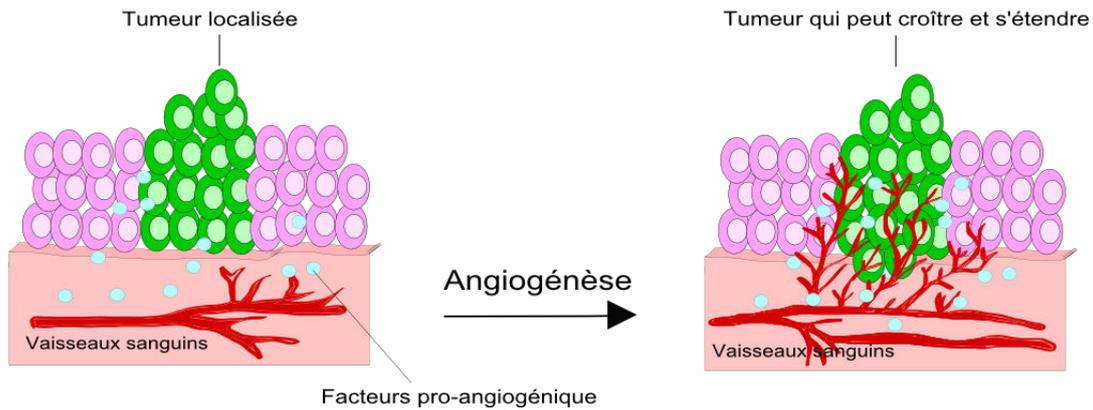


Figure 8 : Angiogenèse tumorale : sécrétion de facteurs pro-angiogéniques dans le microenvironnement afin de promouvoir la croissance de nouveaux néovaisseaux.

I.3.1.1. *Les intégrines, récepteurs transmembranaires*

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques régulant l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire (ECM). Elles sont impliquées dans la transduction de signaux de l'ECM vers la cellule. Elles permettent la croissance cellulaire *via* différents mécanismes de prolifération, de migration et de survie cellulaire. Elles peuvent également interagir avec la surface d'autres cellules ainsi qu'avec des ligands solubles.

Les intégrines sont composées de deux sous-unités α et β et ne sont actives que sous leur forme hétérodimérique. La partie extracellulaire des sous-unités α est constituée d'un domaine « β -propeller », qui est une sorte de suprastructure constituée de 7 séquences organisées comme les pales d'une hélice, et qui participe à la formation de la tête de l'intégrine. Les 3 ou 4 dernières pales de l'hélice possède des sites de liaison au Ca^{2+} , affectant de manière allostérique la liaison au ligand⁶. Dans certains cas, on trouve, inséré entre les pales 2 et 3 de l'hélice, un domaine αI , ou domaine A, qui fait protrusion au sommet de la sous-unité α et est responsable de la reconnaissance du ligand par les intégrines possédant ce domaine. Faisant suite à ces domaines, on trouve une région « Ig-like » (« immunoglobulin-like domain ») reliée par une région charnière, à deux domaines « Calf-1 et 2 », constituant la partie inférieure de la sous-unité α . La partie extracellulaire des sous-unités β se compose d'un domaine PSI (plexin-semaphorin-integrin), d'un domaine hybride « Ig-like » dans lequel s'insère un domaine βI . Ce dernier, participe à la reconnaissance du ligand par les intégrines ne possédant pas un domaine αI . Enfin, la dernière partie est composé de 4 domaines « EGF-like » (I-EGF1 à 4), et d'une queue β^7 . La jambe de la sous-unité β , possède, entre les différents domaines, de nombreux ponts disulfures qui rigidifient la structure avec une zone charnière située entre les domaines I-EGF1 et 2 (Figure 9).

6. Oxvig, C.; Springer, T. A., Experimental support for a β -propeller domain in integrin α -subunits and a calcium binding site on its lower surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, 95 (9), 4870-4875.

7. Xiong, J.-P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R.; Scott, D. L.; Joachimiak, A.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A., Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin $\alpha\text{V}\beta3$. *Science* **2001**, 294 (5541), 339-345.

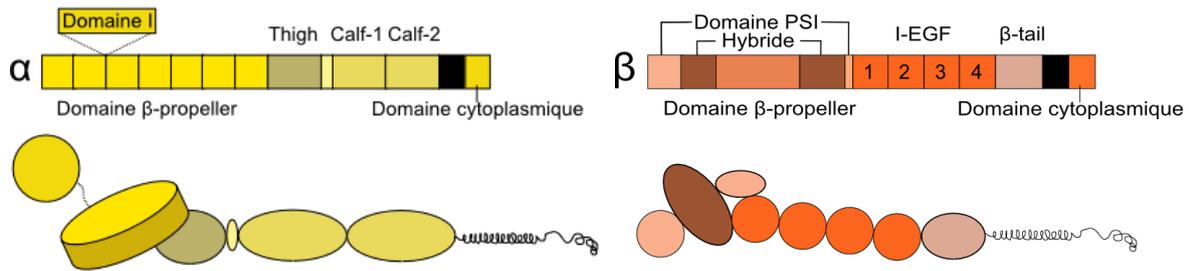


Figure 9 : Intégrine : Sous unités α et β ; Haut : Domaine linéaire ; Bas : Structure globulaire formée par les différents domaines de la protéine.

Il existe 18 différentes sous-unités α , et 8 différentes sous-unités β , mais seulement 24 combinaisons α/β différentes sont connues. Chaque α/β hétérodimère possède ses propres ligands spécifiques (certaines intégrines interagissent avec de nombreux ligands différents). Le répertoire important d'intégrines présentes à la surface de la cellule permet à la cellule d'interagir avec la matrice extracellulaire (ECM) et son micro-environnement. Toutes les intégrines (excepté la β_4) possèdent un petit domaine enfoui dans le cytosol et sont ainsi des médiateurs importants dans la communication cellulaire en plus de l'adhésion à la membrane extracellulaire.

Il a été reporté que les cellules endothéliales expriment plus de 10 intégrines différentes dépendant de la localisation et de l'état d'activation de la cellule. La plupart se situent sur des cellules endothéliales quiescentes : $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_6\beta_1$ et $\alpha_v\beta_5$. Ces intégrines ont tendance à être des récepteurs de composants basaux de l'ECM comme le collagène et la laminine à l'exception de $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_5\beta_1$ qui interagissent avec les ligands de la matrice provisoire comme la vitronectine et la fibronectine.

Les cellules endothéliales angiogéniques vont, elles, altérer leurs surfaces par des mécanismes majeurs. Ce mécanisme se situe au niveau de la transcription des sous-unités des intégrines, résultant dans une altération de l'expression de chacune. Il apparaît que les intégrines se liant aux composants de l'ECM comme le collagène et la laminine semblent sous-régulées alors que les intégrines se liant aux composants provisoires de l'ECM comme la fibronectine ou la vitronectine sont au contraire sur-activées (Tableau 2).

Collagène, laminine	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_6\beta_1$...	
Fibronectine, vitronectine	$\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ $\alpha_{11b}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$	

Tableau 2 : Régulation des intégrines lors de l'angiogénèse.

En réponse à des changements physiques ou chimiques sur la membrane et à des facteurs de croissance à la périphérie des cellules, l'intégrine se lie à ces ligands de façon à passer à un état activé. La cellule va alors déclencher une cascade de signalisation complexe qui conduit à une

réponse globale déclenchant la survie, la prolifération, la différenciation, la migration ou enfin l'adhésion cellulaire (Figure 10).

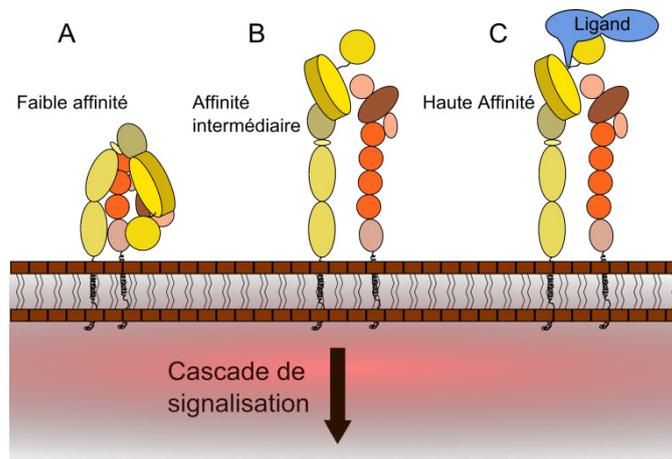


Figure 10 : Structure de l'intégrine et son état d'activation : (A) état inactif et non lié, (B) état intermédiaire déplié, (C) état actif.

Parmi les 24 combinaisons, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ apparaît comme un régulateur critique de l'angiogénèse. Cette intégrine semble, de manière significative, surexprimée à la surface des cellules endothéliales. Elle se lie à de nombreux composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, vitronectine, les facteurs de von Willebrand et l'ostéopontine. Elle peut de plus interagir avec les composants basaux de la matrice extracellulaire comme la laminine ou le collagène par exemple. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est exprimée sur de nombreux types de cellules lors de l'embryogénèse. Lors de l'angiogénèse, son expression est pourtant en premier lieu limitée sur les cellules endothéliales⁸.

Le blocage de cette intégrine par de petites molécules, par des peptides ou des anticorps interrompt la néovascularisation chez un certain nombre d'animaux. En effet, la liaison de molécules aux intégrines interfère avec leur liaison à l'ECM et peut promouvoir l'apoptose. Le fait que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ soit sélectivement exprimée sur les cellules endothéliales en prolifération (et généralement pas sur les vaisseaux sanguins) en fait un bon candidat pour la "drug delivery" ciblée, ainsi que pour l'imagerie médicale.

8. (a) Manakan, B. S.; Zent, R., *Integrin Structure and Function, Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*. Springer science 2010, Chapter 2; (b) Stupack, D. G.; Cheresh, D. A., *Integrins and Angiogenesis*. In *Current Topics in Developmental Biology*, Academic Press: 2004; Vol. Volume 64, pp 207-238.

I.3.1.2. *Le ligand « RGD »*

De nombreuses protéines sont des ligands naturels de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, comme par exemple la vitronectine, le fibrinogène ou la trombosptine. En 1984, le groupe d'Erkki Ruoslahti a découvert, au sein de la fibronectine, une séquence tripeptidique Arg-Gly-Asp (RGD) qui se trouve être un élément essentiel dans la reconnaissance des cellules *via* l'intégrine⁹(Figure 11).

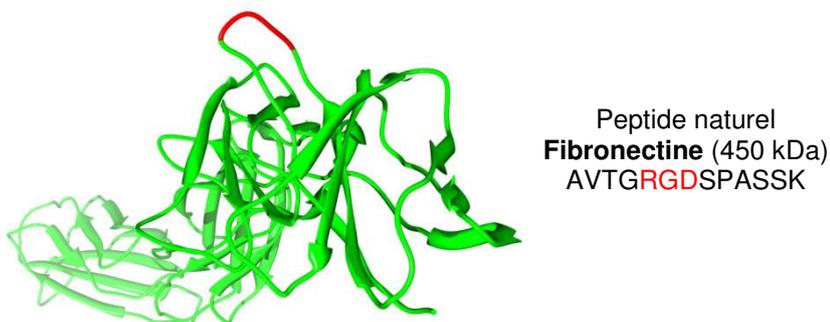


Figure 11 : Structure cristallographique d'un fragment de la fibronectine humaine¹⁰.

Cette découverte a donné un rôle majeur à ce tripeptide et cette séquence de reconnaissance a fait l'objet de nombreuses études et modifications. En effet, du fait de cette petite structure de seulement trois acides aminés, le site de reconnaissance peut aisément être reproduit ou mimé par des peptides de synthèses. De nombreux peptides linéaires présentant la séquence -RGD- ont été synthétisés et évalués. Cependant ces composés se sont révélés peu affins et peu spécifiques *in vivo*. En effet, les peptides linéaires peuvent adopter différentes conformations ce qui diminue leur affinité envers le récepteur. Ils peuvent de plus être rapidement dégradés par les protéases, ce qui diminue leur biodisponibilité. A partir de 1990, le groupe de Horst Kessler, a conçu des penta et hexapeptides cycliques. Il montre que sous une forme contrainte, le pentapeptide cyclo(-RGDfV-) est un meilleur ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (IC₅₀ de 50 nM en compétition avec la vitronectine) en comparaison à une forme linéaire GRGDS (IC₅₀ de 750 nM en compétition avec la vitronectine)¹¹. Son analogue méthylé s'est révélé par la suite plus affiné et plus sélectif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Il possède une IC₅₀ pour l'inhibition de $\alpha_v\beta_3$ de 1 nM, alors que son IC₅₀ d'inhibition de $\alpha_v\beta_3$ n'est que de 140 nM (en comparaison avec la vitronectine). Il ne reconnaît pas l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, récepteur au fibrinogène, qui est le récepteur déclenchant l'agrégation des plaquettes¹². Il est évalué, sous le nom de Cilengitide (Merck KGaA),

9. Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E., Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **1984**, *309* (5963), 30-33.

10. Leahy, D. J.; Aukhil, I.; Erickson, H. P., 2.0 Å Crystal Structure of a Four-Domain Segment of Human Fibronectin Encompassing the RGD Loop and Synergy Region. *Cell* **1996**, *84* (1), 155-164.

11. (a) Aumailley, M.; Gurrath, M.; Müller, G.; Calvete, J.; Timpl, R.; Kessler, H., Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett* **1991**, *291* (1), 50-54; (b) Pfaff, M.; Tangemann, K.; Müller, B.; Gurrath, M.; Müller, G.; Kessler, H.; Timpl, R.; Engel, J., Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins. *J Biol Chem* **1994**, *269* (32), 20233-8.

12. (a) Goodman, S. L.; Hölzemann, G.; Sulyok, G. A. G.; Kessler, H., Nanomolar Small Molecule Inhibitors for $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_5$, and $\alpha_v\beta_3$ Integrins. *J Med Chem* **2002**, *45* (5), 1045-1051; (b) Eskens, F. A. L. M.; Dumez, H.; Hoekstra, R.; Perschl, A.; Brindley, C.; Böttcher, S.; Wynendaele, W.; Drevs, J.; Verweij, J.; van Oosterom, A. T., Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* **2003**, *39* (7), 917-926.

dans des études cliniques de phases II et III pour le traitement de glioblastomes multiformes, de mélanomes de stades avancés et de cancers métastasés de la prostate¹³.

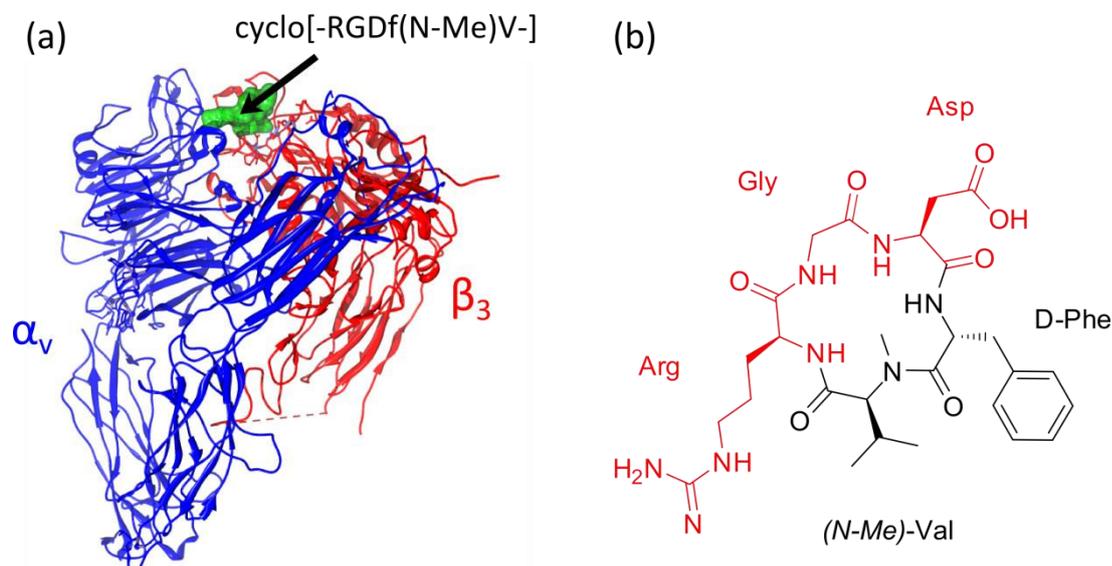


Figure 12 : (a) Représentation de la structure du domaine extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ associée au ligand c[-RGDf(N-Me)V-]¹⁴, (b) Structure du Cilengitide c[-RGDf(N-Me)V-].

Suite à la découverte du cilengitide, ayant une bonne affinité et sélectivité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, de nombreuses études ont été réalisées afin d'étudier ses propriétés de ciblage pour des applications d'imagerie médicales. Parmi ces composés, le groupe de Kessler a synthétisé un composé radiomarqué, le [¹⁸F]-galacto-RGD- pour l'étude de la biodistribution et de la spécificité de marquage tumoral chez le petit animal. Ils ont montré une accumulation rapide et importante du composé au niveau de la tumeur (3-4% ID/g en 10 min)¹⁵. Cependant la durée de vie du ¹⁸F étant relativement courte ($t_{1/2} = 110$ min), il est difficile de préparer ces composés radiomarqués. D'autres alternatives ont alors été développées comme le couplage de radiotraceurs ayant des durées de vie plus longues : le ⁶⁴Cu¹⁶, le ⁶⁸Ga¹⁷ ou le ^{99m}Tc¹⁸ par exemple. Pour cela les composés -RGD- sont liés à des agents de chélation comme le DOTA ou le cyclam.

13. Stupp, R.; Rugg, C., Integrin Inhibitors Reaching the Clinic. *J Clin Oncol* **2007**, *25* (13), 1637-1638.
14. Xiong, J.-P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A., Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin $\alpha_v\beta_3$ in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. *Science* **2002**, *296* (5565), 151-155.
15. Haubner, R.; Wester, H.-J.; Weber, W. A.; Mang, C.; Ziegler, S. I.; Goodman, S. L.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Kessler, H.; Schwaiger, M., Noninvasive Imaging of $\alpha_v\beta_3$ Integrin Expression Using 18F-labeled RGD-containing Glycopeptide and Positron Emission Tomography. *Cancer Res* **2001**, *61* (5), 1781-1785.
16. (a) Wu, Y.; Zhang, X.; Xiong, Z.; Cheng, Z.; Fisher, D. R.; Liu, S.; Gambhir, S. S.; Chen, X., microPET Imaging of Glioma Integrin $\alpha_v\beta_3$ Expression Using 64Cu-Labeled Tetrameric RGD Peptide. *J Nucl Med* **2005**, *46* (10), 1707-1718; (b) Dumont, R. A.; Deininger, F.; Haubner, R.; Maecke, H. R.; Weber, W. A.; Fani, M., Novel 64Cu- and 68Ga-Labeled RGD Conjugates Show Improved PET Imaging of $\alpha_v\beta_3$ Integrin Expression and Facile Radiosynthesis. *Ibid.* **2011**, *52* (8), 1276-1284.
17. Liu, Z.; Niu, G.; Wang, F.; Chen, X., 68Ga-labeled NOTA-RGD-BBN peptide for dual integrin and GRPR-targeted tumor imaging. *Eur J Nucl Med Mol I* **2009**, *36* (9), 1483-1494.
18. Wang, L.; Shi, J.; Kim, Y.-S.; Zhai, S.; Jia, B.; Zhao, H.; Liu, Z.; Wang, F.; Chen, X.; Liu, S., Improving Tumor-Targeting Capability and Pharmacokinetics of 99mTc-Labeled Cyclic RGD Dimers with PEG4 Linkers. *Mol Pharmaceut* **2008**, *6* (1), 231-245.

Dernièrement, afin de pallier au problème de désactivation du ^{18}F , deux groupes rapportent l'utilisation du lien éther d'oxime et du lien tétrazine pour lier rapidement le 5-fluoro-5-deoxy-ribose au ligand -RGD-¹⁹.

Les cyclopentapeptides -RGD- ont de plus été largement utilisés dans le but d'acheminer des composés thérapeutiques vers les cellules tumorales. On trouve de nombreux exemples dans la littérature. Le premier bioconjugué à avoir été évalué fut le conjugué avec la doxorubicine (agent intercalant) qui a montré une activité aussi importante que le composé seul mais en ayant une toxicité plus faible pour les organes comme le cœur ou le foie²⁰. Par la suite de nombreux agents cytotoxiques ont été couplés comme par exemple le paclitaxel²¹, la camptothécine²², ou des peptides cytotoxiques²³

Très récemment, il a été découvert un nouveau peptide cyclique contenant la séquence -RGD-, capable d'interagir avec un récepteur transmembranaire du VEGF, la Neuropiline-1. Ce peptide, nommé iRGD (internalizing RGD), reconnaît la cellule tumorale *via* sa séquence -RGD- et pénètre dans la cellule tumorale *via* une séquence CendR (C-end Rule)²⁴. Il a été reporté par le groupe d'Erkki Ruoslahti, qui a travaillé de nombreuses années sur la recherche de nouveaux peptides de pénétration tumorale, que cette séquence CendR, exposée à l'extrémité C-terminale du peptide pouvait interagir avec la neuropiline-1 et déclencher l'internalisation du peptide. Le peptide iRGD est ainsi un agent de ciblage capable d'induire la pénétration tumorale et donc la possibilité de délivrer un principe actif à l'intérieur de la cellule (Figure 13).

19. (a) Dall'Angelo, S.; Zhang, Q.; Fleming, I. N.; Piras, M.; Schweiger, L. F.; O'Hagan, D.; Zanda, M., Efficient bioconjugation of 5-fluoro-5-deoxy-ribose (FDR) to RGD peptides for positron emission tomography (PET) imaging of [small alpha]v[small beta]3 integrin receptor. *Org Biomol Chem* **2013**; (b) Selvaraj, R.; Liu, S.; Hassink, M.; Huang, C.-w.; Yap, L.-p.; Park, R.; Fox, J. M.; Li, Z.; Conti, P. S., Tetrazine-trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of integrin $\alpha v \beta 3$ targeted PET tracer based on a cyclic RGD peptide. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, *21* (17), 5011-5014.

20. Arap, W.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E., Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. *Science* **1998**, *279* (5349), 377-380.

21. Chang, M.-W.; Lo, J.-M.; Juan, H.-F.; Chang, H.-Y.; Chuang, C.-Y., Combination of RGD Compound and Low-Dose Paclitaxel Induces Apoptosis in Human Glioblastoma Cells. *Plos One* **2012**, *7* (5), e37935.

22. Dal Pozzo, A.; Ni, M.-H.; Esposito, E.; Dallavalle, S.; Musso, L.; Bargiotti, A.; Pisano, C.; Vesci, L.; Bucci, F.; Castorina, M.; Foderà, R.; Giannini, G.; Alicino, C.; Penco, S., Novel tumor-targeted RGD peptide-camptothecin conjugates: Synthesis and biological evaluation. *Bioorgan Med Chem* **2010**, *18* (1), 64-72.

23. Ellerby, H. M.; Arap, W.; Ellerby, L. M.; Kain, R.; Andrusiak, R.; Rio, G. D.; Krajewski, S.; Lombardo, C. R.; Rao, R.; Ruoslahti, E.; Bredesen, D. E.; Pasqualini, R., Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* **1999**, *5* (9), 1032-8.

24. (a) Sugahara, K. N.; Teesalu, T.; Karmali, P. P.; Kotamraju, V. R.; Agemy, L.; Girard, O. M.; Hanahan, D.; Mattrey, R. F.; Ruoslahti, E., Tissue-Penetrating Delivery of Compounds and Nanoparticles into Tumors. *Cancer Cell* **2009**, *16* (6), 510-520; (b) Ye, Y.; Zhu, L.; Ma, Y.; Niu, G.; Chen, X., Synthesis and evaluation of new iRGD peptide analogs for tumor optical imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21* (4), 1146-1150.

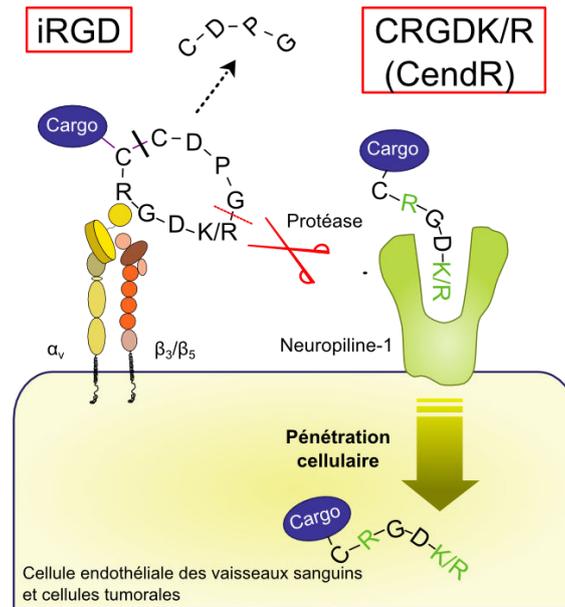


Figure 13 : Mécanisme d'action du peptide iRGD

En résumé, l'interaction entre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la matrice extracellulaire semble cruciale pour la prolifération des cellules endothéliales à partir de néo-vaisseaux lors de l'angiogénèse. Par ailleurs, il a été montré que les intégrines agissaient de façon coopérative et en association avec les récepteurs aux facteurs de croissances. En effet, il serait possible que l'intégrine régule fonctionnellement les signaux facteurs de croissances afin de permettre à la cellule de répondre à son environnement. Durant l'angiogénèse, un ou plusieurs facteurs de croissances vont initier un programme de prolifération et de migration cellulaire. Cette cascade biologique pourra être régulée par différentes intégrines comme par exemple $\alpha_v\beta_3$ et les facteurs de croissance de bEGF et VEGF.

I.3.2. Les récepteurs aux facteurs de croissance

De nombreuses autres protéines membranaires jouent un rôle important dans la prolifération, la vascularisation et le développement du cancer. Parmi l'ensemble de ces protéines on peut citer les récepteurs aux facteurs de croissance comme EGFR (epidermal growth factor receptor) et VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor). Ils jouent tous les deux un rôle critique dans le développement des tumeurs solides. Ces deux protéines sont localisées sur la membrane extracellulaire et possèdent un domaine externe qui se lie à des ligands solubles et un domaine transmembranaire véhiculant les informations vers le domaine intracellulaire.

I.3.2.1. Les récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques

Le récepteur aux facteurs de croissance épidermiques (EGFR) est une protéine responsable de la différenciation et de la prolifération cellulaire, *via* son activation par la fixation d'un ligand spécifique. Le récepteur est localisé sur la surface cellulaire. La fixation du ligand EGF active une tyrosine kinase dans le milieu intracellulaire. Cette tyrosine kinase va alors déclencher une cascade de signalisation induisant la croissance cellulaire et l'expression de certains oncogènes (*fos, jun...*) (Figure 14).

EGFR est impliqué dans le développement de la tumeur, et son gène est le plus souvent surexprimé ou muté sur les cellules cancéreuses.

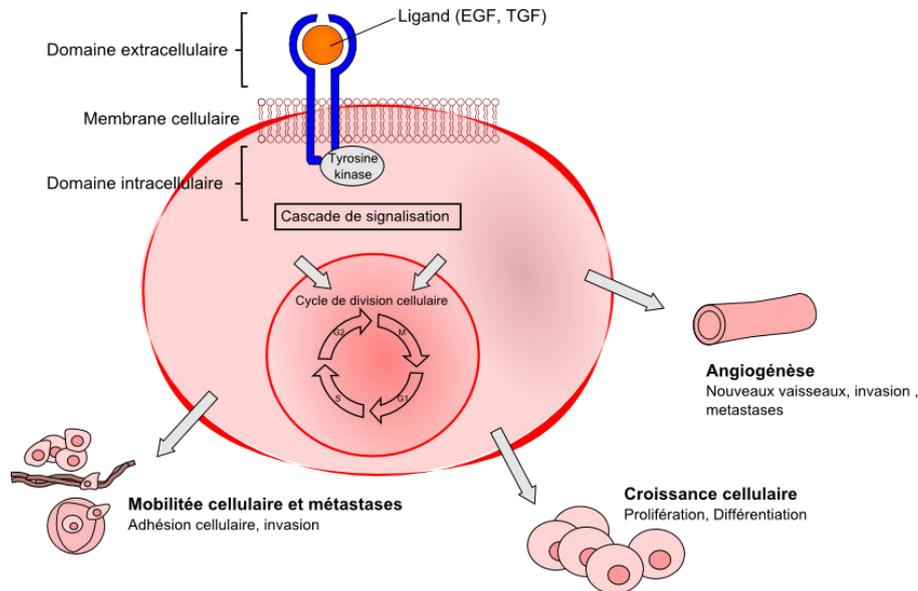


Figure 14 : Mécanisme et rôle du récepteur EGFR²⁵

EGFR est constitué d'une chaîne polypeptidique de 1186 acides aminés (170 kDa), et est exprimé sur la majorité des cellules normales. Trois régions distinctes le constituent : une région extracellulaire dont le rôle est la fixation du ligand, une région intracellulaire avec une activité à tyrosine kinase et une région transmembranaire constitué d'une ancre hydrophobe par laquelle le

25. Herbst, R. S., Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 2004, 59 (2, Supplement), S21-S26.

récepteur traverse la membrane cellulaire (Figure 15). La région extracellulaire peut être divisée en quatre domaines. Le domaine III est responsable de la fixation du ligand. Les principaux ligands de EGFR sont l'EGF (epidermal growth factor), le TGF- α (transforming growth factor), l'amphireguline (AR), le HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) et la bétacelluline (BTC).

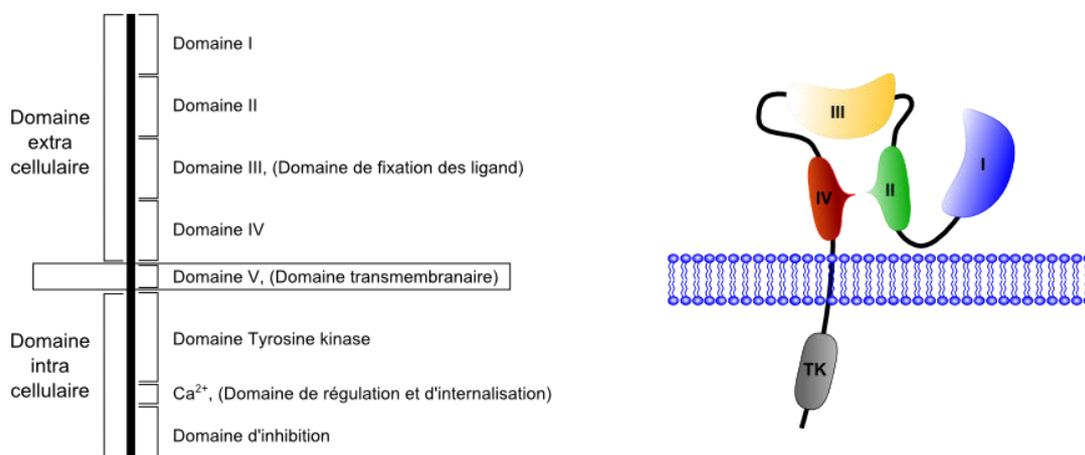


Figure 15 : Structure schématique de EGFR, avec ses domaines intra et extra-cellulaire.

La famille des récepteurs épidermiques aux facteurs de croissance (EGFR), incluant EGFR (aussi connu sous le nom de eRB1), HER2/erB2 ; et HER3/erB3, apparait comme une cible attractive pour des stratégies antitumorales. La présentation aberrante de cette famille sur la surface cellulaire est corrélée avec la progression de nombreuses tumeurs malignes. La surexpression du récepteur EGFR apparait comme une des principales raisons pour la progression et l'invasion des tumeurs malignes.

Le mécanisme d'activation du EGFR est de nos jours bien connu. La première étape passe par l'activation du récepteur par un ligand spécifique. Cette fixation va alors entraîner la dimérisation du récepteur sous la forme d'un homo ou d'un hétérodimère (avec un autre partenaire transmembranaire). Sous sa forme dimérique, le récepteur sera alors actif et pourra induire une cascade de signalisation avec la phosphorylation de résidus tyrosines, et ainsi déclencher le mécanisme de différenciation et de prolifération cellulaires (Figure 16).

L'activation de ce récepteur par ses ligands spécifiques peut entraîner une internalisation de ceux-ci dans des compartiments de l'endosome *via* une endocytose et permettre ainsi le passage de la membrane cellulaire. A partir de là, le récepteur pourra être dégradé par des lysosomes ou recyclé sur la surface cellulaire²⁶.

26. Madhus, I. H.; Stang, E., Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J Cell Sci* **2009**, *122* (19), 3433-3439.

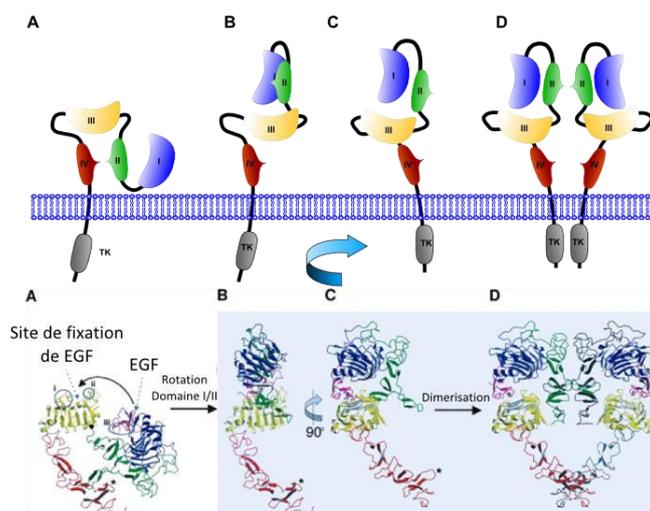


Figure 16 : Réarrangement du récepteur EGFR vers un état actif dimérique²⁷.

- **Thérapie ciblant la famille EGFR**

La famille des récepteurs épidermiques aux facteurs de croissance (EGFR), est une cible rationnelle pour la vectorisation de composé et le traitement des tumeurs solides. En effet le degré d'expression des récepteurs membranaires varie de façon croissante sur un large panel de lignées cellulaires tumorales (cancer des voies aérodigestives supérieures, des ovaires, du col de l'utérus, de la vessie, de l'œsophage...).

Les stratégies cliniques de ciblage et ou d'inhibition les plus avancés concernant EGFR incluent les anticorps monoclonaux bloquant la partie extracellulaire du domaine de fixation du ligand et des petites molécules inhibant le domaine intracellulaire à tyrosine kinase. On pourra citer, par exemple, le cetuximab (Erbix) qui est le plus étudié parmi les anticorps anti-EGFR. Il est approuvé dans de nombreux pays pour le traitement des métastases des voies aérodigestives supérieures. C'est un anticorps chimérique qui se lie avec une très haute affinité au récepteur EGFR. Il bloque ainsi le site de fixation du ligand et provoque l'internalisation du récepteur et sa dégradation, induisant une baisse d'expression du récepteur à la surface cellulaire.²⁸

Agents	Cibles
Anticorps monoclonaux	
Cetuximab (C225)	Colon, tête et cou, poumon, pancréas, sein, col de l'utérus, estomac, ovaires, reins ...
Panitumumab (ABX-EGF)	Colon, rein, poumon
Matuzumab (EMD-72000)	voies aérodigestives supérieures, colon, gastroœsophagien, ovaires, col de l'utérus
Inhibiteurs de la Tyrosine Kinase	
Gefitinib (ZD1839)	poumon, colon, voies aérodigestives supérieures, seins, prostate, vessie, œsophage
Erlotinib (OSI-774)	poumon, pancréas, voies aérodigestives supérieures, seins, ovaires, prostate, colon, glioblastome multiforme

Tableau 3 : Agents de ciblage de EGFR.

27. Ferguson, K. M.; Berger, M. B.; Mendrola, J. M.; Cho, H.-S.; Leahy, D. J.; Lemmon, M. A., EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Molecular Cell* **2003**, *11* (2), 507-517.

28. Rocha-Lima, C. M.; Soares, H. P.; Raez, L. E.; Singal, R., EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control* **2007**, *14* (3), 295-304.

En résumé, les récepteurs de la famille de EGFR sont le plus souvent surexprimé sur un large panel de lignée cellulaire tumorale. Ils sont actuellement utilisés comme cible en thérapie anticancéreuse par des anticorps monoclonaux. De ce fait, il semble intéressant de développer de nouvelles molécules synthétiques, capables de cibler spécifiquement ces récepteurs.

1.3.2.2. Les récepteurs aux facteurs de croissances vasculaires et la neuropiline

Comme discuté précédemment, l'angiogénèse est un mécanisme critique dans l'initiation des tumeurs et la progression de celles-ci vers un état malin. Différentes stratégies visant à bloquer les facteurs de croissance vasculaire (VEGF) *via* son récepteur ont été développées afin d'inhiber l'angiogénèse chez les patients atteints de tumeurs solides²⁹.

Les facteurs de croissances vasculaires endothéliales (VEGF) sont des protéines de signal produites par les cellules pour stimuler la vascularisation et l'angiogénèse. Elles font partie du mécanisme complexe permettant l'apport en oxygène aux tissus quand la circulation préexistante ne le permet pas. La fonction normale de ces protéines est de créer de nouveaux vaisseaux pendant le développement embryonnaire, après une inflammation ou vers le muscle après un exercice. Les tumeurs solides ne peuvent pas grossir indéfiniment sans un apport adéquat en oxygène. Les cellules tumorales pouvant sur-exprimer VEGF sont alors capable de se développer et de métastaser.

Touts les membres de la famille VEGF stimulent une réponse par fixation sur un récepteur à tyrosine kinase (VEGFR) situé sur la membrane cellulaire. La fixation du ligand induit comme pour le récepteur EGFR une dimérisation, état actif *via* lequel il va être phosphorylé et induire une cascade de signalisation. Les récepteurs de VEGF possèdent une portion extracellulaire constitués de 7 domaines déterminant antigénique (immunoglobulin-like) pour la fixation des ligands solubles, un domaine membranaire et une portion intracellulaire constituée du domaine tyrosine kinase³⁰ (Figure 17).

29. Ferrara, N.; Mass, R. D.; Campa, C.; Kim, R., Targeting VEGF-A to Treat Cancer and Age-Related Macular Degeneration. *Annual Review of Medicine* **2007**, *58* (1), 491-504.

30. (a) Hoeben, A.; Landuyt, B.; Highley, M. S.; Wildiers, H.; Van Oosterom, A. T.; De Bruijn, E. A., Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev* **2004**, *56* (4), 549-580; (b) Holmes, K.; Roberts, O. L.; Thomas, A. M.; Cross, M. J., Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* **2007**, *19* (10), 2003-2012.

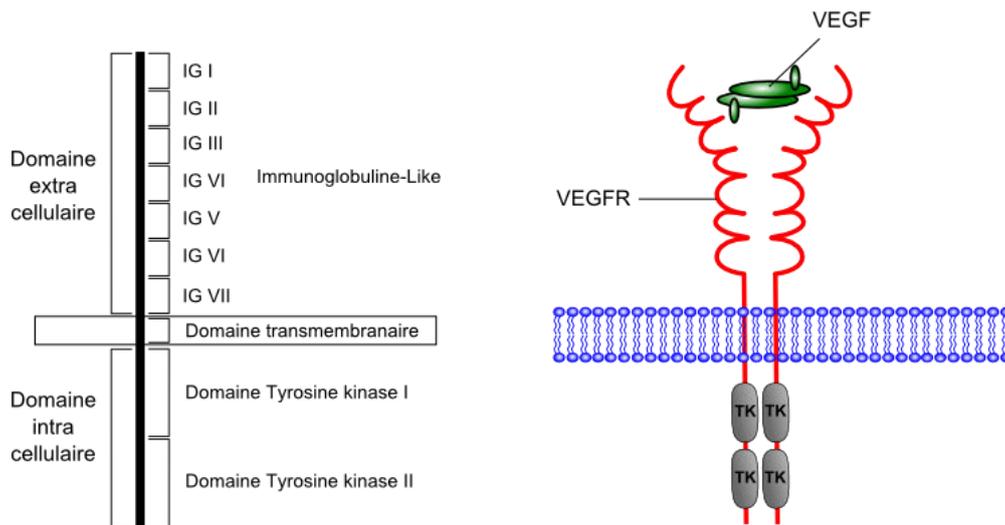


Figure 17 : Structure schématique de VEGFR, avec ses domaines intra et extra-cellulaire.

Les mécanismes liés aux facteurs de croissance vasculaire sont compliqués par le fait que les ligands et leurs récepteurs interagissent avec des protéines cellulaires additionnelles ou co-récepteurs comme la neuropiline-1 (NRP-1), l'héparine sulfate, ou comme discuté précédemment les intégrines.

NRP-1, en particulier, a été découvert comme un co-récepteur du VEGF. Il a été montré qu'il possède des activités *via* un nombre important de facteurs de croissance comme VEGF, PDGF et HGF. La surexpression de NRP-1 dans plusieurs types de lignée cellulaire tumorale a été corrélée avec la croissance et la progression cellulaire. La neuropiline est une glyco-protéine transmembranaire formée d'un domaine intracellulaire court et d'un domaine extracellulaire porteur de deux domaines de liaisons complémentaires (CUB), de deux domaines variables (FV) et d'un domaine MAM impliqué dans les interactions des neuropilines entre elles et avec d'autres récepteurs.³¹

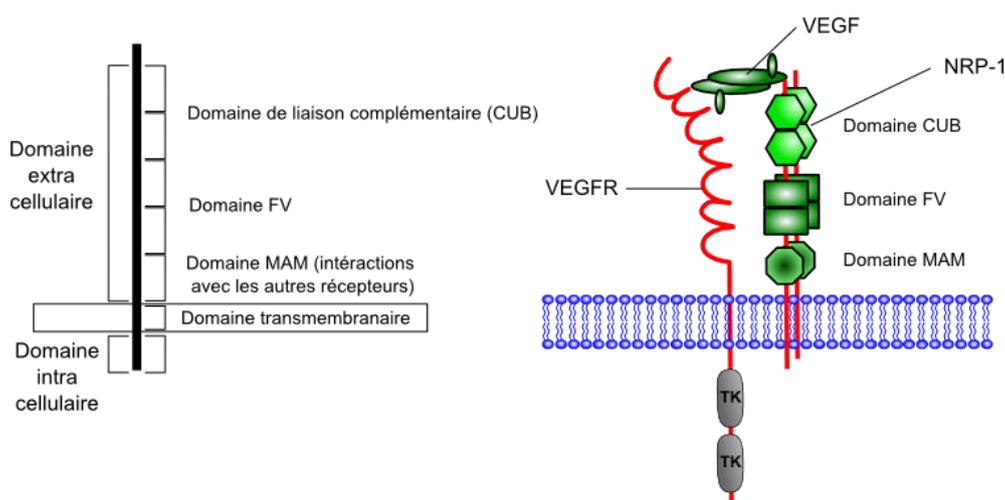


Figure 18 : Structure schématique de NRP-1, avec ses domaines intra et extra-cellulaire et son interaction avec VEGFR.

31. Ellis, L. M., The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* 2006, 5 (5), 1099-1107.

Le blocage du site de fixation de VEGF avec un anticorps anti-NRP-1 a montré de façon préclinique une réduction de la vascularisation tumorale et une augmentation de l'activité des thérapies avec les anticorps anti-VEGF en retardant la croissance tumorale³². Actuellement un anticorps monoclonal anti-NRP-1 a montré une bonne efficacité pour la réduction de la croissance cellulaire et est actuellement en phase I (Genentech). Le ciblage de NRP1 par des petites molécules organiques, au lieu de VEGF directement, peut être développé comme une nouvelle voie de traitement avec moins d'effet secondaire au niveau cardiovasculaire. Du fait de multiples voies de signalisation, *via* NRP-1, le ciblage de NRP-1 au lieu de VEGF, pourrait de plus engendrer moins de résistance au traitement, qui est un gros problème lors d'un traitement avec des anti-VEGF³³. Récemment le groupe de David Selwood a reporté l'utilisation et la synthèse d'un inhibiteur de NRP-1, modélisé à partir de la partie C-terminale de VEGF-A, comme agent antitumoral et comme alternative au traitement biologique par les anticorps. Ils ont montré une réduction de la *viabilité* des cellules tumorales A549 (cancer du poumon) après injection de leur composé et une augmentation de l'effet des traitements avec des agents anticancéreux comme le paclitaxel par exemple quand celui-ci est co-administré avec le traitement³⁴.

32. Pan, Q.; Chanthery, Y.; Liang, W.-C.; Stawicki, S.; Mak, J.; Rathore, N.; Tong, R. K.; Kowalski, J.; Yee, S. F.; Pacheco, G.; Ross, S.; Cheng, Z.; Le Couter, J.; Plowman, G.; Peale, F.; Koch, A. W.; Wu, Y.; Bagri, A.; Tessier-Lavigne, M.; Watts, R. J., Blocking Neuropilin-1 Function Has an Additive Effect with Anti-VEGF to Inhibit Tumor Growth. *Cancer Cell* **2007**, *11* (1), 53-67.

33. <http://www.arktherapeutics.com/main/products.php?content=nrp1>.

34. Jarvis, A.; Allerston, C. K.; Jia, H.; Herzog, B.; Garza-Garcia, A.; Winfield, N.; Ellard, K.; Aqil, R.; Lynch, R.; Chapman, C.; Hartzoulakis, B.; Nally, J.; Stewart, M.; Cheng, L.; Menon, M.; Tickner, M.; Djordjevic, S.; Driscoll, P. C.; Zachary, I.; Selwood, D. L., Small Molecule Inhibitors of the Neuropilin-1 Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) Interaction. *J Med Chem* **2010**, *53* (5), 2215-2226.

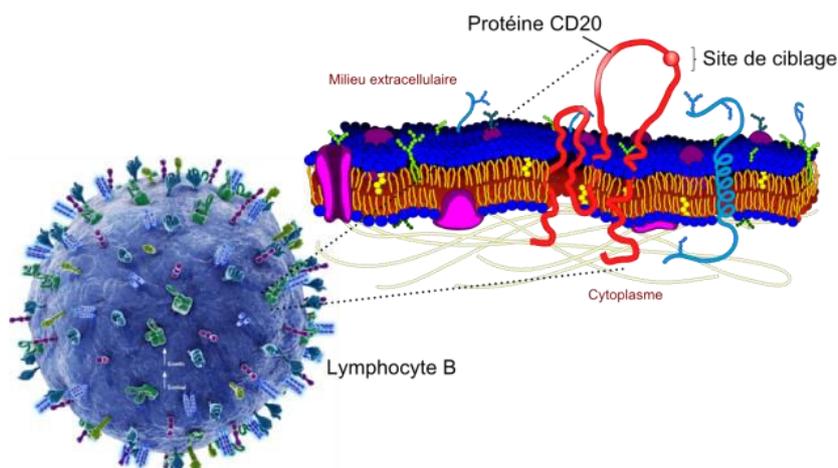


Figure 20 : Expression de CD20 sur la surface cellulaire

La reconnaissance de celui-ci n'entraîne pas une modification de la production d'immunoglobuline puisque CD20 n'agit pas au niveau de la transcription du gène codant pour les anticorps. Ils ne jouent aucun rôle dans leur biosynthèse, leur maturation ou leur internalisation. Enfin il n'affecte pas le développement de nouveaux lymphocytes B car non présent sur les cellules souches hématopoïétique ou sur les cellules plasmatiques³⁸. Par conséquent, le ciblage de la surface des cellules B-matures *via* CD20 apparaît comme une voie de traitement intéressante pour la thérapie anticancéreuse.

A ce jour aucun ligand naturel n'a été découvert et les seuls ligands reconnaissant CD20 sont des anticorps monoclonaux.

I.3.3.2. *Les anticorps monoclonaux thérapeutiques*

Les anticorps monoclonaux (mAb) sont des anticorps mono-spécifiques car ils sont produits par des cellules du système immunitaire identiques qui sont des clones obtenus à partir d'une unique cellule B parente. A l'inverse, les anticorps polyclonaux sont fabriqués à partir de plusieurs types de cellules du système immunitaire. La présentation d'un antigène (protéines, polysaccharides ou lipides...) à une cellule B, va induire la production d'anticorps monoclonaux capable de cibler spécifiquement cet antigène. Ces anticorps pourront par la suite être utilisés pour la détection ou la purification de cette substance. Les anticorps monoclonaux sont devenus aujourd'hui un outil majeur en biochimie, biologie moléculaire et médecine.

La production d'anticorps monoclonaux impliquant des cellules murines humanisés fut pour la première fois décrite par J. Schwaber en 1973³⁹. En 1975 G. Köhler, C. Milstein et N.K. Jerne proposent l'utilisation d'une lignée cellulaire de myélome immortelle ayant perdu leur habilité à produire des anticorps. Ils vont alors les fusionner avec des lymphocytes B sains capable de produire des anticorps contre un antigène. Enfin les hybridomes créés, devenues immortels, sont sélectionnés afin de les multiplier pour la production d'anticorps⁴⁰. Le clone ainsi

38. Glennie, M. J.; French, R. R.; Cragg, M. S.; Taylor, R. P., Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* **2007**, *44* (16), 3823-3837.

39. Schwaber, J.; Cohen, E. P., Human x Mouse Somatic Cell Hybrid Clone secreting Immunoglobulins of both Parental Types. *Nature* **1973**, *244* (5416), 444-447.

40. Kohler, G.; Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Ibid.* **1975**, *256*, 495-497.

conçu aura alors la capacité de produire une quantité illimitée de mAbs (Figure 21). Ils reçurent le prix Nobel en 1984 pour leurs travaux.

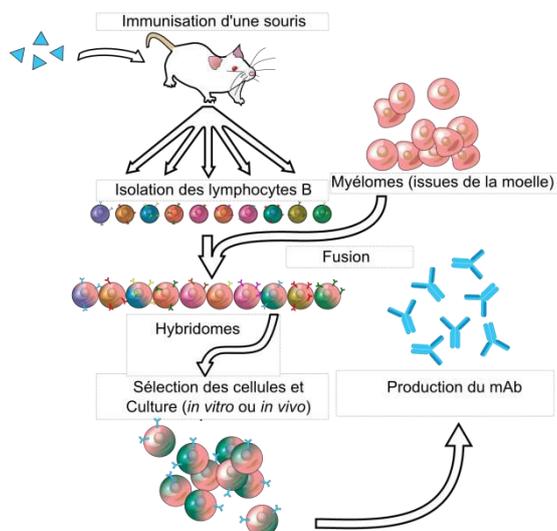


Figure 21 : Processus d'obtention de mAb selon Köhler et Milstein⁴¹

- **Structure et fonctions**

Les anticorps sont des glycoprotéines de la famille des immunoglobulines tel que IgG (150 000 dalton), formé de 4 chaînes polypeptidiques: 2 chaînes lourdes (**H** pour *heavy* de 50 000 Da chacune, en bleu sur la Figure 22) et 2 chaînes légères (**L** pour *light* de 25 000 Da chacune, en vert) qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures (en rouge) assurant la rigidité de la molécule. Ces chaînes forment une structure en Y. On distingue deux domaines, le domaine Fab (fragment antigen binding) et le domaine constant Fc (fragment cristallisable). Le fragment Fab est formé de la chaîne légère entière ($V_L + C_L$) et d'une partie de la chaîne lourde. Il est monovalent et responsable de la fixation de l'antigène *via* son site de reconnaissance appelé CDR (complementary determining region). L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde (V_H) et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère (V_L) constitue le site de reconnaissance (ou paratope) de l'antigène.

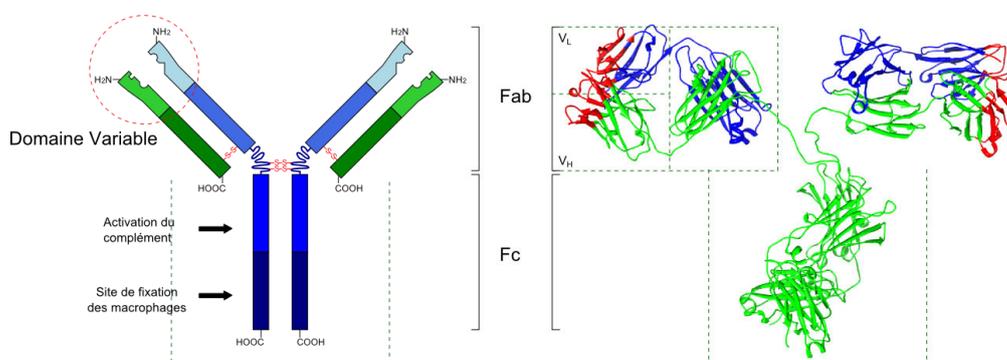


Figure 22 : Structure d'un mAb

41. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Monoclonals-gl.png>.

Ainsi, une molécule d'immunoglobuline possède deux sites de liaison à l'antigène. Ces deux sites sont identiques (mais destinés à différents épitopes), d'où la possibilité de lier deux molécules d'antigène par anticorps⁴².

Le site de fixation de l'anticorps est lui-même composé de plusieurs boucles hypervariables qui ont des longueurs et des séquences différentes. La gamme étendue de ces boucles permet aux anticorps d'avoir une grande diversité de reconnaissance puisque chaque site de fixation va être spécifique d'un antigène. Le reste de l'anticorps est lui-même constitué d'un domaine constant avec une structure relativement identique. Il intervient dans l'activation du système du complément et dans la reconnaissance de celui-ci par les macrophages. Ainsi, au cours de la réponse immunitaire, les anticorps ont trois fonctions principales : bloquer l'action de l'antigène, activer le système du complément et/ou recruter des cellules immunocompétentes. Ils ont pour rôle de protéger l'organisme contre un antigène, et vont alors déclencher la cascade du complément⁴³ (immunité innée dont le rôle est l'élimination des pathogènes) ou se lier à des cellules du système immunitaire. Les anticorps fixés sur un antigène peuvent se lier aux macrophages et déclencher une phagocytose. Les lymphocytes NK recrutés (Natural Killer) pourront alors exercer leur cytotoxicité et lyser la cellule ciblée (Figure 23).

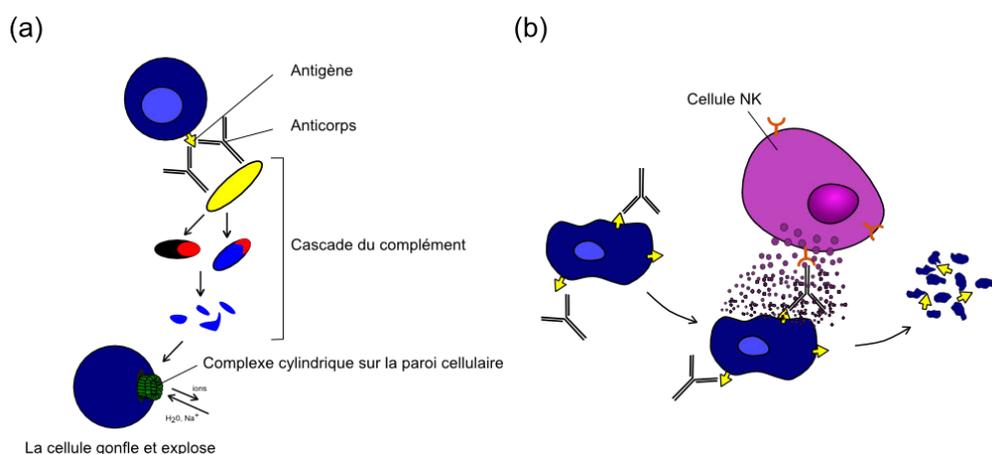


Figure 23 : (a) Activation de la cascade du complément, (b) Activation des cellules immunocompétentes

- **Cibles et traitements**

Les cibles des anticorps monoclonaux sont nombreuses puisque ceux-ci, grâce à la méthode de fabrication utilisée, peuvent être dirigés vers n'importe quel antigène souhaité. Dans le domaine de l'oncologie qui nous intéresse plus particulièrement, les mAbs vont cibler une multitude de glycoprotéines, glycopeptides et carbohydrates, présents et souvent surexprimés à la surface de la cellule cancéreuse.

En 2007, 206 mAbs anticancéreux étaient étudiés en clinique sur plus de 76 cibles différentes⁴⁴. Parmi les cibles principales, on retrouve les facteurs de croissance épithéliaux et

42. Padlan, E. A., Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* **1994**, 31 (3), 169-217.

43. (a) Ravetch, J. V.; Bolland, S., IgG Fc Receptors. *Annual Review of Immunology* **2001**, 19 (1), 275-290; (b) Rus, H.; Cudrici, C.; Niculescu, F., The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res* **2005**, 33 (2), 103-112.

44. Nelson, A. L.; Dhimolea, E.; Reichert, J. M., Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, 9 (10), 767-774.

vasculaires (EGF, HER2, VEGF...), leurs récepteurs spécifiques, ainsi que de nombreux clusters de différenciation (CD) présent sur les lymphomes (Figure 24).

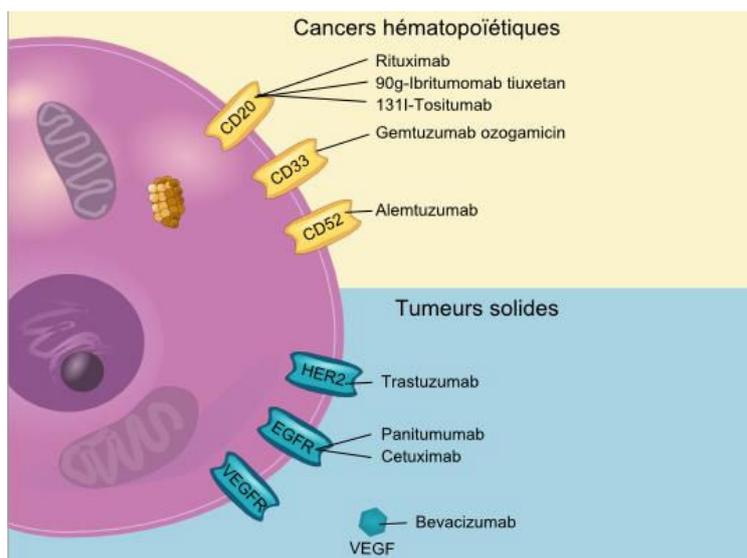


Figure 24 : Anticorps monoclonaux sur le marché et leurs cibles⁴⁵

- **Le Rituximab**

Parmi le nombre important d'anticorps monoclonaux, nous avons choisi de nous intéresser tout particulièrement au Rituximab. Le Rituximab fut le premier anticorps à être approuvé en 1997 par la FDA pour le traitement d'un cancer⁴⁶. Cet anticorps chimérique est dirigé contre la protéine transmembranaire CD20 présente sur les lymphocytes B matures. Il présente une excellente affinité de l'ordre de 5 nM contre ces cellules. Son rôle est de détruire les cellules B. Il est ainsi utilisé dans le traitement des maladies caractérisées par une surexpression, une hyperactivité ou un dysfonctionnement de ces cellules, comme par exemple, un nombre important de lymphomes et de leucémies, lors de rejet d'organes après une transplantation ou pour le traitement de maladies auto-immunes (la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique ou le syndrome de Gougerot-Sjögren)⁴⁷. De multiples mécanismes ont été proposés pour l'action du Rituximab sur l'induction de la mort des cellules B. Il est capable d'induire l'apoptose de la cellule visée de façon directe (Figure 26a), d'activer la cascade du complément (b) ou d'agir par une cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendant (ADCC) (c).

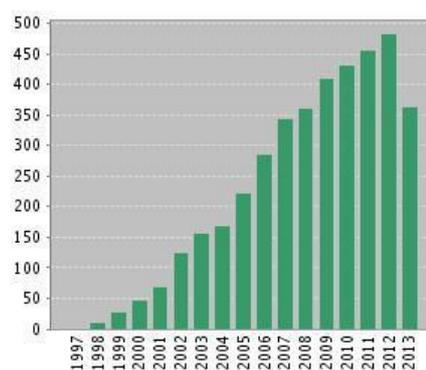


Figure 25 : Nombre de publications contenant le mot Rituximab dans le titre regroupé selon les années de parution

45. Gerber, D. E., Targeted therapies: A new generation of cancer treatments. *American Family Physician* **2008**, *77* (3), 311-319.
 46. McLaughlin, P.; Grillo-Lopez, A. J.; Link, B. K.; Levy, R.; Czuczman, M. S.; Williams, M. E.; Heyman, M. R.; Bence-Bruckler, I.; White, C. A.; Cabanillas, F.; Jain, V.; Ho, A. D.; Lister, J.; Wey, K.; Shen, D.; Dallaire, B. K., Rituximab chimeric Anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* **1998**, *16* (8), 2825-2833.
 47. Gürcan, H. M.; Keskin, D. B.; Stern, J. N. H.; Nitzberg, M. A.; Shekhani, H.; Ahmed, A. R., A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* **2009**, *9* (1), 10-25.

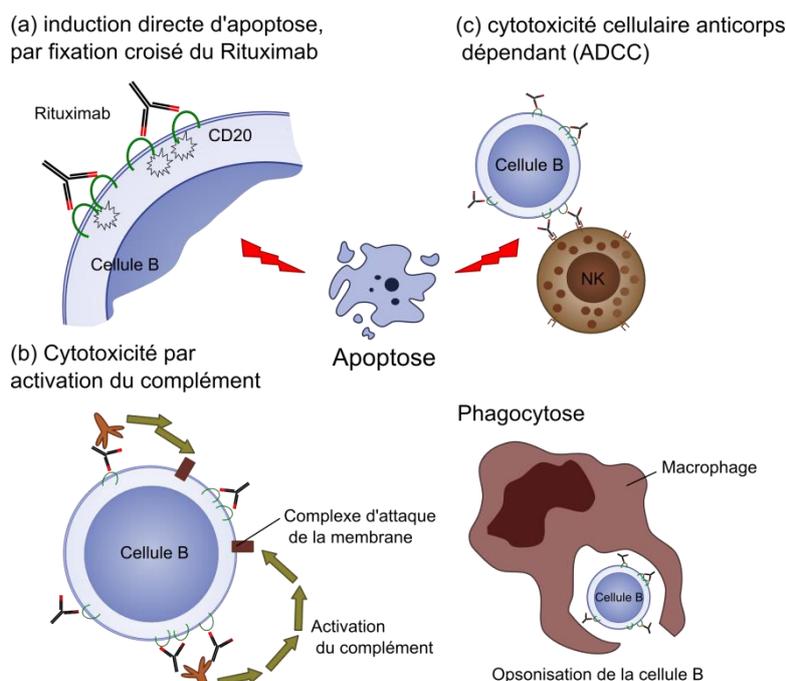


Figure 26 : Représentation schématique des différents modes d'action du Rituximab⁴⁷

Néanmoins les meilleurs résultats pour le traitement des lymphomes folliculaires ont été obtenus en combinaison avec des agents anti-cancéreux tels que le cyclophosphamide, la doxorubicine, la vincristine et le prednisone (CHOP). Le mécanisme d'action de ces deux techniques semble très différent. Cependant, la combinaison du Rituximab apporte comme avantage de rendre sensible les cellules chimiorésistantes au traitement, ce qui a pour effet d'augmenter l'efficacité du traitement⁴⁸.

L'efficacité et le succès du Rituximab ont conduit au développement d'autres anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre CD20 tels que l'Ocrelizumab (humanisé à plus de 90%), l'Oofatumumab (complètement humanisé) et une troisième génération d'anti-CD20 comportant une partie Fc glycosylé afin d'augmenter sa fixation et sa cytotoxicité⁴⁹.

- **Inconvénients majeurs de l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour la thérapie**

L'utilisation des anticorps monoclonaux, dans le traitement des maladies liées au cancer, semble aujourd'hui intéressante pour une thérapie ciblée. En effet, comme nous l'avons vu, ils peuvent être dirigés vers une multitude de cibles et possèdent une spécificité envers certaines cellules cancéreuses. Ils sont de plus capables *via* leur partie constante d'induire une réponse immunitaire et donc une destruction des cellules ciblées. Cependant leur utilisation rencontre plusieurs obstacles notamment en raison de leur poids moléculaire élevé, par rapport aux

48. (a) Czuczman, M. S.; Koryzna, A.; Mohr, A.; Stewart, C.; Donohue, K.; Blumenson, L.; Bernstein, Z. P.; McCarthy, P.; Alam, A.; Hernandez-Ilizaliturri, F.; Skipper, M.; Brown, K.; Chanan-Khan, A.; Klippenstein, D.; Loud, P.; Rock, M. K.; Benyunes, M.; Grillo-Lopez, A.; Bernstein, S. H., Rituximab in combination with fludarabine chemotherapy in low-grade or follicular lymphoma. *J Clin Oncol* **2005**, *23* (4), 694-704; (b) Vose, J. M.; Link, B. K.; Grossbard, M. L.; Czuczman, M.; Grillo-Lopez, A.; Gilman, P.; Lowe, A.; Kunkel, L. A.; Fisher, R. I., Phase II study of rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ibid.* **2001**, *19* (2), 389-397.

49. (a) Jefferis, R., Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8* (3), 226-234; (b) <http://www.healthvalue.net/actionantiCD20engl.html>.

molécules utilisées lors de chimiothérapies classiques, mais aussi dû à leur difficulté de production par voie biologique⁵⁰. En effet ceux-ci sont produits à partir de cellules procaryotes (*E. Coli*) ou eucaryotes (Chinese hamster ovary, CHP) dans des réacteurs ne pouvant excéder 10 000 L pour une production totale de seulement quelques kg⁵¹. Cette limitation est importante et engendre des prix élevés pour le médicament. Une alternative à cela pourrait être la synthèse totale ou partielle de molécules ayant la même capacité de reconnaissance.

Un autre obstacle à l'utilisation des anticorps monoclonaux réside dans le fait que la plupart des anticorps sont produits dans des cellules de rongeurs (souris, rat, hamster, lapin) ou plus rarement de poulet ou mulet. Ils peuvent donc déclencher une réaction immune lors de leur injection à un patient. Cette immunité va alors inactiver progressivement l'action bénéfique de l'anticorps. Pour éviter cela, on cherche à produire des anticorps chimériques « humanisés », modifiés par génie génétique pour remplacer au maximum les fragments constants (Fc) de l'espèce d'origine par des fragments humains et ainsi diminuer les effets secondaires d'allergies ou de choc anaphylactiques. Ces nouveaux anticorps chimériques vont donc combiner le domaine variable de fixation à l'antigène (Fab) produit chez l'animal à une partie constante d'un anticorps humains.

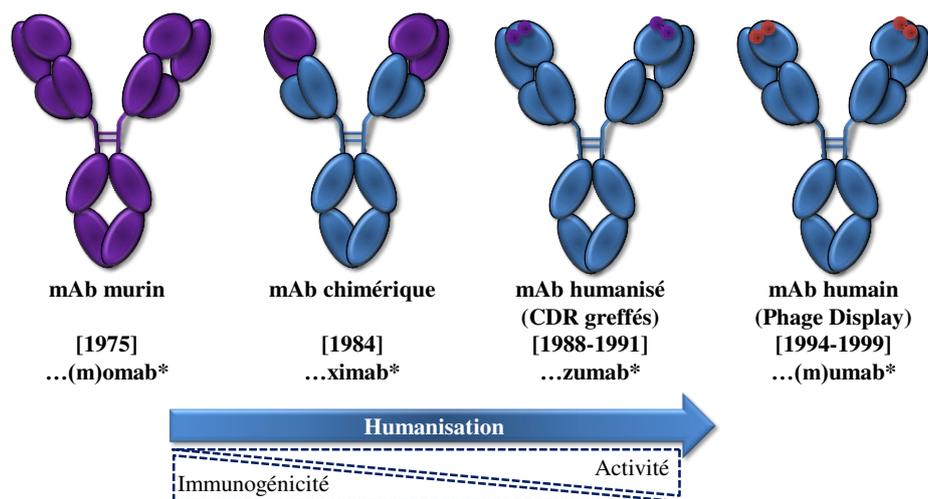


Figure 27 : Evolution des anticorps monoclonaux pour la thérapie (* terminaison du nom du mAb)

Ceci peut réduire de façon importante les réactions allergiques du patient et augmenter l'efficacité de la réponse immunitaire. La chimérisation des anticorps permet de plus d'augmenter son temps de demi-vie à l'intérieur du corps. Grâce à l'avancée du génie génétique, il est aujourd'hui possible de produire des anticorps monoclonaux totalement humanisés, mais qui restent encore très difficiles et coûteux à produire.

50. (a) Lonberg, N., Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotech* **2005**, 23 (9), 1117-1125; (b) Adams, G. P.; Weiner, L. M., Monoclonal antibody therapy of cancer. *Ibid.*, 1147-1157; (c) Hoogenboom, H. R., Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Ibid.*, 1105-1116.

51. http://www.roche.com/research_and_development/innovation_and_technologies/biotechnology/production.htm.

I.3.4. La membrane cellulaire d'une cellule cancéreuse

Comme nous l'avons vu, la membrane des cellules cancéreuses diffère de celle des cellules saines. Afin de pouvoir acquérir de nouvelles fonctions de prolifération, de différenciation ou de survie, ces cellules vont surexprimer sur leur surface de nombreuses protéines transmembranaires (EGFR, VEGFR, Nrp...) ou des antigènes (CD) qui pourront servir de cible afin de vectoriser un principe actif vers la tumeur (Figure 28). Il est possible de développer des systèmes multifonctionnels composés d'agents de ciblage tumoral grâce à la présentation de ligands en combinaison avec des éléments thérapeutiques et/ou de détection.

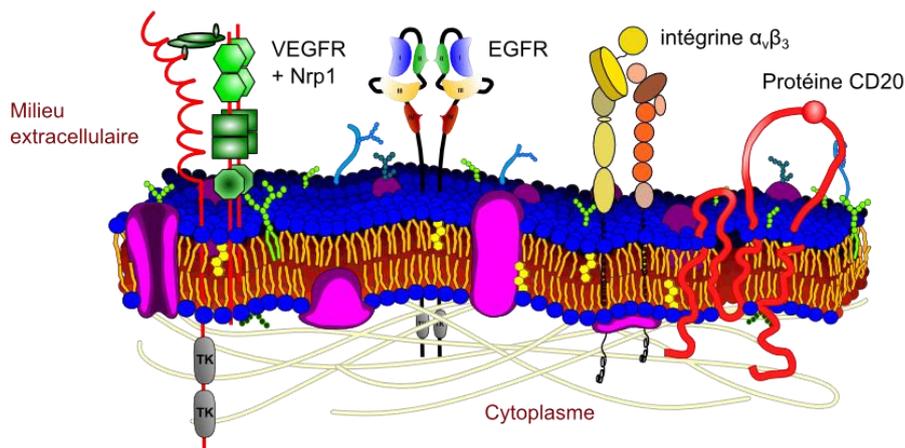


Figure 28 : Représentation des caractéristiques de la membrane d'une cellule tumorale

I.4. Les vecteurs cellulaires

La notion de « magic bullet » a été pour la première fois proposée par Paul Ehrlich, qui, au début du 20^{ème} siècle, postule que, si un composé est capable de cibler sélectivement des cellules à l'origine d'une pathologie, une toxine ou un médicament pourrait ensuite être délivré spécifiquement *via* l'agent de ciblage. Paul Ehrlich et Elie Metchnikoff ont d'ailleurs reçu le prix Nobel 1908 de médecine pour ce travail qui conduisit à un traitement efficace de la syphilis en 1910. Aujourd'hui de nombreux traitements utilisent ce principe de thérapie ciblée et notamment comme nous l'avons vu précédemment grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Il existe cependant de nombreuses autres manières de vectoriser un médicament vers sa cible. Le principe étant de trouver un ligand affiné pour une cible présente sur la surface cellulaire de la cellule maligne. Le plus souvent l'agent de ciblage, qui sert de vecteur, est relié de manière covalente au principe actif (drogue) par l'intermédiaire d'un espaceur. Les agents de ciblage peuvent être toutes sortes de biomolécules (peptide, sucre, acides nucléiques) ou autres composés organiques. Plus récemment, une autre famille de vecteur est utilisée pour délivrer des agents cytotoxiques : les nanoparticules.

I.4.1. Les nanoparticules

La vectorisation des médicaments par le biais des nanoparticules est aujourd'hui une méthode intéressante et très étudiée pour la thérapie anticancéreuse. Des nanovecteurs de plus en plus élaborés apparaissent et permettent de contourner les problèmes rencontrés à chaque génération de vecteurs. Les nanoparticules peuvent être de natures très différentes et possèdent des tailles comprises entre 1 et 200 nm. Leurs fonctions sont de protéger le principe actif à acheminer en limitant sa dégradation au cours du transport et de le délivrer uniquement à l'intérieur de la cellule à traiter. Elles sont pour la majorité synthétisées par voie chimique et possèdent ainsi des caractéristiques très différentes. Elles sont classées en plusieurs catégories : les polymères, les particules polymériques, les nanotubes de carbone, les nanoparticules inorganiques, les dendrimères et les liposomes (Figure 29).

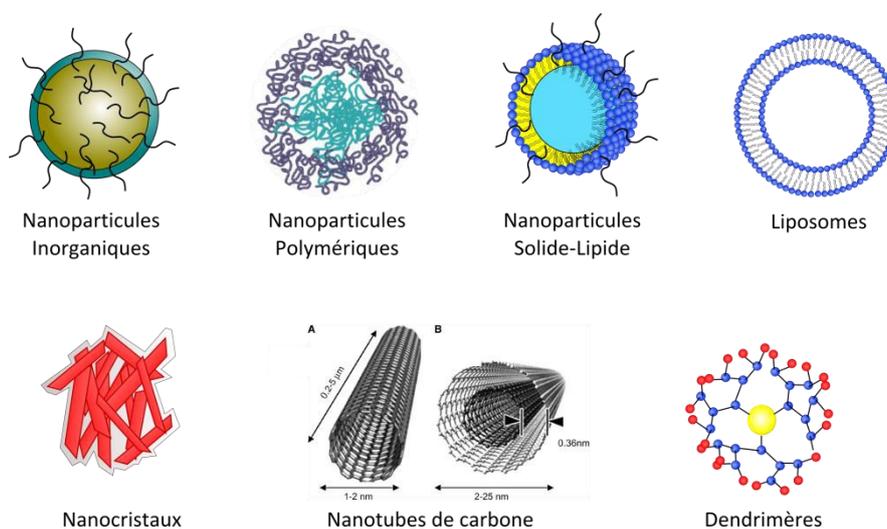


Figure 29 : Types de nanovecteurs⁵²

Selon la nature du nanovecteur, le composé à délivrer peut être soit directement greffé au vecteur par lien covalent (polymère, micelle, dendrimère), soit encapsulé à l'intérieur d'une cavité dans le cas des liposomes ou autres particules polymériques.

La biodistribution des composés acheminés est modifiée en fonction du vecteur utilisé et dépend de la taille de celui-ci. Les nanoparticules avec un diamètre inférieur à 6 nm sont rapidement éliminées par les reins. Pour une administration locale, des composés de taille compris entre 30 et 200 nm seront préférés. Cette taille est plus adaptée pour la délivrance du principe actif *via* les capillaires et est assez petite pour éviter une clairance par le rein trop importante et rapide⁵³. Elle permet de plus une encapsulation du médicament qui ne serait pas possible avec des nanoparticules de tailles inférieures. Le ciblage des cellules cancéreuses à traiter dépend lui aussi de la taille de la particule puisque il résulte en partie de l'effet EPR^{4(a)}. Cet effet

52. Faraji, A. H.; Wipf, P., Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17* (8), 2950-62.

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

53. Albanese, A.; Tang, P. S.; Chan, W. C. W., The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. In *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol 14, Yarmush, M. L., Ed. 2012; Vol. 14, pp 1-16.

spécifique aux tissus tumoraux est dû à la grande perméabilité des vaisseaux sanguins à la périphérie de la tumeur et au dysfonctionnement du drainage lymphatique.

Cependant certaines tumeurs ne peuvent pas être ciblées *via* l'effet EPR. Dans ce cas, les nanoparticules pourront être décorées avec un système de guidage et l'utilisation de ligand de ciblage greffé sur le vecteur.

I.4.2. Peptides et protéines de translocations

Suite à la découverte d'un peptide issu de l'homéodomaine du facteur de transcription codé par le gène Antennapedia ayant la possibilité de traverser la membrane cellulaire, de nombreuses recherches se sont portées sur l'utilisation de peptides de translocation comme vecteurs cellulaires. Ainsi de nombreux peptides (Tableau 4) ayant la particularité de traverser les membranes cellulaires ont été développés. Ces peptides appelés CPP, pour « cell penetrating peptide », sont relativement courts (10 à 30 résidus) et proviennent d'origines diverses. Certains sont issus ou inspirés de protéines naturelles ou de virus ayant la capacité de traverser les membranes alors que d'autres sont purement synthétiques.

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

Tableau 4 : Exemple d'agents de translocation

Ces peptides ont été couplés à de nombreux composés dans le but de faciliter leur entrée cellulaire⁵⁴. Leurs applications sont nombreuses puisqu'ils permettent de délivrer des « cargos » possédant des tailles variables comme des acides nucléiques⁵⁵ (SiRNA, oligonucléotide antisense, plasmide...), des protéines⁵⁶ et peptides, ou des nanoparticules⁵⁷. Ils permettent ainsi d'apporter à la cellule à traiter des composés d'intérêt thérapeutique qui à cause de leur charge négative élevée et ou de leur poids moléculaire n'auraient pas pu être utilisés comme médicament.

Leur mode de pénétration cellulaire a fait l'objet de nombreuses études et reste toujours controversé. Les différentes théories de translocation des CPP peuvent être classées en trois

54. Fonseca, S. B.; Pereira, M. P.; Kelley, S. O., Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv Drug Deliver Rev* **2009**, *61* (11), 953-964.

55. Said Hassane, F.; Saleh, A. F.; Abes, R.; Gait, M. J.; Lebleu, B., Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2010**, *67* (5), 715-26.

56. Hotchkiss, R. S.; McConnell, K. W.; Bullok, K.; Davis, C. G.; Chang, K. C.; Schwulst, S. J.; Dunne, J. C.; Dietz, G. P. H.; Baehr, M.; McDunn, J. E.; Karl, I. E.; Wagner, T. H.; Cobb, J. P.; Coopersmith, C. M.; Piwnica-Worms, D., TAT-BH4 and TAT-Bcl-x(L) peptides protect against sepsis-induced lymphocyte apoptosis in vivo. *J Immunol* **2006**, *176* (9), 5471-5477.

57. Santra, S.; Yang, H.; Stanley, J. T.; Holloway, P. H.; Moudgil, B. M.; Walter, G.; Mericle, R. A., Rapid and effective labeling of brain tissue using TAT-conjugated CdS: Mn/ZnS quantum dots. *Chemical Communications* **2005**, (25), 3144-3146.

catégories et semblent dépendre de la nature du peptide et de sa concentration extracellulaire⁵⁸ : (1) translocation *via* la formation d'un état transitoire, (2) pénétration directe à travers la membrane ou (3) endocytose (Figure 30).

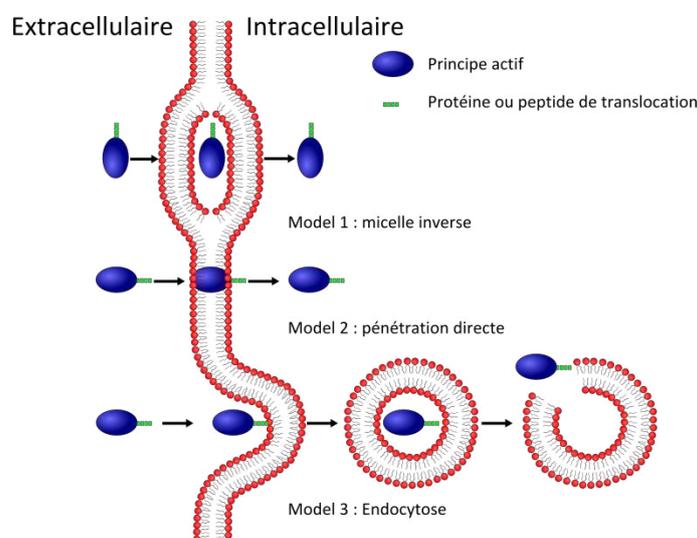


Figure 30 : Mode de translocation des « cell penetrating peptides »

Bien que ces systèmes aient montré une certaine efficacité de vectorisation *in vitro* et *in vivo*, ils ne possèdent aucune spécificité envers les tissus tumoraux. Les CPP interagissent potentiellement avec toutes les membranes cellulaires et ne peuvent être utilisés seuls dans une stratégie anticancéreuse.

I.4.3. Les vecteurs viraux

La capacité naturelle des virus à délivrer leur matériel génétique aux cellules qu'ils infectent peut aussi être exploitée pour la vectorisation d'un principe actif vers la cellule cible. Pour cela ils sont modifiés afin de ne pas être pathogène pour l'organisme tout en gardant leur capacité infectieuse. Ils sont alors considérés comme des véhicules de transfert de gène pour la thérapie-génique. Dans le domaine de l'oncologie, depuis une dizaine d'année, leur utilisation a fait l'objet de nombreuses études. Afin de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses à traiter, ils ont été couplés à de nombreux agents de ciblage comme le peptide RGD ou des anticorps monoclonaux⁵⁹. Une fois reconnu le virus pénètre à l'intérieur de la cellule cible et libère son matériel génétique pouvant induire une apoptose ou activer les systèmes immunitaires *via* le système MHC (major histocompatibility complex).

I.4.4. Effet de multivalence

58. (a) Alves, I. D.; Goasdoue, N.; Correia, I.; Aubry, S.; Galanth, C.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Chassaing, G., Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2008**, *1780* (7-8), 948-959; (b) Jiao, C.-Y.; Delaroche, D.; Burlina, F.; Alves, I. D.; Chassaing, G.; Sagan, S., Translocation and Endocytosis for Cell-penetrating Peptide Internalization. *J Biol Chem* **2009**, *284* (49), 33957-33965.

59. (a) Waehler, R.; Russell, S. J.; Curiel, D. T., Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **2007**, *8* (8), 573-587; (b) Parato, K. A.; Senger, D.; Forsyth, P. A. J.; Bell, J. C., Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5* (12), 965-976.

L'interaction non-covalente entre un ligand et son récepteur selon un modèle clé-serrure constitue une des bases essentielles de tout système biologique. Afin d'améliorer la reconnaissance d'une cible la nature utilise souvent des systèmes multivalent en présentant de façon multiple un ligand de ciblage dans le but d'augmenter de manière considérable la force d'interaction entre le ligand et son récepteur. L'effet de multivalence permet ainsi d'obtenir des constantes d'association impossible à observer avec une interaction monovalente. De nombreux mécanismes biologiques utilisent cet effet comme par exemple les réponses immunitaires, l'adhérence des membranes cellulaires, la transduction du signal, l'endocytose, et de nombreux systèmes enzymatiques. Alors qu'un ligand unique peut interagir avec son site de reconnaissance que d'une seule manière, un ligand, présenté de façon multivalente, pourra interagir avec son récepteur *via* de nombreux mécanismes⁶⁰. Le mode de liaison dépend de la nature du ligand de sa présentation mais aussi de la nature du récepteur.

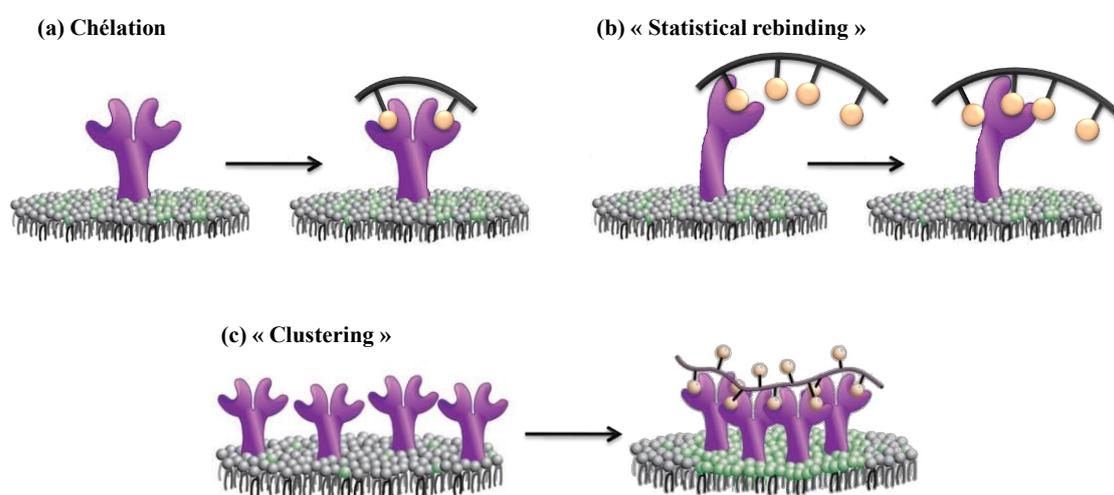


Figure 31 : Mécanismes impliqués dans la reconnaissance d'un ligand multivalent par sa cible

L'effet de chélation est sans doute l'effet le plus observé dans la nature. Il résulte de contacts multiples entre le ligand multivalent et un récepteur présentant plusieurs sites de liaison (Figure 31(a)). Les lectines se servent, par exemple, de cet effet pour augmenter considérablement l'interaction avec leurs ligands multivalents saccharidiques. L'effet de « statistical rebinding » (Figure 31(b)) résulte de la facilité que possède un ligand multivalent à se réassocier à son récepteur après dissociation de celui-ci. Il est dû à l'augmentation de la concentration locale en ligand apportée par la multivalence. Ces deux effets induisent une augmentation de l'affinité apparente du ligand pour sa cible grâce à une diminution de l'énergie d'association du couple ligand/récepteur. Enfin l'effet « cluster » met en jeu l'interaction entre un ligand multivalent et de multiple récepteur présent sur la membrane cellulaire. La présentation d'un ligand multivalent va alors modifier la proximité et la présentation des récepteurs sur la surface. Ce processus est facilité par la fluidité de la bicouche lipidique et permet de créer un « cluster » de récepteur. Ce

60. (a) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L., Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J Am Chem Soc* **2002**, *124* (50), 14922-14933; (b) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E., Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction. *Angew Chem Int Edit* **2006**, *45* (15), 2348-2368.

phénomène peut alors modifier et affecter les fonctions premières des récepteurs et ainsi activer des mécanismes tels que l'endocytose du système ligand/récepteur par exemple⁶¹.

De nombreux composés, ont ainsi été développés pour la présentation de ligands de manière multivalente afin d'augmenter l'affinité apparente du ligand envers son récepteur. En fonction du but recherché, le choix du composé ou châssis moléculaire sera fait suivant le nombre de ligands que l'on veut attacher, et de la taille et du poids des molécules finales. Ils peuvent être classés en différentes catégories suivant la valence qu'ils peuvent apporter. Parmi les châssis de haute valence nous pourrions citer les polymères, les liposomes, les nanoparticules inorganiques et les dendrimères. Ces architectures possèdent de nombreux sites pour l'accroche de ligands mais leur contrôle reste le plus souvent difficile (exception des dendrimères). Dans une deuxième catégorie, d'autres molécules synthétiques ont été développées. Elles possèdent une architecture beaucoup mieux définie mais un nombre de ligands présenté plus faible. Cette catégorie regroupe les calixarènes, les cyclodextrines, les peptides cycliques ou encore des molécules organiques de poids modérés (Figure 32).

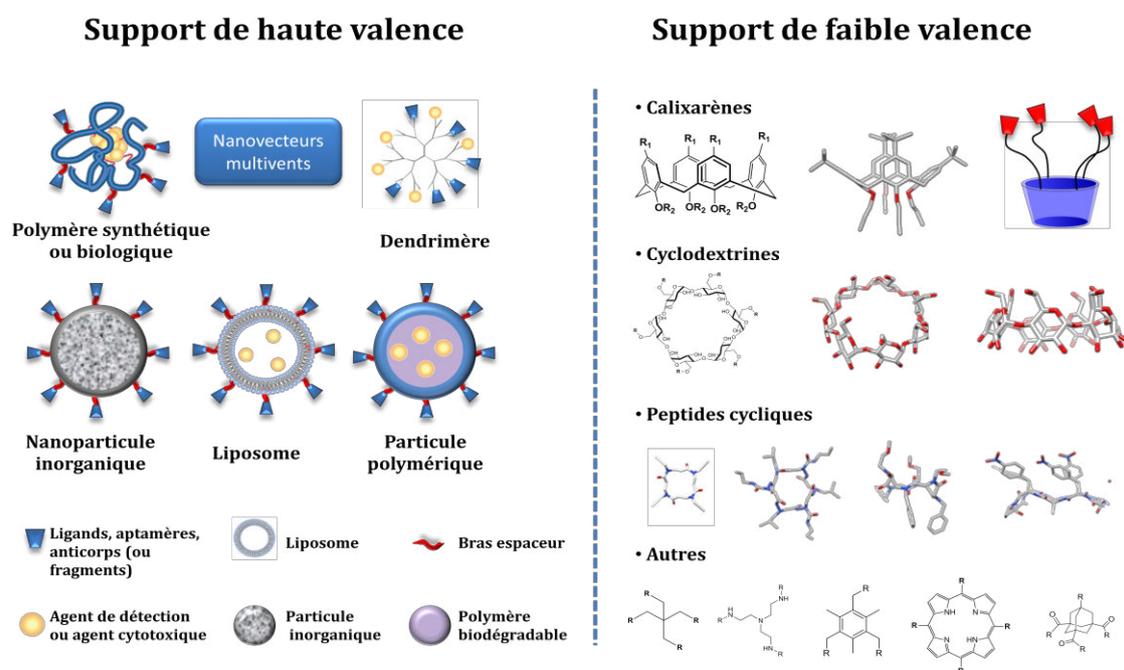


Figure 32 : Représentation schématique des différents châssis classés en fonction de leur valence

61. (a) Simons, K.; Ikonen, E., Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, *387* (6633), 569-572; (b) Maheshwari, G.; Brown, G.; Lauffenburger, D. A.; Wells, A.; Griffith, L. G., Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J Cell Sci* **2000**, *113* (10), 1677-1686.

I.5. Méthode de conjugaison pour l'assemblage de biomolécules

Afin de pouvoir lier à un châssis moléculaire différentes biomolécules, le chimiste doit disposer d'un panel de ligations lui permettant l'accroche, de façon contrôlée, de plusieurs éléments différents. Il pourra ainsi concevoir des macromolécules complexes pour le ciblage, le diagnostic et ou le traitement des cellules visées.

I.5.1. Couplage peptidique traditionnel : le lien amide

La formation d'un lien amide est la réaction la plus classique pour assembler des biomolécules entre elles. Elle fait intervenir la réaction entre une fonction acide et une fonction amine portées par deux partenaires différents. Dans cette stratégie les fonctions mises en jeu dans le couplage doivent être les seules à pouvoir réagir. Pour cela, l'expérimentateur a besoin de protéger l'ensemble des autres fonctions réactives afin de limiter les réactions secondaires. En synthèse peptidique de nombreux groupements protecteurs orthogonaux ont été développés, que ce soit pour la synthèse en solution ou pour la synthèse supportée développée par Robert Bruce Merrifield⁶²⁻⁶³.

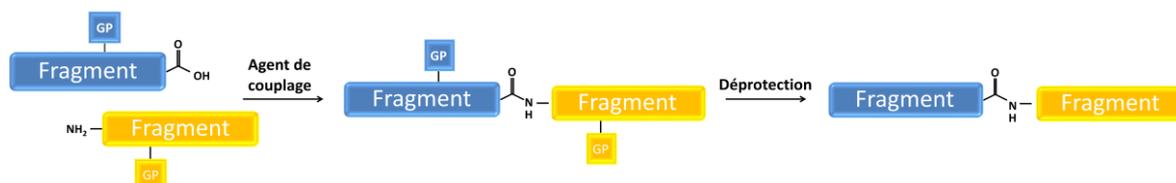


Figure 33 : Principe de couplage de deux fragments protégés par lien amide

Cependant cette méthode de ligation comporte quelques limitations. L'utilisation de nombreux groupements protecteurs est une limitation importante lors de la synthèse puisque cela augmente grandement le nombre d'étapes de synthèse entraînant ainsi une diminution du rendement global. Ces groupements étant pour la plupart apolaires, ils entraînent de plus une diminution de la solubilité des partenaires rendant plus difficile leur manipulation. Enfin la chimie utilisée pour éliminer ces groupements protecteurs est souvent incompatible pour les différentes classes de biomolécules, comme par exemple les conditions acides utilisées pour déprotéger les peptides incompatibles avec les acides nucléiques.

I.5.2. Couplage par lien chimiosélectif

Afin de pallier à ces désavantages, une approche alternative a été développée *via* l'utilisation de liens chimiosélectifs. La conception de macromolécules complexes possédant une activité biologique requiert souvent le développement de réactions chimiosélectives permettant le greffage de molécules totalement déprotégées en solution aqueuse. Pour cela, de nombreuses

62. (a) Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **1963**, *85* (14), 2149-2154; (b) Merrifield, R. B., Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1985**, *24* (10), 799-810.
63. Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F., Amino Acid-Protecting Groups. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (6), 2455-2504.

réactions ont été développées afin de coupler deux partenaires, chacun possédant une fonction chimique réactive réciproque et spécifique de la réaction. Cette stratégie permet le couplage de biomolécules de natures très différentes comme les oligonucléotides, les peptides ou les oligosaccharides. Elles permettent de plus grâce à l'utilisation d'unités totalement déprotégées une meilleure solubilité des différentes espèces, une diminution du nombre d'étapes de synthèse et donc une augmentation du rendement global. Différentes stratégies ont été développées dans les 30 dernières années⁶⁴ et visent à coupler deux partenaires en une étape avec de bons rendements. Elles peuvent être classées en deux catégories. La première vise à obtenir des liens natifs et est le plus souvent utilisé dans la synthèse de protéine alors que la deuxième utilise des réactions chimiques donnant un lien non naturel (oxime, hydrazide, thioéther, triazole...).

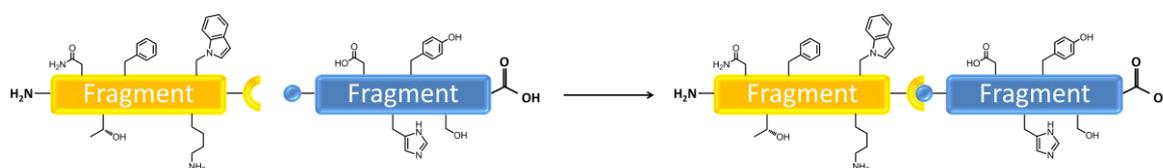


Figure 34 : Principe de la ligation chimiosélective

- **Ligation par lien natif**

La première stratégie permettant d'obtenir un lien stable amide a été développée par Stephen Kent⁶⁵ dans les années 1990 et permet l'assemblage de peptides ou la construction de protéines synthétiques de hauts poids moléculaires. Les deux partenaires sont liés par un lien natif par une stratégie appelée « Native Chemical Ligation » (abrégé NCL). Cette réaction fait intervenir deux partenaires portant une fonction thioester pour l'un et un résidu cystéine sur la partie N terminal pour l'autre. Le couplage des deux espèces donne alors un lien thioester initial qui va se réarranger spontanément *via* un réarrangement intramoléculaire S→N Shift pour donner un lien amide natif avec d'excellents rendements.

Afin de généraliser l'approche à d'autres résidus amino acides autre que cystéine, d'autres groupes ont développés différentes stratégies. En s'inspirant de la réaction de Staudinger, Raines et coll.⁶⁶ utilisent un azoture et un ester de phosphinothiol qui réagissent pour former un iminophosphorane suivi du réarrangement S→N shift. Cette méthode appelée « traceless Staudinger reaction » permet ainsi l'obtention d'un lien amide entre les deux espèces après réarrangement.

Enfin dernièrement, d'autres modifications ont été introduites sur les parties terminales des partenaires à coupler comme des séléncarboxyles⁶⁷, des thioacides⁶⁸ pouvant réagir avec un

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

65. (a) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clarklewis, I.; Kent, S. B. H., Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **1994**, *266* (5186), 776-779; (b) Dawson, P. E.; Kent, S. B. H., Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annual Review of Biochemistry* **2000**, *69*, 923-960.

66. (a) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T., Staudinger ligation: A peptide from a thioester and azide. *Org Lett* **2000**, *2* (13), 1939-1941; (b) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T., High-yielding Staudinger ligation of a phosphinothioester and azide to form a peptide. *Org Lett* **2001**, *3* (1), 9-12; (c) Soellner, M. B.; Dickson, K. A.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T., Site-specific protein immobilization by Staudinger ligation. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (39), 11790-11791.

67. Knapp, S.; Darout, E., New reactions of selenocarboxylates. *Org Lett* **2005**, *7* (2), 203-206.

azoture ou encore la réaction entre un cétoacide et une hydroxylamine développée par le groupe de Jeffrey Bode⁶⁹ permettent l'obtention d'un lien natif.

Enfin récemment le groupe du Professeur Oleg Melnyk⁷⁰ a utilisé un groupement bis(2-sulfanyléthyl)amido (abrégé SEA) lié à l'extrémité C-terminale d'un partenaire qui peut réagir avec un résidu cystéine sur l'extrémité N-terminale de l'autre partenaire. Ce groupement permet une meilleure réactivité des espèces en solution mais aussi de bloquer la réactivité du groupement SEA par un pont disulfure afin d'introduire plusieurs fragments de façon successive (Tableau 5).

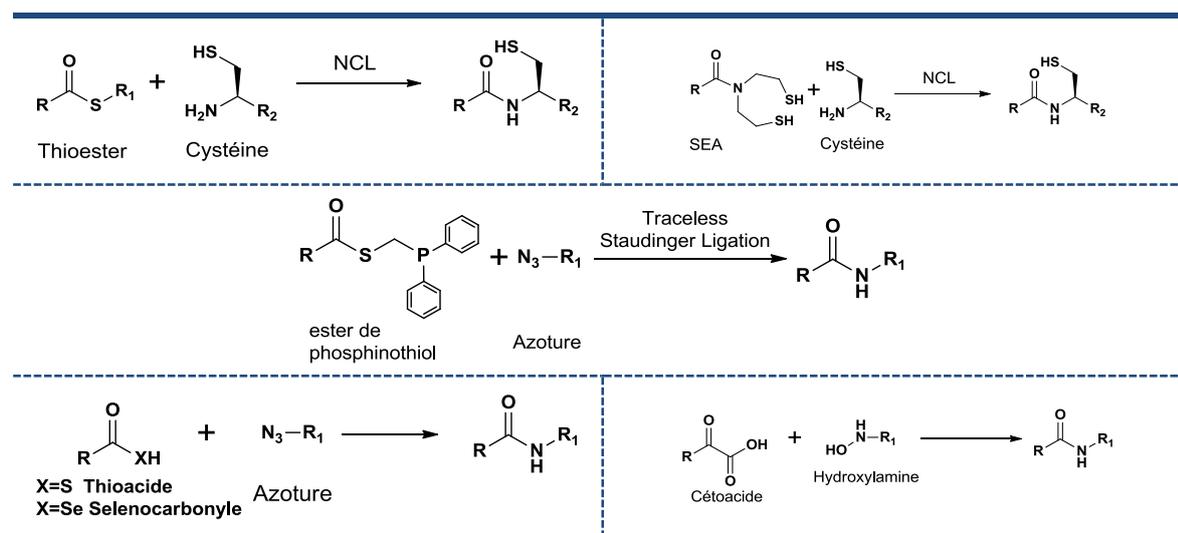


Tableau 5 : ligations chimiosélectives formant un lien natif

- **Ligation par lien non-naturel**

De nombreuses réactions chimiques utilisées et développées pour la synthèse de molécules naturelles ont été par la suite appliquées à la synthèse de macromolécules complexes d'intérêt biologique. Elles mettent en jeu des fonctions chimiques qui vont réagir ensemble pour former un lien covalent non natif sans utilisation de groupements protecteurs. Dans un scénario idéal ces réactions dites chimiosélectives s'effectuent rapidement sous des conditions douces voire physiologiques (pH neutre, température ambiante...).

La réaction chimiosélective la plus citée et la plus étudiée dans la littérature est la cyclisation 1-3 dipolaire catalysée par le cuivre I entre un alcyne et un azoture. Cette réaction développée par Morten Meldal⁷¹ et Barry Sharpless⁷² souvent référencée sous le nom de «click»⁷³ donne un lien

68. Shangguan, N.; Katukojvala, S.; Greenburg, R.; Williams, L. J., The reaction of thio acids with azides: A new mechanism and new synthetic applications. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (26), 7754-7755.

69. (a) Bode, J. W.; Fox, R. M.; Baucom, K. D., Chemoselective amide ligations by decarboxylative condensations of N-alkylhydroxylamines and alpha-ketoacids. *Angew Chem Int Edit* **2006**, *45* (8), 1248-1252; (b) Pusterla, I.; Bode, J. W., The Mechanism of the alpha-Ketoacid-Hydroxylamine Amide-Forming Ligation. *Ibid.* **2012**, *51* (2), 513-516; (c) Pattabiraman, V. R.; Ogunkoya, A. O.; Bode, J. W., Chemical Protein Synthesis by Chemoselective alpha-Ketoacid-Hydroxylamine (KAHA) Ligations with 5-Oxaproline. *Ibid.* (21), 5114-5118.

70. (a) Dheur, J.; Ollivier, N.; Vallin, A.; Melnyk, O., Synthesis of Peptide Alkylthioesters Using the Intramolecular N,S-Acyl Shift Properties of Bis(2-sulfanyléthyl)amido Peptides. *J Org Chem* **2011**, *76* (9), 3194-3202; (b) Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O., Bis(2-sulfanyléthyl)amino Native Peptide Ligation. *Org Lett* **2010**, *12* (22), 5238-5241.

71. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem* **2002**, *67* (9), 3057-3064.

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

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

triazole 1,4 disubstitué comparé à la version non - catalysée qui produit l'isomère 1,4 et 1,5 dans des proportions équivalentes. Cette réaction chimiosélective envers un grand nombre de groupes fonctionnels, donne d'excellents rendements et peut s'effectuer dans des conditions douces.

Depuis son invention, elle a été utilisée pour de nombreuses applications comme le couplage de (bio)-molécules mais aussi la synthèse de (bio)-polymères. Ce n'est que dernièrement que des avancées importantes ont été faites *via* l'utilisation de ligand du cuivre qui permettent une meilleure solubilité de celui-ci dans tous les solvants aqueux ou organiques utilisés et donc une amélioration des cinétiques et des rendements de réaction⁷⁴. Ces ligands ont été synthétisés dans le but de diminuer les réactions parasites sur les biomolécules liés à la présence de cuivre en solution et permettent des manipulations aérobies sans dégradation des biomolécules utilisés⁷⁵. De nombreux ligands ont été référencés dans la littérature. Ils peuvent être classés en trois catégories : les ligands azotés, oxygénés et les carbénoïdes⁷⁶. Les premiers développés et les plus utilisés restent les ligands azotés et notamment les polytriazoles^{74 (c)}. Ils sont synthétisés *via* la réaction de cycloaddition catalysé au cuivre I, sur la base d'un noyau azoté triisopropylamine pour la plupart. Ils possèdent de nombreuses modifications sur la chaîne latérale (alkyle, benzyle, lipide, hydroxyle, amine...) permettant d'apporter des caractéristiques propres à chacun et ainsi obtenir des ligands utilisables dans les solvants organiques (TBTA) ou dans les solvants aqueux (THPTA). Dernièrement, d'autres ligands asymétriques ont été développés afin d'accroître le pouvoir de complexation et la solvataion du cuivre *via* l'introduction de deux groupements isopropyles et un groupement sulfate. Ils permettent le marquage de cellule tout en empêchant au cuivre de franchir la membrane cytoplasmique grâce au groupement chargé sulfate⁷⁷ (Figure 35).

74. (a) Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G., Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Ibid.* **2009**, *48* (52), 9879-9883; (b) Michaels, H. A.; Zhu, L., Ligand-Assisted, Copper(II) Acetate-Accelerated Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem-Asian J* **2011**, *6* (10), 2825-2834; (c) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. *Org Lett* **2004**, *6* (17), 2853-2855.

75. Kumar, A.; Li, K.; Cai, C., Anaerobic conditions to reduce oxidation of proteins and to accelerate the copper-catalyzed "Click" reaction with a water-soluble bis(triazole) ligand. *Chemical Communications* **2011**, *47* (11), 3186-3188.

74 (c) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. *Org Lett* **2004**, *6* (17), 2853-2855.

76. Diez-Gonzalez, S., Well-defined copper(I) complexes for Click azide-alkyne cycloaddition reactions: one Click beyond. *Catal Sci Technol* **2011**, *1* (2), 166-178.

77. Wang, W.; Hong, S. L.; Tran, A.; Jiang, H.; Triano, R.; Liu, Y.; Chen, X.; Wu, P., Sulfated Ligands for the Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem-Asian J* **2011**, *6* (10), 2796-2802.

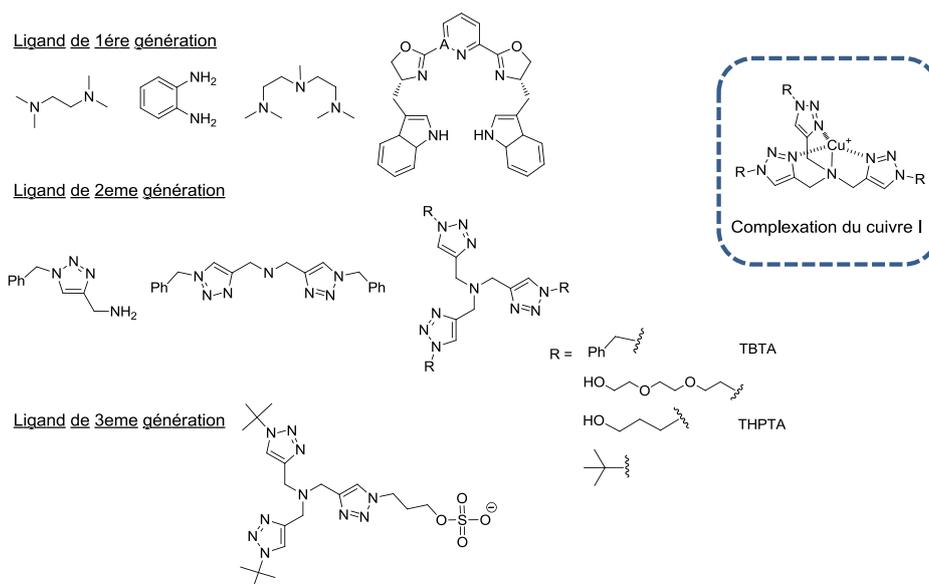


Figure 35 : Classification des ligands du cuivre I les plus couramment utilisés

D'autres liens sont couramment utilisés pour lier des biomolécules entre elles. On peut citer la condensation d'un carbonyle sur un groupement amine pour former un lien imine réversible qui pourra être réduit pour former un lien non-hydrolysable (amination réductrice). Dû à la réversibilité possible entre les deux états, le lien imine est beaucoup utilisé pour des applications de chimie combinatoire dynamique dans la découverte de nouveaux candidats médicaments *via* une amplification in-situ par l'hôte⁷⁸. La présence d'un groupement donneur d'électron en α de l'amine permet de stabiliser de façon importante la liaison formée et la rendre ainsi stable à l'hydrolyse. Deux liens, oximes⁷⁹ et hydrazones⁸⁰, présentent ainsi une grande stabilité à pH physiologique et sont ainsi couramment utilisés pour lier des biomolécules entre elles.

La fonction thiol est aussi très utilisée pour le couplage de biomolécules. Sa nucléophilie particulière en fait un bon partenaire pour des réactions d'addition de type Michael, des réactions de substitution nucléophile sur des halogénures ou l'addition radicalaire sur une double liaison ou « thiol-ene click-chemistry »⁸¹. Ils peuvent de plus former un pont disulfure *via* un groupement activateur⁸² ou dans des conditions oxydantes. Cette liaison présente une particularité due à sa faible stabilité en milieu réducteur. Cet inconvénient peut aussi devenir un avantage et est utilisé dans des stratégies « prodrogues » avec libération intracellulaire du composé actif après rupture du pont disulfure en milieu réducteur à l'intérieur de la cellule.

78. (a) Zameo, S.; Vauzeilles, B.; Beau, J.-M., Direct composition analysis of a dynamic library of imines in an aqueous medium. *Eur J Org Chem* **2006**, (24), 5441-5444; (b) Herrmann, A., Dynamic mixtures and combinatorial libraries: imines as probes for molecular evolution at the interface between chemistry and biology. *Org Biomol Chem* **2009**, 7 (16), 3195-3204; (c) Ludlow, R. F.; Liu, J.; Li, H.; Roberts, S. L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S., Host-guest binding constants can be estimated directly from the product distributions of dynamic combinatorial libraries. *Angew Chem Int Edit* **2007**, 46 (30), 5762-5764.

79. Forget, D.; Boturyn, D.; Defranco, E.; Lhomme, J.; Dumy, P., Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates: Chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Chem-Eur J* **2001**, 7 (18), 3976-3984.

80. (a) Ollivier, N.; Olivier, C.; Gouyette, C.; Huynh-Dinh, T.; Gras-Masse, H.; Melnyk, O., Synthesis of oligonucleotide-peptide conjugates using hydrazone chemical ligation. *Tetrahedron Lett* **2002**, 43 (6), 997-999; (b) Dirksen, A.; Dawson, P. E., Rapid Oxime and Hydrazone Ligations with Aromatic Aldehydes for Biomolecular Labeling. *Bioconjugate Chem* **2008**, 19 (12), 2543-2548.

81. (a) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N., Thiol-Ene Click Chemistry. *Angew Chem Int Edit* **2010**, 49 (9), 1540-1573; (b) Sumerlin, B. S.; Vogt, A. P., Macromolecular Engineering through Click Chemistry and Other Efficient Transformations. *Macromolecules* **2010**, 43 (1), 1-13.

82. Mezo, G.; Mihala, N.; Andreu, D.; Hudecz, F., Conjugation of epitope peptides with SH group to branched chain polymeric polypeptides via Cys(Npys). *Bioconjugate Chem* **2000**, 11 (4), 484-491.

De nombreuses autres réactions de couplage sont référencées dans la littérature mais leur utilisation reste plus rare. On peut citer par exemple les réactions de Diels Alder⁸³ qui ont montré de bons rendements et une bonne sélectivité dans le couplage de biomolécules ou encore les réactions de couplage croisé, catalysé par le Palladium, type Heck⁸⁴ ou Suzuki. Cependant leurs utilisations restent encore anecdotiques. Récemment la réaction de Diels Alder à demande électronique inverse a fait l'objet de plusieurs études *via* l'utilisation de tétrazines. Il montre notamment que cette réaction « click » engendre de très bon rendements et peut être effectuée en milieu physiologique pour le marquage fluorescent de cellules⁸⁵. (Tableau 6)

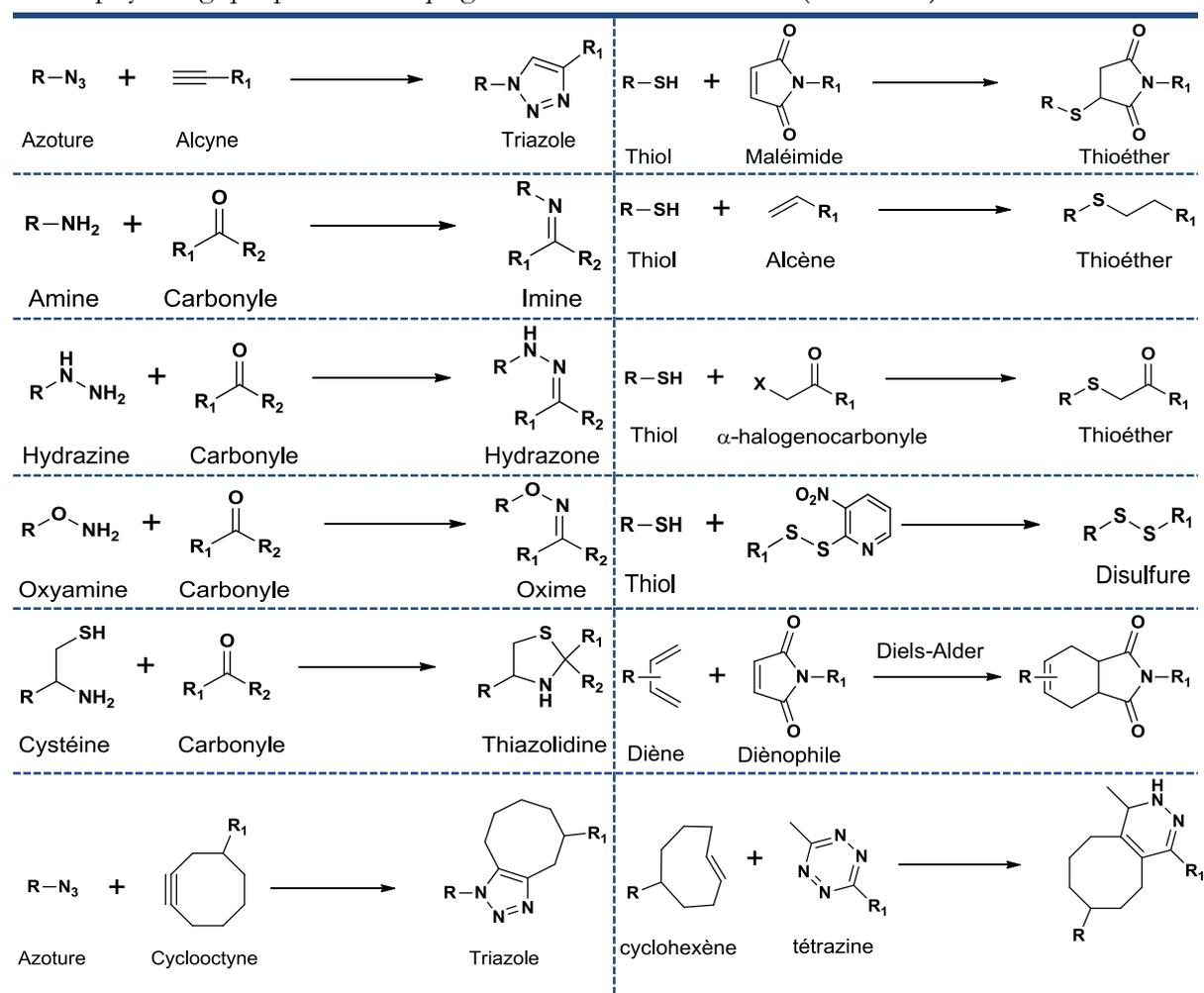


Tableau 6 : ligations chimiosélectives formant un lien non naturel

83. de Araujo, A. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Seitz, O.; Alexandrov, K.; Waldmann, H., Diels-Alder ligation of peptides and proteins. *Chem-Eur J* **2006**, *12* (23), 6095-6109.

84. Akaji, K.; Teruya, K.; Akaji, M.; Aimoto, S., Synthesis of cyclic RGD derivatives via solid phase macrocyclization using the Heck reaction. *Tetrahedron* **2001**, *57* (12), 2293-2303.

85. (a) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A., Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjugate Chem* **2008**, *19* (12), 2297-2299; (b) Devaraj, N. K., Advancing Tetrazine Bioorthogonal Reactions through the Development of New Synthetic Tools. *Synlett* **2012**, (15), 2147-2152; (c) Yang, J.; Seckute, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K., Live-Cell Imaging of Cyclopropene Tags with Fluorogenic Tetrazine Cycloadditions. *Angew Chem Int Edit* **2012**, *51* (30), 7476-7479.

I.6. Objectifs des travaux réalisés

Dans l'optique de développer de nouveaux agents bioinspirés pour la détection ou le traitement des cellules cancéreuses, nos travaux se sont tournés vers la synthèse de macromolécules peptidiques complexes ayant la capacité de reconnaître les cellules tumorales. Pour cela, ces biomolécules vont posséder à la fois un site de reconnaissance pour la liaison avec des protéines présentes à la surface de la cellule cible et un ou plusieurs éléments utilisés pour détecter et/ou détruire la cible.

Des travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire ont montré la capacité d'un châssis cyclodécapeptidique à présenter dans l'espace sous forme multivalente, des ligands de ciblage. Ces propriétés conformationnelles lui confèrent de multiples applications. Ainsi, ce châssis moléculaire peut être utilisé en tant que support multivalent pour présenter des éléments de ciblage (ligands -RGD- par exemple) et délivrer spécifiquement des éléments de détection et/ou cytotoxique dans des cellules tumorales exprimant le récepteur cible (intégrine $\alpha_v\beta_3$) *in vitro* et *in vivo*. Dans cette approche et suite à ces résultats, nous proposons le développement de nouvelles biomolécules complexes pouvant cibler une ou plusieurs anomalies de la membrane cellulaire *via* l'utilisation de plusieurs peptides de ciblage.

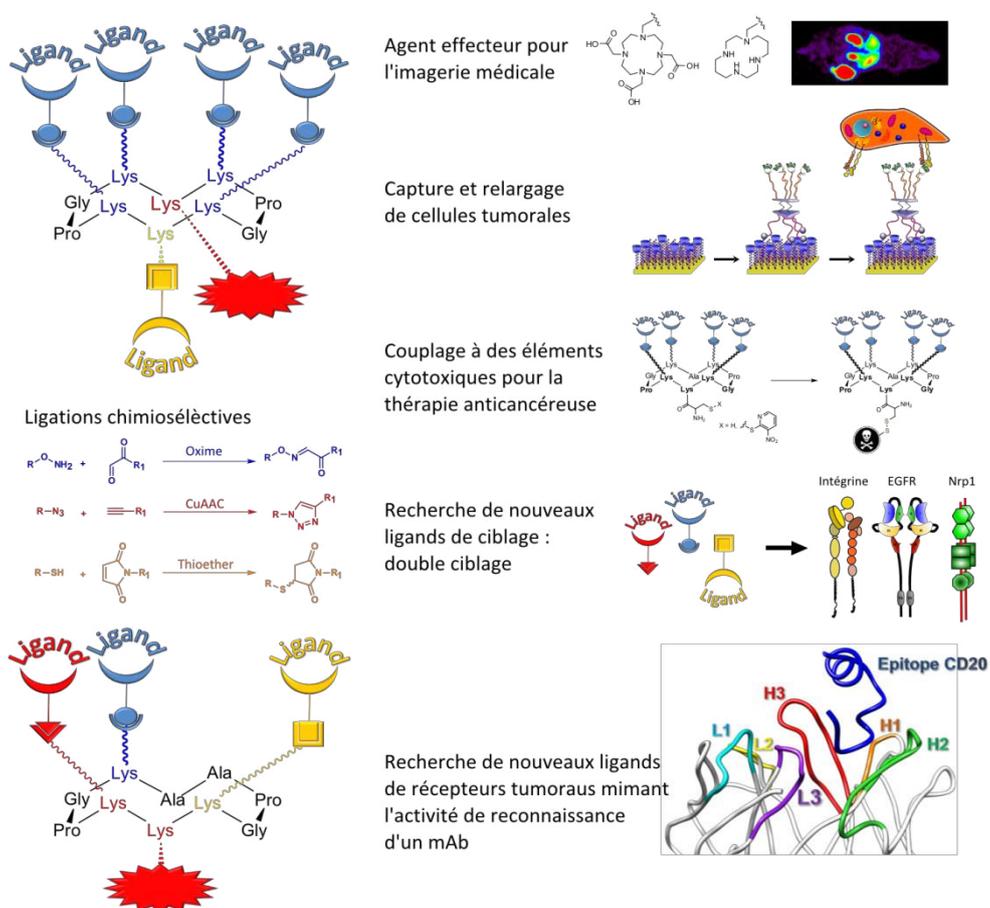


Figure 36 : Objectifs des travaux

L'un des paramètres importants dans la conception de ces vecteurs peptidiques *via* le châssis cyclodécapeptidique est le contrôle des différents sites de greffage. En effet il semble important de pouvoir orienter et disposer dans l'espace les ligands de ciblage avec une position et une conformation bien définie ; le but étant d'obtenir un site de liaison affin et avec une constante d'association importante pour son récepteur. Pour cela, nous pouvons utiliser différentes ligations chimiosélectives qui nous permettront à travers une synthèse définie de contrôler la position de chaque fragment sur le châssis. En utilisant des ligations développées au cours de la thèse de Mathieu Galibert (ligation oxime, CuAAC, thioéther, pont disulfure), nous pouvons concevoir et élaborer de nouveaux vecteurs anticancéreux.

Le premier chapitre du manuscrit est consacré à la synthèse de macromolécules utilisant le ligand -RGD- comme ligand de ciblage pour la détection de cellules tumorales. Ce chapitre regroupe deux parties : la préparation de radiotraceurs pour une application d'imagerie TEP ; la seconde partie concerne la modification d'une surface pour capturer et donc détecter la présence de cellules cancéreuses surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans un fluide biologique (**chapitre 1**).

Le second chapitre est dédié à la recherche de nouveaux agents pour la thérapie anticancéreuse. Cette partie traite de la préparation d'un composé comportant des ligands -RGD- et un composé cytotoxique puis de l'évaluation de son activité biologique *in vivo* et *in vitro* (**chapitre 2**).

Un troisième chapitre est consacré à la recherche de nouveaux composés comportant plusieurs éléments de ciblage tumoraux. Ces molécules peuvent permettre d'être plus sélectif vis-à-vis des tissus tumoraux (**chapitre 3**).

Enfin, la dernière partie de mes travaux est dédiée à la recherche de nouveaux ligands de récepteurs tumoraux s'inspirant du mAb Rituximab. Dans cette approche, nous présenterons la conception, la synthèse et l'évaluation biologique d'assemblages peptidiques mimant l'activité de reconnaissance de cet anticorps. Ce mime de mAb sera composé d'un domaine de reconnaissance issu de l'analyse structurale du mAb, et d'un module effecteur composé d'un élément de détection et/ou cytotoxique, le tout assemblé sur le châssis moléculaire cyclodécapeptidique (**chapitre 4**).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

II. Le vecteur peptidique possédant la séquence RGD sous forme multivalente

II.1. Etat de l'art

II.1.1. Le châssis cyclodécapeptidique

Dans notre laboratoire, de nombreuses études se sont portées sur l'utilisation d'un gabarit cyclodécapeptidique pour la présentation de biomolécules de façon contrôlée. Ce châssis fut développé et utilisé pour la première fois dans le laboratoire du Pr. Mutter sous l'acronyme TASP (Template Assembled Synthetic Protein)⁸⁶. Des études RMN et de modélisation moléculaire de sa structure ont permis de montrer qu'il se structurait en feuillet β antiparallèle⁸⁷. La présence de deux coudes Glycine-Proline de type II lui confère une structure rigide organisée en feuillet β . En 2001, ils montrent par des études de diffraction des rayons X⁸⁸, que cette structure secondaire est stabilisée par la présence de liaisons hydrogènes intramoléculaires entre les deux brins du châssis. Dans cette structure, les résidus centraux adoptent ainsi une conformation bloquée et leurs chaînes latérales sont orientées de part et d'autre du plan moyen du cycle. L'introduction d'acides aminés modifiés et protégés orthogonalement⁸⁹ (exemple : lysines) permet alors le greffage et l'adressage chimique de biomolécules (Figure 37).

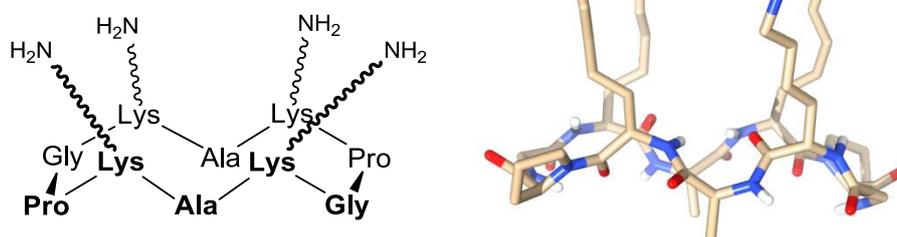


Figure 37 : Structure du châssis vecteur

Ce châssis a fait par la suite l'objet de nombreuses études et est encore beaucoup utilisé dans notre groupe de recherche pour la présentation contrôlée de biomolécules d'intérêts. Cette stratégie est appliquée dans divers domaines comme la conception de vecteurs peptidiques⁹⁰, de glycoconjugués et glycoclusters pour l'immunothérapie antitumorale et la synthèse d'inhibiteurs

86. (a) Mutter, M.; Vuilleumier, S., A Chemical Approach to Protein Design—Template-Assembled Synthetic Proteins (TASP. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1989**, *28* (5), 535-554; (b) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G., Template assembled synthetic proteins (TASP) as functional mimetics of proteins. *Ibid.* **1996**, *35* (13-14), 1482-1485.

87. Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M., Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates: An NMR and restrained molecular dynamics investigation. *Biopolymers* **1996**, *39* (3), 297-308.

88. Peluso, S.; Ruckle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M., Crystal structure of a synthetic cyclodecapeptide for template-assembled synthetic protein design. *ChemBiochem* **2001**, *2* (6), 432-437.

89. Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M., A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron Lett* **1995**, *36* (8), 1255-1258.

90. (a) Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D., One-Pot Approach to Well-Defined Biomolecular Assemblies by Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew Chem Int Edit* **2009**, *48* (14), 2576-2579; (b) Galibert, M.; Renaudet, O.; Dumy, P.; Boturyn, D., Access to Biomolecular Assemblies through One-Pot Triple Orthogonal Chemoselective Ligations. *Ibid.* **2011**, *50* (8), 1901-1904.

d'interactions sucres/protéines⁹¹, ainsi que pour la stabilisation de structures comme les G-quadruplexes⁹² ou la formation de mimes de fibres amyloïdes⁹³ (Figure 38).

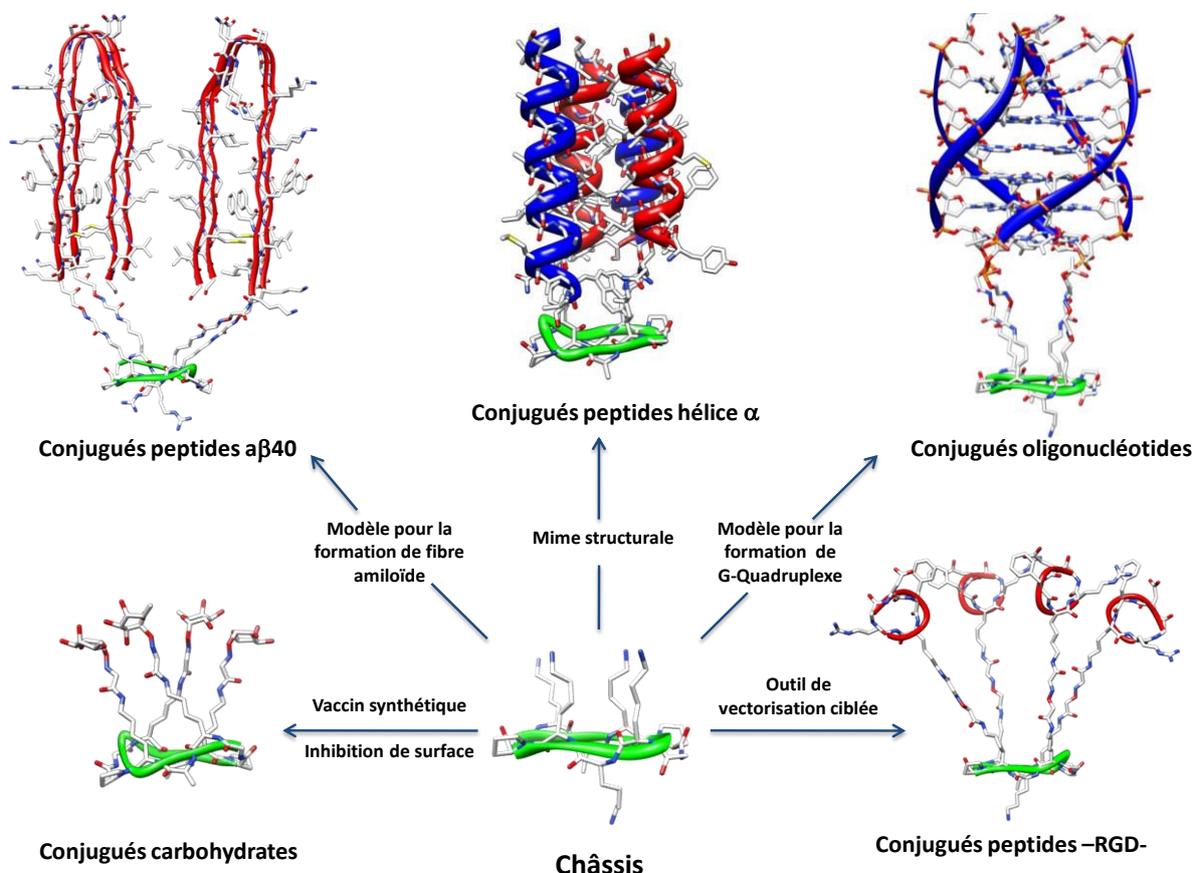


Figure 38 : Schéma représentant les différentes approches basées sur l'utilisation du châssis

II.1.2. Conception et synthèse du vecteur multivalent pour la cancérologie

Une application développée par notre groupe de recherche est la conception de vecteurs peptidiques multivalents pour la thérapie anticancéreuse. Comme nous l'avons vu, le gabarit cyclodécapeptidique permet de présenter spatialement et de façon contrôlée des biomolécules d'intérêts. Nous avons choisi dans notre groupe de construire une architecture multivalente présentant quatre ligands cyclodécapeptidiques -RGD- sur la face supérieure du châssis pour la reconnaissance de l'intégrine. La face inférieure pourra alors être utilisée pour l'accroche de molécules pour l'imagerie ou la thérapie anticancéreuse. De plus, l'utilisation de liens chimiosélectifs permet l'accroche en solution de ces différentes biomolécules sans utilisation d'aucune protection supplémentaire (Figure 39). Ce système permet la différenciation du site de

91. Bossu, I.; Sulc, M.; Krenek, K.; Dufour, E.; Garcia, J.; Berthet, N.; Dumy, P.; Kren, V.; Renaudet, O., Dendri-RAFTs: a second generation of cyclopeptide-based glycoclusters. *Org Biomol Chem* **2011**, *9* (6), 1948-1959.
 92. Murat, P.; Cressend, D.; Spinelli, N.; Van der Heyden, A.; Labbe, P.; Dumy, P.; Defrancq, E., A Novel Conformation ally Constrained Parallel G Quadruplex. *ChemBiochem* **2008**, *9* (16), 2588-2591.
 93. Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J., Control of Amyloid β -Peptide Protofibril Formation by a Designed Template Assembly. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (17), 2699-2702.

reconnaissance et du site effecteur et ainsi d'obtenir une séparation spatiale des molécules afin d'éviter leurs interférences.

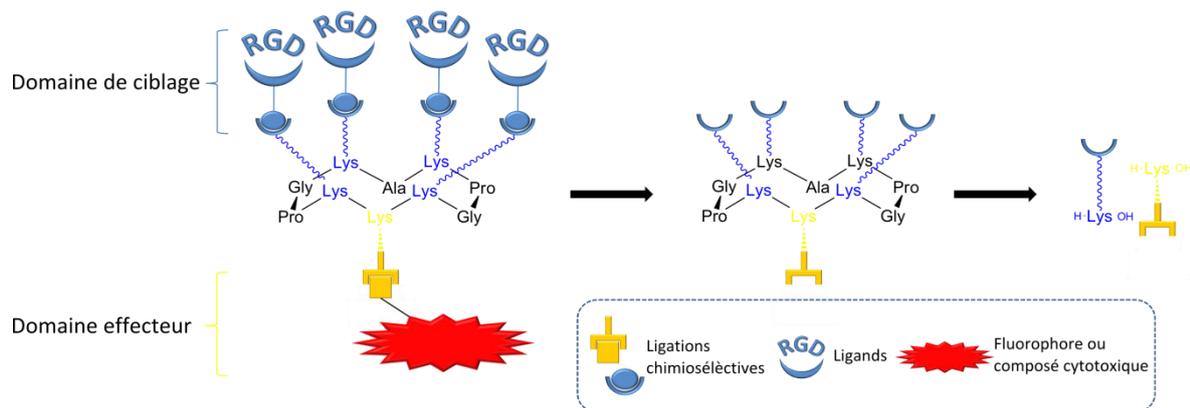


Figure 39 : Schéma de synthèse du vecteur multivalent

Des études antérieures menées au laboratoire ont montré l'effet apporté par les quatre motifs cyclo-[RGDfK-] sur le ciblage des cellules surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Des études ont montré que les structures les plus affines avec l'intégrine étaient obtenues *via* la présentation de trois ou quatre motifs -RGD-⁹⁴. Un marquage sur sa partie inférieure avec de la cyanine 5 a permis, par des études de microscopie de fluorescence *in vitro*, de déterminer que le composé tétravalent est 10 fois plus affiné pour l'intégrine que le composé monovalent⁹⁵ (Figure 40(1)). Cette augmentation d'affinité peut être expliquée par la structure du châssis qui permet une augmentation de la concentration locale du ligand -RGD- à proximité de la cible. Des études complémentaires de FRAP (Fluorescent Recovery After Photobleaching) ont permis de voir un effet cluster de ce composé et une réduction de la mobilité des intégrines sur la membrane. Il apparaît en effet que ce composé serait capable de lier deux intégrines en solution (Figure 40(2)). Par la suite des études *in vitro* d'internalisation du composé ont montré que le gabarit peptidique possédant quatre ligands -RGD-, présente des propriétés d'internalisation dans les cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Il est capable d'internaliser des composés de haut poids moléculaire comme la streptavidine (60kDa) par endocytose récepteur-dépendant⁹⁶, contrairement au cyclopentapeptide -RGD- qui lui semble être internalisé par une endocytose en phase fluide⁹⁷.

94. Garanger, E.; Boturyn, D.; Coll, J. L.; Favrot, M. C.; Dumy, P., Multivalent RGD synthetic peptides as potent $\alpha_v\beta_3$ integrin ligands. *Org Biomol Chem* **2006**, *4* (10), 1958-1965.

95. Sancey, L.; Garanger, E.; Foillard, S.; Schoehn, G.; Hurbin, A.; Albiges-Rizo, C.; Boturyn, D.; Souchier, C.; Grichine, A.; Dumy, P.; Coll, J.-L., Clustering and Internalization of Integrin $\alpha_v\beta_3$ With a Tetrameric RGD-synthetic Peptide. *Mol Ther* **2009**, *17* (5), 837-843.

96. (a) Boturyn, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P., Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (18), 5730-5739; (b) Garanger, E.; Boturyn, D.; Jin, Z. H.; Dumy, P.; Favrot, M. C.; Coll, J. L., New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol Ther* **2005**, *12* (6), 1168-1175.

97. Schraaa, A. J.; Kok, R. J.; Berendsen, A. D.; Moorlag, H. E.; Bos, E. J.; Meijer, D. K. F.; de Leij, L.; Molema, G., Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting. *J Control Release* **2002**, *83* (2), 241-251.

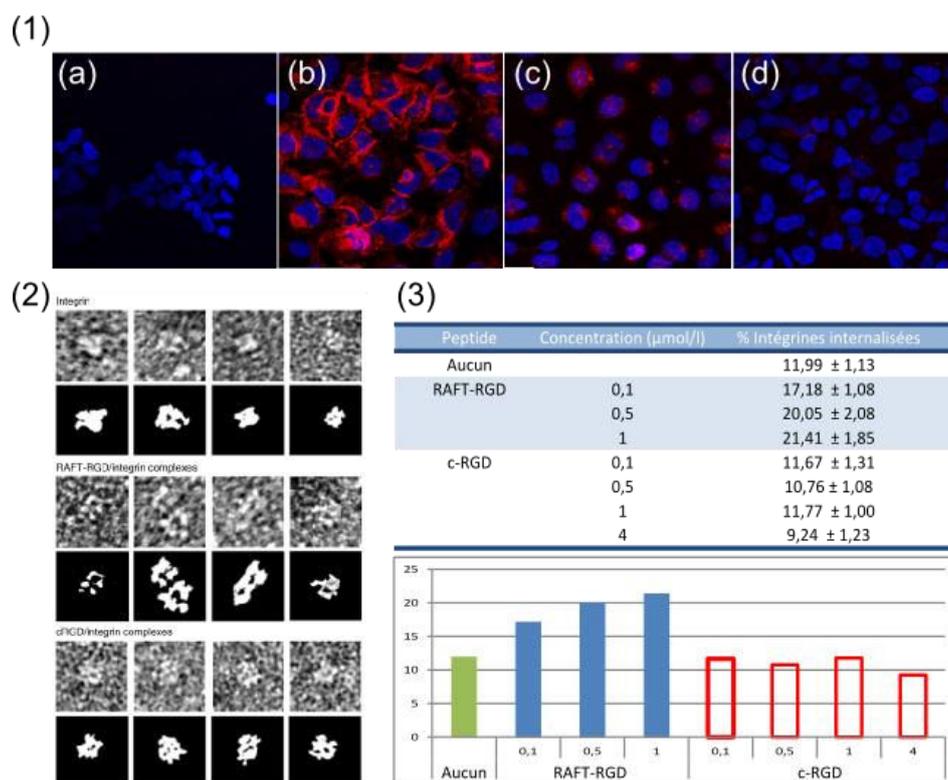


Figure 40 : (1) Clichés d'imagerie de fluorescence de l'étude d'adhésion cellulaire du ligand marqué à la cyanine 5 (a-b) RAFT4(c[-RGDfK-]) (c) c[-RGDfK-]) et (d) RAFT4(c[-RbADfK-]) sur la lignée cellulaire HEK293 (β1) (a) et HEK293 (β3) (b-d) ; (2) Etude par FRAP du complexe peptide RGD- /integrin $\alpha_v\beta_3$: L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ reste dans un état monomérique, excepté après l'utilisation de RAFT4(c[-RGDfK-]) (photo du milieu) ; (3) Tableau représentatif du pourcentage d'internalisation des intégrines après incubation avec le gabarit vecteur RAFT4(c[-RGDfK-]) en comparaison avec le c[-RGDfK-])

La très bonne affinité et spécificité de ce vecteur de ciblage pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et ses propriétés d'internalisation récepteur-dépendant ont permis d'envisager son utilisation pour la vectorisation de molécules effectrices *in vivo*.

II.1.3. La fluorescence un outil de détection tumorale comme aide à la chirurgie

Des expériences réalisées chez le petit animal ont permis de valider par la suite la sélectivité de nos composés *in vivo*. En exploitant la capacité de la lumière proche infra-rouge à pénétrer les tissus, l'imagerie et la spectroscopie optique peuvent être utilisées pour détecter des tissus cancéreux de façon non invasive. Dans ce contexte, nous avons préparé des composés fluorescents, déjà évalués *in vitro*, en couplant sur la partie inférieure du gabarit peptidique un fluorophore proche IR, tel que la cyanine 5^{96(b)} ($\lambda_{abs} = 649 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 670 \text{ nm}$) ou l'alexa 700⁹⁸ ($\lambda_{abs} = 702 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 723 \text{ nm}$). L'injection par voie intraveineuse, sur des souris de type nude, porteuses de tumeur souscutanées, et surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comme HEK293(β3) par

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

98. Keramidas, M.; Josseland, V.; Righini, C. A.; Wenk, C.; Faure, C.; Coll, J. L., Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model. *British Journal of Surgery* **2010**, *97* (5), 737-743.

exemple, a permis l'étude de la biodisponibilité des composés. Les résultats montrent que les composés fluorescents ciblent efficacement les tumeurs solides mais aussi les métastases (Figure 41). Il a été aussi montré que nos composés étaient très sélectifs de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et ne ciblaient pas une autre lignée de cellules tumorales comme HEK293(β_1) par exemple.

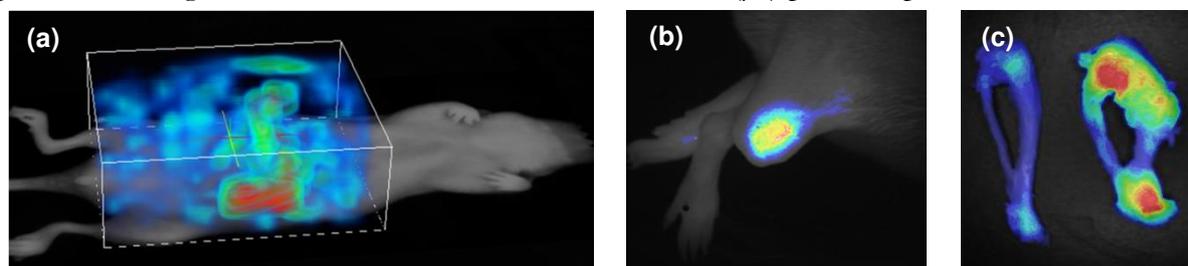


Figure 41 : (a) Clichés d'imagerie optique non invasive (a) de métastases et (b-c) de tumeurs (ostéosarcome) chez la souris (injections i.v. 10 nmol de conjugués/souris)

L'utilisation d'une fonction de détection activable (smart probe) a permis l'étude plus approfondie de la biodistribution des composés -RGD-. Sur cette nouvelle génération de composés, a été introduit sur la partie inférieure du châssis moléculaire un fluorophore et un quencheur de fluorescence, reliés par un pont disulfure. Le pont disulfure n'étant réduit qu'à l'intérieur de la cellule (milieu réducteur), la fluorescence n'est détectée qu'au sein du tissu ciblé. La réduction dans la cellule peut avoir lieu soit dans le cytosol par la thioredoxine, soit dans les endosomes tardifs par la réductase GILT (Gamma Interferon-inducible Lysosomal Thiol reductase). L'observation de la fluorescence *in vivo* démontre non seulement que le composé a atteint sa cible, mais aussi qu'il est internalisé (Figure 42)⁹⁹.

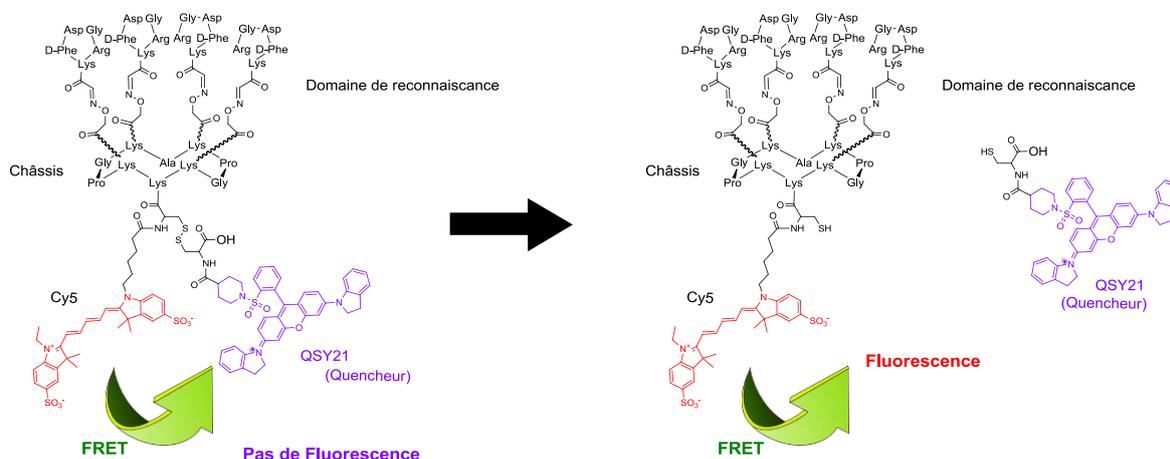


Figure 42 : Structure d'un composé « Smart Probe » et son mécanisme de sonde activable.

- **Application clinique : l'aide à la chirurgie**

Fort de l'expérience acquise en imagerie de fluorescence du petit animal, nous nous sommes dirigés vers le guidage du geste chirurgical par fluorescence. Cette approche a été validée

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

sur des animaux domestiques (chats, chiens) atteints de fibrosarcome et nécessitant une intervention chirurgicale (Figure 43).



Figure 43 : Chirurgie en salle opératoire en clinique vétérinaire

Des composés fluorescents et la technique d'imagerie sont commercialisés par une start-up « Fluoptics » sous le nom d'AngiostampTM. La technologie repose sur la combinaison d'un système d'imagerie optique en temps réel (Figure 44) et de traceurs fluorescents qui ciblent spécifiquement les cellules tumorales. Une fois injecté le traceur émet un signal infrarouge permettant d'illuminer les cellules cancéreuses qui deviennent alors visibles à l'écran. Ce procédé autorise ainsi une chirurgie de précision pour enlever des métastases non visibles à l'œil nu (jusqu'à 300 microns). Suite à l'utilisation en routine de cette technologie dans de nombreuses applications précliniques¹⁰⁰, des essais cliniques chez l'homme ont été réalisés.



Figure 44 : (gauche) Présentation de la sonde : l'instrument est constitué d'un boîtier de contrôle et d'une tête (caméra et éclairage) reliés au boîtier par un câble pouvant être déconnecté. Le système est relié à un ordinateur. (droite) Sonde en situation lors de chirurgie sur gros animaux

Cette technologie peut être utilisée pour d'autres applications comme la chirurgie cardiovasculaire, la chirurgie reconstructrice ou encore pour détecter les ganglions sentinelles dans le cadre de l'ablation d'une tumeur cancéreuse.

100. Mery, E.; Jouve, E.; Guillermet, S.; Bourgoignon, M.; Castells, M.; Golzio, M.; Rizo, P.; Delord, J. P.; Querleu, D.; Couderc, B., Intraoperative fluorescence imaging of peritoneal dissemination of ovarian carcinomas. A preclinical study. *Gynecol Oncol* **2011**, *122* (1), 155-162.

III. Synthèse et caractérisation de vecteurs multivalents de ligand RGD pour la détection tumorale

III.1. Conception de vecteurs pour l'imagerie

III.1.1. Les radiotraceurs et l'imagerie oncologique PET

Afin d'augmenter les qualités d'image de détection des tumeurs *in vivo*, nous nous sommes par la suite tourné vers l'utilisation de techniques d'imageries plus performantes comme l'IRM, le SPECT (*Single photon emission computed tomography*) ou le PET (*positron emission tomography*). Ainsi des résultats antérieurs ont montré que le composé -RGD- couplé au radiotracer ^{99m}Tc permettait par la technique SPECT d'imager de façon efficace l'angiogénèse du myocarde¹⁰¹. Des conjugués du Gadolinium pour l'IRM ont aussi été synthétisés au cours de la thèse de M. Galibert soutenue en 2010. Malheureusement, l'utilisation de ce composé comme agent de contraste pour l'IRM n'a pas été concluante. Le seuil de détection de cette technique d'imagerie étant relativement élevé, la concentration en composé à la périphérie des tumeurs n'a pas été suffisante pour obtenir des images de bonnes qualités.

Nous avons donc décidé d'utiliser des techniques d'imagerie PET et SPECT, permettant la détection à partir de concentration en composés beaucoup plus faible. La Tomographie à émission de positron (PET en anglais) est une méthode d'imagerie médicale qui permet de reconstituer des images en trois dimensions grâce aux émissions produites par les positrons issus de la désintégration d'un produit radioactif injecté au préalable. Comme le SPECT, cette technique possède un seuil de détection très bas (concentration en traceur de l'ordre du picomolaire) et une pénétration tissulaire illimitée. Cependant ces techniques ne sont actuellement pas beaucoup utilisées pour le diagnostic en raison des durées de vie courte des radiotraceurs utilisés. Quelques exemples existent quand même dans la littérature pour la détection de lignées cellulaires surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec la conjugaison d'un peptide -RGD- avec un galactose marqué au ^{18}F ($t_{1/2} = 110 \text{ min}$)¹⁰².

III.1.2. Synthèse des vecteurs multivalents pour la tomographie à émission de positron

Afin de remédier à ce problème de temps de demi-vie court, nous avons choisi d'utiliser le ^{64}Cu comme radioélément ($t_{1/2} = 12,6 \text{ h}$) qui sera fixé à notre gabarit *via* un macrocycle : le

101. Dimastromatteo, J.; Riou, L. M.; Ahmadi, M.; Pons, G.; Pellegrini, E.; Broisat, A.; Sancey, L.; Gavrilina, T.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Fagret, D.; Ghezzi, C., In vivo molecular imaging of myocardial angiogenesis using the $\alpha_v\beta_3$ integrin-targeted tracer Tc-99m-RAFT-RGD. *J Nucl Cardiol* **2010**, *17* (3), 435-443.

102. Haubner, R.; Wester, H. J.; Burkhart, F.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Weber, W.; Goodman, S. L.; Kessler, H.; Schwaiger, M., Glycosylated RGD-containing peptides, tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics. *J Nucl Med* **2001**, *42* (2), 326-336.

cyclam pour l'imagerie PET et le DOTA, complexant le radiotraceur ^{111}In ($t_{1/2} = 2,8$ j), pour l'imagerie SPECT.

La synthèse du gabarit cyclodécapeptidique **13** se fait par synthèse supportée en phase solide avec une stratégie Fmoc/tbu (résine 2-chloro-trityle). Toutefois, nous avons choisi d'incorporer au sein de la synthèse une lysine modifiée **5** par une fonction oxyamine protégée dans le but de coupler directement le ligand -RGD- par ligation oxime, après cyclisation du gabarit. L'incorporation de lysines modifiées nous permet de diminuer le nombre d'étapes de synthèse et ainsi améliorer les rendements de production des composés. Il est important d'utiliser le groupement 1-éthoxyéthylidène comme groupement protecteur de la fonction oxyamine car ce groupement est stable lors de la synthèse peptidique et il permet d'éviter une acétylation possible de l'amine secondaire présente dans le cas d'une protection boc¹⁰³. De la même façon, le ligand cyclo[RGDfK-] **17** est synthétisé sur support solide avec l'incorporation au cours de la synthèse d'une lysine modifiée permettant la présentation d'une fonction aldéhyde sur le ligand. Ces lysines modifiées sont préparés en deux ou trois étapes, en solution avec d'excellents rendements. En fin de synthèse, le traitement par une solution d'AcOH/TFE/DCM (1/2/7) permet le décrochage du peptide du support et la conservation de l'ensemble des groupements protecteurs. La cyclisation intramoléculaire des peptides **12** et **14** est réalisée en solution, en présence d'agent de couplage, dans des conditions de haute dilution. On obtient ainsi les composés **13** et **15** avec d'excellents rendements et une pureté satisfaisante pour leur utilisation.

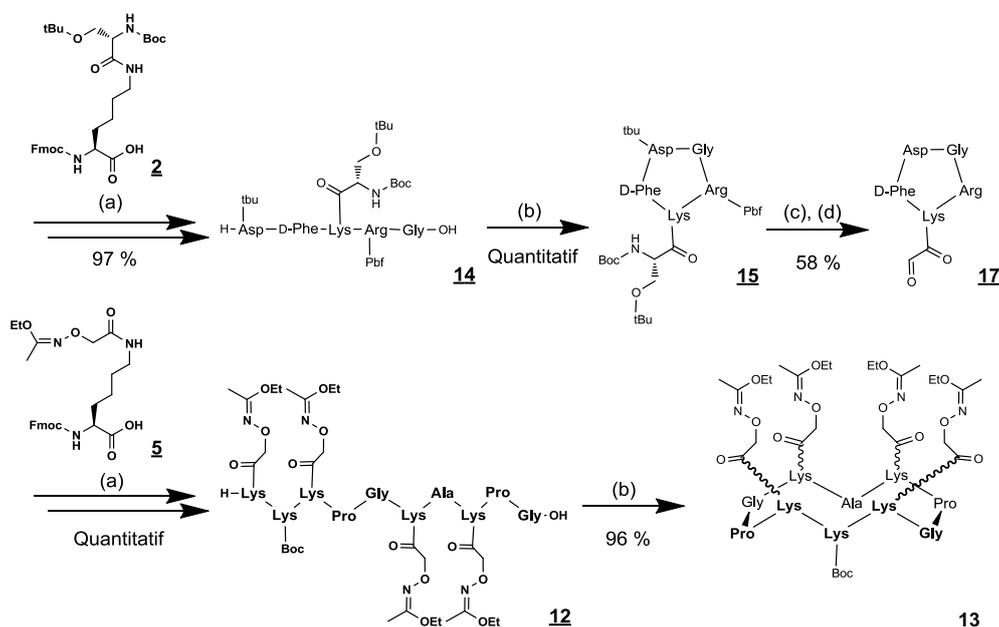


Figure 45 : Schéma de synthèse des composés **13** et **17**. Réactifs : (a) synthèse peptidique en phase solide, résine 2-chloro-trityle (b) 1,2 éq. PyBOP, DIPEA, DMF (c) TFA/H₂O/TIS ; 95/2,5/2,5 (d) 10 éq. NaIO₄, H₂O

Le composé **15** est ensuite totalement déprotégé par une solution de TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5). L'oxydation du composé par le périodate de sodium conduit alors au composé **17**,

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

présentant la fonction aldéhyde utile à la ligation oxime, avec un bon rendement après purification par HPLC-préparative (Figure 45).

Le couplage par lien oxime du ligand -RGD- **17** sur le châssis protégé **13** est réalisé dans une solution contenant 70% de TFA et 30 % d'eau (Figure 46). Cette réaction est généralement effectuée en utilisant un excès de composés aldéhydes (1,5 équiv. par site oxyamine). La forte concentration en TFA utilisée est nécessaire pour une déprotection rapide des groupements Boc et permet de réduire la formation d'agrégats. Dans ces conditions, les groupements 1-éthoxyéthylidène sont rapidement enlevés et la ligation oxime est rapidement réalisée. Au bout d'une heure de réaction, la ligation est complète et les produits sont directement purifiés par HPLC préparative. Le conjugué **18** est obtenu avec un bon rendement de l'ordre de 50 % (Figure 46) et une excellente pureté (Figure 47).

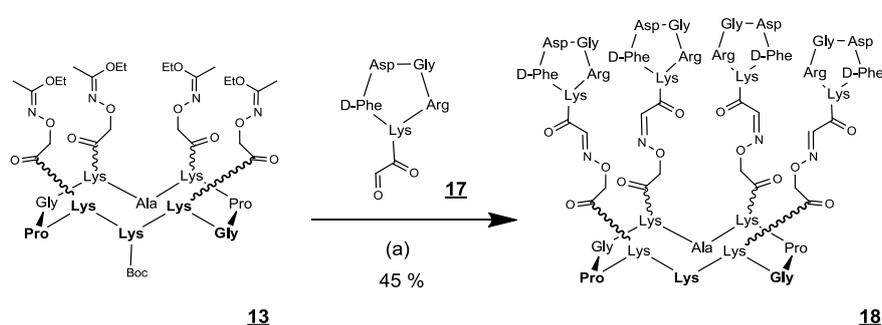


Figure 46 : Schéma de synthèse du composé **18**. Réactifs : (a) TFA/H₂O ; 7/3

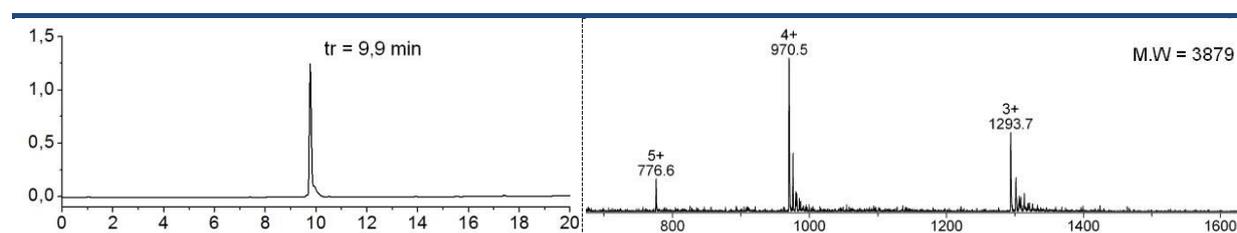


Figure 47 : Spectre HPLC et chromatogramme ESI+ du composé **18**

De la même manière, et comme contrôle, nous avons préparé le composé -RAD- **27** ne se liant pas à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, selon le même protocole de synthèse.

Les conjugués pour le couplage de radiotraceurs ont été préparé à partir du gabarit **18**. Le couplage des agents de complexation DOTA et cyclam par lien amide, est réalisé, en condition légèrement basique, en présence d'un léger excès d'ester activé DOTA-NHS commercial ou du trisboc-cyclam-NHS préparé préalablement. Pour le composé cyclam, la déprotection des groupements protecteurs des amines est réalisée par ajout d'une solution de TFA/H₂O (95/5). Les produits sont ensuite directement purifiés par chromatographie préparative (HPLC) pour donner les composés **21** et **22** avec de bons rendements (Figure 48) et une excellente pureté (Figure 49) pour les tests d'imagerie *in vivo*.

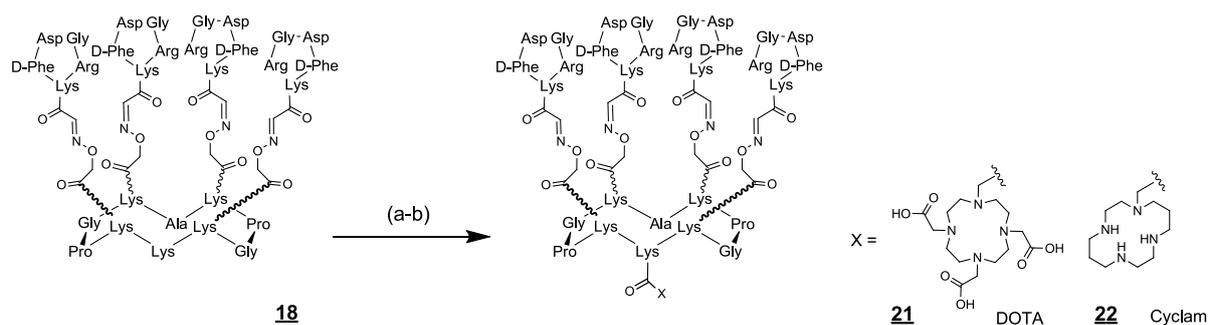


Figure 48 : Schéma de synthèse des conjugués pour la complexation de radioéléments.
Réactifs : (a) 1,5 éq. DOTA-NHS ou Cyclam-NHS, DIPEA, DMF, 2h (b) TFA/H₂O (95/5), 2h

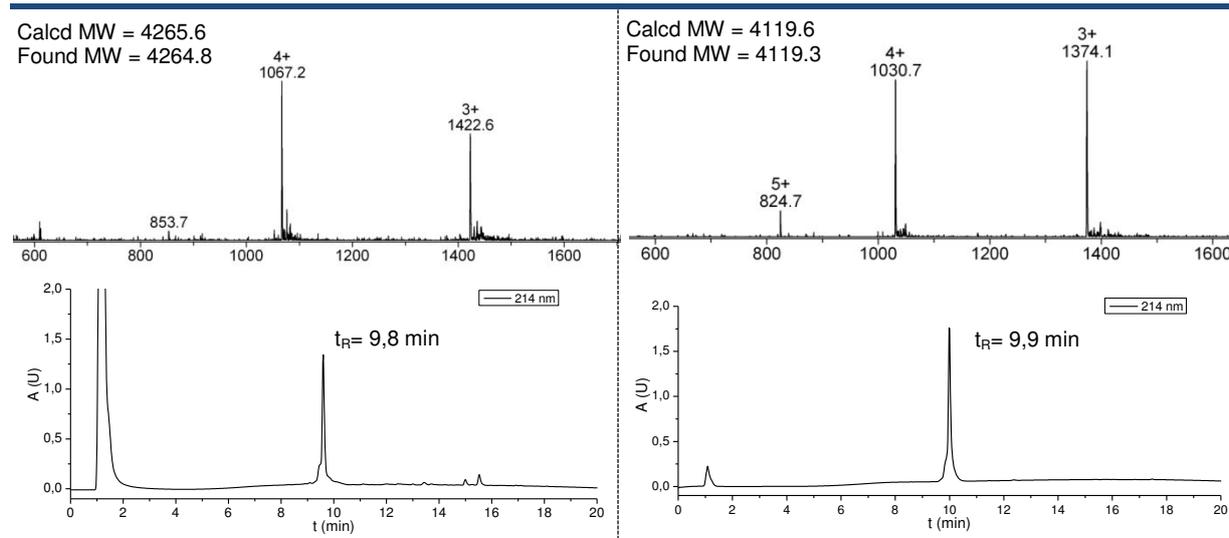


Figure 49 : Spectres ESI+ et HPLC (prg 5-100% ACN en 20 min) des composés (a) **21** et (b) **22**

De la même manière à été synthétisé les composés références ne ciblant pas l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, les produits **28** et **29** avec aussi d'excellents rendements.

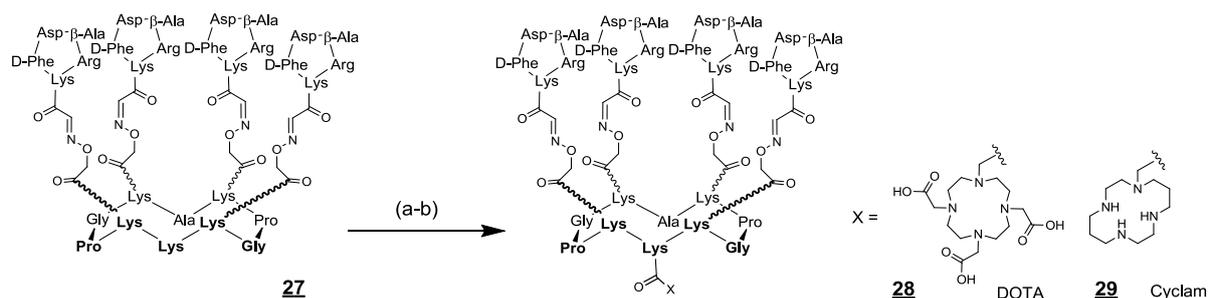


Figure 50 : Schéma de synthèse des conjugués pour la complexation de radioéléments
Réactifs : (a) 1,5 éq. DOTA-NHS ou Cyclam-NHS, DIPEA, DMF, 2h (b) TFA/H₂O (95/5), 2h

III.1.3. Localisation des tumeurs in vivo par Tomographie à émission de positron, avancés technologiques

L'imagerie des tumeurs et la biodistribution de nos composés ont été réalisées par le Dr. Zhao-Hui Jin (Responsable Dr. Y. Fujibayashi, Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japon) ainsi que par l'équipe du Prof. Daniel Fagret (CHU de Grenoble).

Des études antérieures avaient déjà été réalisées sur ces composés et ont montré que nos composés étaient capables de cibler et imager efficacement les tumeurs. Ces résultats préliminaires (thèse de M. Galibert) ont aussi guidé le choix du macrocycle permettant la complexation des radioéléments. En effet, il apparaît que le DOTA ne soit pas un très bon complexant du ^{64}Cu ce qui engendrerait un relargage de cuivre libre dans l'organisme. Le cyclam apparaît lui comme un meilleur agent de complexation puisque aucun relargage du radioélément n'a été observé dans les organes non ciblés.

Il apparaît de plus que notre composé, comme dans les études d'imagerie de fluorescence, se retrouve à de très forte concentration dans les reins. Il possède une clairance rapide et est donc très vite éliminé dans les urines. Il permet cependant, grâce à une très faible rétention dans les tissus sains, d'obtenir une très belle qualité d'image et un excellent contraste¹⁰⁴.

Ceci nous a conduit à continuer le projet dans le but d'améliorer la biodistribution de nos composés afin d'accroître le temps de rétention des composés dans l'organisme et ainsi permettre des études plus approfondies de ciblage et d'imagerie.

Afin de réduire la réabsorption et la digestion de nos composés, qui une fois métabolisés se retrouvent à de fortes concentrations dans la circulation sanguine, nous avons proposé, en collaboration avec l'équipe du Prof. Fagret à Grenoble, d'utiliser la gélofusine comme adjuvant. Son rôle étant d'interférer avec le récepteur régulant la voie d'élimination des composés vers les reins. Il a été ainsi montré que la co-injection de gélofusine dans des souris porteuses de tumeur (HEK293(β 3)) (^{111}In -DOTA-RAFT(c[RGDfK]₄) 4 μg , Gélofusine 4%, 120 μL /inj) réduisait de façon considérable l'activité dans les reins (50-60%) alors que l'activité dans les autres organes et notamment dans les tissus cancéreux n'était pas affectée (Figure 51)¹⁰⁵.

104. (a) Jin, Z.-H.; Furukawa, T.; Galibert, M.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Fukumura, T.; Saga, T.; Dumy, P.; Fujibayashi, Y., Noninvasive visualization and quantification of tumor $\alpha\text{V}\beta$ 3 integrin expression using a novel positron emission tomography probe, ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK)-4. *Nucl Med Biol* **2011**, *38* (4), 529-540; (b) Galibert, M.; Jin, Z. H.; Furukawa, T.; Fukumura, T.; Saga, T.; Fujibayashi, Y.; Dumy, P.; Boturyn, D., RGD-cyclam conjugate: Synthesis and potential application for positron emission tomography. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20* (18), 5422-5425.

105. Briat, A.; Wenk, C. H. F.; Ahmadi, M.; Claron, M.; Boturyn, D.; Jossierand, V.; Dumy, P.; Fagret, D.; Coll, J. L.; Ghezzi, C.; Sancey, L.; Vuillez, J. P., Reduction of renal uptake of In-111-DOTA-labeled and A700-labeled RAFT-RGD during integrin $\alpha(\text{v})\beta(3)$ targeting using single photon emission computed tomography and optical imaging. *Cancer Sci* **2012**, *103* (6), 1105-1110.

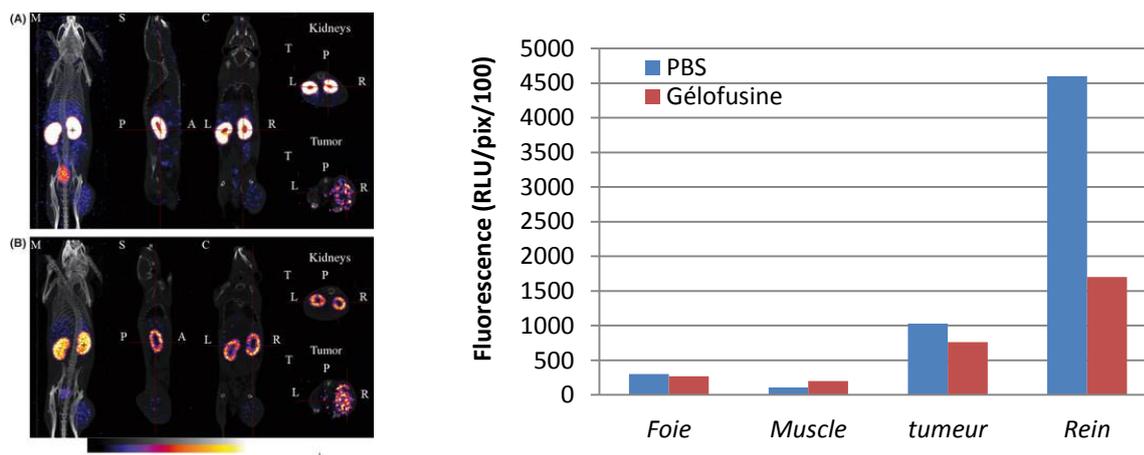


Figure 51 : Image réalisée par SPECT sur souris porteuses de tumeur HEK293(β_3), 24h après injection intraveineuse de (A) ^{111}In -DOTA-RAFT(4RGD) + PBS ; (B) ^{111}In -DOTA-RAFT(4RGD) + Gélofusine ; (C) Biodistribution du composé 24h après injection

Parallèlement à cette étude, et en collaboration avec le Dr. Zhao-Hui Jin, nous avons montré qu'il était possible de suivre l'efficacité d'un traitement anticancéreux par marquage des cellules tumorales exprimant $\alpha_v\beta_3$ *via* le marqueur ^{64}Cu -cyclam-RAFT(c[-RGDfK]₄). En effet, suite au développement de nombreux agents anticancéreux, il nous apparaissait important de développer une technique efficace de suivi de la croissance tumorale. Pour cela, l'effet d'un nouvel inhibiteur de tyrosine kinase, TSU-68¹⁰⁶ (phase clinique) sur la croissance ou la réduction des tumeurs a été évalué. Il a été ainsi montré qu'il existait une corrélation entre le développement vasculaire de la tumeur et l'activité, préalablement standardisée, de radiation visualisé par PET. Ainsi, et grâce à l'efficacité de cette technique d'imagerie, nous avons pu confirmer l'effet, à 10 jours ou plus, de la thérapie anticancéreuse sur la réduction de la croissance tumorale (Figure 52)¹⁰⁷.

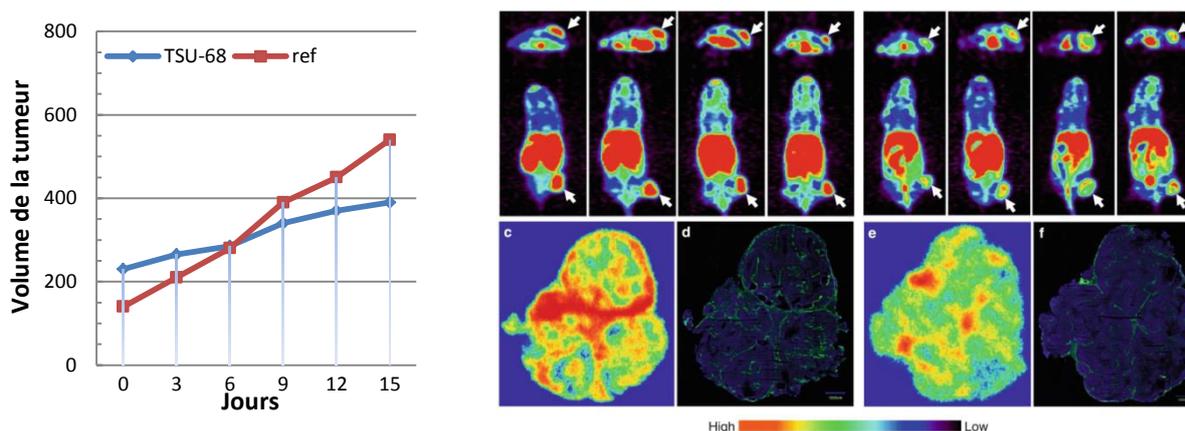


Figure 52 : (a) Evolution de la taille de la tumeur mesurer par PET (b) Image transverse et coronale de souris : à gauche non traitées (c-d) et à droite après 15 jours de traitement par TSU-68 (e-f), montrant l'évolution de la tumeur (pointée par une flèche)

106. Machida, S.; Saga, Y.; Takei, Y.; Mizuno, I.; Takayama, T.; Kohno, T.; Konno, R.; Ohwada, M.; Suzuki, M., Inhibition of peritoneal dissemination of ovarian cancer by tyrosine kinase receptor inhibitor SU6668 (TSU-68). *Int J Cancer* **2005**, *114* (2), 224-229.

107. Jin, Z.-H.; Furukawa, T.; Claron, M.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Fukumura, T.; Fujibayashi, Y.; Dumy, P.; Saga, T., Positron emission tomography imaging of tumor angiogenesis and monitoring of antiangiogenic efficacy using the novel tetrameric peptide probe (^{64}Cu -cyclam-RAFT-c[-RGDfK-]) (4). *Angiogenesis* **2012**, *15* (4), 569-80.

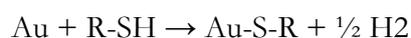
III.2. Détection, capture et relargage de cellules tumorales

III.2.1. Principe et objectifs

Toujours dans un but de ciblage des cellules tumorales pour le diagnostic, nous avons comme projet de concevoir des surfaces capables de détecter et capturer sélectivement des cellules tumorales sur-exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Il est en effet difficile de détecter ces cellules dont la concentration est très faible dans le sérum sanguin. Notre projet vise donc à préparer des surfaces capables de capturer spécifiquement ces cellules dans un fluide biologique afin de les concentrer pour des analyses ultérieures. Ces analyses pourront ensuite être réalisées après détachement des cellules de leur substrat d'adhésion. La méthode mise en oeuvre devra être douce afin de ne pas altérer les cellules capturées et détachées.

Ce projet fait ainsi intervenir plusieurs compétences comme la synthèse de gabarits peptidiques permettant le ciblage des cellules cancéreuses d'une part, et d'autre part l'accroche sur la surface ainsi que des techniques de caractérisations de surface (la micro-balance à quartz avec suivi de la dissipation d'énergie (QCM-D) couplée à de la microscopie optique). Ce projet est effectué en collaboration avec le Dr. Liliane Guerente spécialiste dans la formation de nanostructures immobilisées sur surface et leurs études par les techniques citées.

De nos jours le développement de bio-capteurs et la fonctionnalisation de surface qu'il requiert suscitent un grand intérêt. L'une des méthodes les plus courantes pour fonctionnaliser une surface d'or consiste à adsorber une monocouche auto-assemblée d'alcane-thiol. Les monocouches auto-assemblées sont formées par l'adsorption de molécules organiques qui peuvent s'organiser ensuite spontanément en une structure cristalline ou semi-cristalline¹⁰⁸. Le mécanisme de couplage sur or est présenté comme une addition oxydative d'une liaison S-H suivi d'une élimination réductrice d'hydrogène conduisant à la formation d'un thiolate :



Les thiols (R-SH), les sulfures (R-S-R) et les disulfures (R-S-S-R) s'auto-assemblent rapidement sur l'or par leur simple mise en contact avec la surface. Dans le cas où les thiols présentent une longue chaîne alkyle (>10), la SAM formée a une structure cristalline : une fois que les molécules sont adsorbées sur la surface, elles se réorganisent pour donner une monocouche parfaitement ordonnée. En utilisant un mélange de thiols, on obtient une couche mixte dont la composition reflètera plus ou moins la concentration en solution des deux espèces.

G. Whitesides a démontré au début des années 90 que la fonctionnalisation des SAM avec des groupements éthylène glycol permettait de limiter l'adhésion non spécifique des protéines¹⁰⁹. Un nombre de motifs éthylène glycol (EG) compris entre trois et six motifs permet de limiter

108. Bain, C. D.; Whitesides, G. M., Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the length of the alkyl chain. *J Am Chem Soc* **1989**, *111* (18), 7164-7175.

109. Prime, K. L.; Whitesides, G. M., Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. *Ibid.* **1993**, *115* (23), 10714-10721.

l'adhésion non spécifique. Le choix du groupe terminal de l'alkanethiol oriente vers différentes méthodes de fixation d'une biomolécule : liaison covalente ou non-covalente. La chimie supramoléculaire offre notamment de nombreuses possibilités ; par exemple l'interaction hôte-invité entre la cyclodextrine et des molécules invitées constitue une stratégie de couplage qui s'avère intéressante.

Le groupe de Huskens de l'université de Twente au Pays-bas a notamment beaucoup travaillé sur la formation de monocouches auto-assemblées d'alcane thiols fonctionnalisées par des cyclodextrines (SAM-CD) et l'immobilisation de nanoparticules, de dendrimères et de biomolécules par des interactions hôte-invités. Les auteurs ont étudié le rôle de la multivalence dans l'interaction cyclodextrine-molécule invitée (ferrocène ou adamantane). Pour cela ils synthétisent une large gamme de plateformes modulant ainsi la valence des invités et leurs espacements, comme des petites molécules monovalentes ou bivalentes, des calixarènes tétravalents, des polymères ou des dendrimères¹¹⁰ (Figure 53).

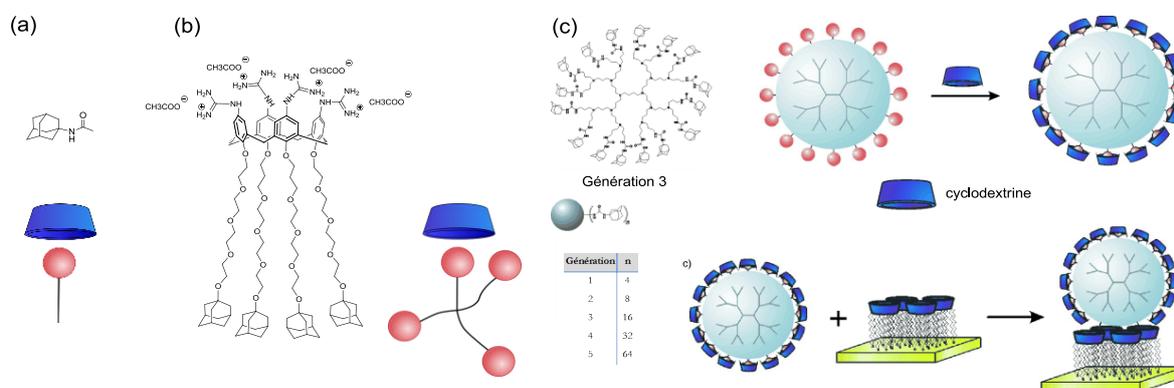


Figure 53 : Représentation de différentes plateformes pour la présentation multivalente d'invités

Ainsi, la faible affinité ($K_a=1,2.10^3$) β -cyclodextrine (CD)-ferrocène peut être grandement augmentée par la présentation multivalente des molécules invitées et ainsi obtenir des constante d'association de l'ordre du nanomolaire pour des molécules multimériques ($n \geq 4$)¹¹¹.

Dans notre groupe, nous avons présenté dernièrement une méthode de préparation de la SAM-CD utilisant la click-chemistry pour fixer la CD sur une SAM préformée¹¹². La surface est fonctionnalisée par l'adsorption d'alkanethiols dont une fraction porte la fonction azoture. La cyclodextrine peut alors être greffée *in situ* par cycloaddition de Huisgen (CuAAC) entre la fonction azoture de la surface et la fonction alcyne présente sur la CD. Dans cette étude, les

110. (a) Ludden, M. J. W.; Ling, X. Y.; Gang, T.; Bula, W. P.; Gardeniers, H. J. G. E.; Reinhoudt, D. N.; Huskens, J., Multivalent Binding of Small Guest Molecules and Proteins to Molecular Printboards inside Microchannels. *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14* (1), 136-142; (b) Huskens, J., Multivalent interactions at interfaces. *Curr Opin Chem Biol* **2006**, *10* (6), 537-543; (c) Mulder, A.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N., Multivalency in supramolecular chemistry and nanofabrication. *Org Biomol Chem* **2004**, *2* (23), 3409-3424; (d) de Jong, M. R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N., Influencing the binding selectivity of self-assembled cyclodextrin monolayers on gold through their architecture. *Chem-Eur J* **2001**, *7* (19), 4164-4170.

111. Huskens, J.; Mulder, A.; Auletta, T.; Nijhuis, C. A.; Ludden, M. J. W.; Reinhoudt, D. N., A model for describing the thermodynamics of multivalent host-guest interactions at interfaces. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (21), 6784-6797.

112. Dubacheva, G. V.; Van der Heyden, A.; Dumy, P.; Kaftan, O.; Auzely-Velty, R.; Coche-Guerente, L.; Labbe, P., Electrochemically Controlled Adsorption of Fc-Functionalized Polymers on beta-CD-Modified Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2010**, *26* (17), 13976-13986.

interactions hôte-invité ont été utilisées pour fixer de manière réversible une protéine : la streptavidine (SA_V). Ce complexe est stable uniquement avec le ferrocène à l'état réduit. L'oxydation électrochimique de celui-ci provoque alors la dissociation du complexe. Cette réversibilité du processus de complexation a été mise à profit pour fixer et détacher la SA_V par le biais d'un gabarit cyclodécapéptidique possédant quatre ligands ferrocène et une biotine¹¹³.

Le processus de fixation réversible d'une biomolécule développée au laboratoire a été étendu à la capture sélective et au détachement contrôlé de cellules surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Pour ce faire, nous avons synthétisé des gabarits peptidiques présentant des molécules invitées ferrocène sur une face et des ligands -RGD- permettant de cibler les cellules (Figure 54).

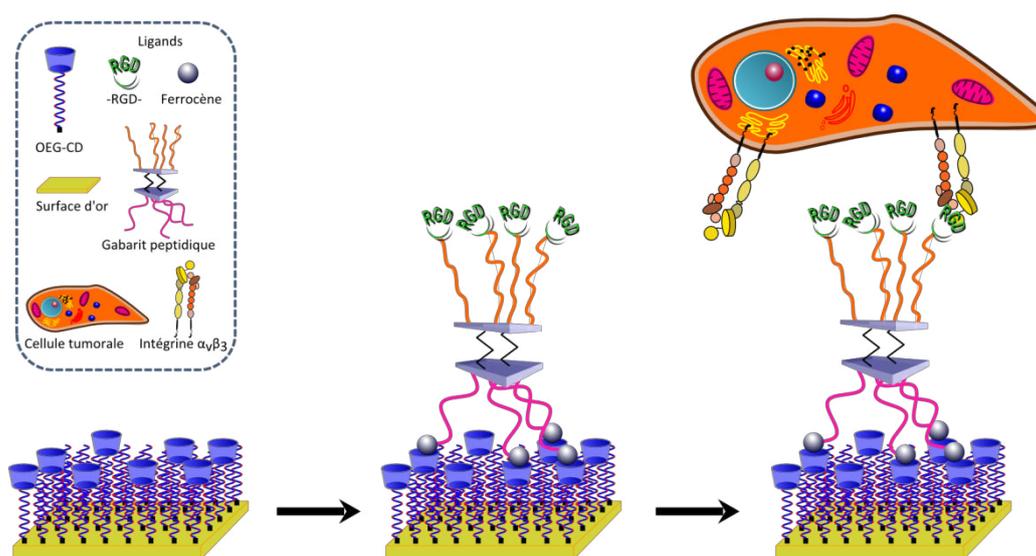


Figure 54 : Schéma présentant la capture cellulaire sur une surface fonctionnalisée par des cyclodextrines *via* l'intermédiaire d'un gabarit peptidique

113. Dubacheva, G. V.; Galibert, M.; Coche-Guerente, L.; Dumy, P.; Boturyn, D.; Labbe, P., Redox strategy for reversible attachment of biomolecules using bifunctional linkers. *Chemical Communications* **2011**, 47 (12), 3565-3567.

III.2.2. Les différentes méthodes de caractérisations à l'interface solide/liquide

- Principe de la Microbalance à Quartz

La microbalance à quartz (QCM) est une méthode acoustique basée sur les propriétés piézoélectriques d'un cristal de quartz. En appliquant une différence de potentiel entre les deux faces du cristal de quartz un mouvement de cisaillement est induit créant un oscillateur harmonique. Elle permet d'évaluer des changements de masse d'un cristal de quartz piézoélectrique en mesurant les variations de fréquence de résonance. Ainsi, en déposant un matériau (polymère, protéine, nanoparticule...) à la surface du cristal de quartz recouvert d'or, l'analyse par QCM permet d'accéder à la masse du film. Dans le cas d'un film rigide, Sauerbrey, en 1959, a démontré la relation linéaire simple qui relie la variation de masse déposée sur la surface Δm aux variations de fréquences observées Δf .

$$\Delta m = -C \cdot \frac{\Delta f n}{n} \quad \text{avec} \quad C = \frac{v_q \rho_q}{2f_0^2}$$

Equation de Sauerbrey ; $C = 17,7 \text{ ng.Hz}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ est la constante de sensibilité massique pour un cristal de quartz dont la résonance fondamentale f_0 est de 5 MHz (v_q = vitesse de propagation du son dans le quartz et ρ_q = densité du quartz) ; $n = 1, 3, 5, 7, 9$ et 13 est l'harmonique utilisé.

La sensibilité de la microbalance et sa capacité à mesurer des masses de quelques nanogrammes/cm² vient d'une part des très faibles pertes acoustiques dans le quartz qui confèrent au dispositif un facteur de qualité élevé (quelques dizaines de milliers dans l'air, quelques milliers en phase liquide), et d'autre part de notre capacité à mesurer avec une très grande précision une fréquence d'oscillation.

L'équation de Sauerbrey constitue le fondement de l'utilisation de la technique de QCM comme capteur de masse ou microbalance mais elle s'applique de façon approchée au dépôt d'un film en milieu liquide. Une diminution de la fréquence est interprétée comme une augmentation de la masse adsorbée sur le quartz. Dans les années 80, il a été montré que la technique de QCM pouvait être utilisée pour des applications en phase liquide. Il devenait alors nécessaire d'utiliser un nouveau modèle tenant compte de l'amortissement des oscillations du cristal lié aux pertes visqueuses dans une couche organique hydratée. Cette extension de technique développée par la société suédoise « Q-Sense » permet l'apport d'informations sur les propriétés viscoélastiques de la couche adsorbée *via* la mesure de la dissipation d'énergie après coupure de la source d'excitation (Figure 55). Le modèle de Voinova¹¹⁴ permet d'extraire les paramètres caractérisant les propriétés viscoélastiques de la couche organique adsorbée sur le cristal de quartz (épaisseur, densité, viscosité et module élastique) à partir des variations de fréquence de résonance et de dissipation d'énergie mesurées à sa fréquence fondamentale et également aux harmoniques (3, 5, 7, 9, 11 et 13).

114. Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B., Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach. *Physica Scripta* **1999**, 59 (5), 391-396.

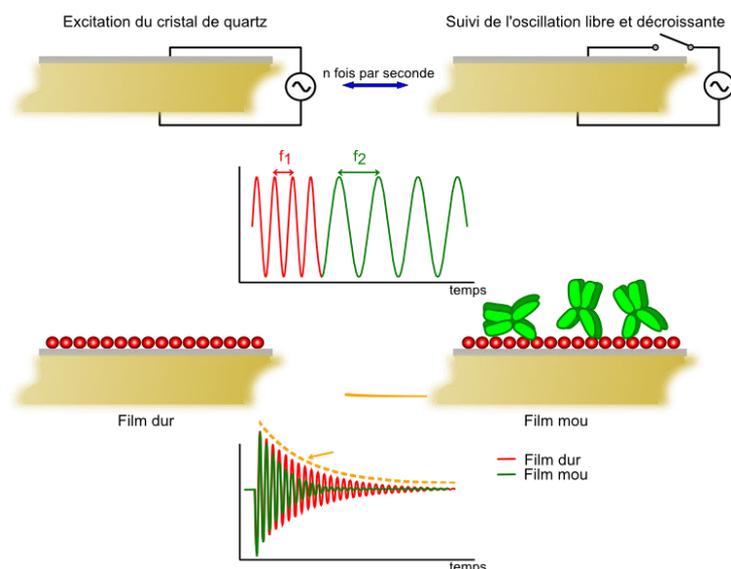


Figure 55 : Présentation schématique du fonctionnement de la QCM-D. L'application d'un courant alternatif induit des oscillations mécaniques et la mesure des caractéristiques (fréquence et atténuation) de ces oscillations permet d'obtenir des informations sur la nature du film adsorbé (masse, viscosité).

Les variations de fréquence et de dissipation permettent ainsi d'obtenir des informations en temps réels sur les processus d'adsorption et les changements structuraux des couches déposées. La résolution massique des appareils commercialisés par Q-Sense est de 2 ng/cm^2 pour les appareils E-1 et E-4 dont dispose le laboratoire.

Il faut noter que la masse mesurée par cette technique d'analyse inclut l'eau d'hydratation et les contre-ions liés à la matière adsorbée. Pour obtenir une masse sèche des entités adsorbées sur la surface il faudra utiliser d'autres techniques d'analyse optique comme la résonance plasmonique de surface (SPR) ou l'ellipsométrie.

III.2.3. Stratégie rédox pour l'attachement réversible de biomolécules

Afin de débiter cette étude, nous allons présenter dans un premier temps la synthèse des précurseurs pour la conception d'une nouvelle méthode d'élaboration de la SAM-CD puis la préparation d'un gabarit peptidique possédant quatre ligands ferrocényle et un ligand biotine. L'objectif visé est de démontrer qu'il est possible d'attacher des biomolécules sur nos surfaces fonctionnalisées et de les détacher par une oxydation électrochimique afin de les relarguer et de régénérer la surface.

III.2.3.1. Synthèse et caractérisations des polyéthylènes-glycol fonctionnalisés par des cyclodextrines

La cyclodextrine est un oligosaccharide cyclique constitué de six (α -cyclodextrine), sept (β -cyclodextrine), ou huit unités glucopyranose. La β -CD possède une cavité hydrophobe qui permet la complexation d'invités organiques comme le ferrocène ou l'adamantane en solution aqueuse (Figure 56).

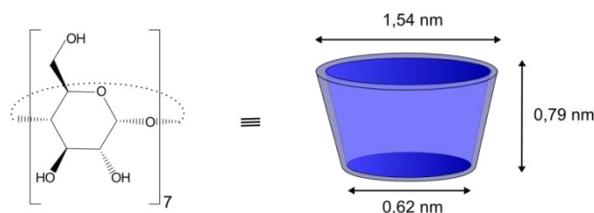


Figure 56 : Structure et dimensions de la β -cyclodextrine

De manière à simplifier la préparation de la mono-couche auto-assemblée décrite dans le réf 112 où la β -CD était fixée par liaison covalente sur SAM préformé par CuAAC nous avons synthétisé des oligo(éthylènes glycols) (OEGs), possédant une fonction thiol ou disulfure, fonctionnalisés par des CDs (Figure 57). Afin de moduler la densité de greffage en CD sur la surface, des SAM mixtes sont élaborées par l'incubation de la surface d'or dans le mélange de 2 thiols (ou disulfure) : thiol-CD (ou disulfure-CD) et thiol-OEG-alcane (disulfure-OEG). Ces derniers jouant le rôle de diluant des CD dans la SAM (Figure 57).

Pour ce faire, le greffage des β -cyclodextrines commerciales sur un thiol-OEG est effectué par lien amide. Notre stratégie pour obtenir une monocouche dense, afin que toutes les cyclodextrines soit orientées de façon ordonnée, est d'utiliser des espaceurs OEGs ou OEGs–chaînes alkyles pour l'attache à la surface. Nous avons ainsi synthétisé deux molécules avec des espaceurs OEGs et étudié leurs propriétés à former une monocouche ordonnée sur un quartz d'or. La ligation entre le polyéthylène glycol commercialement sous la forme activé N-hydroxysuccinimide et la β -cyclodextrine est effectuée dans le DMF à pH légèrement basique avec de bons rendements (Figure 57). La purification du produit obtenu est faite sur colonne C_{18} avec un gradient eau/ACN et la détection est réalisée par un détecteur à diffusion de lumière (ELSD).

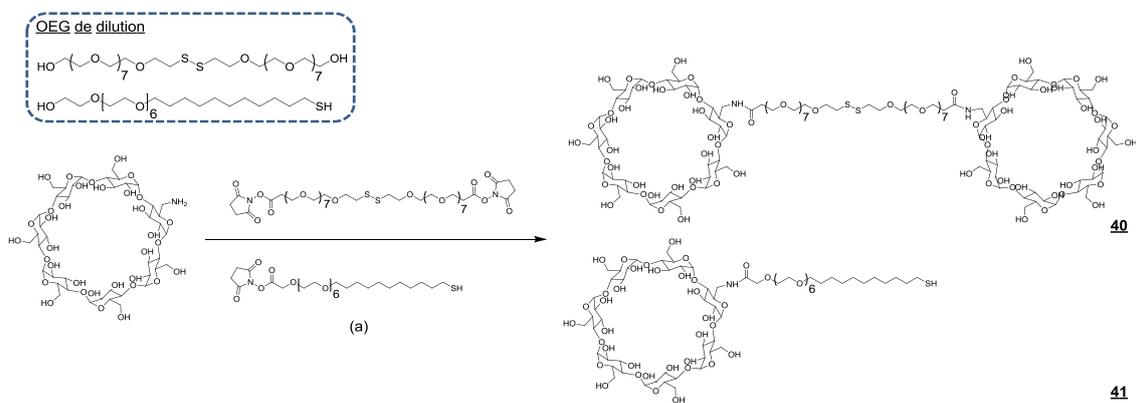


Figure 57 : Schéma de synthèse des composés **40** et **41**. (a) DMF, DIPEA, 2h

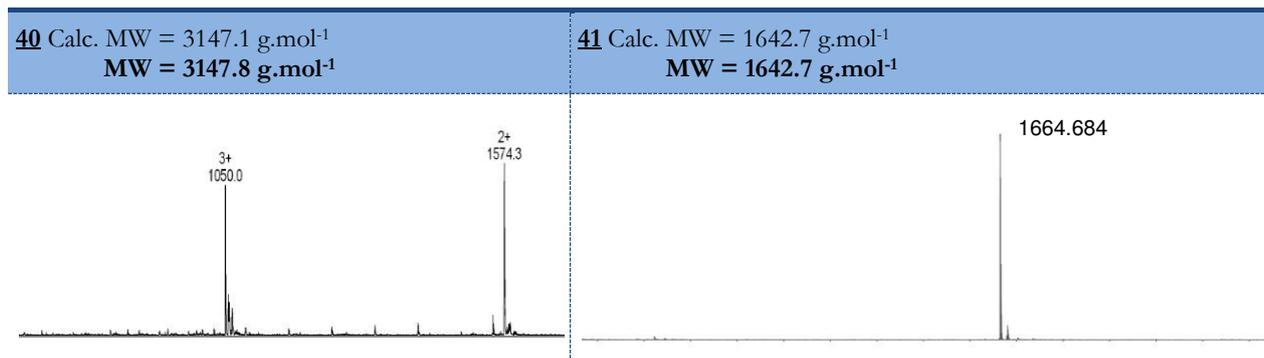


Figure 58 : Analyse ESI+ des composés **40** et **41**

Suite à la synthèse de ces composés, leurs propriétés à former une monocouche organisée de CD a été étudiée. Pour ce faire, des solutions, contenant des proportions différentes des deux thiols (ou disulfures) ont été préparées et mises en contact avec des surfaces d'or préalablement activées. L'objectif est ici de montrer qu'en augmentant le pourcentage de thiol-OEG-CD dans le mélange, on obtient des surfaces avec des densités de greffage en CD plus élevées. La mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur la surface nous renseigne sur l'hydrophilie de la surface et donc indirectement sur le pourcentage de cyclodextrine présentée à la surface (Figure 59 et Figure 60).

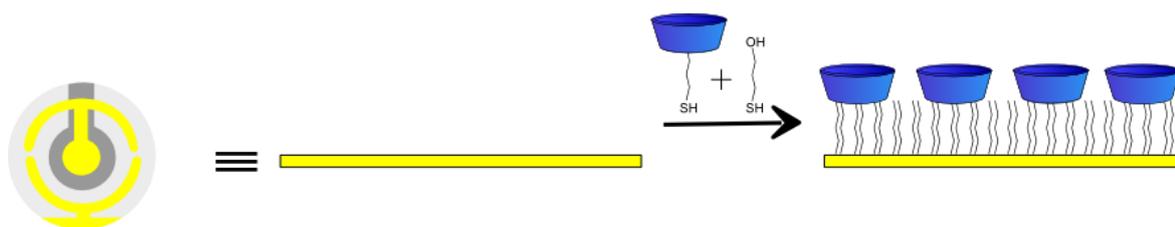


Figure 59 : Schéma de fonctionnalisation d'un quartz, conception de la SAM

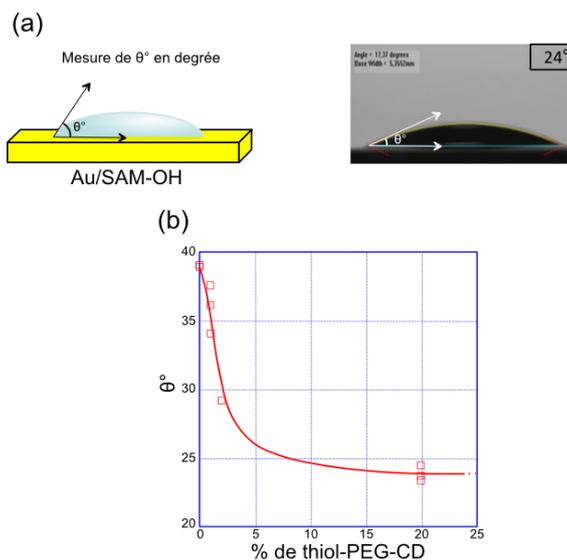


Figure 60 : Analyse de la fonctionnalisation du quartz par les cyclodextrines modifiées : (a) représentation schématique de la mesure de l'angle de contact après dépôt d'une goutte d'eau sur la surface, (b) graphique représentant l'angle de contact mesuré en fonction du pourcentage en thiol-OEG-CD **41** dans le mélange de thiols utilisé pour la préparer la SAM

La figure 60 montre que l'angle de contact diminue lorsque le pourcentage de thiol-OEG-CD dans la solution utilisée pour fonctionnaliser la surface d'or augmente. On obtient une hydrophilie maximum pour des pourcentages supérieurs à 10 %. Pour cette concentration, la surface correspond à la saturation en CD et l'ajout de plus de CD sur la surface n'engendre pas une augmentation importante de l'hydrophile.

III.2.3.2. Synthèse et caractérisations d'un gabarit peptidique pour l'attachement et le détachement de biomolécules sur la surface.

- Synthèse du châssis possédant quatre ligands ferrocènes et une biotine

Afin de comparer les propriétés hôte de la SAM-CD préparée en une étape à partir de l'adsorption directe de thiol-CD (ou disulfure-CD) à celles de la SAM-CD obtenue par couplage de la CD sur une SAM préformée (référence 112), nous avons synthétisé un gabarit peptidique à 4 ligands ferrocènes et présentant une fonction biotine sur sa face opposée. L'objectif visé est de vérifier la faisabilité de l'attachement et du détachement de la streptavidine *via* un couplage affinité biotine/streptavidine ($K_d \approx 10^{-14} \text{ mol.l}^{-1}$)¹¹⁵ sur cette nouvelle SAM-CD.

Le couplage des ligands ferrocènes a été réalisé par cycloaddition 1-3 dipolaire catalysée au Cu^I entre l'alcyne porté par le châssis et l'azoture porté par le bras espaceur PEG qui est couplé au ferrocène. Nous avons choisi de relier les ligands au gabarit peptidique *via* l'utilisation d'un espaceur de quatre unités éthylène glycol, permettant d'obtenir un bon compromis entre flexibilité et rigidité afin d'optimiser les chances d'obtenir une constante d'association importante et suffisante avec la surface. La biotine sera liée sur la lysine de la face opposée par un lien amide.

La première étape de la préparation du composé est la synthèse des ligands ferrocènes aminés. Pour cela nous avons réduit par un mélange $\text{AlCl}_3/\text{LiAlH}_4$ la fonction acétonitrile du composé commercial ferrocèneacétonitrile avec un rendement de 49% après purification. Cette fonction amine nous permet de coupler avec un bon rendement le ferrocène à un polyéthylène glycol commercial non symétrique possédant une fonction acide activé par un succinimide et un azoture (Figure 61). On obtient le produit **37** avec une excellente pureté après purification par HPLC-préparative.

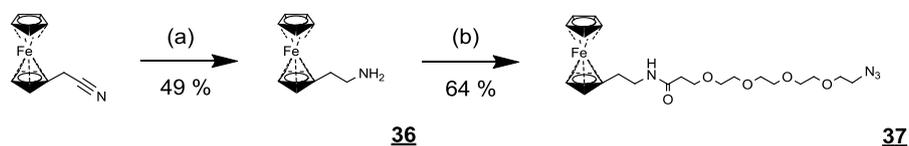


Figure 61 : Schéma de synthèse du ligand ferrocène **37**. Réactifs : (a) $\text{LiAlH}_4/\text{AlCl}_3$; 3/2 équiv., THF anhy., 2h, reflux (b) 1,2 équ. N3-dPEG(4)-CONHS, DMF, 2h

Le gabarit peptidique est préparé par SPPS avec l'incorporation de l'acide aminé modifié **7**. La déprotection de la résine chlorotrytyle est réalisée par une solution de TFA/DCM (1/99) en 1 heure et la cyclisation a lieu en milieu dilué en présence de PyBop. Après déprotection du groupement Boc protecteur de la lysine inférieure et couplage peptidique de la biotine activée par

115. Green, N. M., Avidin. *Advances in protein chemistry* **1975**, *29*, 85-133.

un succinimide, on obtient le composé **34** avec un très bon rendement et une excellente pureté après purification par HPLC-préparative (Figure 62).

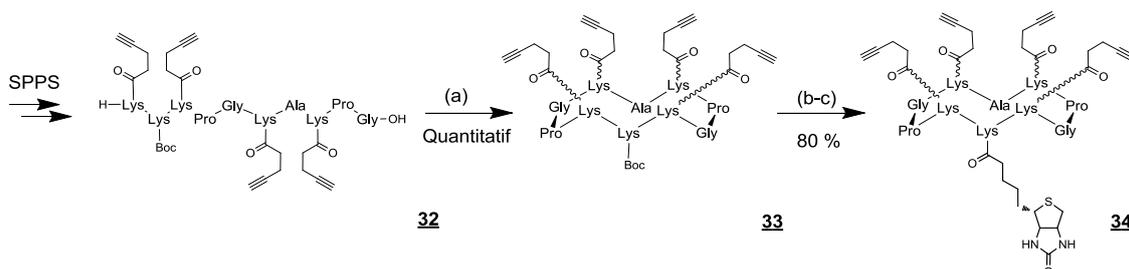


Figure 62 : Schéma de synthèse du châssis **32**. Réactifs : (a) 1,2 éq. PyBop, DMF, 1h30 (b) TFA/DCM 1/1, 2h (c) 1,5 éq. biotine-NHS ester, DMF, 1h30

Le couplage des ligands ferrocène est ensuite réalisé par ligation CuAAC en présence de CuSO_4 comme fournisseur de cuivre et l'ascorbate de sodium comme réducteur de celui-ci. Un ligand du cuivre, le THPTA, a de plus été utilisé afin de solubiliser le cuivre I formé en milieu aqueux et le stabiliser afin d'augmenter la vitesse de réaction et diminuer les réactions parasites. Le ligand a été choisi car permettant de travailler dans des solvants aqueux. La description complète du choix du ligand, de sa synthèse et des protocoles développés est faite dans le chapitre VI.

La réaction de couplage a lieu sous argon en 2h dans un tampon PBS à pH= 7,4 et on obtient le produit **38** avec un bon rendement après purification (Figure 63).

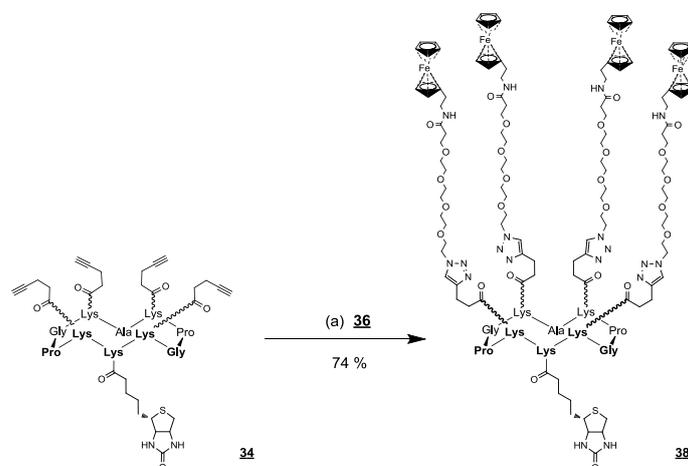


Figure 63 : Schéma de synthèse du gabarit **38**. Réactifs : (a) 6 éq. de composé **36**, 1 éq CuSO_4 , 5 éq NaAsc, 2 éq. THPTA, PBS(100mM ; pH 7,4)/DMF, 2h

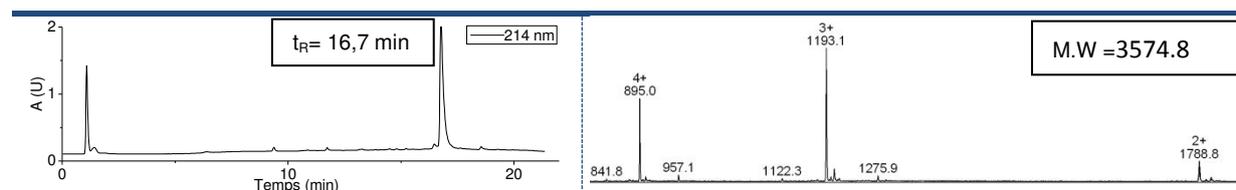


Figure 64 : Analyse HPLC et ESI+ du composé **38**

III.2.3.3. Immobilisation du gabarit **38** sur les SAMs, application à la capture et au relargage de biomolécules

Une fois les SAMs-CD formées *ex-situ*, l'immobilisation du gabarit peptidique **38** synthétisé est suivie par QCM-D.

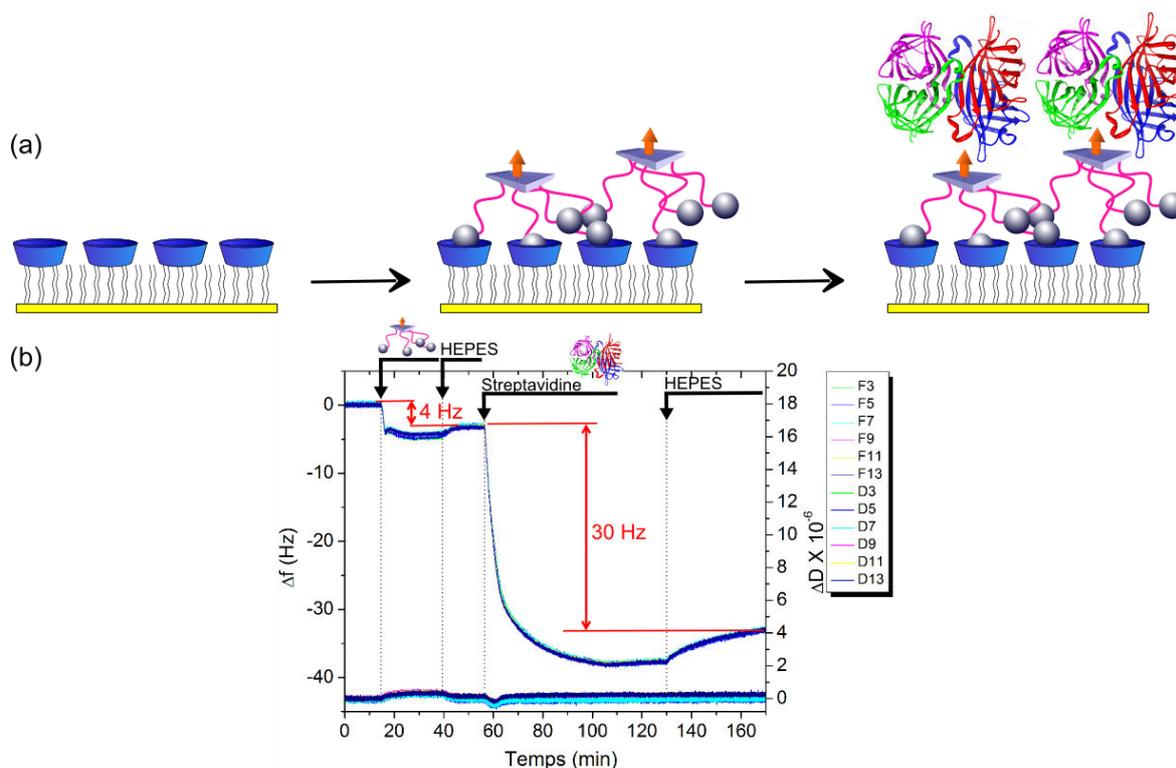


Figure 65 : Schéma de la construction et de l'adsorption du gabarit **38** et de la SA_V sur une SAM à 2,5% de OEG-disulfure-CD **40** (a) et suivi par QCM-D (b)

Le profil de QCM-D de l'adsorption du gabarit sur une SAM à 2,5% de OEG-disulfure-CD est présenté sur la Figure 65. On observe que l'immobilisation du gabarit peptidique provoque une diminution de fréquence de 4 Hz et une très faible augmentation de dissipation. La variation de dissipation d'énergie largement inférieure à 1.10^{-6} après le rinçage indique la formation d'une couche mince et rigide nous permettant d'utiliser l'équation de Sauerbrey pour déterminer la masse adsorbée et l'épaisseur de la couche. On obtient ainsi une masse de la couche hydratée adsorbée de 70 ng.cm^{-2} . Afin de vérifier l'accessibilité des fonctions biotines sur la surface nous avons ensuite immobilisé sur la couche de gabarit formée de la streptavidine (SA_V) *via* l'interaction affine biotine/streptavidine.

On observe sur le profil de QCM-D que l'injection de la SA_V provoque une diminution de fréquence de 30 Hz et une très faible augmentation de dissipation. On peut ainsi appliquer, comme précédemment, l'équation de Sauerbrey. On obtient ainsi une masse hydratée de la couche adsorbée de streptavidine de 530 ng.cm^{-2} . Cette valeur est en accord avec les données de la littérature et correspond à une monocouche dense de SA_V ¹¹⁶. Nous avons enfin vérifié qu'il

116. Seifert, M.; Rinke, M. T.; Galla, H.-J., Characterization of Streptavidin Binding to Biotinylated, Binary Self-Assembled Thiol Monolayers-Influence of Component Ratio and Solvent. *Langmuir* **2010**, *26* (9), 6386-6393.

était possible en appliquant une tension sur la surface, d'oxyder le ferrocène et ainsi de dissocier le complexe hôte-invité et induire le détachement de l'ensemble biomolécule (SA_v) plus châssis. Pour cela une tension de 0,5 V (potentiel d'oxydation du ferrocène en ferrocenium) est appliquée sur la surface avec des temps d'oxydation courts. Le profil de QCM-D de la Figure 66 montre alors une augmentation de la fréquence et une diminution de la dissipation jusqu'à atteindre des valeurs de fréquence et dissipation proches de celles mesurées à $t=0$.

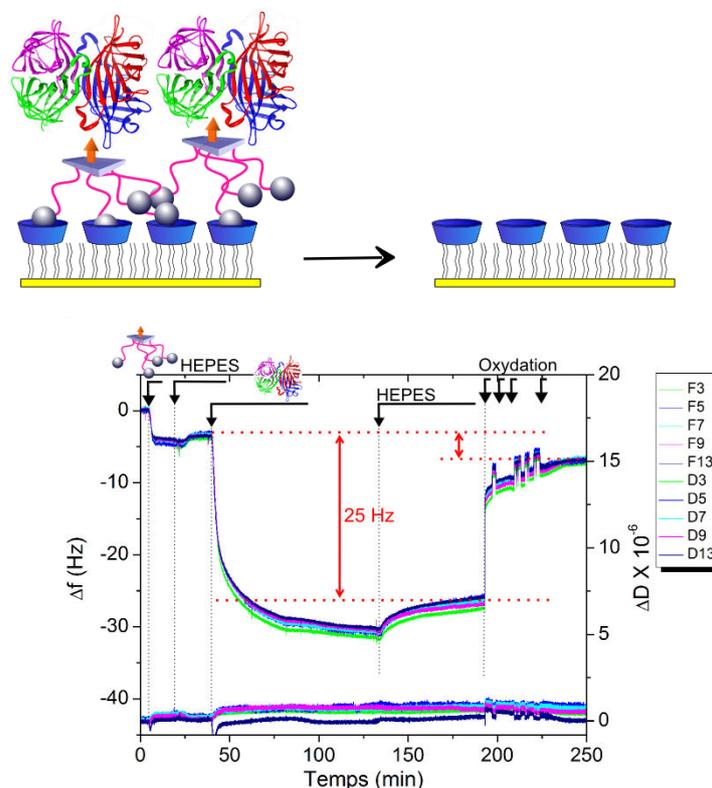


Figure 66 : Schéma du relargage de la streptavidine et du gabarit de la surface et suivi par QCM-D

Ces mesures ont été réalisées plusieurs fois, avec la collaboration de Dhruv Thakar (doctorant au DCM), en faisant varier le pourcentage de CD pour former la SAM. Il est apparu un manque de reproductibilité des masses de composé **38** adsorbé sur la SAM-CD préparé par l'adsorption du disulfure CD **40**. Ce résultat a été expliqué par la faible stabilité des solutions de disulfure CD **40**. En revanche, les solutions congelées de thiol-CD **41** se sont avérées plus stables et ont conduit à des résultats plus reproductibles. Le composé **41** a donc été utilisé pour former les SAM dans la suite de l'étude.

III.2.4. Caractérisations physicochimiques des surfaces biofonctionnalisées et évaluation de leurs propriétés à reconnaître, capturer et relarguer des cellules tumorales

Notre étude a été poursuivie par la synthèse d'un gabarit peptidique possédant un ligand - RGD- afin d'étudier sa capacité à capturer des cellules tumorales surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sur les surfaces que nous avons fonctionnalisées précédemment.

III.2.4.1. Synthèse d'un gabarit peptidique possédant un ligand – RGD- pour l'attachement et le détachement de cellules tumorales.

Nous nous sommes servis pour la préparation de ce composé du gabarit **33** et du ligand ferrocène **37** déjà synthétisés. Le groupement boc du châssis est déprotégé par une solution de TFA/H₂O (7/3) en 2h avec un rendement quantitatif. L'introduction de la fonction oxyamine protégée par un groupement acétimide est effectuée dans le DMF en milieu légèrement basique par ajout de 1,5 équivalent de composé **4** en 2h. Le produit formé est directement engagé, après précipitation dans l'éther, dans l'étape de couplage du ligand -RGD- **17**. L'ajout de 2 équivalent de ligand -RGD- en milieu acide (TFA/H₂O ; 7/3) permet d'effectuer en une étape « one pot » la déprotection du groupement acétimide et la ligation oxime. On obtient le gabarit peptidique **35** avec un rendement de 68% après purification par HPLC-préparative.

Le couplage des quatre ligands ferrocènes **37** est effectué comme précédemment par ligation CuAAC. On obtient après purification par HPLC le composé final **39** avec un rendement de 58% (Figure 67).

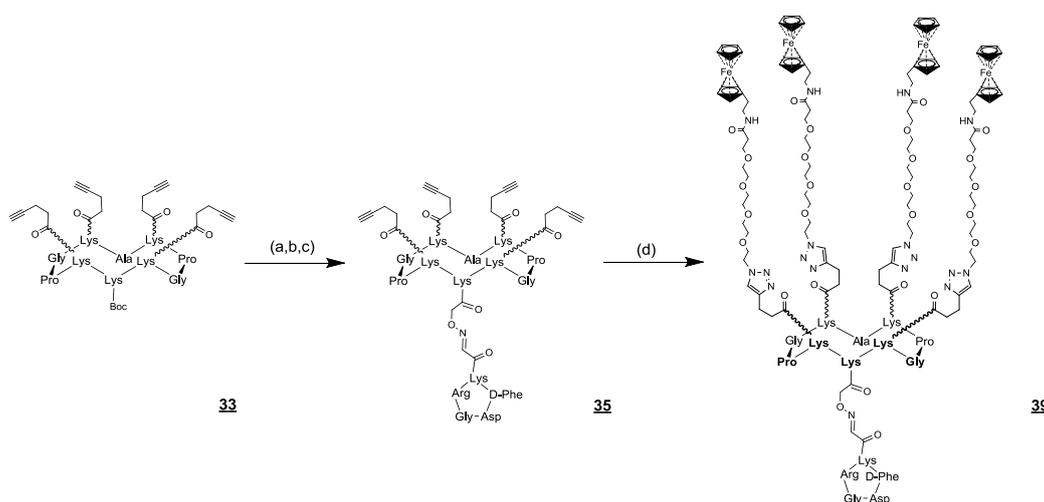


Figure 67 : Schéma de synthèse du gabarit **39**. Réactifs : (a) TFA/H₂O 7/3, 2h, (b) 1,5 éq. **4**, DMF, DIPEA, 2h (c) 1,5 éq. **17**, TFA/H₂O 7/3 (d) 6 éq. **37**, 1 éq. CuSO₄, 5 éq. NaAsc, 2 éq. THPTA PBS(100mM ; pH 7,4)/DMF, 2h

Celui-ci est alors caractérisé par HPLC et spectrométrie de masse ESI en mode positif avant d'être utilisé dans des expériences de capture et relargage cellulaire (Figure 68).

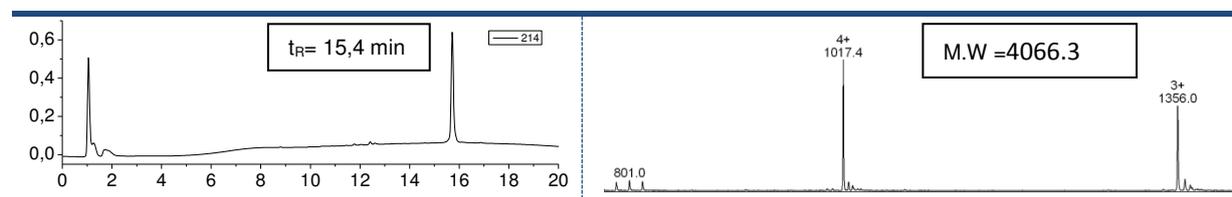


Figure 68 : Analyse HPLC et ESI+ du composé **39**

III.2.4.2. Immobilisation du gabarit **39** sur les SAMs

L'immobilisation du gabarit **39** a lieu comme précédemment sur des SAMs-CD préparées à partir de mélanges thiols-OEG-CD **41** et thiols-OEG-OH de pourcentages connus. Le profil de QCM-D pour l'adsorption du gabarit **39** sur une SAM saturée en CD montre une diminution de fréquence rapide, due à l'adsorption du châssis sur la surface. De façon à étudier l'influence de la densité en CD sur les propriétés hôte des SAMs, nous avons réalisé ce suivi de l'adsorption du gabarit **39** sur différentes SAM-CD (Figure 69). On remarque sur le profil QCM-D une dissipation quasi-constante. On applique alors l'équation de Sauerbrey pour extraire la masse hydratée et tracer la masse de châssis adsorbé en fonction du pourcentage de CD dans la solution de thiols (Figure 69).

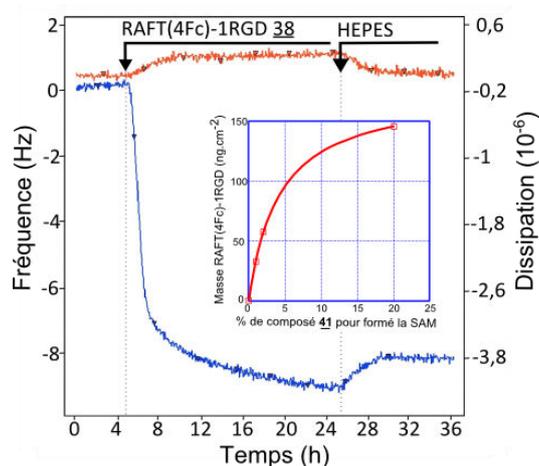


Figure 69 : Profil QCM-D de l'adsorption du gabarit **39** sur une SAM à 25 % de PEG **41**, et masse de châssis adsorbé en fonction du pourcentage de CD sur la SAM.

On remarque une pente qui tend vers une limite pour une adsorption maximale d'environ 8 Hz pour un pourcentage en cyclodextrine de 25%. A cette concentration, la surface est saturée en cyclodextrine (Figure 60). On a ainsi d'après l'équation de Sauerbrey, et en faisant l'hypothèse d'un taux d'hydratation de la couche de 50%, un taux d'adsorption en châssis de $1,7 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$. De plus, du fait de la taille d'une cyclodextrine et d'après la littérature¹¹⁷ une surface saturée en CD aurait $7,4 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ de CD. On a ainsi 4,3 cyclodextrines interagissant avec le gabarit lors de la saturation de la couche en châssis. Ceci nous permet de vérifier l'apport et l'importance de la multivalence apporté par quatre ligands ferrocène. Ces résultats étant confirmés par des expériences de voltamétrie cyclique qui ont permis de calculer la concentration surfacique en Fc après adsorption du gabarit **39** : $\tau_{\text{Fc}} = 6,3 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$, soit $1,6 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ en gabarit.

117. Domi, Y.; Yoshinaga, Y.; Shimazu, K., Characterization and Optimization of Mixed Thiol-Derivatized beta-Cyclodextrin/Pentanethiol Monolayers with High-Density Guest-Accessible Cavities. *Ibid.* **2009**, 25 (14), 8094-8100.

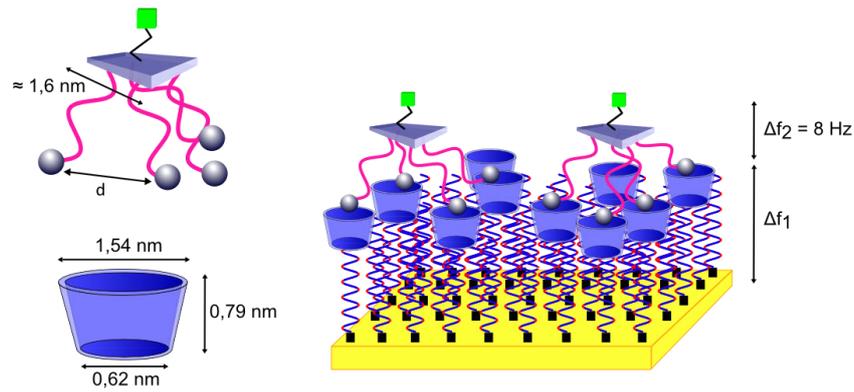


Figure 70 : Représentation schématique d'une cyclodextrine, du gabarit et de la couche formée, et leurs tailles respectives

Nous avons par la suite testé l'adsorption de cellules HEK(β_3) sur la surface fonctionnalisée. Pour cela, après adsorption du gabarit **39**, (à 5 μ M dans 1mM CD et un tampon PBS), sur la SAM fonctionnalisé avec 30% de CD, on lave la surface avec un tampon PBS avant de passer en milieu DMEM biologique. Après stabilisation de la fréquence on injecte une solution contenant 50000 cellules HEK(B3) par ml sur la surface.

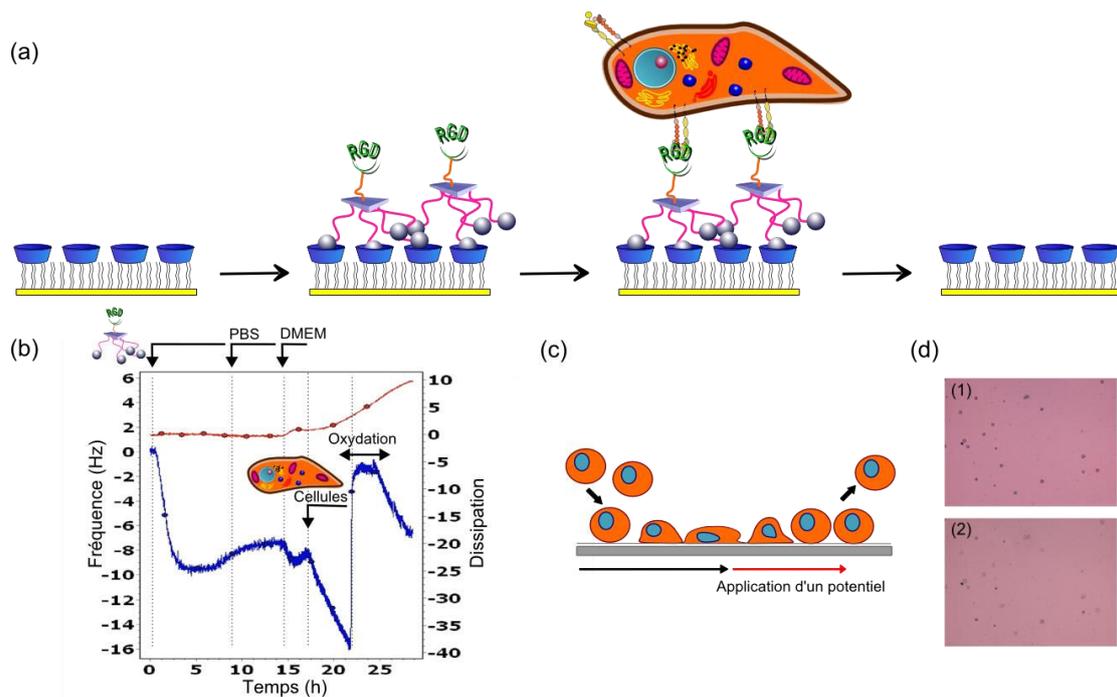


Figure 71 : (a) Schéma de l'assemblage permettant l'adsorption et le relargage des cellules HEK(β_3), (b) Profil QCM-D de l'adsorption du châssis, des cellules et leur relargage après oxydation, (c) Schéma du trajet des cellules sur la surface, (d) image de microscopie après adsorption des cellules et après relargage

On remarque une diminution de fréquence de 8 Hz pour l'adsorption du châssis correspondant à l'adsorption maximale déjà évaluée pour une SAM saturée en cyclodextrines. On remarque par la suite une diminution de fréquence de 8 Hz due à l'adsorption des cellules surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. On applique alors sur cette surface un potentiel de 0,5V pendant quelques secondes. Ce potentiel permet l'oxydation du ferrocène en ferrocenium, et donc le détachement du gabarit portant les cellules sur la surface. On remarque alors une augmentation nette de la fréquence de vibration de 15 Hz et donc un retour à l'état initial de la SAM. La

dissipation augmente, probablement à cause de la présence des cellules à la périphérie de la surface, augmentant la viscosité du milieu de façon importante (Figure 71).

Des clichés de microscopie ont de plus été réalisés *via* l'utilisation d'une cellule de QCM-D ouverte. On voit sur ces clichés l'attachement des cellules sur la surface (Figure 71(d-1)). Après détachement, on remarque sur le cliché (Figure 71(d-2)) que les cellules ne sont plus présentes mais qu'il reste des résidus protéiques sur la surface.

III.2.4.3. Synthèse d'un gabarit peptidique possédant quatre ligands -RGD- pour l'attachement et le détachement de cellules tumorales.

Après ces résultats encourageants nous nous sommes tournés vers la synthèse d'un gabarit peptidique possédant quatre ligands ferrocène pour l'interaction avec la surface et quatre ligands -RGD- pour la capture des cellules tumorales. Le but est d'augmenter la force d'adhésion des cellules tumorales *via* l'utilisation du gabarit déjà beaucoup étudié présentant quatre ligands -RGD-. Afin de ne pas diminuer la force d'interaction ou d'adhésion à la surface qui nous a semblée suffisante et adéquate dans l'étude précédente, la deuxième partie de la molécule présente aussi quatre ligands ferrocènes. Pour cela nous avons choisi de lier deux châssis cyclodécapeptidiques face à face *via* deux liens oximes. L'utilisation de deux liens au lieu d'un seul, plus facile à mettre en œuvre, nous paraît importante afin de diminuer les libertés de mouvements possibles entre les deux châssis et ainsi rigidifier la molécule. En effet pour ce projet la molécule doit pouvoir présenter les deux familles de ligands bien orientées de part et d'autres du plan moyen des châssis. La synthèse de cette molécule se fait donc de manière convergente. Chaque châssis est synthétisé séparément puis assembler en fin de synthèse (Figure 72).

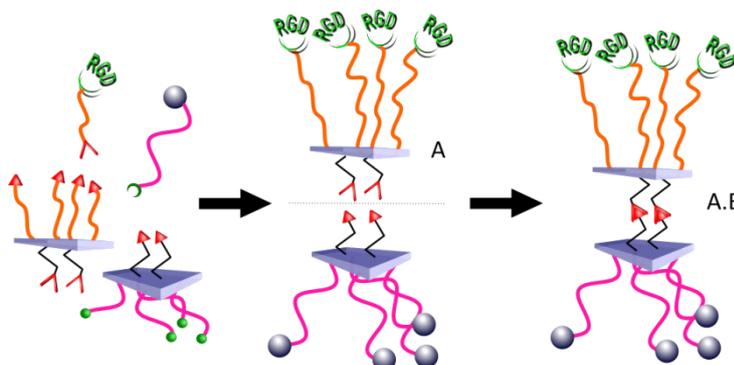


Figure 72 : Schéma de l'assemblage du bis-châssis par stratégie convergente

Afin de synthétiser cette molécule nous avons fait le choix d'utiliser comme précédemment la ligation CuAAC pour l'assemblage des ferrocènes sur le châssis B. Le greffage des ligands - RGD- est lui réalisé sur le châssis A comme dans les études précédentes *via* la ligation oxime.

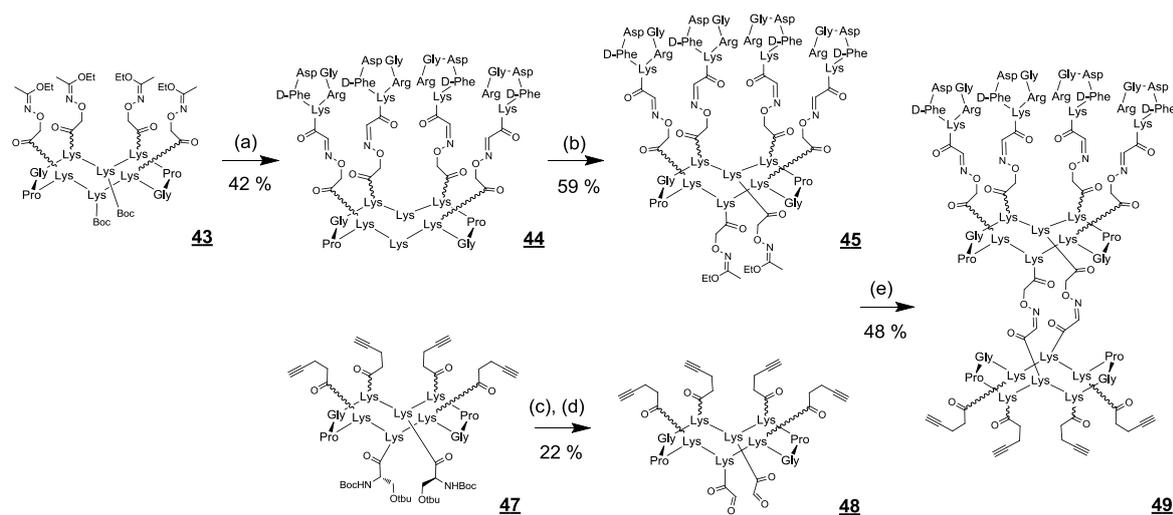


Figure 73 : Schéma de synthèse du gabarit **49**. Réactifs : (a) 6éq. **17**, TFA/H₂O 7/3, 1h (b) 5éq. **4**, DMF, DIPEA, 2h (c) TFA/TIS/H₂O ; 95/2,5/2,5, 2h (d) 20éq. NaIO₄, H₂O, 45 min (e) TFA/H₂O/ACN ; 2/4/4, 1h

La synthèse des châssis A et B portant les fonctions utiles au greffage respectif des ligands -RGD- et ferrocènes est effectuée en phase solide sur résine chlorotrityle avec de très bon rendements. La cyclisation est effectuée à haute dilution, en milieu basique, dans le DMF et donne les composés **43** et **47**. De la même manière que dans le chapitre précédent, les ligands -RGD- sont liés aux châssis **43** *via* la réaction one-pot de déprotection des groupements boc et ligation oxime sur la face supérieure du cyclodécapéptide. Cette réaction conduit au composé **44** avec un bon rendement après purification par HPLC préparative. La fonction 1-éthoxyéthylidène est introduite par couplage amide *via* l'ester activé **4**. On obtient ainsi le composé **45** avec un rendement de 25% en quatre étapes. Après cyclisation, le produit **47** est déprotégé par une solution de TFA/TIS/H₂O. Les groupements sérines, introduits lors de la synthèse peptidique en phase solide, sont alors soumis à une réaction d'oxydation par le périodate de sodium pour conduire après purification par HPLC au composé **48**.

Les deux gabarits sont alors greffés entre eux *via* ligation oxime en milieu dilué afin d'éviter toute réaction secondaire de polymérisation. On obtient finalement le composé **49** en 8 étapes et 5 % de rendement (Figure 73 et Figure 74)

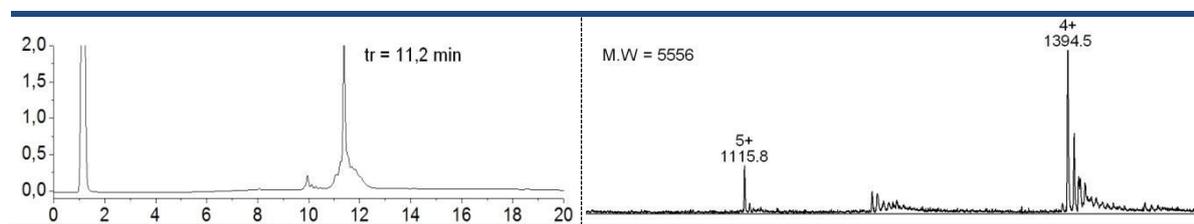


Figure 74 : Analyse HPLC et ESI+ du composé **49**

Le ligand ferrocène est ensuite associé au gabarit **49** par ligation CuAAC catalysée au cuivre I en présence de ligand THPTA. La réaction est laissée agitée 2h à 30°C sous atmosphère inerte. On observe la totale transformation du composé **49** et la formation du produit final **50**. Le produit est alors purifié par HPLC préparative. Nous nous apercevons cependant que le

rendement de purification est très faible et peu de produit est obtenu, dû à la faible solubilité du composé.

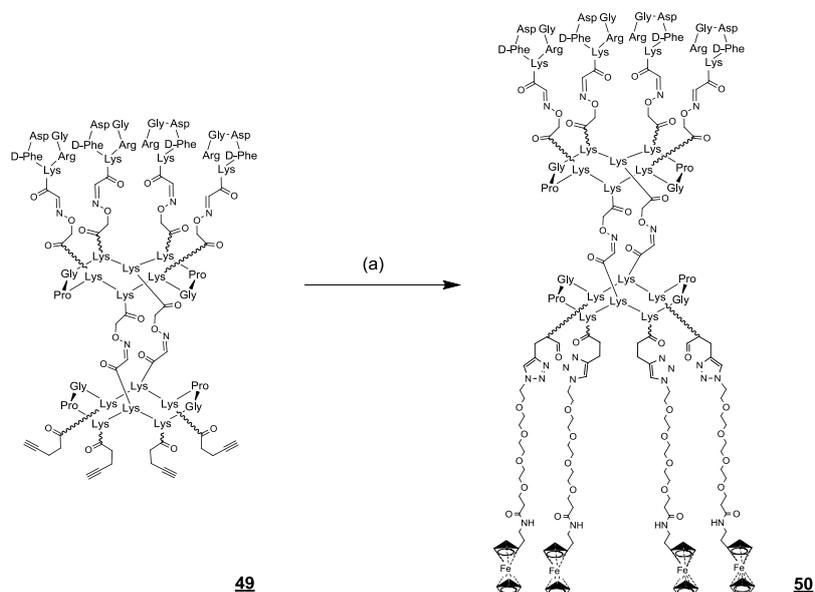


Figure 75 : Schéma du composé final **50**. Réactifs : (a) 6éq. **37**, 2éq. CuSO₄, 10éq. NaAsc, 4éq. THPTA, tampon PBS/ACN, 2h

Du fait du rendement très faible de purification, déjà observé lors de la synthèse de composés similaires comportant des ligands ferrocènes, le produit n'a pas pu être obtenu avec des quantités nécessaires pour réaliser des expériences de capture cellulaire. Actuellement une nouvelle synthèse est en cours de réalisation afin d'améliorer cette dernière étape de purification.

III.3. Bilan des travaux et perspectives

Nous avons montré, tout d'abord, que notre gabarit cyclodécapeptidique tétravalent en ligand -RGD-, permettait *via* l'utilisation de radiotraceurs ou de fluorophores la visualisation efficace de la zone tumorale chez le petit animal. Aujourd'hui ces molécules ont montré un grand intérêt et sont en cours de développement pour la chirurgie anticancéreuse et applicable pour la chirurgie reconstructrice de la face. Elles ont fait, de plus, l'objet récemment de trois publications dans la littérature pour l'étude et la visualisation post-opératoire des zones tumorales chez la souris.

Grâce à la technique de QCM-D et fort de notre expérience de synthèse de plateformes pouvant être fonctionnalisées par de nombreux ligands différents, nous avons pu montrer qu'il était possible de développer des surfaces capables à la fois de capter et détecter des cellules tumorales surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ mais aussi de les relarguer afin de les enrichir. Pour cela de nombreuses molécules ont été synthétisées pour la fonctionnalisation des surfaces d'or mais aussi pour faire l'interface entre la surface et les cellules à détecter. Une publication sur ce projet est écrite et devrait bientôt sortir dans la littérature.

En parallèle à cela, j'ai pris part au début d'un projet qui a pour but d'étudier différent substrat pour la capture cellulaire. Pour cela, et afin de compléter l'étude déjà effectuée j'ai synthétisé une plateforme fonctionnalisée par quatre ligands ferrocènes et possédant un site d'accroche pour une pointe AFM. *Via* cette molécule un groupe partenaire est en cours d'études des forces d'interactions entre nos surfaces d'or fonctionnalisées et le châssis (Figure 76).

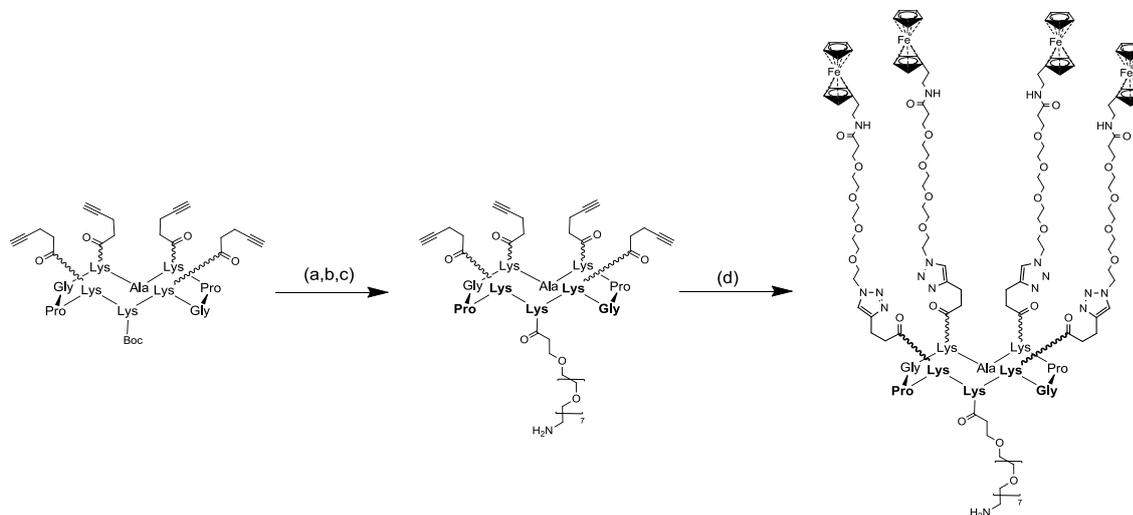


Figure 76 : Schéma de synthèse du gabarit **40**. Réactifs : (a) TFA/H₂O ; 7/3, 2h, (b) 1,7 éq. Boc-dPEG(7)-CONHS, DMF, DIPEA, 2h, (c) TFA/H₂O ; 7/3, (d) 6 éq. de composé **36**, 1 éq. CuSO₄, 5 éq. NaAsc, 2 éq. THPTA, PBS(100mM ; pH 7,4)/DMF, 2h

Une même molécule a de plus été synthétisée en remplaçant les ligands ferrocènes par des ligands adamantanes afin d'étudier toujours par microscopie de force atomique les propriétés de chaque molécules d'adhésion sur une surface fonctionnalisée avec des cyclodextrines.

Le projet de capture cellulaire a montré ainsi de très bon résultats. Cependant, du fait de l'étalement de la cellule après reconnaissance de la surface -RGD-, de la méthode de

fonctionnalisation et des techniques de microfluidiques mises en jeu, peu de cellules adhèrent par unité de surface. La technique de microbalance à quartz ne semble donc pas être suffisamment sensible pour détecter des cellules faiblement représentées dans un sérum complexe. Ce qui est notre cas avec des cellules tumorales $\alpha_v\beta_3$ positive circulante. D'autres techniques d'analyses comme la SPR pourraient montrer de meilleurs résultats et seront testées par la suite.

IV. Outils pour la thérapie.

IV.1. Conjugué vecteur-peptide cytotoxique.

IV.1.1. Etat de l'art

Les thérapies anticancéreuses actuelles comme la radiothérapie et la chimiothérapie sont efficaces mais génèrent d'importants effets secondaires. Les cellules cancéreuses développent également des capacités de résistance aux traitements car leurs voies d'apoptose sont souvent inactivées. Il est donc important de développer de nouvelles drogues qui ciblent spécifiquement les tumeurs. Il a été montré précédemment, lors des expériences d'imagerie *in vivo*, que les composés possédant quatre ligands -RGD- étaient très sélectifs des cellules tumorales. Ces vecteurs multivalents ont donc été couplés, dans une stratégie de thérapie anticancéreuse, à divers agents cytotoxiques tels que la doxorubicine, des siRNA ou encore un peptide antibactérien induisant l'apoptose (Figure 77)¹¹⁸.

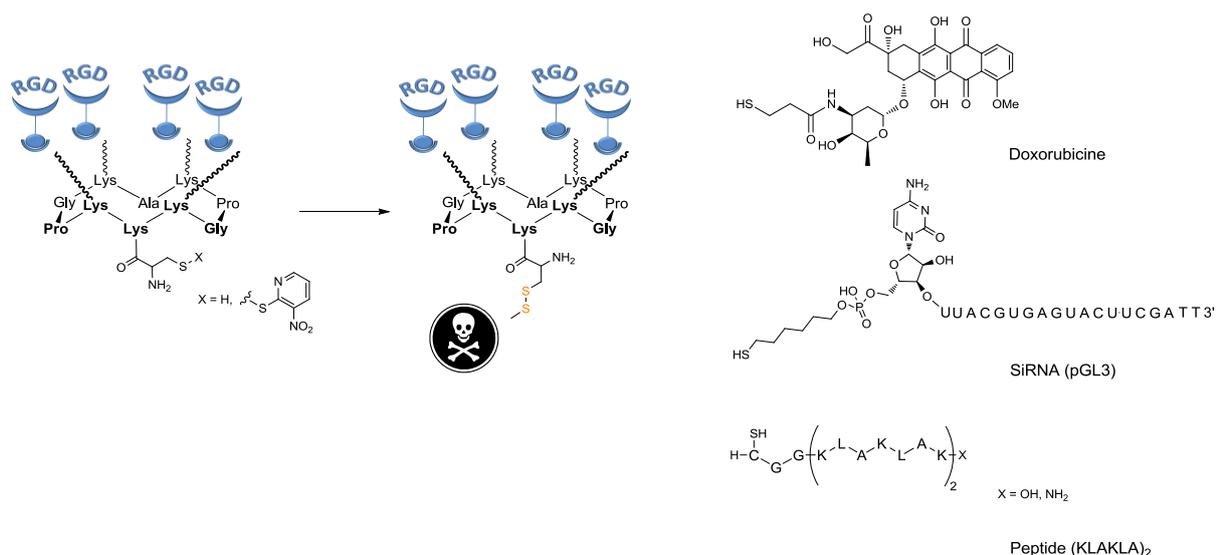


Figure 77 : Couplage des composés vecteurs à des agents cytotoxiques

Pour conjuguer les composés cytotoxiques au vecteur peptidique, ils ont été fonctionnalisés par des fonctions thiols qui peuvent conduire à un pont disulfure.

Le peptide (KLAKLAK)₂ est décrit dans la littérature comme ayant des propriétés bactériostatiques. Il agirait sur la membrane des bactéries en déclenchant l'apoptose de celles-ci. Il n'a aucune activité envers les cellules eucaryotes, sauf si il est injecté à l'intérieur de celle-ci. En effet, le couplage de celui-ci à un vecteur lui confère des propriétés anti-tumorales¹¹⁹. Après internalisation, il va, comme pour la paroi bactérienne, agir sur la paroi mitochondriale de la cellule pour induire une cascade de signalisations conduisant à l'apoptose.

118. GARANGER, É., Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie *Thèse : Chimie-Biologie, Université Joseph Fourier* 2005.

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

Nous avons montré que le composé couplé au peptide pro-apoptotique (KLAKLAK)₂ ne présente aucune toxicité à l'extérieur de la cellule et qu'il possède, après internalisation, une bonne efficacité pour induire la mort cellulaire¹²⁰. Des études de FRET ont été effectuées sur ce composé afin de vérifier le mécanisme d'action et l'internalisation de l'agent cytotoxique. Nous avons validé les propriétés de notre vecteur : (1) internalisation du composé à l'intérieur de la cellule cible, (2) libération du peptide cytotoxique à l'intérieur de la cellule tumorale, et (3) induction de la mort cellulaire par perturbation de la membrane mitochondriale¹²¹ (Figure 78).

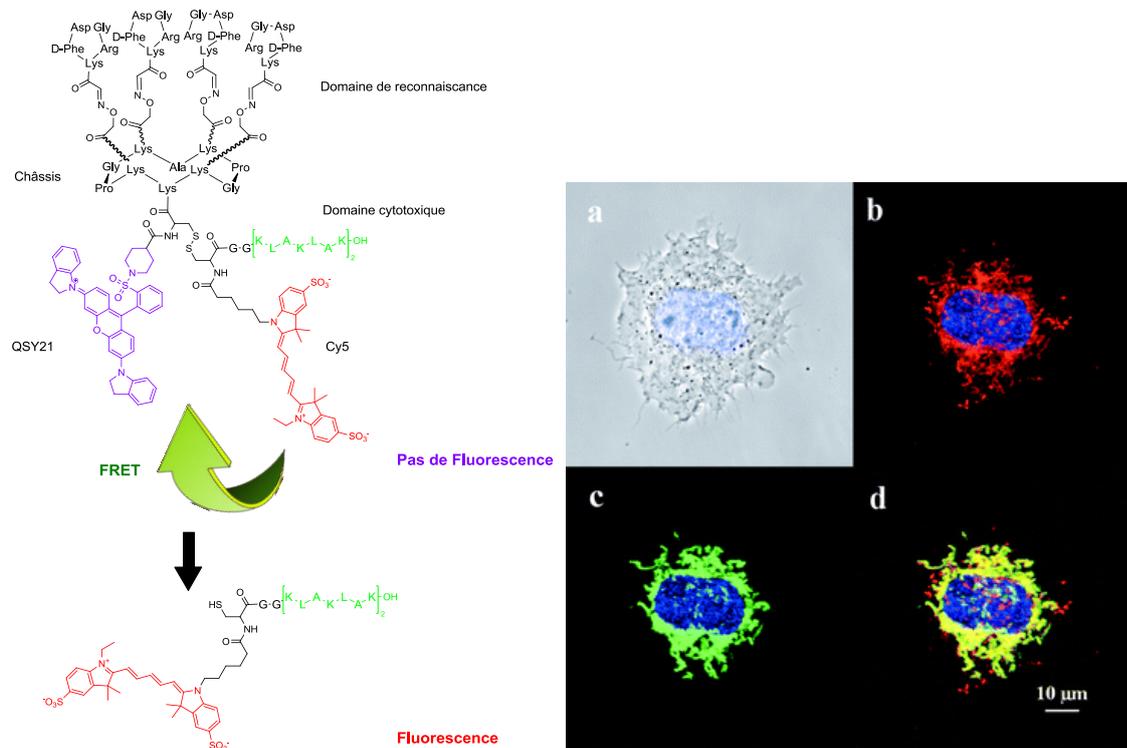


Figure 78 : (gauche) Structure du composé cytotoxique fluorescence activable, (droite) image confocale de fluorescence de cellules HEK293(β3) incubées avec 2μm de composé pendant 60 min, un colorant du noyau Hoechst (bleu) et un colorant des mitochondries mitotracker (vert) : (a) image de contraste de phase, (b) peptide incorporé en rouge présent sur les mitochondries, (c) mitotracker, (d) colocalisation

Cependant, même si certains peptides agissant sur la mitochondrie sont prometteurs, leur efficacité est limitée. La mitochondrie semble pourtant une cible privilégiée pour des drogues anticancéreuses. En effet, malgré la capacité importante des cellules tumorales à résister à la mort par apoptose, la machinerie pro-apoptotique mitochondriale demeure fonctionnelle et peut être activée sans que les cellules puissent développer de résistance, comme c'est le cas avec des drogues « conventionnelles ».

Nous avons donc décidé de développer d'autres composés en suivant la même stratégie.

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

121. Foillard, S.; Sancey, L.; Coll, J.-L.; Boturyn, D.; Dumy, P., Targeted delivery of activatable fluorescent pro-apoptotic peptide into live cells. *Org Biomol Chem* **2009**, 7 (2), 221-224. (b) Foillard, S. Synthèse de nouveaux vecteurs peptidiques pour la thérapie anticancéreuses et l'imagerie tumorale. Thèse : Chimie-Biologie, Université Joseph Fourier, 2008.

IV.1.2. La protéine pro-apoptotique Bax

La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, induite par les membres de la famille Bcl-2, comme Bax (Bcl-2-associated X protein), est considéré comme un point de non-retour dans l'initiation de la mort cellulaire par apoptose. Ce rôle cruciale à mis en exergue l'importance des membres de la famille Bcl-2 dans le développement de nouveaux agents pour la thérapie anticancéreuse.

Bax a été la première protéine pro-apoptotique identifiée appartenant à la famille Bcl-2. Tous les membres et Bax partagent un ou plus des quatre domaines caractéristiques d'homologie appelés domaine d'homologie de Bcl-2 (BH). Ils peuvent former des hétéro ou des homo-dimères et ils agissent en tant que régulateur anti ou pro-apoptotique, impliqués dans une large gamme d'activités cellulaires.

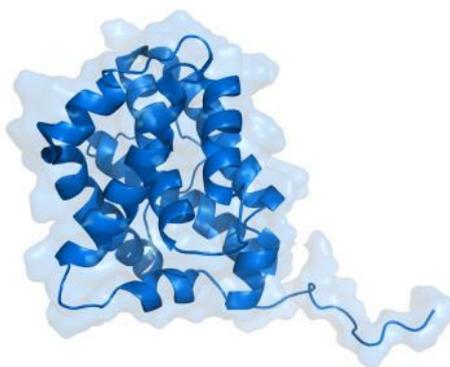


Figure 79 : Structure RMN de Bcl-2-associated X protein¹²²

Dans les cellules saines, Bax se retrouve en majorité dans le cytosol où il joue le rôle d'initiateur de la cascade de signalisation de la mort cellulaire par apoptose. Il agit par association à la membrane mitochondriale et induit une ouverture de celle-ci (anion dépendante) en formant des pores oligomériques. La perforation de la membrane externe de la mitochondrie induit alors un relargage de cytochrome-c et d'autres facteurs pro-apoptotique conduisant à l'activation de la cascade de mort, caspase dépendante.

Au contraire, la plupart des cellules tumorales vont sur-exprimer des facteurs de survie et des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 contribuant au développement de la maladie et à sa progression¹²³. Cette famille de protéines représente ainsi une cible privilégiée pour la thérapie anti-cancéreuse qui pourrait restaurer la possibilité de mort cellulaire par apoptose des cellules cancéreuses résistantes. Des efforts ont porté sur le développement de composés

122. Suzuki, M.; Youle, R. J.; Tjandra, N., Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization. *Cell* **2000**, *103* (4), 645-654.

123. Adams, J. M.; Cory, S., The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **2007**, *26* (9), 1324-1337.

peptidiques ou organiques pouvant s'associer à ces protéines et ainsi restaurer la possibilité de mort cellulaire¹²⁴.

Dans notre stratégie, nous avons choisi d'étudier en partenariat avec le groupe du Dr. A. Auouacheria de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines à Lyon plusieurs séquences peptidiques formant des hélices α issues de Bax. Cette étude a pour but d'identifier une séquence consensus permettant de s'associer à la membrane mitochondriale et d'induire la mort cellulaire par apoptose. Plusieurs constructions combinant différents fragments issues des hélices α de Bax et un GFP tag (Green Fluorescent Protein) ont ainsi été préparées. Leurs propriétés d'induction de mort, de formation de pores et de modification de morphologie a ensuite été étudié sur des cellules HT1080. Il a été montré que toutes les constructions, excepté celle contenant $\alpha 1$, étaient capable d'induire une apoptose et que le maximum d'activité était observé pour les séquences $\alpha 5$ et $\alpha 6$. Il a de plus été montré que le mécanisme de mort était dépendant des caspases puisque une inhibition de celle-ci réduisait considérablement la mort cellulaire. Une étude de microscopie confocale montre de plus la localisation des constructions au niveau des mitochondries pour les construction $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 5-\alpha 6$, et $\alpha 5-\alpha 9$ (Figure 80)¹²⁵.

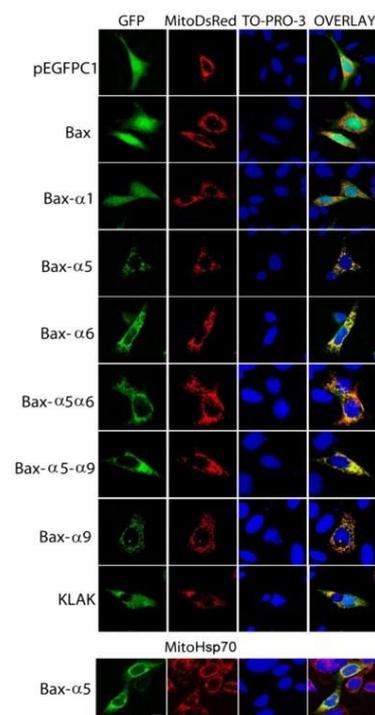


Figure 80 : clichés d'imagerie confocale sur des cellules MEF-DKO, localisation des peptides-GFP tag, de la mitochondrie (rouge) et du noyau (bleu).

Afin d'arriver à une molécule cytotoxique utilisable en thérapie il a été choisi par la suite d'optimiser la séquence du peptide cytotoxique appelé « poropeptide » (réduire sa taille tout en augmentant son efficacité et sa stabilité)

124. Oltersdorf, T.; Elmore, S. W.; Shoemaker, A. R.; Armstrong, R. C.; Augeri, D. J.; Belli, B. A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T. L.; Dingemans, J.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Kitada, S.; Korsmeyer, S. J.; Kunzer, A. R.; Letal, A.; Li, C.; Mitten, M. J.; Nettlesheim, D. G.; Ng, S.; Nimmer, P. M.; O'Connor, J. M.; Oleksijew, A.; Petros, A. M.; Reed, J. C.; Shen, W.; Tahir, S. K.; Thompson, C. B.; Tomaselli, K. J.; Wang, B.; Wendt, M. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H., An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **2005**, *435* (7042), 677-681.

125. Valero, J. G.; Sancey, L.; Kucharczak, J.; Guillemin, Y.; Gimenez, D.; Prudent, J.; Gillet, G.; Salgado, J.; Coll, J.-L.; Auouacheria, A., Bax-derived membrane-active peptides act as potent and direct inducers of apoptosis in cancer cells. *J Cell Sci* **2011**, *124* (4), 556-564.

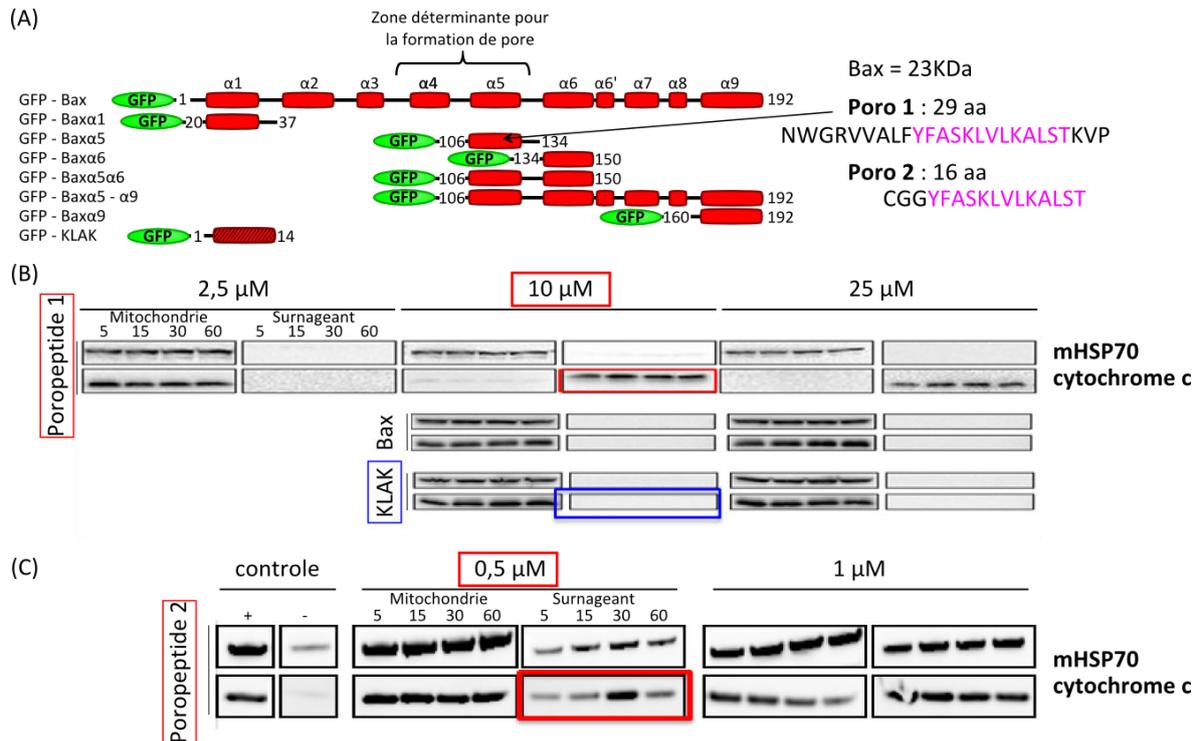


Figure 81 : Optimisation de la séquence des poropeptides : (A) représentation schématique de la structure secondaire de la protéine bax et de ces différentes hélices, associées à la protéine GDP ; (B) Western blot des mitochondries isolées et du surnageant après traitement par le peptide poro 1 et (C) par le peptide poro 2

Ces études ont été complétées par la synthèse d'un peptide (poro 1) issue de l'hélice $\alpha 5$ (résidues Asn¹⁰⁶ à Arg¹³⁴). Il a été montré que l'exposition à 10 μM de peptide pendant 5 min sur les mitochondries induit un relargage suffisant de cytochrome c, et qu'à 25 μM la totalité du cytochrome c semble relargué. Le marquage de la protéine mitochondriale HSP70 responsable de la structuration de la membrane permet de plus de définir une concentration pour laquelle le peptide a une activité sur celle-ci. A cette concentration de 10 μM , nous avons donc un peptide ayant une bonne activité sur la perturbation de la membrane mitochondriale en comparaison avec le peptide (KLAKLAK)₂ déjà étudié, qui lui n'a aucune action à cette concentration (Figure 81B). Afin d'étudier les propriétés de ce peptide sur des cellules, il a été couplé à un poly-Arg permettant la pénétration cellulaire et à un fluorophore. Des études de fluorescence montre alors que le peptide induit la mort de la cellule (LC50 \sim 15 μM) alors que le peptide scramble ne semble avoir aucune toxicité. Par la suite la séquence de ce peptide a été raccourci à 16 acides aminés. Des expériences similaires montrent alors que curieusement, il possède une activité sur la membrane mitochondriale plus importante (0,5 μM) et entraîne à cette concentration le relargage de cytochrome c (Figure 81C).

Ce peptide pourra alors être vectorisé (par couplage à une molécule de guidage assurant son adressage sélectif au niveau du site tumoral, en épargnant les tissus sains). La technologie de vectorisation choisie ciblera comme pour le peptide (KLAKLAK)₂ les intégrines $\alpha_v\beta_3$ surexprimées à la périphérie de certaines tumeurs solides, *via* l'utilisation du châssis cyclodécapeptidique présentant quatre ligands -RGD-. Les conjugués « chasseurs-tueurs » ainsi

préparés seront capables de naviguer dans le sang, de reconnaître le site tumoral, d'être internalisés et d'induire une apoptose due à la rupture des membranes mitochondriales. Ces « missiles à tête chercheuse » pourront être utilisés pour asphyxier certaines tumeurs ou comme adjuvants venant en complément des traitements conventionnels, permettant ainsi de diminuer leur dose et leurs effets secondaires (Figure 82).

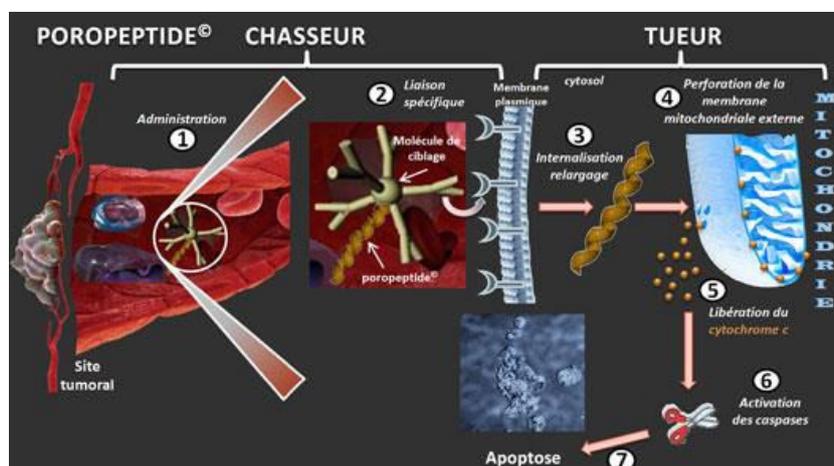
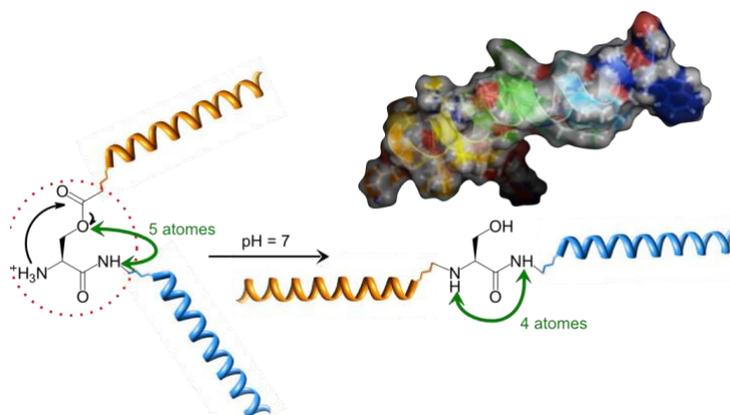


Figure 82 : Injecté par voie systémique ou localement (1), le couple poropeptide-molécule de ciblage reconnaît spécifiquement certaines cellules indésirables (2). Après internalisation (3), le poropeptide tueur perce la membrane externe des mitochondries (4), induisant la libération du cytochrome c (5) et l'activation des protéases de mort appelées caspases (6), conduisant à l'apoptose de la cellule cible (7). Cette mort cellulaire pourrait initier une réponse immunitaire anti-cancéreuse

IV.1.3. Synthèse des composés cytotoxiques « porocombo »

Après optimisation de la séquence peptidique, deux séquences ont été identifiées comme ayant une bonne activité sur la mitochondrie. Ces peptides ont été synthétisés par le groupe de G. Subra de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron à Montpellier. Il a été décidé de les synthétiser en série D afin d'augmenter leur stabilité en les rendant plus résistant aux dégradations enzymatiques. Ces peptides possèdent une structure secondaire bien définie en hélice α . Il a été choisi de synthétiser une forme tronquée n'ayant pas d'activité sur la mitochondrie comme référence. Enfin, afin d'augmenter la solubilité du peptide poro, un acide aminé modifié a été incorporé au sein de la séquence induisant une déstructuration partielle de l'hélice. En effet la fonctionnalisation d'une sérine de la séquence *via* un lien ester au lieu d'un lien amide sur le côté N-terminal permet d'introduire un atome de plus entre l'acide et l'amine et ainsi casser le pas de l'hélicité. Un retour à pH neutre induit une augmentation de la nucléophilie de l'amine, une attaque de celle-ci sur la fonction ester et un retour à la conformation secondaire sous forme d'hélice (Figure 83).


 Figure 83 : Mécanisme de retour dans la conformation secondaire hélice α

Trois peptides ont ainsi été préparés et conjugués au vecteur de ciblage. Un peptide initial de 29 acides aminés, un peptide plus court de 22 acides aminés, contenant l'acide aminé induisant la perturbation de la structure secondaire et un peptide tronqué, n'ayant pas d'activité sur la mitochondrie, de 13 acides aminés. Chaque peptide possède de plus un résidu cystéine en position N-terminale relié au peptide par un espaceur glycine pour l'attache sur le châssis (Tableau 7).

Peptide	Référence	Séquence	Masse molaire (g.mol ⁻¹)
1	4953	Ac-CGnwgrvvalfyfasklvkalkstkvpelir-NH ₂	3522.3
2	5119	H-CGGrvvalfyfa-O-Acyl-skvlkalkst-NH ₂	2342.9
Tronqué	5089	H-cGGyfasklvkalsv-NH ₂	1657.0

Tableau 7 : Références et séquences des peptides sélectionnés

- **Synthèse du gabarit fonctionnalisé par un groupement Npys**

Au laboratoire, nous avons donc couplé les peptides « poro » cytotoxique à l'élément de ciblage. Cette ligation a été réalisée *via* un pont disulfure labile permettant le relargage du composé cytotoxique dans le cytosol. Afin d'effectuer ce couplage, nous avons choisi d'introduire un groupement activateur Npys sur une cystéine présente sur la partie inférieure du châssis moléculaire.

Pour cela, le châssis est, comme précédemment, synthétisé sur support solide et cyclisé, après décrochage de la résine, en milieu dilué en présence d'un agent de couplage (Figure 84). Le groupement Npys n'étant pas stable en présence de pipéridine utilisée lors de la synthèse sur support solide, il a été introduit en solution après cyclisation. Pour cela, nous avons choisi de placer une lysine protégée par un groupement alloc sur la partie inférieure du cyclodécapeptide. La déprotection de ce groupement est orthogonale aux protections utilisées pour les oxyamines. Ainsi, le groupe alloc peut être déprotégé sélectivement en présence de palladium et d'un fournisseur d'hydrure, et conduire à une amine libre sur la chaîne latérale de la lysine. Cette fonction réactive permet alors la fonctionnalisation par le groupement Npys *via* un ester activé commerciale de la cystéine-Npys. La dernière étape de synthèse du châssis vecteur est la ligation *via* un lien éther d'oxime des quatre ligands cyclopentapeptidiques -RGD-. Le composé **55** a été

caractérisé par spectrométrie de masse Electrospray, notamment par la présence des ions multichargés (Figure 84).

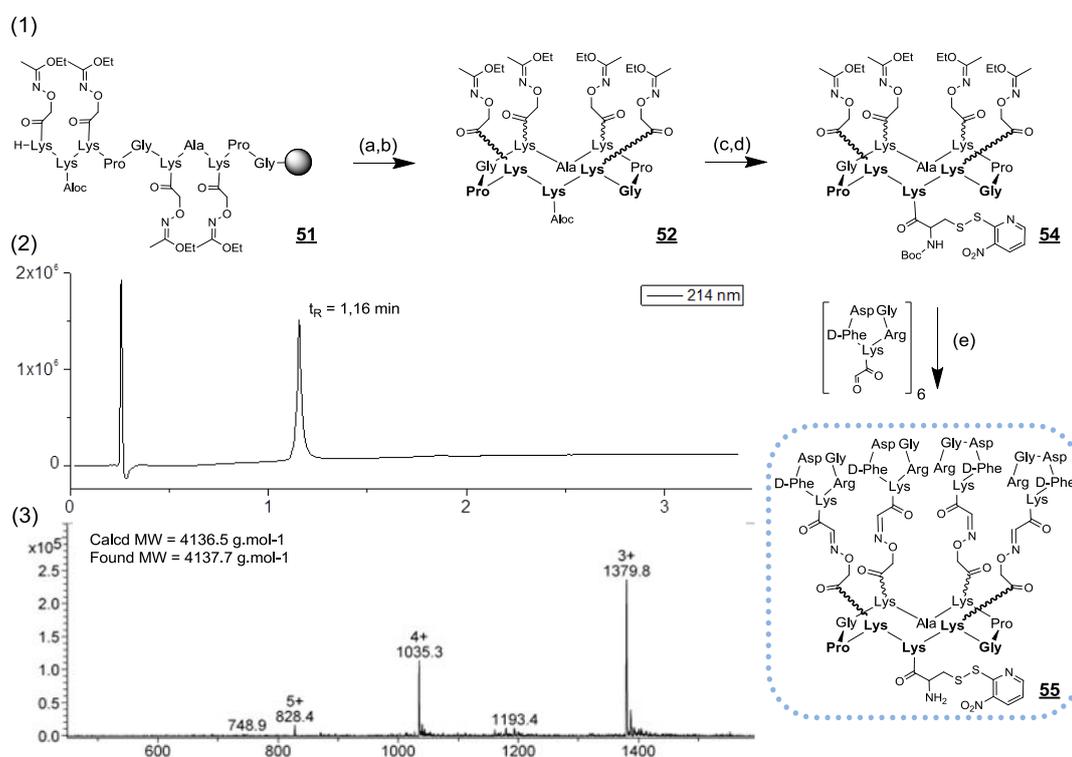


Figure 84 : (1) Schéma de synthèse du composé **55**. Réactifs : (a) AcOH/TFE/DCM ; 1/2/7, 2h (b) 1,5 éq. PyBop, DMF, 2h (c) 0,05 éq. Pd(Ph₃)₄, 100 éq. Ph₃SiH, DMF/DCM ; 1/1, 1h (d) 2 éq. PyBop, 2 éq. Boc-Cys(Npys)-OH, DMF, 1h (e) 6éq. **17**, TFA/H₂O ; 7/3 (2) Chromatogramme HPLC du composé après purification (3) Spectre de masse ESI du composé

• Procédure d'assemblage des composés « chasseurs-tueurs »

Pour réaliser l'assemblage final, le châssis préparé avec un groupement activateur sur sa partie inférieure est placé en présence d'un léger excès de peptide cytotoxique (1.2 équiv), possédant une fonction thiol libre, dans un milieu CH₃CN/tampon PBS (pH = 4,8 ; 100 mM) sous argon. Après 5 minutes de réaction le produit est directement purifié par HPLC préparative pour conduire aux composés finaux. Nous remarquons la formation rapide du produit final et peu de réactions parasites, dus à la formation d'homodisulfures.

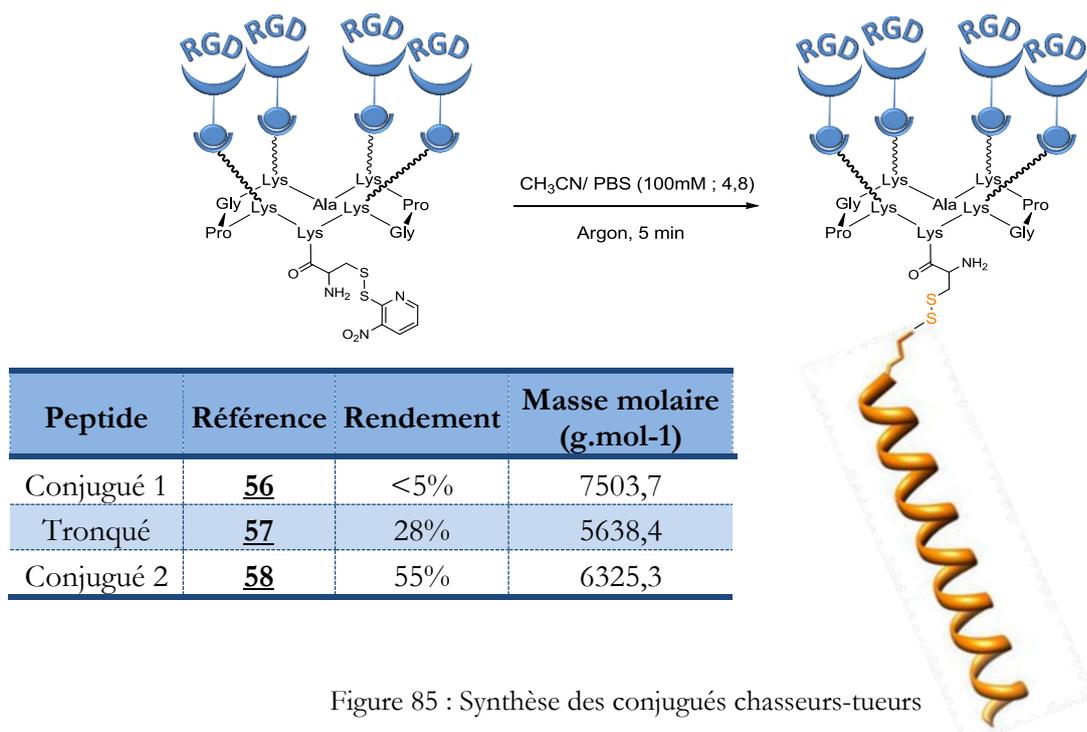


Figure 85 : Synthèse des conjugués chasseurs-tueurs

Dû à la faible solubilité du long peptide initial, le rendement de couplage est très faible et très peu de produit **56** a pu être isolé après purification. Au contraire, l'ajout de l'acide aminé, dont le rôle est de déstructurer l'hélicité du peptide, rend celui-ci beaucoup plus soluble. La réaction de couplage se passe alors dans de meilleures conditions et nous pouvons obtenir le composé final **58** avec un rendement acceptable.

Nous avons ensuite essayé de plus de restaurer la structure secondaire de l'hélice en dissolvant le composé **58** dans un tampon PBS à pH 7.4. Il apparaît que celui-ci devient quasiment instantanément insoluble dans le milieu ACN/tampon et nous observons un déplacement du temps de rétention sur le profil HPLC et formation du produit **59** (Figure 86).

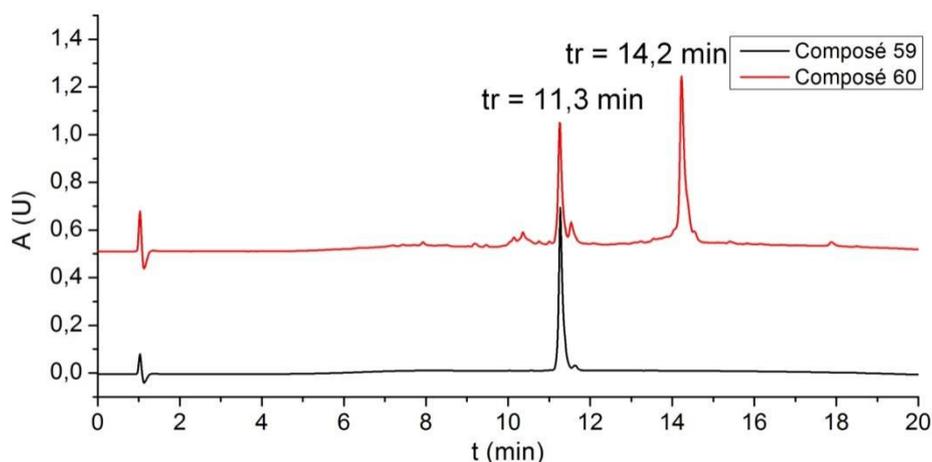


Figure 86 : Chromatogramme HPLC (programme 5-100% ACN en 20 min) du composé **60** purifié et après 5 minutes dans un tampon PBS pH = 7,4

IV.1.4. Evaluation biologique

L'évaluation biologique des conjugués **56** à **59** a été réalisée par l'équipe du Dr. J.L. Coll (Institut Albert Bonniot, La Tronche) par Anastassia Karageorgis. Les premières expériences réalisées ont pour but : d'évaluer *in vitro* l'efficacité des conjugués sur différentes lignées cellulaires tumorales, de déterminer la dose à partir de laquelle un effet est observable *in vitro* en vue de déterminer les doses à tester *in vivo*, et enfin de déterminer le mécanisme d'action sur les cellules cancéreuses. Pour cela des expériences de viabilité cellulaire (test MTT, bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) ainsi que le comptage des cellules mortes ou vivantes (comptage au bleu de trypan) et l'évaluation du pourcentage de cellules mortes par apoptose (comptage au Hoechst) ont été réalisées.

Les premières expériences réalisées ont été des expériences de viabilités cellulaires, effectuées sur deux lignées cellulaires surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (la lignée A375 et la lignée colo829 issues de mélanomes de la peau). Pour cela les conjugués sont ajoutés au milieu de culture sans SVF (Sérum de Veau Fœtal) de façon à avoir une concentration de 0.25, 0.5, 1 ou 2 μM final. Après 15 minutes de contact à 37°C le milieu de culture est dilué avec du milieu de culture contenant du SVF. Le test MTT est alors réalisé 24 h après traitement.

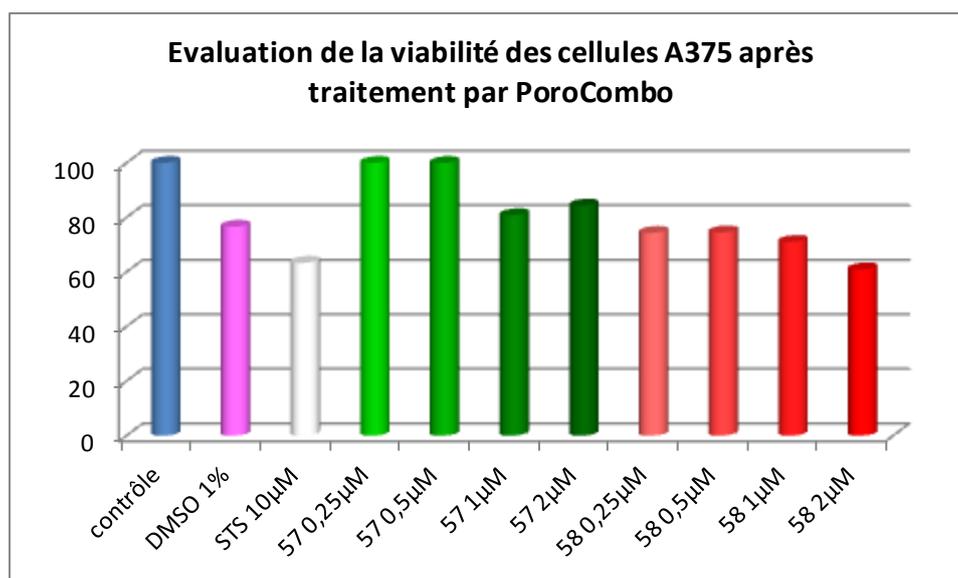


Figure 87 : Pourcentage de viabilité des cellules 24h après traitement par les conjugués **57** (tronqué) et **58**, temps de contact 15min puis dilution (a) Colo829, (b) A375

Nous pouvons déduire de ces expériences que le composé cytotoxique **58** semble induire une réduction de la viabilité cellulaire de 25% à 2 μM (Figure 87). Par la suite, nous avons choisi de mesurer le pourcentage de cellules mortes après traitement *via* un comptage au bleu de trypan. Pour cela, les peptides sont ajoutés au milieu de culture avec SVF de façon à avoir une concentration de 0.5, 2.5 ou 5 μM final pendant 24heures. Un comptage au bleu de trypan est ensuite effectué.

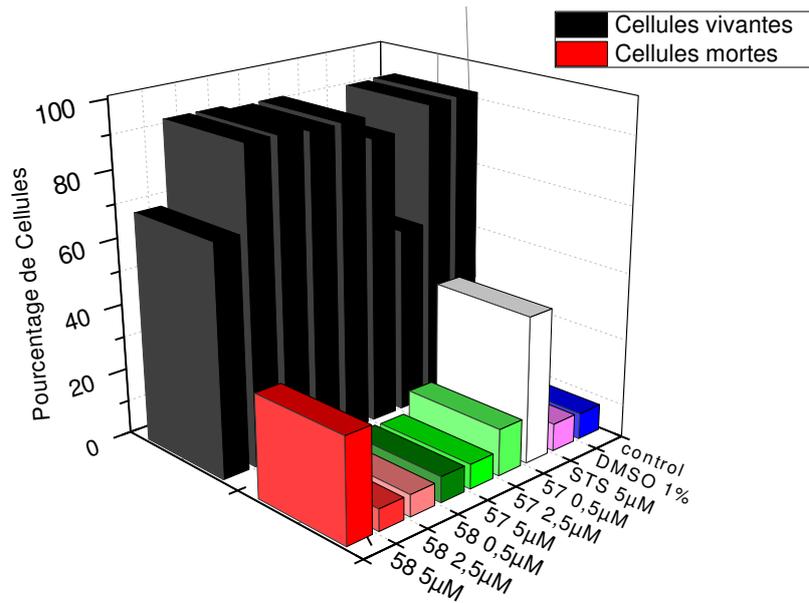


Figure 88 : Pourcentage de cellules A375 mortes et vivantes après traitement par les conjugués **57** (tronqué) et **58** cytotoxiques pendant 24h

Il apparait que le composé **58** est bien capable d'induire la mort cellulaire des cellules testées à 5 µM en comparaison à un agent inducteur d'apoptose (STS = staurosporine, inhibiteur de la Protéine kinase C) (Figure 88).

Après ces résultats encourageant, une quantité plus importante de peptide à été synthétisé pour effectuer des expérimentations sur le petit animal. 30 mg de composé **58** ont ainsi été synthétisés pour faire des injections sur 6 souris pendant 10 jours. Les souris sont préalablement irradiées puis une tumeur est implantée de façon sous-cutanée (lignée cellulaire : Me275). Après deux jours, le composé est injecté, dissous dans du serum physiologique, une fois par jour (dose : 0,132 µmol/jour/souris).

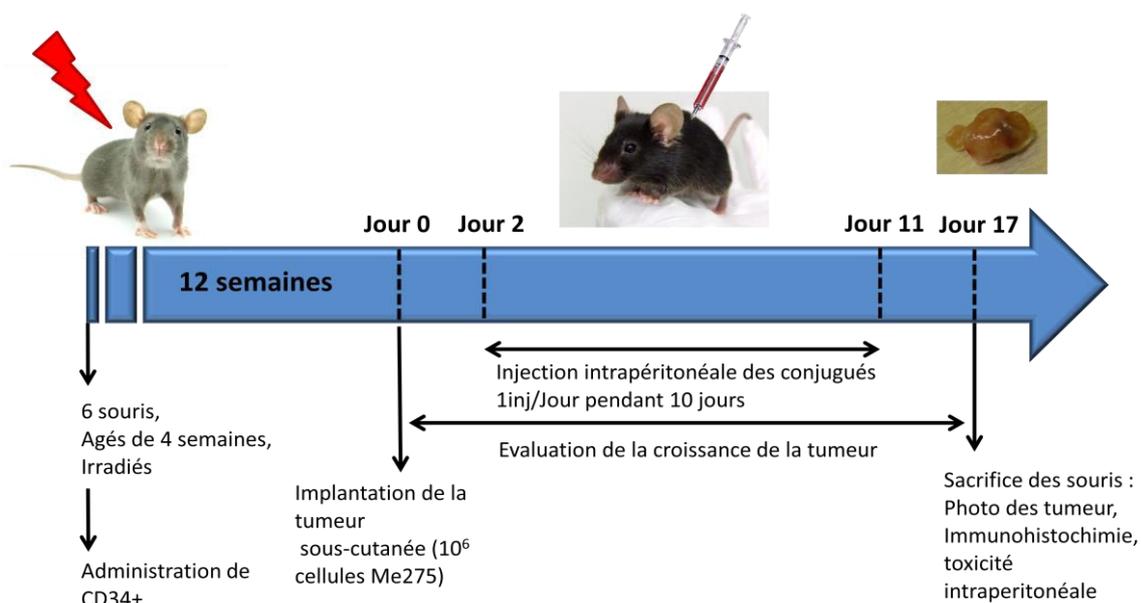


Figure 89 : Protocole d'expérimentation chez l'animal

L'évolution de la tumeur est évaluée chaque jour par mesure de sa taille et prise de photos.

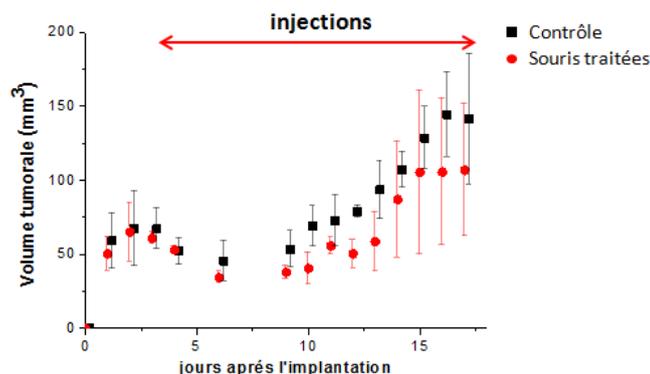


Figure 90 : évolution de la tumeur sur 18 jours après implantation

On remarque que sur deux souris, nous avons un arrêt de la progression tumorale. Une souris semble avoir échappée au traitement. On remarque cependant en faisant la moyenne des expériences, que le volume tumoral des souris traitées est inférieur au volume tumoral des souris contrôles (Figure 90). Après 10 jours de traitement, les souris sont sacrifiées afin de regarder plus en détails l'évolution des tumeurs par microscopie. Certaines tumeurs, après traitement, semblent avoir changées d'aspect (partie blanche à l'intérieur qui serait peut être des tissus nécrotiques). Elles semblent de plus beaucoup moins vascularisées et moins prolifératives (Figure 91).

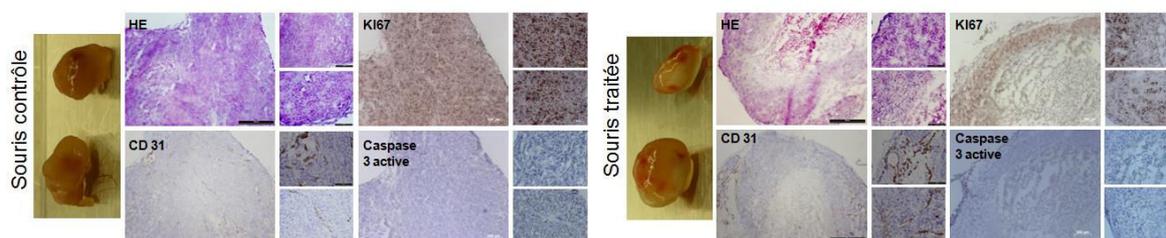


Figure 91 : Coupe histologique d'une tumeur (d'une souris contrôlé à gauche et d'une souris traitée à droite) : marquage Haematoxyline-éosine des noyaux cellulaire et du cytoplasme, marquage de la vascularisation par CD 31 et de la prolifération cellulaire par KI67

Grâce à ces premiers résultats, il semble que le composé semble avoir une activité sur la progression de la tumeur. Il permet l'induction de la mort cellulaire *in vitro* et une régression du développement tumoral *in vivo*. Les coupes histologiques effectuées après traitement montrent que les tumeurs semblent posséder des zones de tissus nécrotiques ou les cellules semblent mortes. La tumeur semble de plus moins vascularisée et moins proliférative. Aujourd'hui, nous n'avons cependant obtenu encore aucun résultat sur le mécanisme d'action du peptide. De plus, du fait de la faible quantité de produit synthétisé, seulement trois souris ont pu être traitées. Actuellement, afin de confirmer ces résultats positifs la synthèse d'une quantité plus importante est en cours afin de réaliser des injections sur une famille plus nombreuse et donc d'obtenir des résultats plus fiables et ainsi confirmer les résultats déjà obtenus.

IV.2. Conjugué vecteur peptidique –oligonucléotide

En suivant la même stratégie pour des applications anti-cancéreuses, il a été décidé de coupler au vecteur de ciblage un acide nucléique « motif dBait » en collaboration avec l'équipe du Prof. J.S. Sun (président de la société française DNA Therapeutics) spécialisé dans le développement de motifs SiDNA (Signal Interfering DNA).

IV.2.1. Role des dBait

Il a été énoncé, dans le chapitre précédent, la faculté des cellules tumorales à échapper au mécanisme d'apoptose induit par les traitements classiques (radiothérapie ou chimiothérapie). Le groupe de DNA Therapeutics a récemment proposé une nouvelle stratégie consistant à inhiber le mécanisme de réparation de l'ADN et donc de permettre aux agents cytotoxiques de détruire les cellules visées.

L'un des plus sévères dommages subis par l'ADN sont les cassures doubles brins. Ces lésions, lorsqu'elles ne sont pas réparées, sont létales pour la cellule. Deux voies majeures de réparation vont alors intervenir afin de réparer l'ADN, la réparation par recombinaison homologue et le « non-homologue end-joining ». Afin de contourner ce mécanisme de réparation le groupe du Professeur Sun propose d'introduire de courtes séquences d'ADN mimées d'une coupure double brin et reconnue par les protéines de réparation¹²⁶. Ceci a pour but d'inhiber le processus de réparation et ainsi accroître la sensibilité des traitements agissant sur l'ADN¹²⁷.

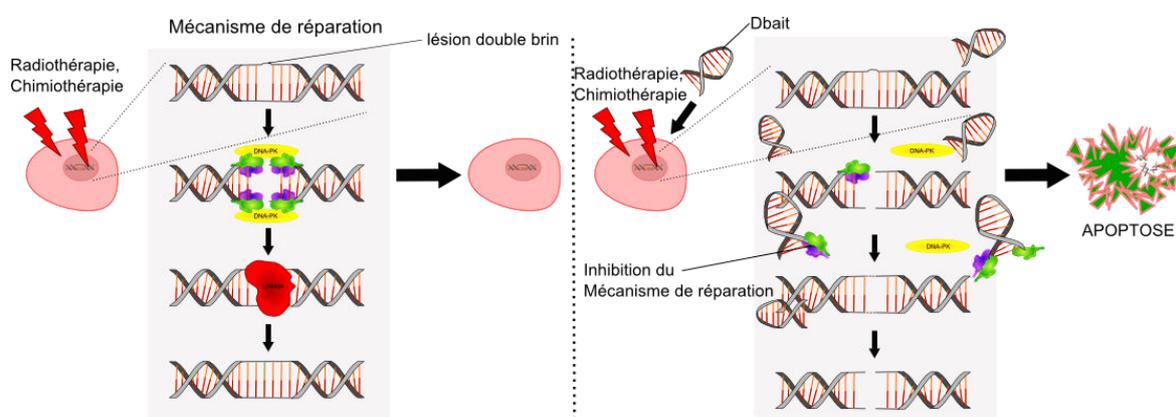


Figure 92 : Mécanisme de réparation de l'ADN après une cassure double brin : voie normale (droite) et avec action du composé DBAIT (gauche)

Ces oligonucléotides appelés Dbait (DNA bait) vont ainsi déclencher un faux signal de dommage sur l'ADN et inhiber la réparation des cellules endommagées lors d'une radiothérapie ou chimiothérapie. (Figure 92).

126. Quanz, M.; Berthault, N.; Roulin, C.; Roy, M.; Herbet, A.; Agrario, C.; Alberti, C.; Josserand, V.; Coll, J.-L.; Sastre-Garau, X.; Cosset, J.-M.; Larue, L.; Sun, J.-S.; Dutreix, M., Small-Molecule Drugs Mimicking DNA Damage: A New Strategy for Sensitizing Tumors to Radiotherapy. *Clin Cancer Res* **2009**, *15* (4), 1308-1316.

127. Quanz, M.; Chassoux, D.; Berthault, N.; Agrario, C.; Sun, J.-S.; Dutreix, M., Hyperactivation of DNA-PK by Double-Strand Break Mimicking Molecules Disorganizes DNA Damage Response. *Plos One* **2009**, *4* (7), e6298.

Cette approche a montré de très bon résultats en couplage avec des techniques de radiothérapies sur plusieurs types de tumeurs *in vitro* et *in vivo*¹²⁸. Des études pré-cliniques sur des mélanomes de la peau indiquent que les Dbait sont bien tolérés et n'augmentent pas la sensibilité aux radiothérapies des cellules saines. Ces résultats ont conduit le groupe du professeur Sun à commencer une phase clinique sur leurs composés.

Un inconvénient majeur de ces composés est qu'ils ne vont pas pénétrer de façon spontanée à l'intérieur de la cellule. Ils ont été pour cela conjugués à des polyéthylèneimines mais la dose de Dbait pouvant alors être injectée était insuffisante. Pour cela, ils ont par la suite été conjugués à un cholestérol comme agent de transfection. Ils ont montré que CoDbait (Cholesterol-Dbait) n'avait pas d'effet néfaste sur les cellules saines. Une injection intra-tumorale de co-Dbait précédant la radiothérapie augmente de façon significative la survie des rats traités et réduit le volume de la tumeur en amplifiant les effets du traitement par radiothérapie¹²⁹.

IV.2.2. Synthèse du conjugué médicament

Il a été choisi afin d'augmenter la pénétration tumorale et l'efficacité des Dbait de les coupler à des motifs -RGD-. Nous avons choisi de greffer deux types de motif -RGD- en 5' sur le Dbait : un -RGD- cyclique, de séquence cyclo[RGDfC] et le gabarit de ciblage déjà utilisé précédemment. Pour cela nous avons synthétisé, au laboratoire, un gabarit peptidique possédant sur sa face supérieure quatre ligands -RGD- et sur sa partie inférieure une fonction thiol pour pouvoir lier le Dbait *via* la ligature thiol-maléimide (Figure 93).

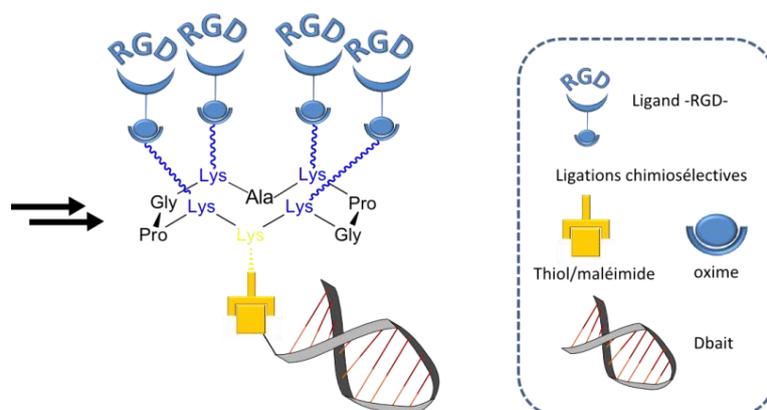


Figure 93 : Stratégie d'assemblage gabarit de ciblage Dbait par une fonction thiol-maléimide

La synthèse du gabarit peptidique est réalisée à partir du composé intermédiaire **18** déjà utilisé pour les projets précédents.

Cette synthèse est effectuée en 2 étapes « one-pot » avec un rendement de 74%. La première étape est l'incorporation de la fonction thiol protégée par un groupement trityl par

128. Devun, F.; Bousquet, G.; Biau, J.; Herbette, A.; Roulin, C.; Berger, F.; Sun, J.-S.; Robine, S.; Dutreix, M., Preclinical study of the DNA repair inhibitor Dbait in combination with chemotherapy in colorectal cancer. *J Gastroenterol* **2012**, *47* (3), 266-275.

129. (a) Coquery, N.; Pannetier, N.; Farion, R.; Herbette, A.; Azurmendi, L.; Clarencon, D.; Bauge, S.; Josserand, V.; Rome, C.; Coll, J.-L.; Sun, J.-S.; Barbier, E. L.; Dutreix, M.; Remy, C. C., Distribution and Radiosensitizing Effect of Cholesterol-Coupled Dbait Molecule in Rat Model of Glioblastoma. *Plos One* **2012**, *7* (7), e40567; (b) Berthault, N.; Maury, B.; Agrario, C.; Herbette, A.; Sun, J. S.; Peyrieras, N.; Dutreix, M., Comparison of distribution and activity of nanoparticles with short interfering DNA (Dbait) in various living systems. *Cancer Gene Ther* **2011**, *18* (10), 695-706.

couplage peptidique. La déprotection du groupement trityl est alors effectuée directement après évaporation du solvant de réaction par ajout d'une solution de TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5). On obtient ainsi le composé **60** après purification par HPLC préparative qui pourra être utilisé pour la ligature du Dbait sur la face inférieure.

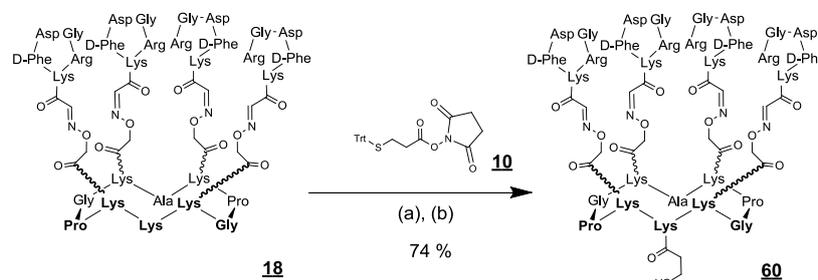


Figure 94 : Schéma de synthèse du gabarit peptidique de ciblage utilisable pour la ligature avec un Dbait : (a) 1,5 éq. **10**, DMF, 1h (b) TFA/TIS/H₂O ; 95/2,5/2,5, 30 min

Le greffage de Dbait a été réalisé avec un rendement de 13% dans le groupe du Prof. Sun. Un composé avec un peptide non ciblant du type -RAD- a également été synthétisé pour servir de contrôle négatif. Il a été montré que le motif -RAD- n'avait aucune affinité pour l'intégrine⁹⁵.

IV.2.3. Evaluation biologique in vitro

D'après la littérature, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ seraient présentes sur plusieurs lignées cellulaires utilisées comme modèle de tumeurs au laboratoire du Professeur Sun. Il a été vérifié par immunofluorescence que ces lignées surexpriment les intégrines. Parmi toutes les lignées testées, seules MRC5, T98G et MDA-MB-231 présentent une légère expression de l'intégrine et les cellules U87MG une forte surexpression (Figure 95).

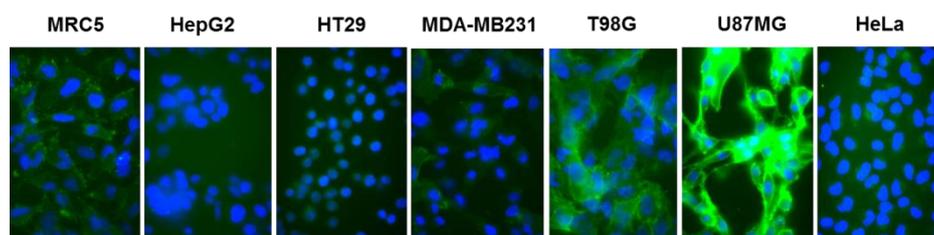


Figure 95 : Analyse par immunofluorescence de la présence d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sur les lignées disponibles (en bleu, noyaux marqués au Dapi, en vert, les intégrine $\alpha_v\beta_3$)

L'activité des molécules a d'abord été évaluée par un test enzymatique puis sur cellules. Elles sont capables d'activer l'activité ATPasique de DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) à peu près de la même manière que CoDbait (Figure 96C). La présence des groupements peptidiques fixés en 5' ne semble donc pas interférer avec l'activité de la molécule. L'efficacité intracellulaire des nouveaux conjugués a été déterminée par des expériences de transfection (Figure 96D). Les cellules choisies pour ces essais sont à chaque fois des cellules qui expriment les intégrines $\alpha_v\beta_3$, les cellules U87-MG (glioblastome humain) et des cellules ne l'exprimant pas, les HeLa. Les transfections ont été réalisées en incubant les molécules pendant 24h sur les cellules

en présence de sérum de veau fœtal. L'expérience de transfection n'a été réalisée qu'une seule fois. On peut tout de même voir que dans les cellules U87 surexprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$, l'activité du RGD-Dbait et du composé **60**-Dbait (RAFT-Dbait) semble supérieure à l'activité dans les cellules HeLa. L'activité du RAFT, qui possède 4 Ligands -RGD- cycliques, semble également supérieure à celle du RGD simple. Le RAD-Dbait ne paraît avoir aucune activité dans les deux types cellulaires. Le fait que les transfections sur des cellules HeLa ne surexprimant pas les intégrines $\alpha_v\beta_3$, montrent une efficacité moindre des molécules conjuguées alors que le CoDbait est très efficace dans ces cellules confirme que la présence des ligands -RGD- confère une sélectivité pour les cellules exprimant le récepteur. L'expérience doit cependant être réalisée à nouveau afin de consolider ces résultats.

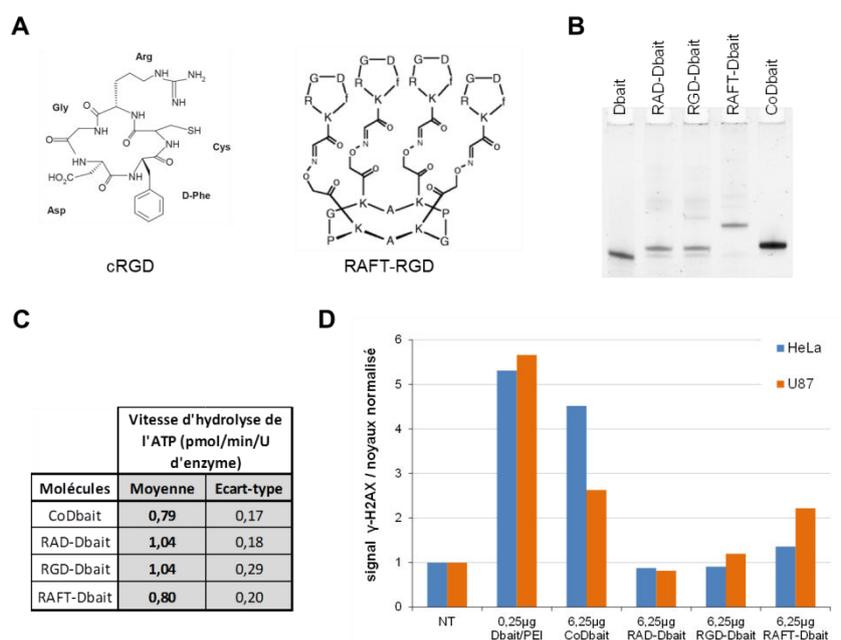


Figure 96 : **Efficacité *in vitro* des Dbait conjugués au RGD.** (A) Structure des ligands RGD et RAFT-RGD couplés à l'extrémité 5' de Dbait ; (B) Dépôt sur gel de polyacrylamide des Dbait conjugués ; (C) Dosage enzymatique de l'activité ATPasique de DNA-PK activée par les Dbait. La vitesse d'hydrolyse de l'ATP est exprimée en pmol/min/U d'enzyme, corrigée par rapport au contrôle négatif. (D) Efficacité intracellulaire (induction de la phosphorylation de H2AX) par les conjugués RGD dans les cellules HeLa et U87-MG. Les transfections ont été réalisées en incubant les molécules à 1,5 μ M pendant 24 h sur les cellules, avec ou sans sérum de veau fœtal (SVF) (n=1). L'analyse est réalisée par western-in-cell. Les résultats sont donnés en unité arbitraire, représentant la quantité de γ H2AX par rapport au nombre de noyaux

A ce jour, il n'a pas été possible de réaliser des expériences *in vivo*. Le couplage du RAFT-RGD sur le Dbait est une étape présentant actuellement un faible rendement. Des optimisations de cette réaction de couplage vont être réalisées avant de produire un lot plus important pour les expériences *in vivo*. Différents ligands ont été conjugués à la molécule Dbait : du tocophérol, du folate ou un peptide RGD. Pour certains, les résultats *in vitro* et *in vivo* obtenus sont encore préliminaires. Le couplage du tocophérol sur le Dbait permet d'obtenir une efficacité intracellulaire identique au CoDbait et *in vivo*, il permet un léger gain pour l'adressage au foie. Pour le folate et le RGD, les résultats *in vitro* doivent être approfondis avant d'envisager une administration *in vivo* et une étude de biodistribution.

IV.3. Bilan des travaux

L'approche synthétique de ces différents conjugués multivalents pour la thérapie anticancéreuse s'est avérée adéquate. En effet, l'utilisation d'un thiol activé permet le couplage efficace d'un composé cytotoxique qui pourra être relargué à l'intérieur de la cellule après rupture de celui-ci par le milieu hautement réducteur de la cellule cible. Par ailleurs, dans le cas du composé Dbait, le ralongage du composé n'étant pas nécessaire, un lien covalent a été réalisé entre les deux biomolécules assurant une stabilité plus importante du composé.

Du point de vue biologique, les deux projets ont montré des résultats concluants.

L'injection de composé porocombo a montré une réduction de la croissance tumorale chez plusieurs souris. Les coupes histologiques des tumeurs après traitements semblent montrer des zones nécrotiques. Nos composés seraient donc capables d'induire l'apoptose de la cellule mais le mécanisme d'action de ceux-ci n'a pas encore été démontré. Pour cela, des composés fluorescents restent à préparer avec une sonde FRET par exemple, qui permettrait la visualisation de chaque élément *in vivo*. Des expériences *in vitro* et *in vivo* sont en cours afin de démontrer comment nos composés induisent l'apoptose et si ce mécanisme est capable d'induire une réponse immunitaire par les cellules dendritiques.

Les résultats préliminaires du composé « DBait » semblent indiquer que ce composé cible efficacement les cellules tumorales et permet l'activation de DNA-PK. Ce composé permet ainsi l'activation du système de réparation de l'ADN induisant l'inhibition de la réparation de l'ADN par une surepression de la molécule dans le milieu. Cependant ces expériences ont été réalisées qu'une seule fois et restent à confirmer.

V. Amélioration de la capacité de ciblage : double targeting

Nous avons montré dans les chapitres précédents, que nos molécules ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sont efficaces pour la détection des cellules tumorales en imagerie de fluorescence ou par PET. Nos molécules ont de plus montré une bonne efficacité pour la thérapie anticancéreuse *via* l'utilisation d'éléments cytotoxiques.

Nous proposons d'améliorer la capacité de ciblage de nos vecteurs en ajoutant un deuxième ligand permettant de cibler une protéine supplémentaire. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, la cellule tumorale présente une membrane plasmique caractéristique. Suivant les lignées cellulaires tumorales, on pourra voir une surexpression à la surface d'intégrine pour l'adhésion cellulaire et la prolifération, mais aussi d'autres récepteurs comme les récepteurs aux facteurs de croissance que sont EGFR, VEGFR ou Nrp-1 par exemple. Nous avons choisi d'utiliser des ligands peptidiques décrits dans la littérature pour cibler ces derniers et de les associer à notre vecteur afin de vérifier s'il était possible d'augmenter la capacité de reconnaissance de ces cellules à travers un ciblage de deux récepteurs de façon concomitante. Un autre avantage apporté au fait de cibler deux récepteurs est que nous pourrions de plus augmenter la spécificité des cellules ciblées possédant les deux récepteurs.

V.1. Etat de l'art et nouveaux ligands peptidiques

Plusieurs ligands peptidiques sont décrits dans la littérature pour cibler les récepteurs aux facteurs de croissance et notamment les peptides GE11 et ATWLPPR qui ciblent respectivement EGFR et Nrp-1.

Récemment un nouveau peptide, nommé GE11 fut découvert par le groupe du Pr. Li à Shanghai. Ce peptide issu d'une librairie de phage a été identifié comme un nouveau ligand capable de lier efficacement et spécifiquement le récepteur aux facteurs de croissance des cellules épithéliales (EGFR). Encodé par la séquence YHWYGYTPQNVI, il montre une constante de dissociation de 22 nM et révèle moins d'effet mitogène que le ligand naturel EGR. Le peptide GE11 est internalisé dans les cellules surexprimant EGFR et s'accumule dans ces cellules après injection par voie intra-veineuse¹³⁰. Par la suite, ils montrent que ce peptide fonctionnalisant un liposome est capable de vectoriser un composé fluorophore vers la cellule cible et de le faire pénétrer à l'intérieur de celle-ci par endocytose¹³¹. Ce peptide apparaît ainsi comme un bon ligand de ciblage de ce récepteur et permet l'internalisation sélective de composé actif pour la délivrance de médicament.

130. Li, Z.; Zhao, R.; Wu, X.; Sun, Y.; Yao, M.; Li, J.; Xu, Y.; Gu, J., Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *The FASEB Journal* **2005**, *19* (14), 1978-1985.

131. Song, S.; Liu, D.; Peng, J.; Sun, Y.; Li, Z.; Gu, J.-R.; Xu, Y., Peptide ligand-mediated liposome distribution and targeting to EGFR expressing tumor in vivo. *Int J Pharmaceut* **2008**, *363* (1-2), 155-161.

De la même manière, par phage display, un heptapeptide ATWLPPR (A7R) a été identifié par le groupe du Pr. G. Perret de l'université de Paris 13 comme ayant une bonne affinité de reconnaissance de la protéine transmembranaire Nrp-1¹³². Ce peptide est très sélectif vis-à-vis de ce récepteur et inhibe la reconnaissance de VEGF₁₆₅. Des études *in vivo* ont montré qu'un traitement *via* ce peptide entraîne une décroissance notable de l'angiogénèse et de la croissance cellulaire dans le cas du cancer du sein¹³³. Lors d'expérience *in vitro* et *in vivo*, ils montrent que ce peptide, conjugué à un photosensibilisateur, accroît sensiblement son internalisation dans les cellules surexprimant Nrp-1¹³⁴. Ce peptide, malgré sa forme linéaire possède une structure bien définie car rigidifiée par un enchaînement d'acides aminés proline¹³⁵. Cette structure lui permet de reconnaître spécifiquement Nrp-1, et ainsi être un bon candidat pour le ciblage et la délivrance de médicament.

V.2. Principe et objectifs du double ciblage tumoral

Comme nous l'avons vu précédemment, le double ciblage nous permettrait d'une part de cibler plus efficacement la cellule cancéreuse en augmentant l'affinité de reconnaissance mais aussi d'autre part d'être plus sélectif envers les cellules possédant les deux récepteurs surexprimés sur leur membrane.

Afin de développer ces nouveaux vecteurs, il semble nécessaire de synthétiser de nouveaux gabarits possédant plusieurs sites d'accroche différents pour un ou plusieurs nouveaux ligands. La manière de présenter ce nouveau ligand semble très importante. Pour que nos molécules puissent se lier efficacement et simultanément aux deux récepteurs nous devons tenir compte de la distance minimale existante entre les deux récepteurs à cibler. Pour cela, nous avons choisi de synthétiser plusieurs gabarits et utiliser plusieurs espaceurs entre les différents ligands (Figure 97).

132. Binetruy-Tournaire, R.; Demangel, C.; Malavaud, B.; Vassy, R.; Rouyre, S.; Kraemer, M.; Plouet, J.; Derbin, C.; Perret, G.; Mazie, J. C., Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *Embo J* **2000**, *19* (7), 1525-1533.

133. Starzec, A.; Vassy, R.; Martin, A.; Lecouvey, M.; Di Benedetto, M.; Crepin, M.; Perret, G. Y., Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life sciences* **2006**, *79* (25), 2370-2381.

134. Tirand, L.; Frochet, C.; Vanderesse, R.; Thornas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M. L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., A peptide competing with VEGF(165) binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release* **2006**, *111* (1-2), 153-164.

135. Starzec, A.; Ladam, P.; Vassy, R.; Badache, S.; Bouchemal, N.; Navaza, A.; du Penhoat, C. H.; Perret, G. Y., Structure–function analysis of the antiangiogenic ATWLPPR peptide inhibiting VEGF165 binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPPR/neuropilin-1 complex. *Peptides* **2007**, *28* (12), 2397-2402.

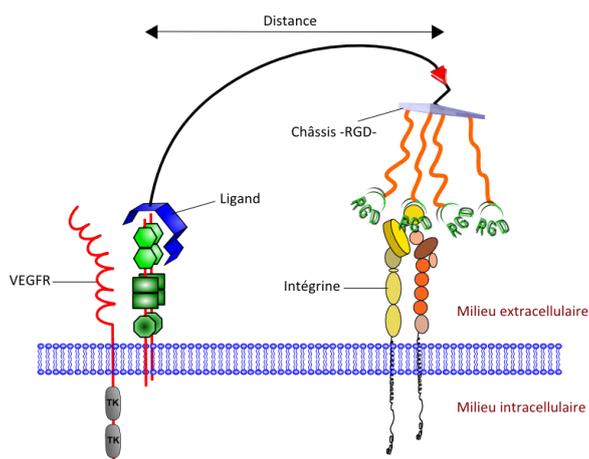


Figure 97 : Représentation schématique des molécules à concevoir afin de pouvoir cibler deux protéines transmembranaires différentes

V.3. Synthèse des composés

Afin de lier efficacement et orthogonalement un second ligand sur nos molécules ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, nous avons fait le choix d'utiliser la ligation CuAAC comme méthode de ligation chimiosélective. Pour cela, nous avons ajouté un nouveau site d'adressage chimique, la fonction alcyne, sur la face inférieure du châssis. Le gabarit peptidique est, comme précédemment préparé sur support solide grâce à une résine chlorotrityle et la méthode de synthèse peptidique classique. L'incorporation des différentes fonctions utiles aux ligations est faite *via* l'introduction au cours de la synthèse peptidique des acides aminés modifiés **5** et **7**.

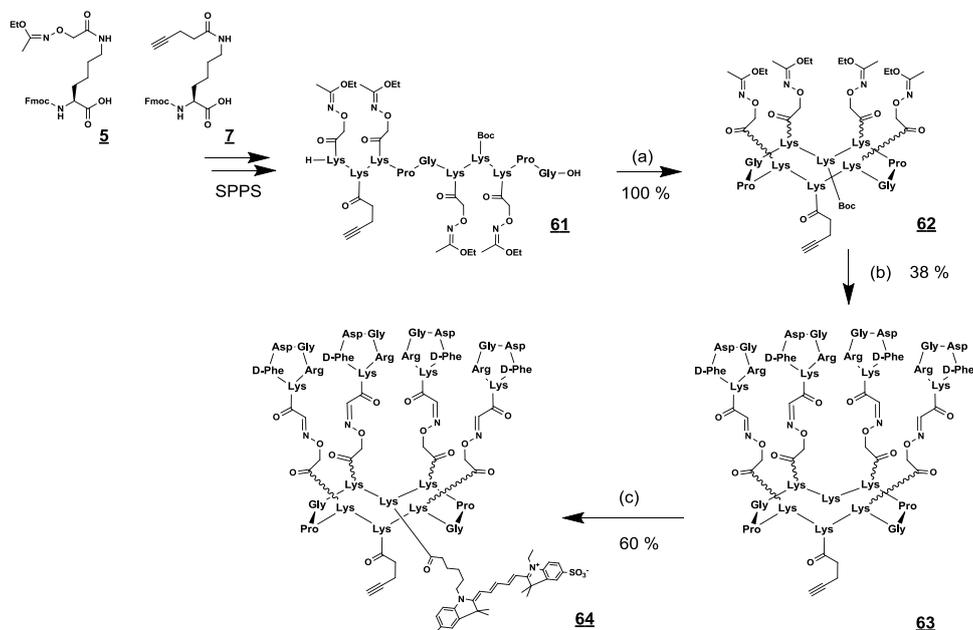


Figure 98 : Réactifs (a) 1,2 éq. PyBop, DMF, DIPEA, 1h (b) 6 éq. **17**, TFA/H₂O ; 7/3, 1h (c) 1,2 éq. Cy5-Mono-NHS-ester, DMF, DIPEA, 2h

Après décrochage du support et cyclisation intramolécule, on obtient un châssis permettant la ligation de quatre ligands -RGD- sur la face supérieure. Cette étape est réalisée comme

précédemment en milieu acide (TFA/H₂O ; 7/3) avec un excès de ligand -RGD- et conduit au composé **64** avec un rendement de 38 % après purification (Figure 98). Le produit est alors caractérisé par HPLC analytique et spectrométrie de masse en mode positif (Figure 99).

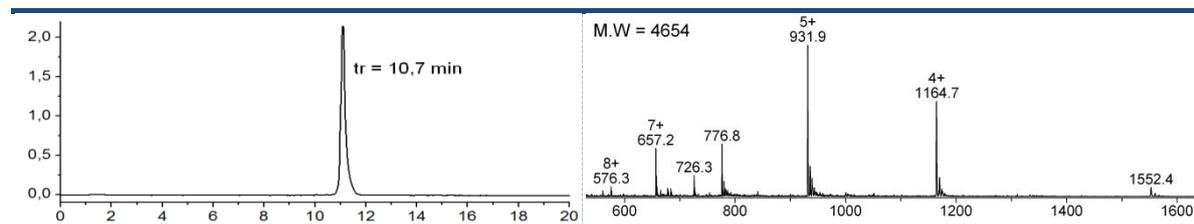


Figure 99 : Chromatogramme HPLC (gauche) et spectre de masse ESI+ (droite) du composé **64** après purification

Nous avons fait le choix d'introduire un fluorophore afin d'étudier les capacités de ciblage de nos nouvelles molécules par microscopie ou cytométrie en flux. La deuxième partie de la molécule ciblant une autre particularité de la membrane cellulaire sera introduite en fin de synthèse par une chimie déjà employée et orthogonale à la chimie oxime : la ligation CuAAC.

V.3.1. Synthèse des conjugués ciblant EGFR

Afin de préparer la molécule finale possédant un ligand supplémentaire, nous avons choisi d'utiliser un espaceur polyéthylène glycol nous permettant de faire le lien entre le châssis moléculaire déjà synthétisé et le ligand GE11. La séquence GE11, est elle, synthétisée de manière automatisée par synthèse peptidique classique sur une résine 2-chlorotrityle. Après décrochage en milieu acide faible (AcOH/TFE/DCM ; 1/2/7), le peptide totalement protégé, est couplé à l'espaceur contenant 11 unités polyéthylène glycol. La réaction de couplage est effectuée dans le DMF en milieu légèrement basique sur l'extrémité N-terminale du peptide, *via* la fonction ester activé présente sur l'espaceur. Après évaporation du solvant de réaction, le produit formé est directement déprotégé par une solution de TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5) en 2h. On obtient ainsi le produit **66** avec un rendement de 45% après purification par HPLC.

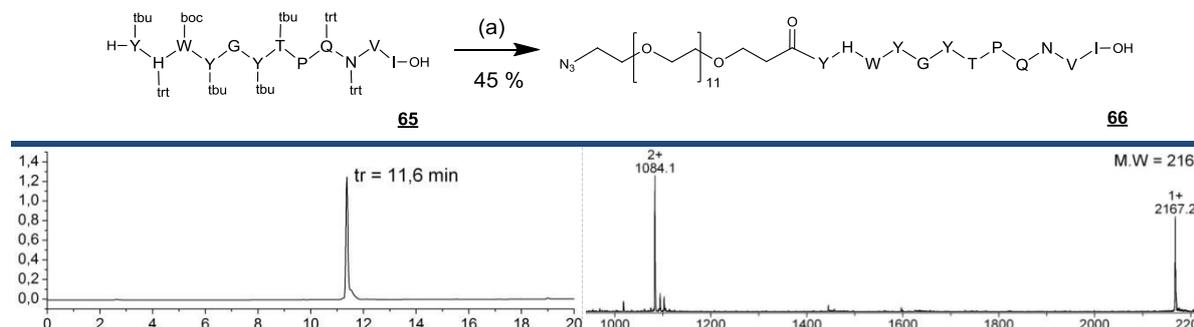


Figure 100 : Schéma de synthèse du composé **66**. Réactifs : (a) 2éq. N₃-PEG(11)-CONHS, DMF, DIPEA, 2h (b) TFA/H₂O/TIS ; 95/2,5/2,5. Chromatogramme HPLC (gauche) et spectre de masse ESI+ (droite) du composé

La molécule finale est alors synthétisée par couplage *via* la réaction de CuAAC catalysée au cuivre I en présence de THPTA, et des deux espèces **64** et **66** préparées précédemment. Le fournisseur de cuivre I est, comme dans les chapitres précédents, le CuSO₄ qui est réduit *in situ*

par un excès d'ascorbate de sodium (voir partie III et VI pour une discussion plus approfondie sur le choix du ligand et les protocoles de couplage). La réaction est effectuée sous atmosphère inerte en 2h à 30°C. Le produit final **79** est obtenu avec un excellent rendement de 72% après purification par HPLC (Figure 101).

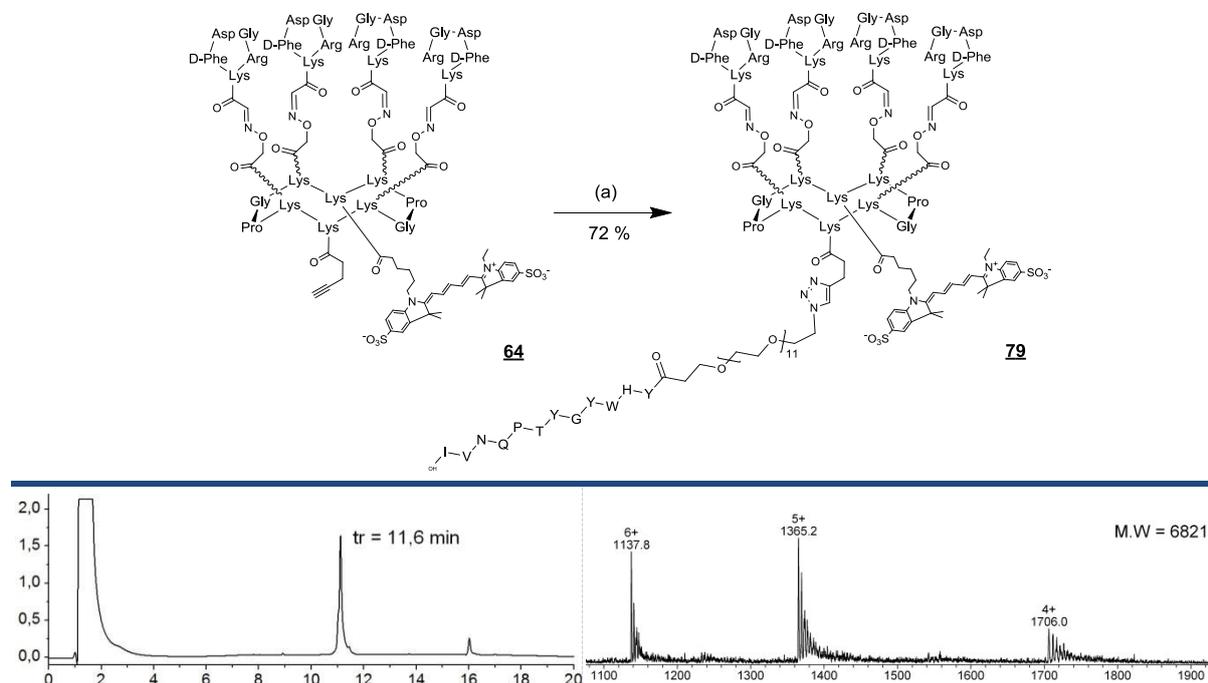


Figure 101 : Schéma de synthèse du composé **79**. Réactifs : (a) 1,2 éq. **66**, 1 éq. CuSO₄, 5 éq. NaAsc, 2 éq. THPTA, Tampon PBS/ACN, 2h. Chromatogramme HPLC (gauche) et spectre de masse ESI+ (droite) du composé

Afin de présenter deux ligands sur la même molécule nous avons aussi choisi d'utiliser un nouveau gabarit moléculaire développé au laboratoire (thèse du Dr. E. Dufour) : la dicétopipérazine. Ce châssis de faible poids moléculaire permet *via* ces trois sites d'accroche de présenter 3 ligands différents dont deux seront orientés du même côté du gabarit sous la forme d'une pince (Figure 102).

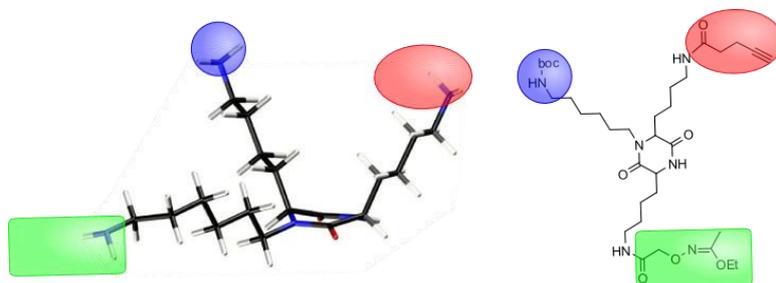


Figure 102 : Représentation schématique de la structure de la dicétopipérazine, fonctionnalisable par 3 ligands différents

Grâce aux différentes fonctions présentes sur la dicétopipérazine, nous avons pu lier, comme pour la molécule précédente, un châssis comportant quatre ligands -RGD-, un fluorophore et le peptide GE11. Dans une première étape le cyclodécapeptide, possédant quatre ligand -RGD- et fonctionnalisé sur sa face inférieure par une fonction aldéhyde, est accroché sur la dicétopipérazine par ligation oxime. Cette réaction est effectuée dans un mélange TFA/H₂O

(7/3) permettant comme pour les réactions présentées précédemment la déprotection du groupement boc et la ligation oxime entre la fonction aldéhyde du gabarit **74** et la fonction oxyamine de la dicétopipérazine **75** avec un rendement de 58%.

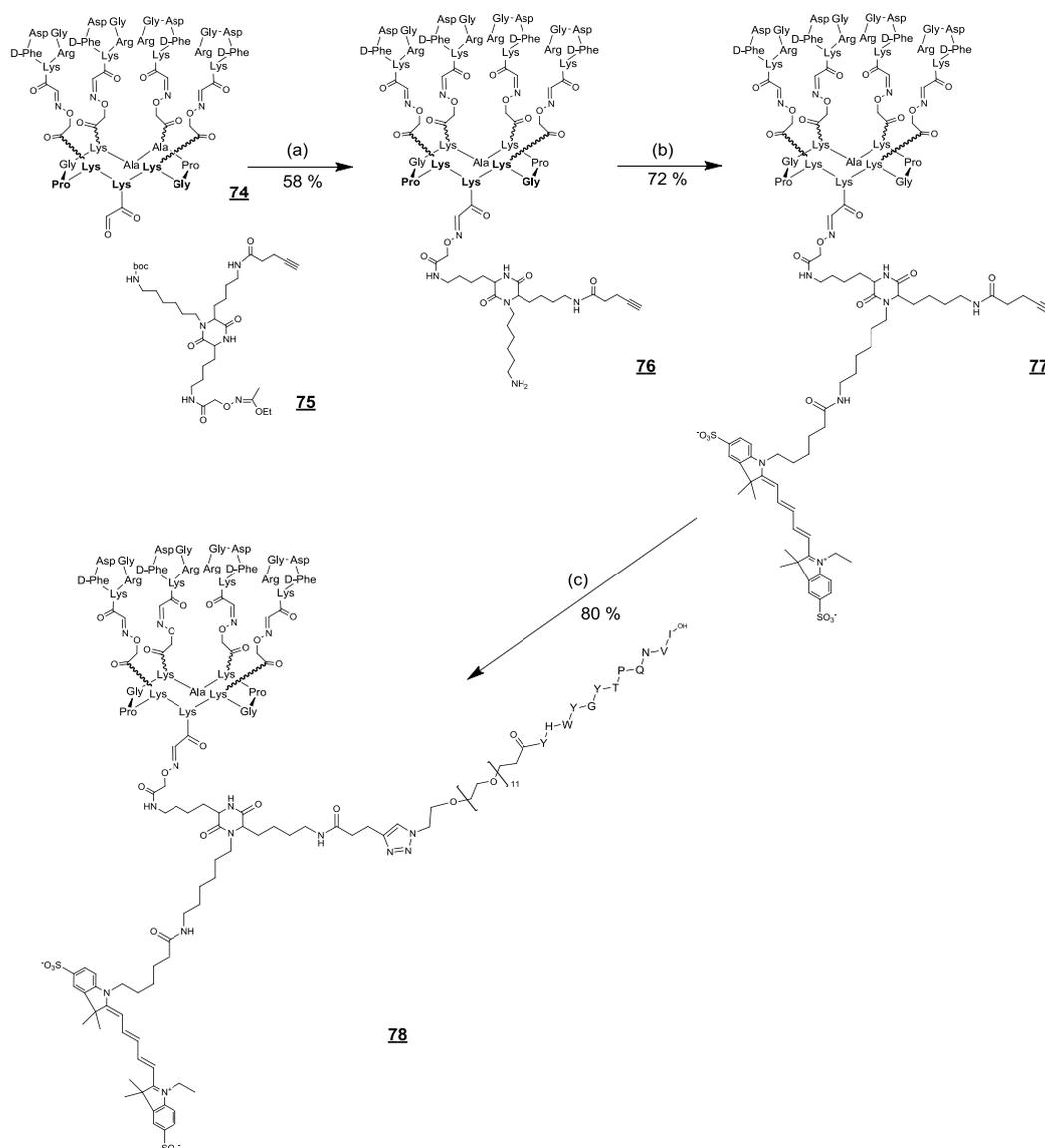


Figure 103 : Schéma de synthèse du composé **78**. Réactifs : (a) TFA/H₂O ; 7/3, 1h ; (b) 1,5 éq. Cy5-mono-NHS-ester, DMF, DIPEA, 1h (c) 1,4 éq. **66**, 2 éq. CuSO₄, 10 éq. NaAsc, 2éq. THPTA, tampon PBS (pH=7,4) /ACN, 2h

Le fluorophore Cy5 est classiquement introduit *via* un lien amide entre l'ester activé commercial et l'amine libre de la dicétopipérazine avec un bon rendement de 72 % après purification par HPLC. Enfin comme précédemment le composé **66** GE11 est lié au gabarit *via* un lien triazole par click chemistry. On obtient le composé final **78** en 7 étapes avec un rendement global de 10 % (Figure 103).

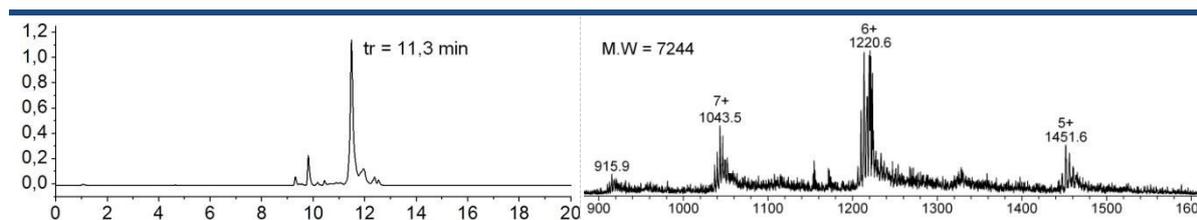


Figure 104 : Chromatogramme HPLC (gauche) et spectre de masse ESI+ (droite) du composé **78**

Un composé GE11 fluorescent a également été synthétisé comme contrôle pour les évaluations biologiques des molécules. Pour cela, le peptide totalement protégé GE11 est placé en présence de Cy5-mono-NHS-ester en milieu légèrement basique pendant 2h. Après formation du produit et évaporation des solvants de réaction, celui-ci est placé dans une solution de déprotection TFA/H₂O pendant 2h. On obtient, après purification le composé **67** avec un rendement de 48 %.

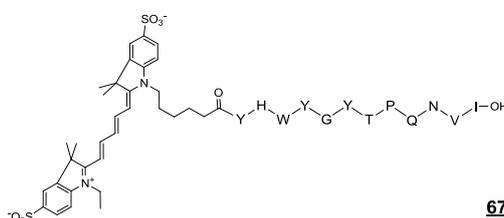
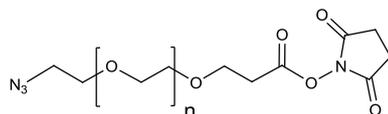


Figure 105 : Structure du composé **67**

V.3.2. Synthèse des conjugués ciblant NRP-1

Nous avons aussi choisi de synthétiser des molécules ciblant à la fois l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et à la fois la protéine transmembranaire Nrp-1 *via* l'utilisation du peptide ATWLPPR. Le même gabarit **64** est utilisé pour présenter le peptide ATWLPPR sur la face inférieure du châssis. Nous avons décidé de faire varier les longueurs de liaisons ainsi que la manière de présenter le ligand ATWLPPR afin d'étudier *in vivo* l'influence de ces modifications sur l'adhésion des cellules. Pour cela, deux longueurs de polyéthylène glycol (PEG) ont été utilisées : un PEG de 11 unités et un de 24 unités de longueurs respectives de 5 et 9.5 nm. Le polyéthylène glycol de 24 unités PEG n'existant pas sous une forme ester activé, nous l'avons préparé au laboratoire *via* une réaction d'activation conventionnelle utilisant du DCC et de la NHS. Cette réaction nous conduit au composé **71** activé avec un rendement de 78 % après purification sur colonne de silice.



n = 11 ; Composé commercial
n = 24 ; **71**

Figure 106 : Structure des composés N₃-PEG-CONHS

Comme pour le peptide GE11, le peptide ATWLPPR est synthétisé sur résine 2-chlorotrityle de façon automatisée. Après décrochage de la résine en milieu acide faible, celui-ci est couplé aux deux polyéthylènes glycol, possédant chacun une fonction azoture, par un lien

amide *via* leur fonction ester activé. Une partie du peptide protégé est de plus greffée à un espaceur acide amino-hexanoïque puis liée à la cyanine 5, comme molécule contrôle (Figure 107).

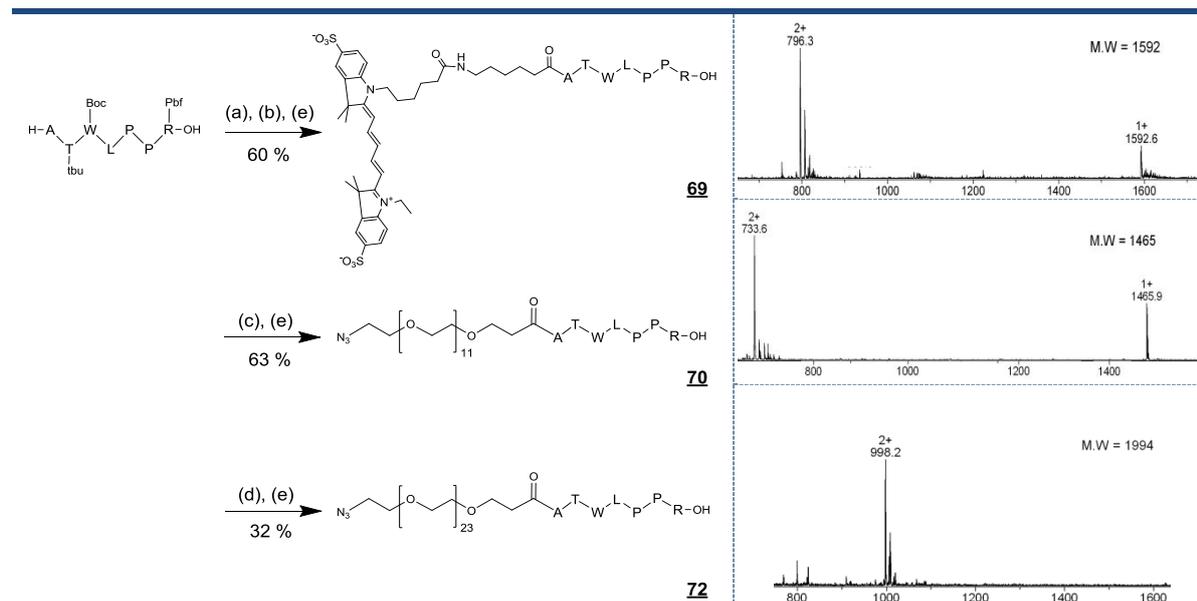


Figure 107 : Schéma de synthèse des composés **69**, **70**, et **72**. Réactifs : (a) 2éq. Fmoc-Ahx-OH, 2 éq. PyBop, DMF, DIPEA, 1h ; (b) 1,5 éq. Cy5-mono-NHS-ester, DIPEA, DMF, 2h (c) 1,5 éq. N3-dPEG(11)-CONHS, DIPEA, DMF, 1h (d) 1,5 éq. **71**, DIPEA, DMF, 1h (e) TFA/H₂O/TIS ; 95/2,5/2,5, 2h

Enfin, nous avons aussi choisi de préparer un composé multivalent présentant quatre peptides ATWLPPR. Pour cela, celui-ci a été greffé sur le gabarit peptidique **53** préalablement fonctionnalisé par un espaceur de 24 unités polyéthylène glycol sur la face inférieure (Figure 108). La ligation du polyéthylène glycol est effectuée dans le DMF en milieu légèrement basique et conduit au gabarit **86** avec un rendement de 86 %. Le peptide SATWLPPR est lui synthétisé de façon automatisée sur support solide selon la méthode classique de synthèse peptidique. Après déprotection de celui-ci par une solution de TFA/H₂O/TIS et évaporation des solvants la sérine placée sur l'extrémité N-terminale, est oxydée en aldéhyde par un excès de périodate de sodium en 30 minutes. Après purification par HPLC préparative on obtient le peptide linéaire possédant une fonction aldéhyde. Celui-ci est alors greffé sur le châssis **86** par ligation oxime dans un milieu TFA/H₂O (7/3). On obtient ainsi après purification par chromatographie le dernier morceau multivalent ATWLPPR avec un rendement moyen de 28 % (Figure 108).

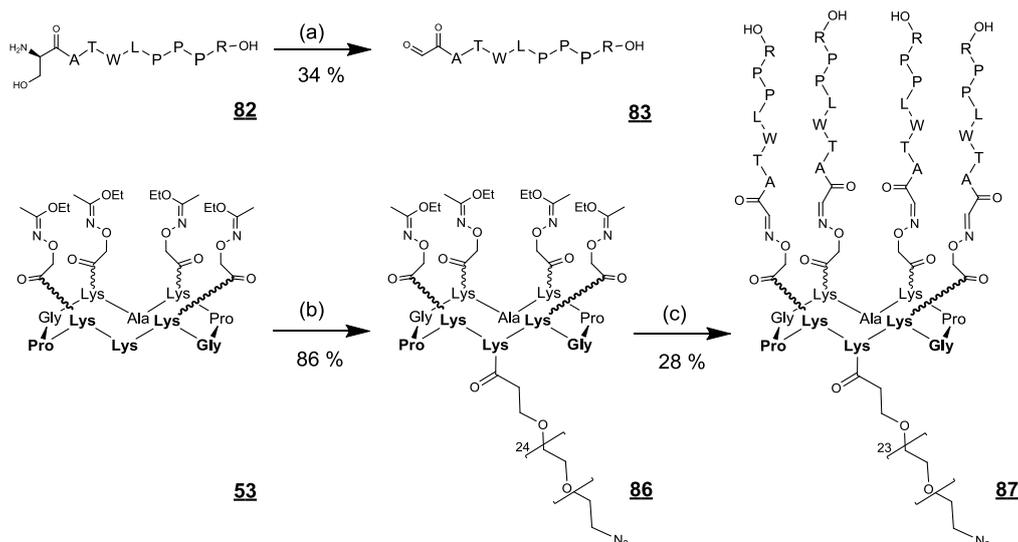


Figure 108 : Schéma de synthèse du composé **87**. Réactifs : (a) 10 éq. NaIO₄, H₂O, 30 min (b) 1,5 éq. **71**, DIPEA, DMF, 1h ; (c) 6éq. **83**, TFA/H₂O ; 7/3, 1h

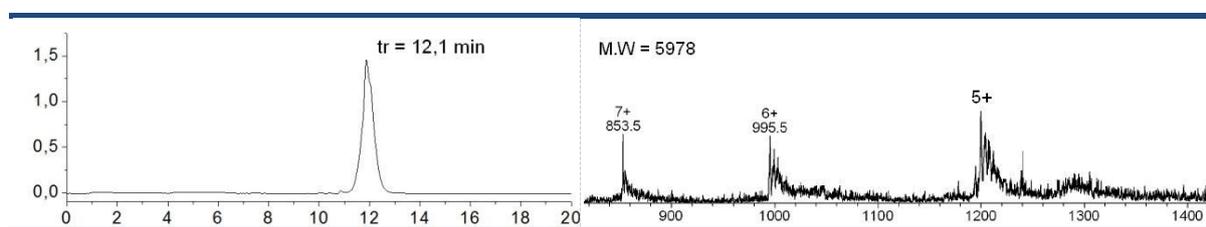


Figure 109 : Chromatogramme HPLC (gauche) et spectre de masse ESI+ (droite) du composé **87**

De la même manière et afin de vérifier l'effet de la multivalence de la présentation de quatre ligands ATWLPPR, nous avons synthétisé un châssis fluorescent sur sa partie inférieure présentant quatre peptides ATWLPPR sur sa face supérieure. Le composé **53** est lié à la cyanine 5 *via* un lien amide en milieu légèrement basique avec un rendement de 64 %. Sans purification ultérieure, le peptide **83** est assemblé sur le cyclodécapeptide par ligation oxime classique en milieu acide (TFA/H₂O ; 7/3). On obtient ainsi le composé contrôle **85** avec un rendement de 34 % en 2 étapes (Figure 110), après purification.

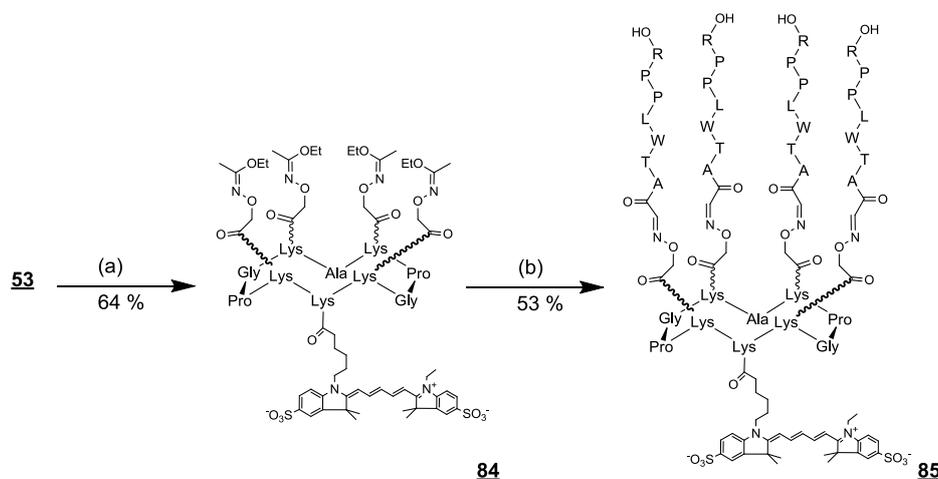


Figure 110 : Schéma de synthèse du composé **85**. Réactifs : (a) 1 éq. Cy5-mono-NHS-ester, DIPEA, DMF, 1h ; (b) 6 éq. **83**, TFA/H₂O ; 7/3, 1h

L'ensemble des différents ligands de la neuropiline-1 est ensuite assemblé au vecteur peptidique reconnaissant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Pour cela un lien triazole permet l'assemblage des différents fragments. La réaction est effectuée sous atmosphère inerte en présence d'un équivalent de cuivre I, 5 équivalent du réducteur ascorbate et 2 équivalent de ligand THPTA dans un milieu tampon PBS (pH = 7,4)/acétonitrile. Après 2 heures de réaction à 30°C et purification, les composés finaux **80**, **81** et **88** sont obtenus avec des rendements respectifs de 35, 60 et 35 % (Figure 111).

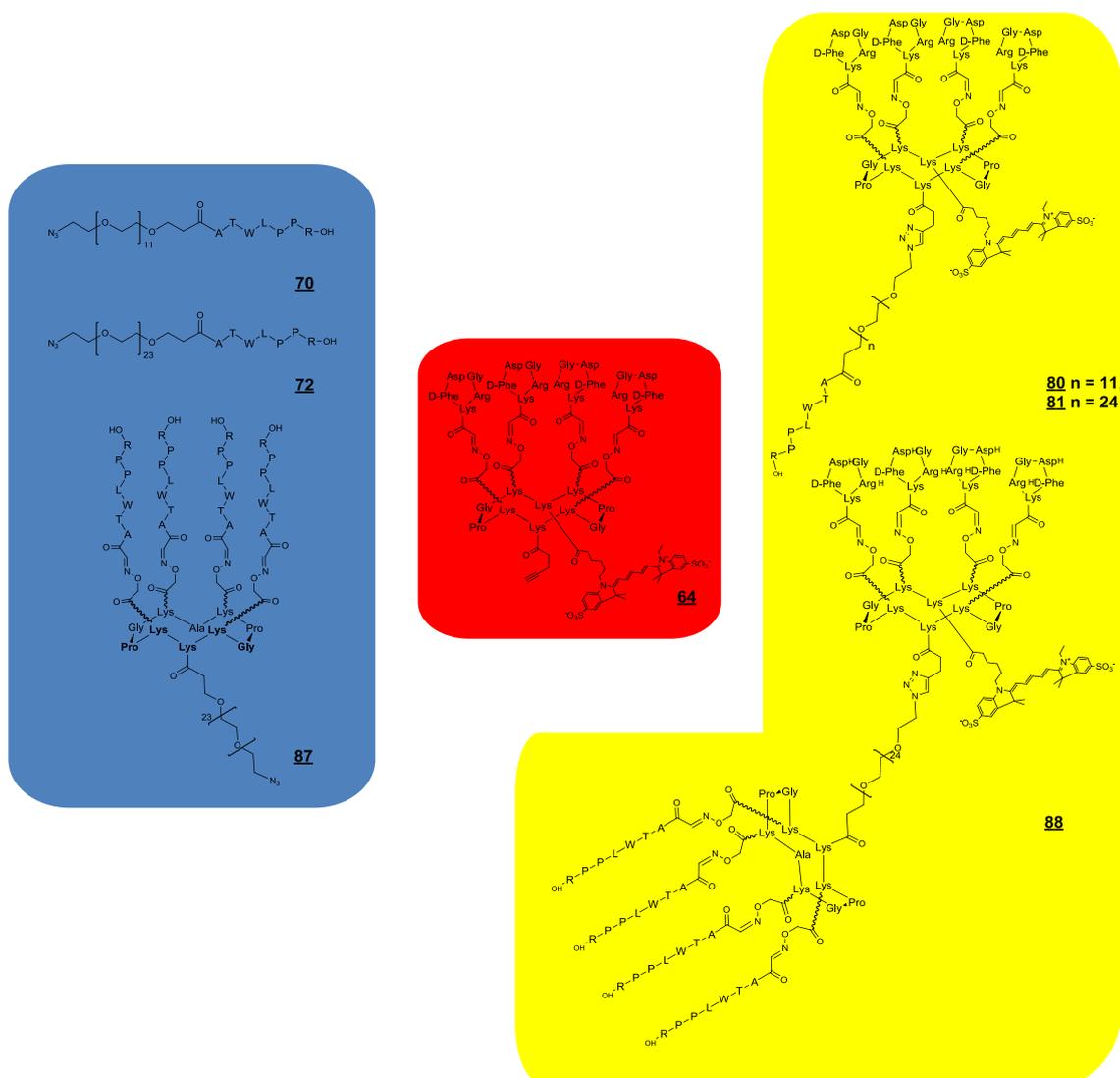


Figure 111 : Assemblages finaux par click-chemistry des molécules **87**, **88** et **95**

Produits	Formule	MW Calc.	MW	RP-HPLC	Rdt
80	C ₂₇₉ H ₄₁₃ N ₇₂ O ₈₀ S ₂	6120,0	6121,1	11,3	35%
81	C ₃₀₁ H ₄₆₁ N ₇₂ O ₉₂ S ₂	6648,6	6651,2	11,3	60%
88	C ₄₈₆ H ₇₃₃ N ₁₂₄ O ₁₄₁ S ₂	10633,1	10632,9	11,5	35%

Tableau 8 : Analyse par HPLC et spectrométrie de masse des composés **80**, **81** et **88** et rendements de couplage des fragments

V.4. Evaluation biologique

L'évaluation biologique des produits a été réalisée par l'équipe du Dr. Jean-luc Coll (Institut Albert Bonniot, Grenoble). La capacité d'adhésion, la spécificité ainsi que la réactivité de nos composés fluorescents ont été déterminées sur plusieurs modèles de cellules choisies pour exprimer à la fois l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ mais aussi le récepteur Nrp-1 ou le récepteur EGFR. Pour effectuer ces tests, les cellules ont été incubées avec les différents peptides. Le pouvoir d'adhésion sur différentes lignées cellulaires a pu être mesurée par microscopie de fluorescence et cytométrie de flux. Afin de calibrer les analyses effectuées, une mesure de l'émission de chaque échantillon a été réalisée, grâce au fluorophore présent, sur chaque molécule, afin de vérifier les concentrations en composés.

V.4.1. Evaluation biologique des composés ciblant EGFR

Le pouvoir d'adhésion des molécules **67**, **78** et **79** (Figure 112), a été évalué sur une nouvelle lignée cellulaire, développée par le Dr Ihab Atallah, chirurgien à l'hôpital Michalon de Grenoble, présentant les deux récepteurs (intégrine $\alpha_v\beta_3$ et EGFR) surexprimés.

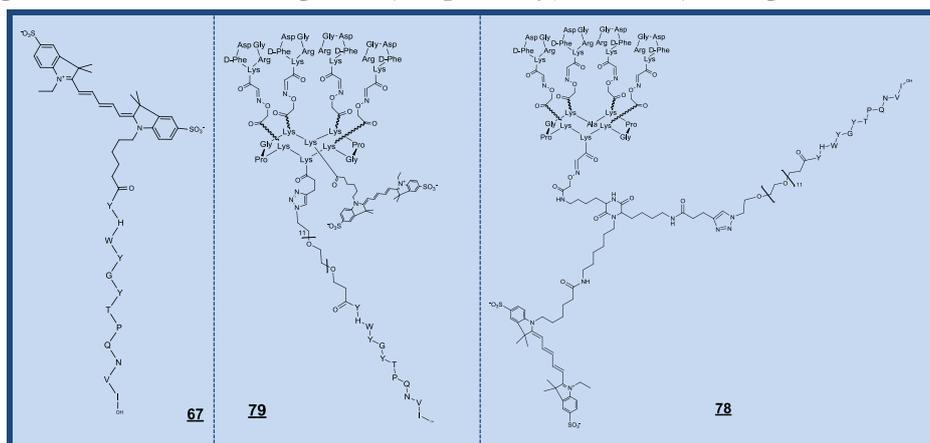


Figure 112 : Représentation schématique des composés **67**, **78** et **79** testés

Plusieurs concentrations de nos composés ont été évaluées dans des tests d'adhésion cellulaire. A partir de ces premiers résultats préliminaires, il résulte que nos molécules, possédant deux récepteurs liés de façon covalente, n'engendreraient pas un marquage plus important que le composé **19** présentant uniquement quatre motifs -RGD-. Cependant, des expériences d'études de la phosphorylation du récepteur semblent montrer que le récepteur serait sous phosphorylé par nos composés. L'incubation des cellules par le ligand naturel EGF induit une sur-phosphorylation du récepteur alors que de manière surprenante l'incubation de nos composés GE11 induit une baisse de la phosphorylation. Ces premiers résultats, à confirmer *in vitro* et *in vivo* nous permettent de dire que nos composés semblent posséder un pouvoir antagoniste du récepteur EGFR et ainsi le désactiver (Figure 113).

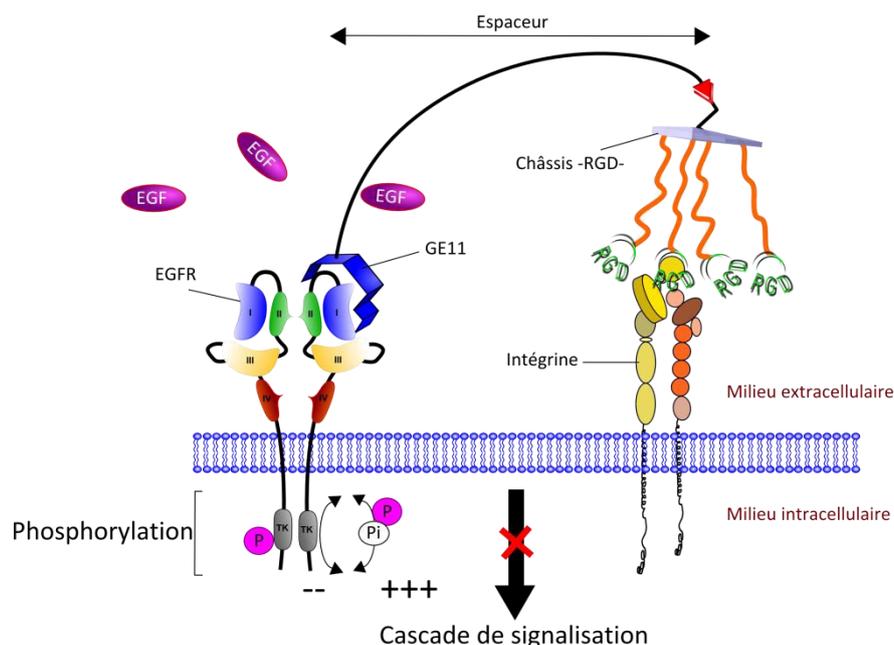


Figure 113 : Représentation schématique du ciblage de EGFR et sa désactivation par le ligand GE11

V.4.2. Evaluation biologique des composés ciblant NRP-1

De la même manière, le pouvoir d'adhésion des molécules **69**, **80**, **81**, **85** et **88** a été évalué sur plusieurs lignées cellulaires présentant les deux récepteurs (intégrine $\alpha_v\beta_3$ et Nrp-1). Afin de sélectionner les bonnes lignées cellulaires candidatent, celles-ci ont été testées par des expériences de western blot et de cytométrie en flux. Il résulte de ces expériences que la lignée MDA-MB231 et la lignée 4T1 semblent avoir une surexpression à la fois des récepteurs Nrp-1 mais aussi des récepteurs intégrine $\alpha_v\beta_3$, ce qui en ferait de bonnes candidates pour les expériences d'adhésion cellulaire avec nos composés. Les lignées cellulaires H358 et A549 ont de plus été sélectionnées comme lignées cellulaires contrôles car n'exprimant que très faiblement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et fortement les récepteurs à la neuropiline (Tableau 9).

Lignée cellulaire/récepteur	Intégrine ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_V\beta_3$)	Nrp-(1 et 2)	VEGFR-(1 et 2)
MDA-MB-231	+++	R1++ et R2+	R1++ et R2++
4T1	++	R1++ et R2+	R1++ et R2-
TSA/PC	+	R1++ et R2++	R1 ? et R2-
H358	faible	R1+ et R2++	R1 ? et R2-
A549	faible	R1++ et R2++	R1+ et R2-

Tableau 9 : Représentation de l'expression relative de chaque récepteur en fonction de la lignée cellulaire tumorale étudiée (+ niveau d'expression, - aucune expression)

Suite à cette sélection, l'adhésion cellulaire des molécules synthétisées a été évaluée par mesure en cytométrie en flux du nombre de cellules de chaque lignée cellulaire marqué à deux concentrations différentes (Figure 114).

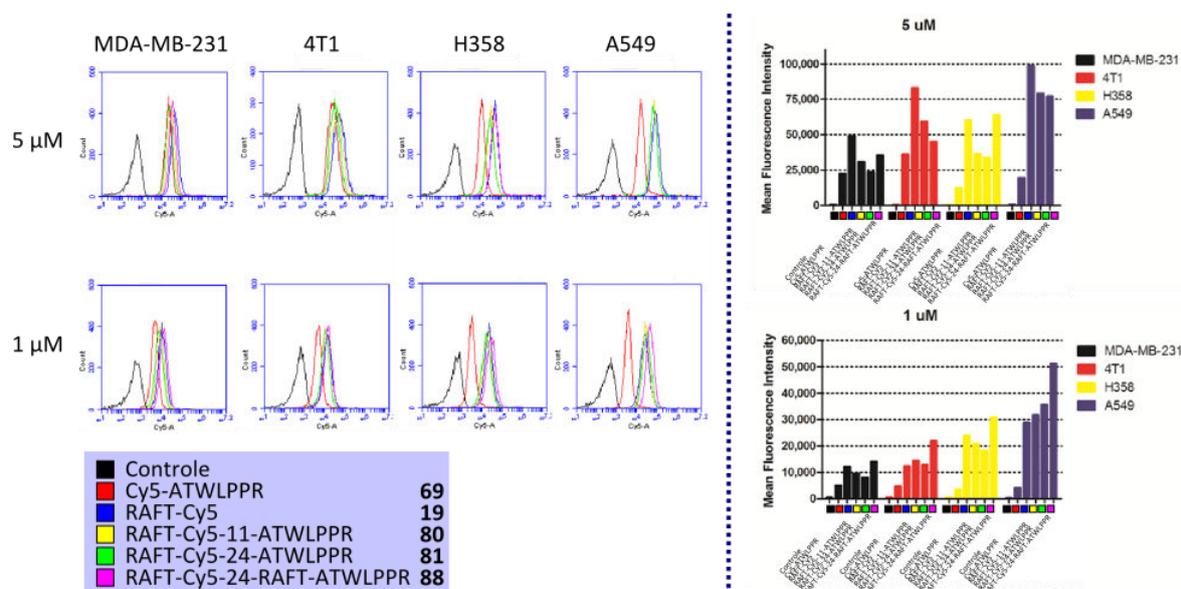


Figure 114 : analyse FAX des peptides **69**, **19**, **80**, **81** et **88** sur quatre lignées cellulaires tumorales

L'adhésion cellulaire des composés a de plus été observée par microscopie de fluorescence.

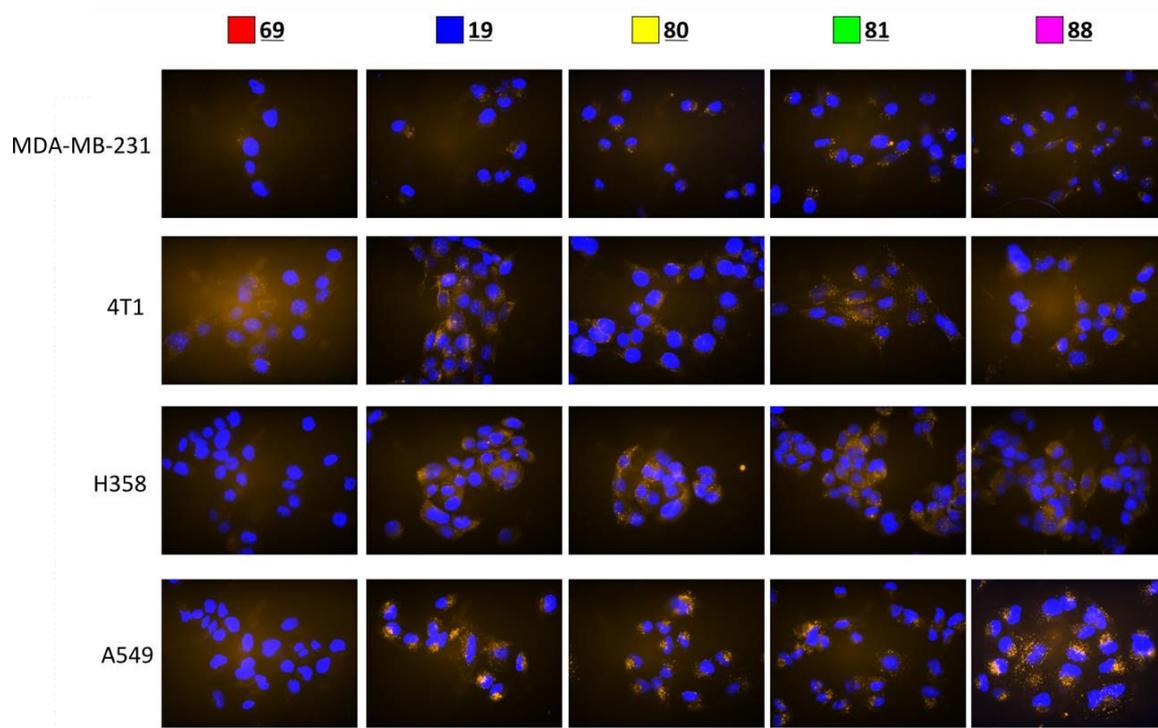


Figure 115 : image de microscopie de fluorescence après incubation des composés sur quatre lignées cellulaires différentes (noyau marqué en bleu, molécules en jaune)

D'après les résultats préliminaires, nous voyons que nos composés ne semblent pas augmenter énormément la fluorescence et donc l'adhésion sur les quatre lignées cellulaires testées. Cependant, nous voyons par cytométrie en flux une petite amélioration de la fluorescence à 1 µM du composé **88** sur les cellules tumorales A549. Ce qui est aussi visible sur les images de microscopie de fluorescence (Figure 115). Plus surprenant, sur les lignées cellulaires 4T1 et H358, nous remarquons que le composé **80** semble adhérer légèrement mieux que le composé **81**. Une

distance plus courte, de l'ordre de 4 nm semble peut être suffisante pour pouvoir lier les deux récepteurs de manière concomitante.

Cependant, au regard de ces résultats, il semble difficile de tirer beaucoup de conclusions de ces expériences. Et notamment du fait que le composé -RGD- **19** possède à lui seul un pouvoir d'association au récepteur intégrine très important et masque donc l'effet du double ciblage aux concentrations testées en récepteurs et en composés.

V.5. Bilan des travaux

Dans ce chapitre, nous avons mis au point plusieurs gabarits peptidiques et différentes ligations chimiosélectives permettant le greffage de plusieurs ligands de manière covalente. Ainsi, nous avons pu synthétiser 6 molécules complexes présentant à la fois le ligand -RGD- ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et les peptides GE11 ou ATWLPPR ciblant respectivement les récepteurs membranaires EGFR ou Nrp-1. Ces molécules marquées, ont pu par la suite être évaluées dans des tests d'adhésion cellulaire par cytométrie en flux et microscopie de fluorescence.

Concernant les molécules GE11, il apparaît que l'apport du GE11 sur le ciblage des cellules tumorales ne soit pas très important. Cependant, des expériences permettant la visualisation de la phosphorylation du récepteur ont montré que nos composés seraient des antagonistes du récepteur et qu'il pourrait par fixation avec celui-ci inhiber peut-être la division cellulaire.

Ces résultats sont actuellement à confirmer, et une nouvelle synthèse de composé devra être effectuée.

Pour les molécules ATWLPPR, les tests d'adhésion cellulaire ont montré une légère augmentation de l'affinité de nos composés et notamment pour le composé **88**. Cependant, l'augmentation de fluorescence est faible du fait du marquage déjà important induit par le composé -RGD- seul. Ces résultats restent à confirmer. La sélectivité de nos composés en fonction des récepteurs exprimés n'a donc pas pu être démontrée.

Par la suite des expériences d'études du mécanisme d'action des composés sont envisagées et pourraient permettre de mettre en évidence un avantage important du double ciblage que serait l'inhibition de la vascularisation des tumeurs *via* un effet antagoniste du peptide.

VI. Conception de mimes d'anticorps thérapeutiques

VI.1. Modèle choisi : Le rituximab

La présentation de nombreux antigènes sur la surface membranaire tels que CD20 dans le cas des lymphomes Non-Hodgkinien et des leucémies chroniques lymphocytaires constitue une cible potentielle pour le traitement du cancer. Comme nous l'avons vu, cet antigène peut être ciblé par des anticorps monoclonaux synthétiques comme le Rituximab. Il est utilisé depuis 1997 dans le traitement des cancers mais son utilisation reste rare, due aux nombreux inconvénients liés aux anticorps monoclonaux (comme un taux de rejet élevé dans le cas des anticorps non humanisés, un coût de production élevé et un poids moléculaire important). C'est pourquoi nous nous proposons de mimer le site de reconnaissance de celui-ci en développant des biomolécules totalement synthétiques présentant les mêmes peptides de reconnaissance *via* l'utilisation du châssis cyclodécapeptidique. L'efficacité de ce châssis a déjà été démontrée pour la présentation de nombreux ligands.

VI.1.1. Etude de l'interaction Rituximab CD-20

Un intérêt a été porté ces dernières années sur l'identification de la séquence épitopique reconnue par le rituximab. Dans le but de comprendre le mode d'action de l'anticorps, des études de mutagenicité ont été réalisées afin de déterminer les résidus essentiels pour la reconnaissance de l'épitope. Ainsi, il a été montré que les résidus Ala¹⁷⁰ et Pro¹⁷², présents dans la boucle extracellulaire, semblaient critiques pour la liaison avec sa cible¹³⁶. La sélection d'une librairie aléatoire d'heptapeptides par phage display a permis par la suite la mise en évidence de deux séquences clé : la première déjà identifiée comprenant les résidus Ala¹⁷⁰ et Pro¹⁷² ainsi qu'une seconde, le motif ¹⁷¹NPS¹⁷³¹³⁷. Des études similaires par phage display ont permis la détermination d'un autre motif de l'épitope, discontinu, compris entre les résidus ¹⁷¹ANPS¹⁷³ et ¹⁸²YCYSI¹⁸⁵. Il a été montré qu'utilisés séparément, ces peptides CD20 avaient une interaction faible avec le Rituximab et ce n'est que lorsque les deux peptides sont liés que l'interaction était plus importante¹³⁸. A travers cela, a été mise en avant l'importance de la liaison disulfure pour la conformation du peptide et la reconnaissance par l'anticorps. La rupture de ce lien engendre une diminution importante de l'affinité.

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

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

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

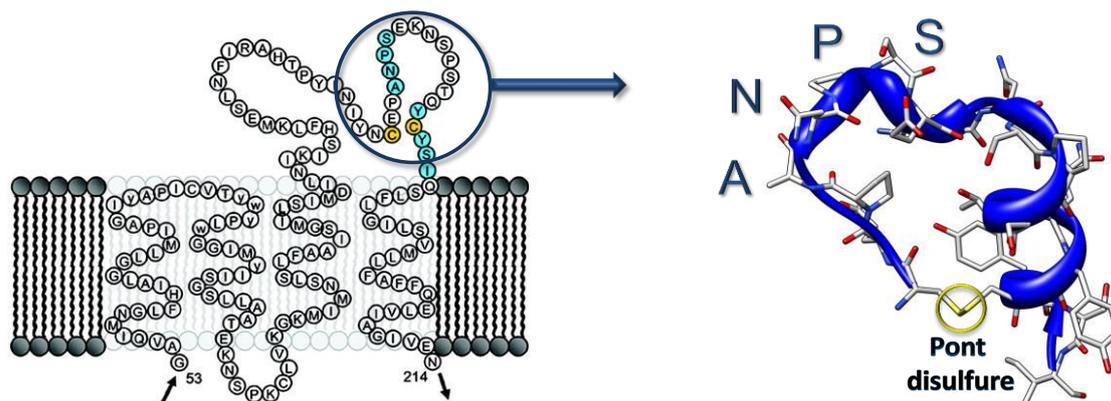


Figure 116 : (a) Représentation schématique des domaines transmembranaires et extracellulaires du CD20 (b) Structure du peptide mimant l'épitope de la boucle extracellulaire du CD20 (163-187)

Afin d'approfondir la connaissance du mécanisme de reconnaissance de CD20 par le Rituximab, Du et al. ont déterminé la structure cristalline du domaine Fab du rituximab associé à un peptide synthétique de la partie épitopique de CD20 (résidus 163-167). Afin d'apporter une structure comparable à celle présente sur la partie extracellulaire de la membrane, ils ont introduit un pont disulfure entre les résidus Cys¹⁶⁷ et Cys¹⁸³. Ils montrent ainsi grâce à la structure cristalline que l'épitope se situe à l'intérieur d'une poche hydrophobe formée par les boucles CDR H1, H2, H3 et L3 du domaine variable du mAb. Les résidus de ce motif forment un réseau de sept liaisons hydrogène avec les résidus des différentes boucles CDR environnantes comme Asn^{L93}, Ser^{H59}, Ser^{H99}, Trp^{H106}, Asn^{H55}, Asn^{H33} et Thr^{H58} (Figure 117c)¹³⁹. En plus de ces liaisons H, l'épitope interagit avec le Fab *via* de multiples interactions de type Van der Waals. Ces nombreuses interactions expliquent en partie la forte affinité du Rituximab pour l'épitope CD20 (Figure 117).

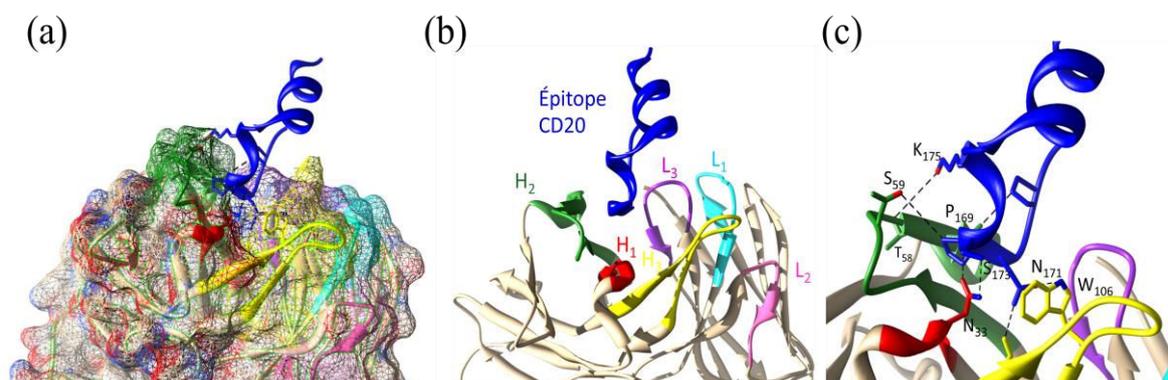
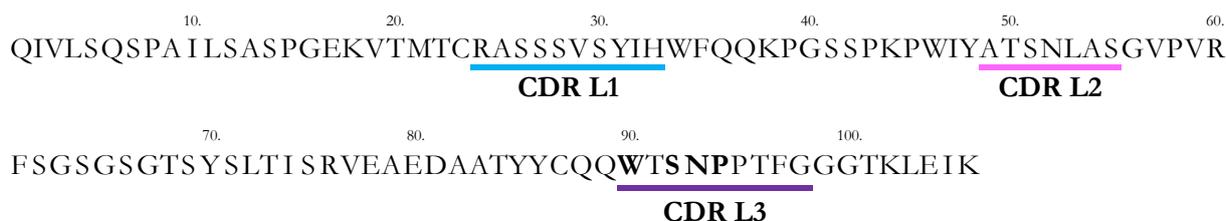


Figure 117 : (a) Représentation de la poche hydrophobe du Rituximab (b) Représentation des différentes boucles CDR du Rituximab interagissant avec l'épitope (c) Représentation des liaisons hydrogènes entre l'épitope et les boucles CDR H1, H2 et H3

Domaine variable de la chaîne légère (VL)

139. Du, J.; Wang, H.; Zhong, C.; Peng, B.; Zhang, M.; Li, B.; Huo, S.; Guo, Y.; Ding, J., Structural Basis for Recognition of CD20 by Therapeutic Antibody Rituximab. *J Biol Chem* **2007**, *282* (20), 15073-15080.



Domaine variable de la chaîne lourde (VH)

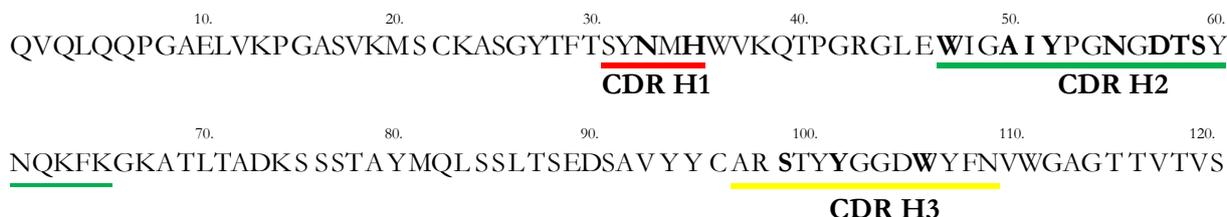


Figure 118 : Séquence du domaine variable de la chaîne légère et lourde du Rituximab (CDR souligné selon la nomenclature de Chothia, Résidu coloré en **rouge** : résidu impliqué dans une liaison hydrogène avec le CD20, Résidu coloré en **bleu** : résidu impliqué dans une interaction de type VDW avec le CD20)

VI.1.2. Travaux antérieurs : Recherche de fragments interagissant avec l'épitope CD20

Selon les travaux effectués précédemment au sein du laboratoire, au cours de la thèse de M. Galibert (2006-2009), la méthode SPOT a été utilisée pour rechercher les fragments peptidiques les plus affins pour l'épitope.

VI.1.2.1. Principe de la méthode SPOT

Présentée pour la première fois au début des années 90 et développée par R. Franck¹⁴⁰, la méthode SPOT est une technique qui permet la synthèse en parallèle de nombreux peptides de séquences différentes supportée sur une plaque de cellulose. Elle est présentée comme rapide et facile à mettre en œuvre et utilisée dans de nombreuses applications de screening (test d'affinité, études d'interactions ligands/récepteur)¹⁴¹. L'application la plus couramment utilisée reste cependant la recherche d'épitope antigénique *via* des interactions peptides/anticorps. Les peptides sont synthétisés, selon une stratégie Fmoc/tBu, par des dépôts de fines gouttelettes contenant les acides aminés activés sur une feuille de cellulose spécialement fonctionnalisée. Plusieurs centaines de peptides différents peuvent être préparés sur la membrane. Chaque spot contient une faible quantité de peptide mais avec une forte densité de l'ordre de 300 à 400 nmol/cm², permettant ainsi une présentation multivalente (Figure 119).

140. Frank, R., SPOT-Synthesis - An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **1992**, *48* (42), 9217-9232.

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

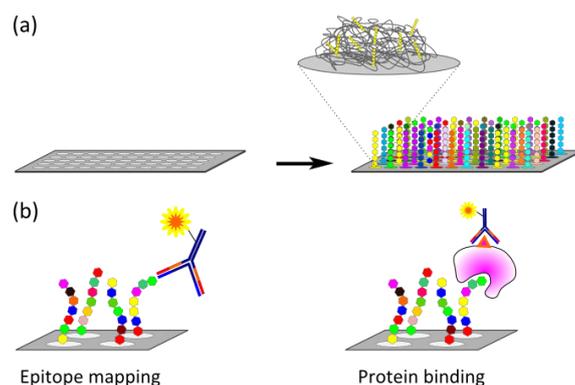


Figure 119 : (a) Immobilisation des peptides sur la membrane (b) Applications de la technique SPOT

Cette technique a été notamment beaucoup utilisée pour la recherche de fragments importants d'un antigène pour la reconnaissance de l'anticorps. La procédure consiste à synthétiser de courts fragments peptidiques qui balayent la totalité de la séquence protéique avec un chevauchement d'un à plusieurs résidus. Après incubation des membranes en présence d'anticorps marqués, on peut déterminer le site d'interaction d'un complexe antigène-anticorps. En 1997, Laune *et al.* ont employé une stratégie analogue pour identifier les fragments peptidiques d'un paratope de mAb présentant une affinité pour l'antigène¹⁴². Ils ont ainsi identifié plusieurs peptides dérivés d'un mAb anti-lysosomes ayant une forte affinité pour les lysozymes ($K_d = 4,1 \cdot 10^{-7}$ à $6,7 \cdot 10^{-8} \text{ mol}^{-1}$).

VI.1.2.2. Détermination des fragments peptidiques important pour la reconnaissance du Rituximab par méthode SPOT

En utilisant la méthode décrite par Laune et al. en 1997, il a été choisi d'utiliser la méthode SPOT afin de déterminer les résidus importants présent sur le domaine variable du Rituximab pour la reconnaissance de l'antigène. Pour cela et en collaboration avec le groupe de Dr F. Molina de Montpellier, M. Galibert a synthétisé de façon automatisée sur plaque de cellulose, *via* une stratégie Fmoc/tBu, de courts fragments peptidiques balayant l'ensemble du domaine variable avec un décalage d'un acide aminé. Ainsi 400 peptides de 6 et de 12 résidus issus de la séquence du domaine hypervariable de la chaîne lourde (VH) et de la chaîne légère (VL) ont été synthétisés sur 3 plaques de cellulose. En parallèle, a été synthétisé un mime de CD20 fluorescent comportant 24 résidus présentant une boucle *via* un pont disulfure. Nous avons pu par mesure de la fluorescence de chaque puits, après incubation avec l'antigène fluorescent, déterminer les peptides les plus importants pour la reconnaissance de l'épitope (Figure 120).

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

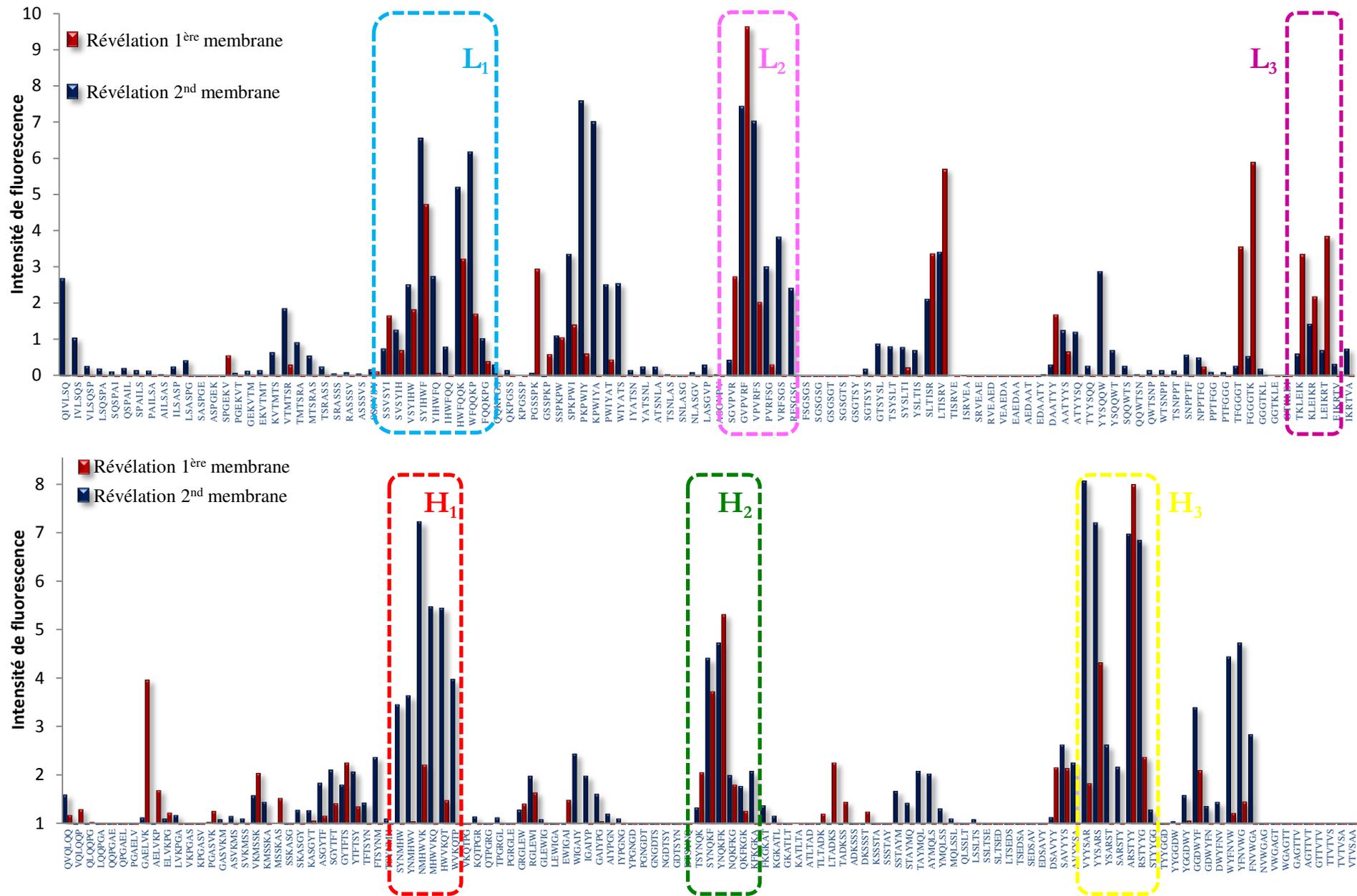
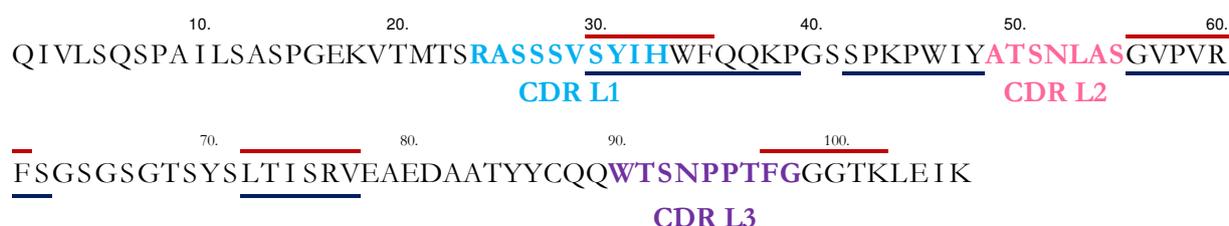


Figure 120 : Intensité de fluorescence des spots présentant les fragments hexapeptidiques de VL et VH après révélation à l'épitope marqué

Nous avons pu ainsi mettre en évidence plusieurs fragments de la boucle légère et de la boucle lourde semblant avoir une bonne affinité avec l'épitope fluorescent lorsqu'ils sont présentés à une concentration élevée sur la plaque de cellulose. Deux membranes identiques ont été synthétisées. Ces deux membranes réalisées présentent des résultats identiques, comme les peptides ³⁰SYIHW^{F35}, ⁵⁶GVPVRF⁶¹ et ⁷²LTISRV⁷⁷. La seconde membrane a montré une bien meilleure résolution et d'autres segments interagissant avec le CD20 ont pu être identifiés, comme ³⁴WFQQK^{P39} et ⁴²PKPW^{IY47} présents sur la boucle légère.

De la même manière l'analyse des fragments peptidiques du domaine VH a révélé trois zones d'interactions correspondant aux séquences des différentes boucles CDR (H1, H2 et H3). La première membrane a permis d'identifier deux segments de forte affinité ⁶⁰YNQKFK⁶⁵ et ⁹⁷ARSTYY¹⁰² provenant respectivement des CDR H2 et H3. La seconde membrane a révélé une zone d'interaction plus étendue et mieux définie. D'autres peptides de bonne affinité ont été déterminés, comme le segment ³³NMHWVK³⁸ provenant du CDR H1 ou les segments ⁹⁴YYSARS⁹⁹ et ¹⁰⁶WYFN^{VW111} provenant des deux extrémités de la boucle CDR H3.

Domaine variable de la chaîne légère (VL)



Domaine variable de la chaîne lourde (VH)

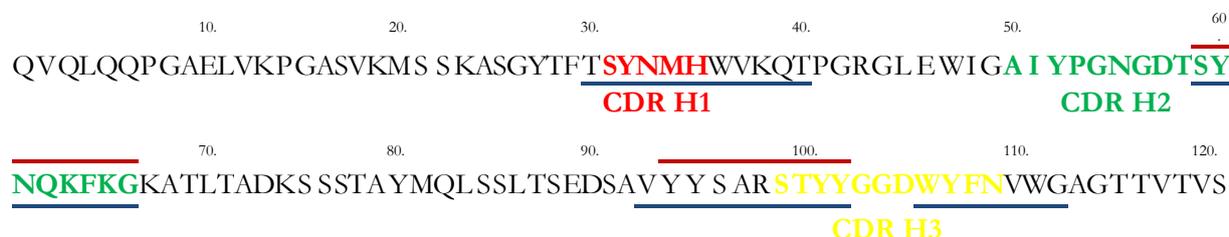


Figure 121 : Séquence du domaine variable de la chaîne lourde du Rituximab (Résidus en gras : résidus des boucles CDR déterminés par cristallographie, Résidus surlignés en rouge : résidus des fragments interagissant avec l'épitope déterminés par la 1^{ère} membrane, Résidus soulignés en bleu : résidus des fragments interagissant avec l'épitope déterminés par la 2nd membrane

Nous avons trouvé des résultats en accord à ceux déterminé par cristallographie. La boucle H3 semble la plus importante à la reconnaissance et les boucles H1 H2 et L3 possèdent des fragments de haute affinité. Cependant il apparait que les fragments que nous avons trouvés par SPOT semblent plus enfouis dans la poche hydrophobe. Selon l'étude cristallographique, la boucle CDRH2 interagit avec l'épitope *via* le segment ⁴⁷WIGAIYPGNGDTS⁵⁹ alors que la méthode SPOT révèle un segment plus éloigné correspondant à la séquence ⁶⁰YNQKFK⁶⁵. Ceci est également observé pour le segment ⁹⁴YYSARS⁹⁹ qui est situé juste à l'extrémité de la boucle

H3. Par contre, les peptides $^{33}\text{NMHWVK}^{38}$, $^{97}\text{ARSTYY}^{102}$ et $^{106}\text{WYFNVW}^{111}$ sont en parfait accord avec l'étude cristallographique.

VI.1.3. Synthèse des composés multivalents par ligation CuAAC

Afin de continuer l'étude débutée lors de la thèse de M. Galibert, nous avons choisi de synthétiser des mimes d'anticorps présentant tout d'abord, quatre fragments de reconnaissance identiques, orientés sur la partie supérieure du châssis cyclodécapeptidique. Le choix des hexapeptides à greffer a été fait en se basant sur l'étude SPOT réalisée précédemment. 16 peptides semblant avoir une bonne affinité avec CD20, lorsqu'ils sont présentés à une forte concentration sur la membrane de cellulose, ont ainsi pu être sélectionnés. Afin d'augmenter la multivalence et donc l'affinité, nous avons choisi de les greffer par des réactions CuAAC sur le composé cyclodécapeptidique déjà utilisé. Pour tenir compte de l'orientation de présentation des fragments dans l'anticorps, nous avons choisi de plus, de les lier à la fois sur l'extrémité N-terminale mais aussi sur l'extrémité C-terminale.

Pour cela nous avons dû développer plusieurs méthodes de synthèses afin de modifier et contrôler les différents sites de greffage.

VI.1.3.1. *Montage des fragments coté C-terminal sur le châssis peptidique*

Le châssis cyclodécapeptidique peut présenter jusqu'à quatre unités de ligands induisant une augmentation de la concentration locale et améliorant ainsi l'affinité pour le récepteur. Pour réaliser ces montages multivalents, nous avons sélectionné les fragments provenant des boucles CDRH1, CDRH2 et CDRH3 ainsi que des boucles légères CDRL1, et CDRL2 soit 16 peptides composés de six résidus (Figure 122). Sur la partie inférieure du gabarit nous avons fixé un fluorophore, afin de pouvoir suivre par cytométrie en flux l'affinité de nos composés envers les cellules surexprimant CD20.

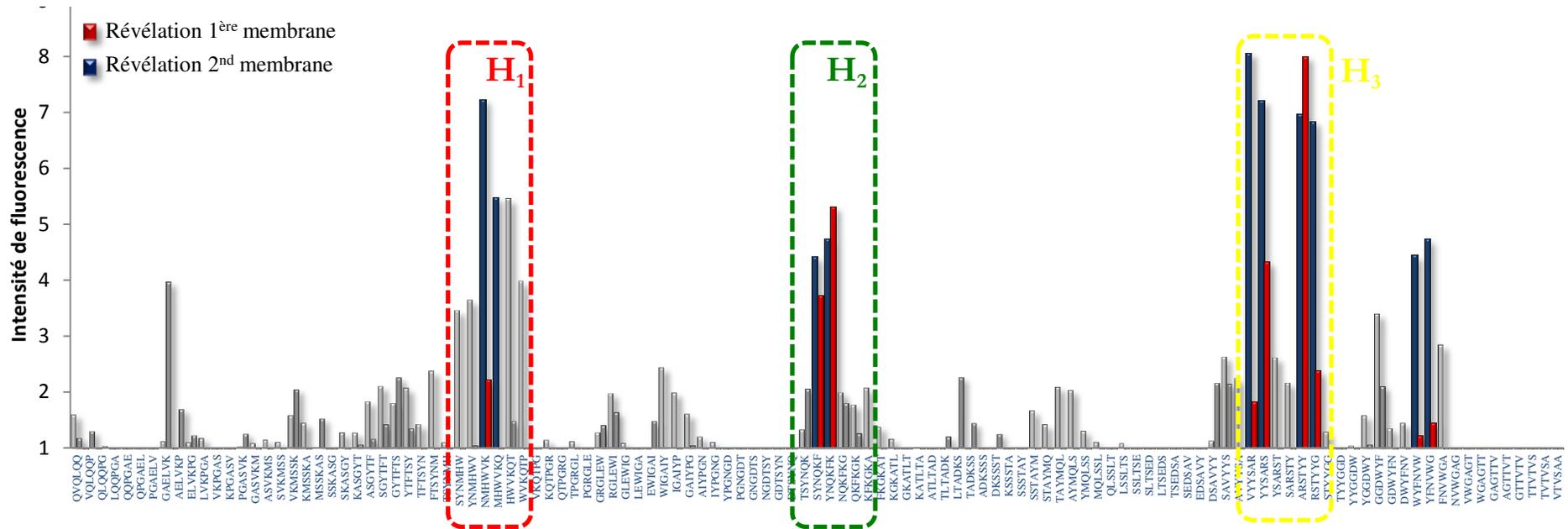
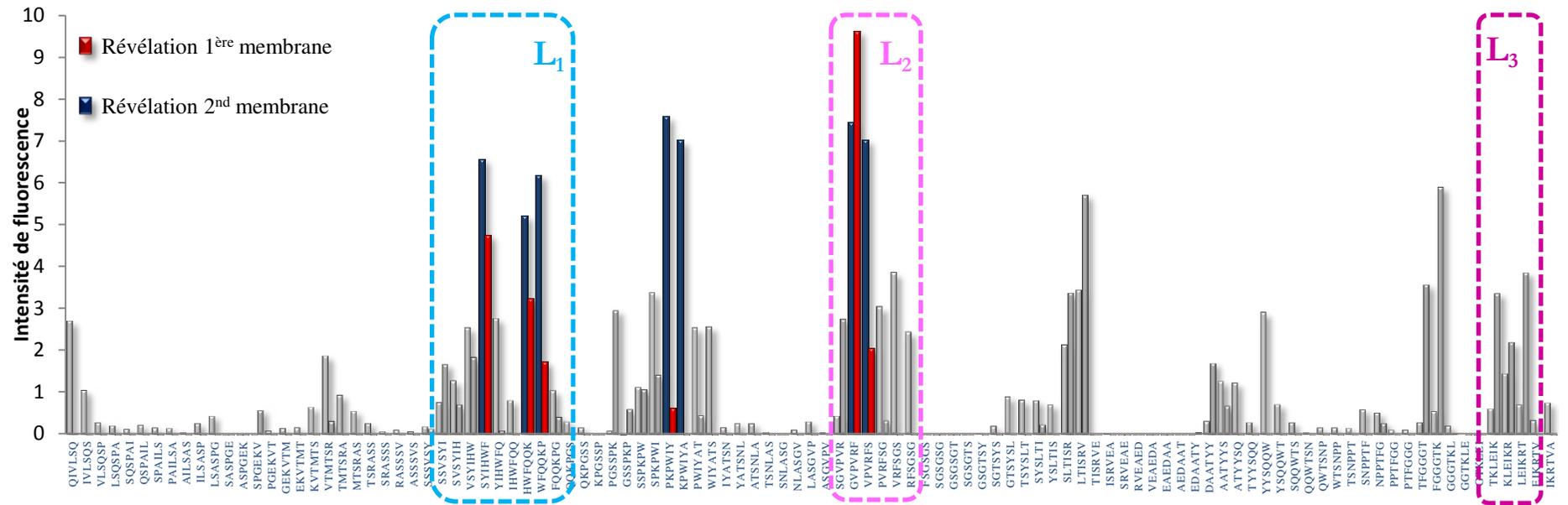


Figure 122 : Peptides sélectionnés de plus haute affinité avec CD20

- Synthèse du châssis fonctionnalisé par quatre groupements azoture

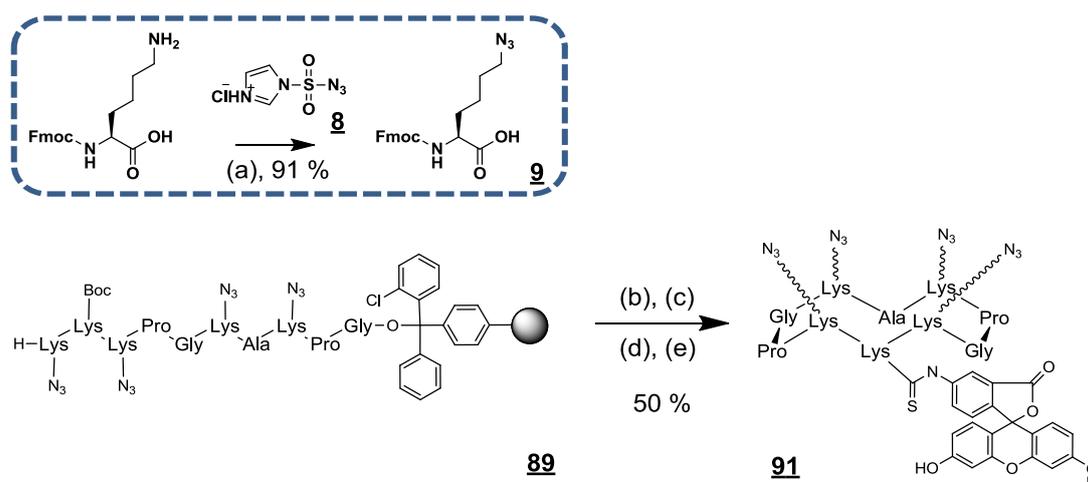


Figure 123 : Schéma de synthèse du châssis : Réactifs : (a) 0,05 éq. $ZnCl_2$, MeOH/ H_2O ; 8/2 (b) TFA/ CH_2Cl_2 ; 1/99 (c) 1,2 éq. PyBOP, DIPEA, DMF (d) TFA/ CH_2Cl_2 ; 70/30 (e) 2éq. FITC, DMF, DIPEA

La fonction azoture de la lysine **9** est introduite *via* l'utilisation d'un réactif de diazo transfert **8** qui va réagir en milieu basique en présence d'un catalyseur métallique sur la fonction amine en ϵ de la lysine. Cette lysine modifiée est obtenue avec un rendement de 91 % et une pureté suffisante pour son utilisation. La synthèse du peptide linéaire est réalisée par SPPS en introduisant de manière contrôlée la lysine modifiée **9**. Après décrochage de la résine en milieu faiblement acide, le peptide est cyclisé puis précipité dans l'éther pour donner le châssis avec une pureté satisfaisante. Le groupement boc est éliminé dans une solution de TFA/DCM (70/30) et la fluorescéine est introduite sur l'amine libre obtenue *via* un groupement isothiocyanate dans le DMF en milieu basique. Notre choix s'est porté sur la fonction isothiocyanate dû fait de sa haute réactivité envers les groupements amines, de sa facilitée d'utilisation et de sa disponibilité commerciale. Pour des raisons de coût et de disponibilité, nous avons choisi d'utiliser comme fluorophore la fluorescéine qui est classiquement utilisée dans les tests de cytométrie. Le composé final **91** est ainsi obtenu en quatre étapes et une purification finale avec un rendement de 50 % (Figure 123).

- Synthèse des fragments fonctionnalisés par une fonction alcyne

Afin de modifier la position C-terminale des hexapeptides sélectionnés, nous avons eu besoin de développer une méthode de synthèse permettant l'introduction d'une fonction alcyne directement sur la résine, l'élongation du peptide étant faite après la fonctionnalisation. Pour cela nous nous sommes basés sur des travaux publiés par M. Van Hest¹⁴³, montrant l'introduction de nombreux groupements fonctionnels *via* l'utilisation d'une résine présentant une fonction aldéhyde comme fonction réactive. La fonction a apportée étant alors introduite via une amination réductrice. La propargylamine est ainsi introduite sur une résine FMPB (4-(4-formyl-3-methoxyphenoxy)butyryl) à 80°C dans un mélange MeOH/DMF en présence de réducteur

143. Ten Brink, H. T.; Meijer, J. T.; Geel, R. V.; Damen, M.; Löwik, D. W. P. M.; van Hest, J. C. M., Solid-phase synthesis of C-terminally modified peptides. *J Pept Sci* **2006**, *12* (11), 686-692.

NaBH₃CN et d'acide acétique. Cette réaction conduit à une amine secondaire sur laquelle pourra être synthétisé un peptide de manière classique. Le premier couplage est cependant réalisé à deux reprises à cause de l'encombrement potentiel de l'amine secondaire. Le loading de la résine est lui déterminé après le couplage du premier acide aminé. De manière classique le loading obtenu est compris entre 0,45 et 0,55 mol/g. Le peptide est ensuite dissocié de la résine via une solution de TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5) ou TFA/TIS/H₂O/DIOD (92,5/2,5/2,5/2,5) lorsque le peptide contient un résidu méthionine.

Via cette méthode, nous avons put synthétiser 13 peptides parmi les 16 sélectionnés avec des rendements compris entre 35 et 80% selon les séquences après purification par HPLC préparative (

Figure 124).

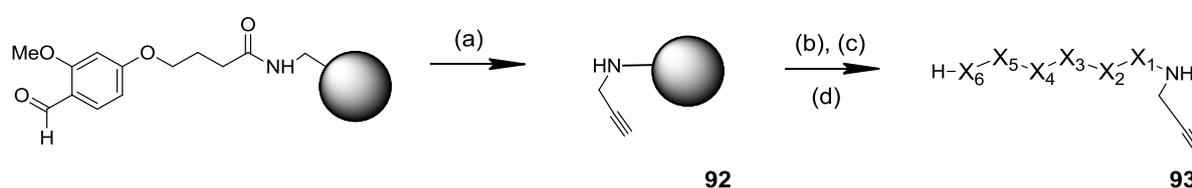


Figure 124 : Schéma de synthèse des hexapeptides : Réactifs : (a) 10 éq. NaBH₃CN, 10 éq. AcOH, MeOH/DMF ; 1/1 (b) 2 éq. PyBOP, 2 éq. A.A, DIPEA, DMF (c) Piperidine 20%/DMF (d) TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5)

- **Assemblage des fragments sur l'extrémité C-terminale par ligation CuAAC**

Au début des travaux nous avons sélectionné plusieurs protocoles déjà utilisés au laboratoire permettant l'assemblage des fragments synthétisés sur le châssis moléculaire *via* la ligation CuAAC.

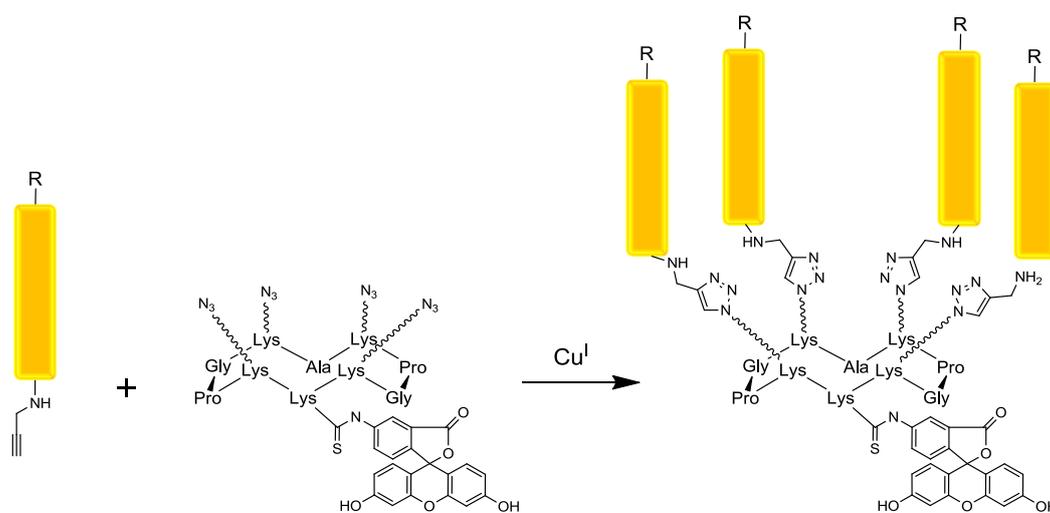


Figure 125 : Schéma de l'assemblage des fragments par CuAAC sur le châssis peptidique

Plusieurs systèmes catalytiques au cuivre ont été testés comme les poudres de cuivre 0 (micro et nano) le sulfate de cuivre, ou les sels de cuivre I comme CuI, CuBr, ou CuOAc. L'oxydation du cuivre métallique est une méthode déjà décrite dans la littérature pour générer du Cu^I catalytique pour la réaction. Cependant cette réaction d'oxydation est lente et requiert l'utilisation d'un excès important de cuivre. L'utilisation de nanopoudre de cuivre semble être une bonne alternative, mais la dissolution oxydative du cuivre activé sous forme de nanopoudre nécessite l'utilisation de sels de chlorure d'ammonium. L'utilisation de nanopoudre de cuivre a montré de très bon résultats et une haute tolérance à beaucoup de groupements fonctionnels¹⁴⁴. Cependant une grande quantité de cuivre en solution est formée ce qui s'est avéré être un inconvénient majeur à l'utilisation de ce fournisseur de cuivre. En effet cette grande quantité de cuivre pourrait interagir et donc dégrader les nombreux groupements fonctionnels présents sur nos biomolécules. Nous avons par la suite testé les sels de cuivre I. Ils sont pratiques car rapide à mettre en œuvre. Cependant leur utilisation reste pour la plupart difficile à envisager pour le couplage de biomolécules, car souvent insolubles en milieu aqueux.

La méthode testée la plus efficace semble être la méthode la plus couramment utilisée avec comme fournisseur de cuivre le CuSO₄ réduit *in situ* par de l'ascorbate de sodium mis en excès. Cette méthode ne nous a pourtant pas permis d'obtenir le couplage de quatre fragments identiques sur le châssis. Il apparaît que les temps de réaction sont longs malgré un chauffage de la réaction jusqu'à 50°C. Nous obtenons dans les cas les plus favorables deux ou trois couplages de fragments hexapeptidiques, mais difficilement quatre (Figure 126). Il semble que la solubilité des espèces formées ainsi que l'encombrement stérique apporté par les quatre fragments empêche l'avancement total de la réaction et la formation de l'espèce présentant quatre fragments peptidiques.

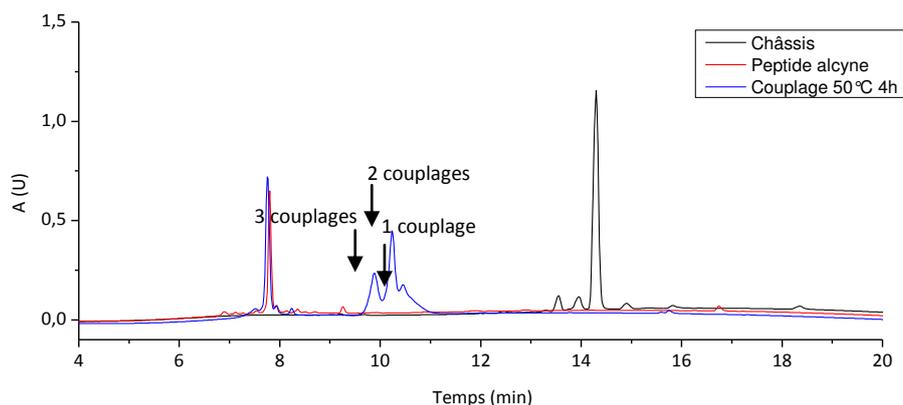


Figure 126 : Chromatogramme HPLC du couplage du peptide SYNQKF alcyne sur le châssis **111** en présence de 1 éq. de CuSO₄ et 5 éq. d'ascorbate de sodium à 50°C après 4h de réaction.

144. Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H., CuI-Catalyzed Alkyne–Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *Eur J Org Chem* **2006**, 2006 (1), 51-68.

Nous nous sommes ensuite tournés vers l'utilisation des micro-ondes dans le but d'augmenter l'énergie apportée au système et ainsi faciliter la réaction de couplage. Plusieurs effets peuvent être attribués aux micro-ondes.

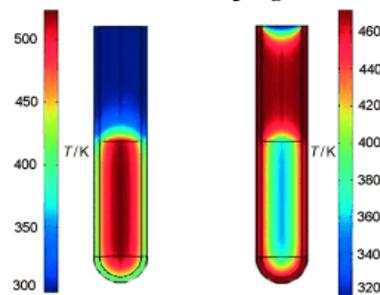


Figure 127 : Gradient de température après une minute de chauffage par micro-ondes (gauche) comparé à un chauffage classique par bain d'huile (droite).

L'apport énergétique apporté au solvant polaire est tout d'abord beaucoup plus important qu'avec un chauffage classique. Ceci permet d'arriver à des températures élevées en quelques instants et ainsi diminuer les temps de réaction de plusieurs facteurs (Figure 127).

Plusieurs groupes ont de plus émis l'hypothèse qu'il existerait d'autres avantages, non liés à l'apport énergétique sur le solvant¹⁴⁵. Lorsque l'intermédiaire réactionnel ou les espèces réactives possèdent une polarité intrinsèque, les micro-ondes pourraient faciliter la réaction. Dans le cas des peptides, la partie N-terminale, et le squelette polypeptidique sont polaires. Sous l'influence de micro-ondes, ils vont ainsi constamment tenter de s'aligner avec le champ électrique. Ceci va alors aider à rompre les interactions inter ou intra-brins permettant de libérer la fonction réactive pour la réaction¹⁴⁶.

Nous avons ainsi essayé de coupler, *via* la réaction de click chemistry sous irradiation micro-ondes nos fragments hexapeptidiques sélectionnés. Les réactions ont été effectuées en présence de 1 équivalent de CuSO_4 , 5 équivalents d'ascorbate de sodium dans un solvant : tampon PBS (100mM, pH=7.5)/DMF (1/1) ou tampon PBS (100mM, pH=7.5)/tBuOH (1/1). Nous avons réussi, grâce à ces conditions, à obtenir les assemblages finaux sur plusieurs peptides sélectionnés tels que VPVRFS, YYSARS, SYIHWf, WFQQKP et ARSTYY. Cependant, il apparaît que de nombreuses dégradations ont lieu sur les peptides au cours de la synthèse sous irradiations. Les pics des chromatogrammes HPLC des produits obtenus ne sont pas fins et des sous-produits d'oxydation sont visibles par spectrométrie de masse. Ceci dépend de la séquence des peptides utilisés. En effet certains assemblages comme avec ARSTYY sont obtenus après 30 minutes d'irradiations à 50°C de façon très propre alors que d'autres nécessitent un temps de réaction plus long allant jusqu'à 1h30 et une purification plus difficile due aux nombreux sous produits de dégradation (Figure 128).

145. (a) Kappe, C. O., Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43* (46), 6250-6284; (b) de la Hoz, A.; Diaz-Ortiz, A.; Moreno, A., Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem Soc Rev* **2005**, *34* (2), 164-178.

146. Jonathan Collins, M. J. C. J., Sandeep K Singh, Grace Vanier, Hillary Merriweather, Alicia Douglas, Zachary J Cox, Recent developments in microwave enhanced solid phase peptide synthesis. *4th international peptide symposium, 7th Australian peptide conference and 2nd Asia-pacific international peptide symposium* **2007**.

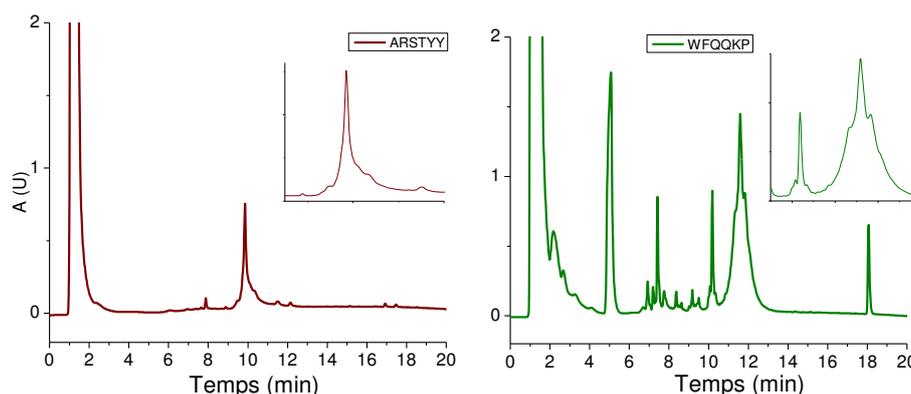


Figure 128 : Chromatogramme HPLC des couplages par click-chemistry *via* micro-ondes des fragments (a) ARSTYY 30 minutes et (b) WFQQKP 1h30, 50°C.

Ainsi 5 produits ont pu être synthétisés mais certains avec des rendements faibles de l'ordre de 20% dus à la difficulté à isoler le produit par chromatographie parmi les nombreux sous-produits de dégradation.

Une avancée majeure dans cette ligation est l'utilisation de ligands du cuivre permettant de le solubiliser et de stabiliser l'espèce réactive, et ainsi de diminuer les réactions parasites de dégradations des biomolécules. Tous ces ligands et notamment le THPTA (tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine) ont montré un réel apport pour l'utilisation de la réaction de click chemistry dans le marquage et la conjugaison de biomolécules. Hong et al. reportent en 2009 un protocole utilisant le THPTA permettant une nette diminution des réactions parasites liées au cuivre et une augmentation nette de la cinétique de la réaction en solvant aqueux⁷⁴.

Nous avons donc décidé par la suite, en vue des nombreuses publications sur le sujet, d'utiliser un ligand du cuivre permettant à la fois de solubiliser le cuivre I dans les solvants aqueux, d'augmenter ainsi les vitesses de réaction, mais aussi de diminuer grandement les réactions parasites de dégradations. Le THPTA a été synthétisé, afin de vérifier ces effets sur la bioconjugaison et l'assemblage des fragments peptidiques sur le châssis moléculaire. Le ligand est synthétisé en trois étapes à partir du protocole décrit par Hong en 2009. La purification du composé THPTA étant difficile par chromatographie sur gel de silice, il est préparé préalablement sous sa forme protégée par trois groupements acétate. Le 3-Azidopropyl acetate **30** est préparé par acétylation du groupement alcool par un mélange $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Et}_3\text{N}$ en une heure et remplacement du précurseur bromide par un sel d'azoture. Il est isolé par extraction dans un solvant organique et obtenu par évaporation des solvants sous pression réduite. La réaction CuAAC avec la tripropargylamine commerciale est effectuée avec un léger excès de composé **30** sous argon en présence de 5% de catalyseur $\text{Cu}^{\text{I}}\text{OAc}$ à reflux dans le THF pendant une nuit. Le cuivre dissout rendant difficile la purification est éliminé du milieu réactionnel grâce à une résine Chelex. Le composé formé est purifié sur gel de silice et directement déprotégé en une heure par une solution de MeONa dans le MeOH pour donner le THPTA final **31** sous forme d'une poudre blanche après précipitation et sonication dans l'acétonitrile (Figure 129).

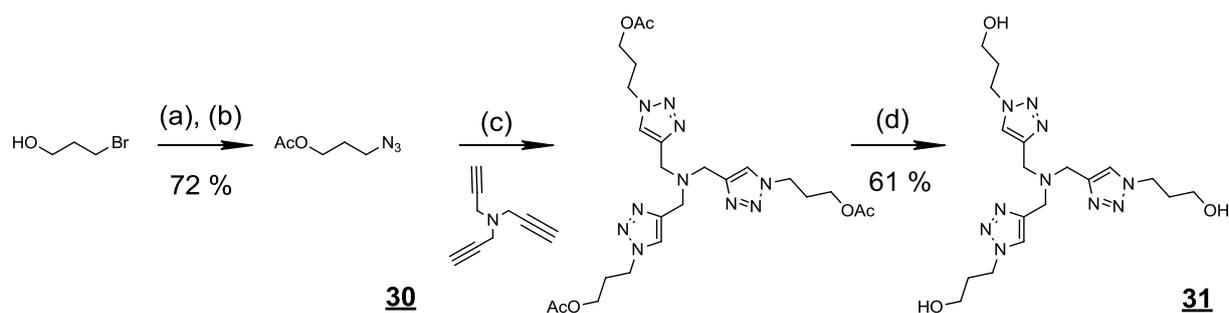


Figure 129 : Schéma de synthèse du THPTA **31** : Réactifs : (a) AC₂O/Et₃N ; 1 éq./1 éq., DCM (b) 2 éq. NaN₃, H₂O (c) 0,25 éq. trispropargylamine, Cu^IOAc (5%), THF (d) MeONa/MeOH (pH = 9)

Le couplage des fragments peptidiques modifiés par une fonction alcyne sur la partie C-terminale a ensuite été évalué *via* l'utilisation du THPTA. Le couplage est effectué en milieu anaérobie en présence de cinq équivalents de peptide, 1 équivalent de cuivre, 5 équivalents de réducteur et 2 équivalents de THPTA. Nous avons pu, grâce à l'utilisation de ce ligand effectuer le couplage des fragments sélectionnés en milieu aqueux avec l'apport d'une certaine quantité de solvant organique (ACN ou DMF) suivant les peptides utilisés. Les cinétiques de couplage de quatre fragments sur le châssis sont considérablement plus rapides et ne nécessitent en général que 1 à 2h de réaction à 50°C. Les rendements sont meilleurs (35 à 80% après purification) et les profils HPLC obtenus après couplage montrent beaucoup moins de sous-produits (Figure 130).

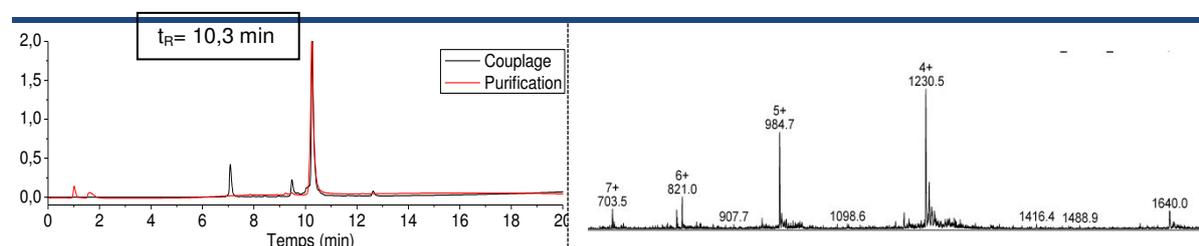


Figure 130 : Chromatogramme HPLC et Analyse ESI+ de l'assemblage avec le fragment NMHWVK **108**

Ainsi, 11 composés supplémentaires ont pu être synthétisés pour des tests d'adhésion cellulaire (Figure 131).

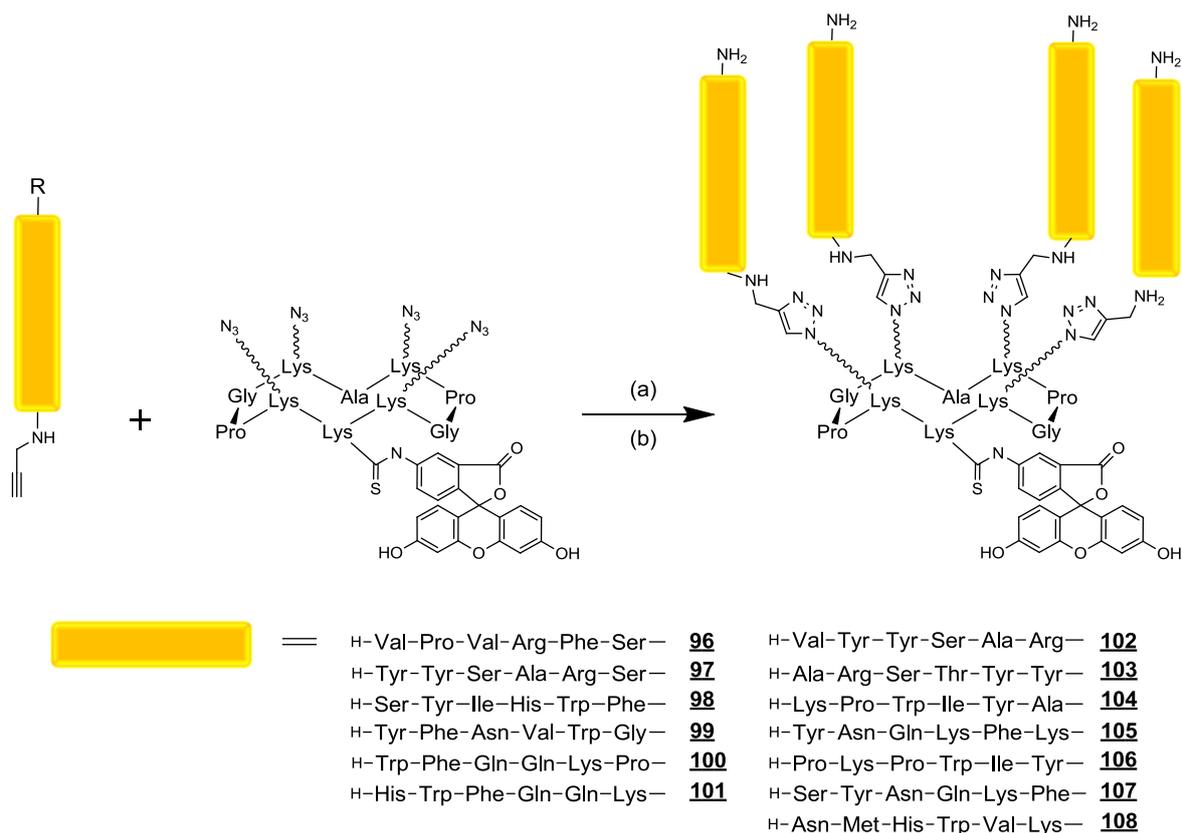


Figure 131 : Schéma de synthèse des assemblages finaux : Réactifs : (a) CuSO₄, Ascorbate de sodium, DMF, micro-ondes; (b) CuSO₄, Ascorbate de sodium, THPTA, tampon PBS (pH=7,4)/ACN ou DMF

VI.1.3.2. *Evaluation des différents assemblages*

L'évaluation biologique des produits a été réalisée par l'équipe du Prof. Jean-Jacques Fournié, spécialisée dans l'immunité innée et les hémopathies malignes (INSERM U563, Toulouse). La capacité d'adhésion des composés fluorescents a été déterminée sur deux modèles de cellules : les cellules DAUDI et RL exprimant CD20, et les cellules JURKAT et THP1 dépourvues de CD20. Pour effectuer ce test, les cellules ont été incubées avec les différents peptides **96** à **108** et un anticorps anti-CD20 utilisé comme contrôle. Après rinçage, la fluorescence des cellules immobilisées est quantifiée par cytométrie de flux. Les résultats obtenus avec les assemblages **96** à **108** sont répertoriés dans la figure suivante (Figure 132)

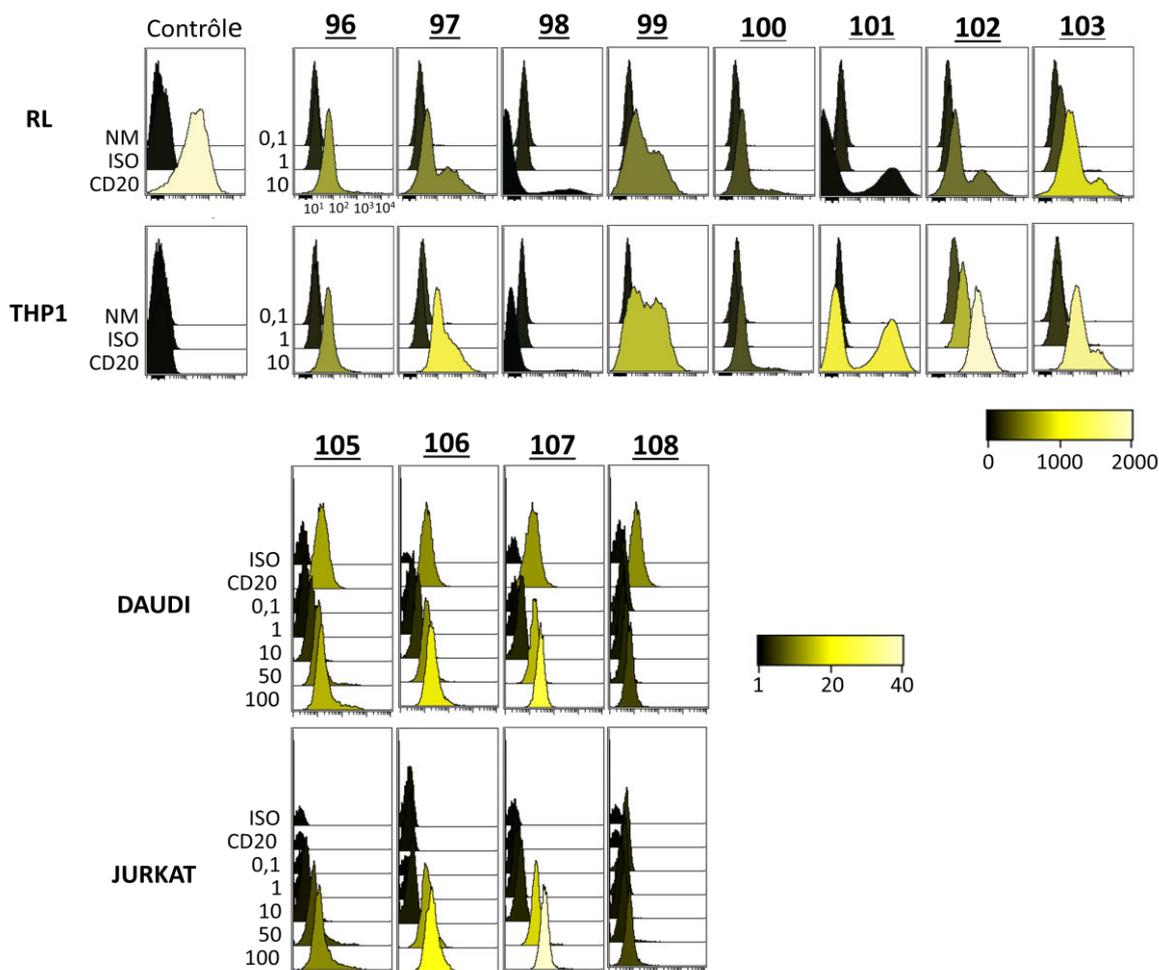


Figure 132 : Analyse FACS des composés **96** à **108**

En comparaison avec l'anticorps anti-CD20, les composés analysés sont peu spécifiques vis-à-vis des cellules exprimant CD20. Aucun composé s'est révélé efficace et montre une meilleure spécificité pour les cellules CD20+ par rapport aux cellules CD20-. Il apparaît sur ces résultats qu'une concentration de 1 à 10 μ molaire est nécessaire pour détecter une adhésion sur les cellules. Cependant, et étonnamment, les peptides **101**, **102** et **103** adhèrent préférentiellement sur les cellules n'exprimant pas l'antigène. Cette forte adhésion non-spécifique de nos composés est probablement causée par une forte charge positive. En effet, ces peptides présentent de nombreux résidus chargés (lysine et arginine) qui sont connus pour interagir avec la membrane cellulaire par interaction ionique. L'extrémité N-terminale n'étant pas protégée, elle apporte de plus une charge supplémentaire importante à nos molécules pouvant de la même façon augmenter la non-spécificité de nos composés. Nous avons donc décidé dans la suite du projet de protéger les fonctions terminales des fragments. Quelques composés importants pour la reconnaissance ont été de plus synthétisés par greffage *via* le côté N-terminale afin de vérifier l'importance de la direction de présentation des fragments.

- Synthèse des fragments fonctionnalisés par une fonction alcyne protégée sur le côté C-terminale et assemblage sur le châssis.

De la même façon que précédemment, les peptides sont synthétisés *via* une élongation sur support solide sur une résine préalablement fonctionnalisée par une fonction alcyne. Après déprotection du dernier groupement Fmoc, la résine est placée dans une solution d'Ac₂O/pyridine/DCM pendant 45 minutes et l'opération est répétée deux fois afin de s'assurer de la complète protection de la fonction amine terminale. Le peptide est détaché de la résine par une solution de TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5) ou TFA/TIS/H₂O/DIOD (92,5//2,5/2,5/2,5) lorsque le peptide contient un résidu méthionine. *Via* cette méthode, nous avons pu synthétiser 3 peptides semblant importants pour la reconnaissance et présent sur les boucles L1 et H3 avec de bons rendements, entre 40 et 65% suivant les séquences, après purification par HPLC préparative (Figure 133).

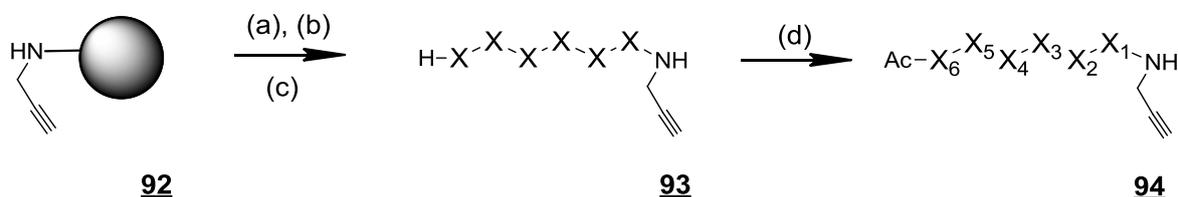


Figure 133 : Schéma de synthèse des fragments protégés : Réactifs : (a) 2 éq. PyBOP, 2 éq. A.A, DIPEA, DMF (b) Piperidine 20%/DMF (c) TFA/TIS/H₂O ; 95/2,5/2,5 (d) AC₂O/pyridine/DCM ; 2/1/7

Comme précédemment, nous avons assemblé les fragments synthétisés sur le châssis par cycloaddition de Huisgen, catalysée au cuivre, en présence de ligand THPTA. Ainsi, 4 composés supplémentaires, avec l'extrémité N-terminale des fragments protégée, ont pu être synthétisés pour les tests d'adhésion cellulaire (Figure 134). Le rendement de couplage est bon et permet d'obtenir les composés avec une excellente pureté après purification par HPLC préparative (Tableau 10).

Produits	Séquences	Formule	MW Calc	MW	RP-HPLC	Rdt
109	Ac-Ala-Arg-Ser-Thr-Tyr-Tyr-	C ₂₁₆ H ₂₉₆ N ₆₄ O ₅₅ S	4701,2	4700,0	10,2	56%
110	Ac-Trp-Phe-Gln-Gln-Lys-Pro-	C ₂₅₂ H ₃₃₂ N ₆₈ O ₅₁ S	5161,9	5163,5	12,4	61%
111	Ac-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Arg-Ser-	C ₂₂₀ H ₂₉₆ N ₆₄ O ₅₉ S	4813,3	4813,6	10,4	38%
112	Ac-Tyr-Phe-Asn-Val-Trp-Gly-	C ₂₄₈ H ₃₀₀ N ₆₀ O ₅₁ S	4969,6	4969,9	11,4	42%

Tableau 10 : Analyse par HPLC et spectrométrie de masse des composés 109 à 112 et rendements de couplage des fragments

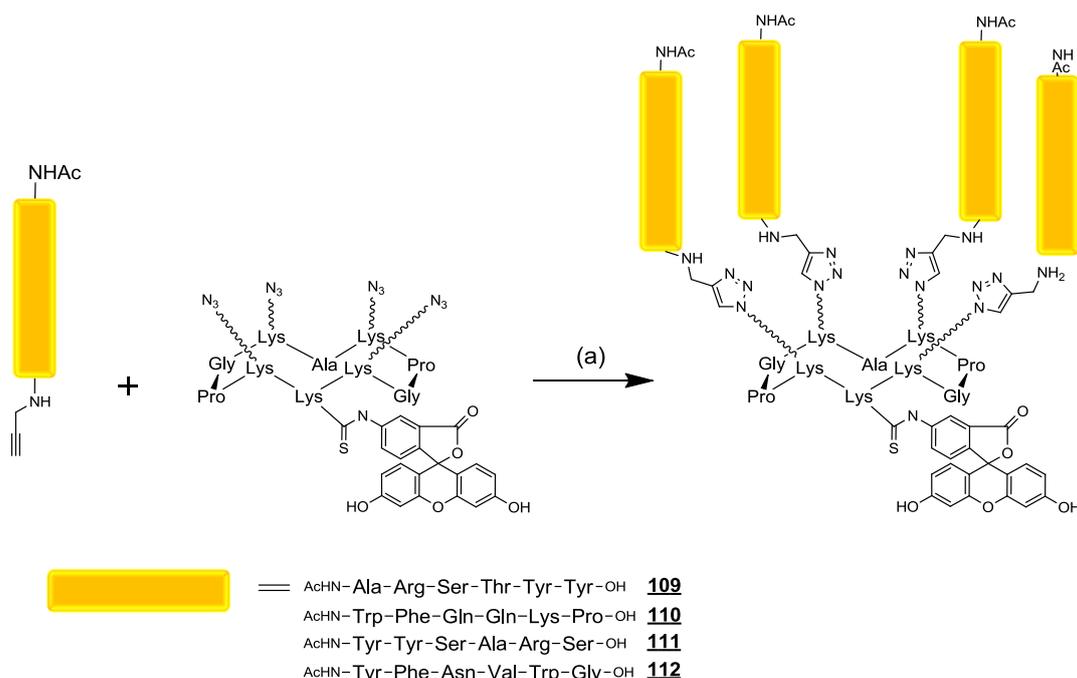


Figure 134 : Schéma de synthèse des assemblages finaux : Réactifs (a) CuSO₄, Ascorbate de sodium, THPTA, tampon PBS (ph=7,4)/ACN ou DMF

- **Synthèse des fragments fonctionnalisé par une fonction alcyne sur le coté N-terminale et assemblage sur le châssis.**

Les peptides sont assemblés sur une résine Rink amide (loading 0,5 mmol/g) *via* la méthode classique de synthèse peptidique. Après déprotection du groupement final fmoc, la fonction alcyne est introduite *via* un couplage peptidique classique avec comme agent de couplage le PyBOP. Le peptide est relargué de la résine par une solution de TFA/TIS/H₂O. On obtient ainsi les hexapeptides fonctionnalisés, avec de bons rendements (de 30 à 65%), après purification par HPLC préparative (Figure 135).

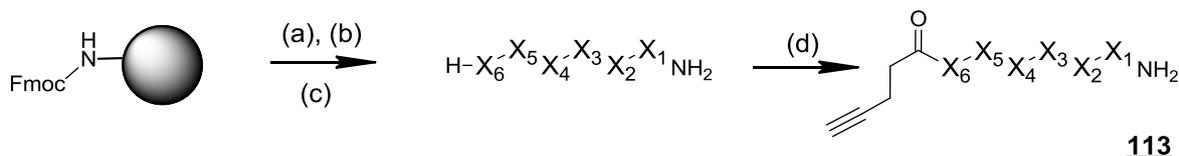


Figure 135 : Schéma de synthèse des hexapeptides alcynes fonctionnalisés sur la partie N-terminale : Réactifs : (a) 2 éq. PyBOP, 2 éq. A.A, DIPEA, DMF (b) Piperidine 20%/DMF (c) TFA/TIS/H₂O ; 95/2,5/2,5 (d) 2 éq. acide pentynoïque, 2 éq. PyBOP, DIPEA, DMF

L'assemblage des fragments sur le châssis moléculaire est effectué par la méthode développée précédemment en présence de cuivre I et de ligand THPTA. Ainsi, 2 composés supplémentaires greffés à l'extrémité N-terminale, ont pu être synthétisés pour les tests d'adhésion cellulaire (Figure 136). Le rendement de couplage est satisfaisant et permet d'obtenir les composés avec une excellente pureté après purification par HPLC préparative (Tableau 11).

Produits	Séquences	Formule	MW Calc.	MW	RP-HPLC	Rdt
115	- Tyr-Phe-Asn-Val-Trp-Gly-NH ₂	C ₂₄₈ H ₃₀₀ N ₆₀ O ₅₁ S	4969,6	4970,0	11,5	66%
116	- Ala-Arg-Ser-Thr-Tyr-Tyr-NH ₂	C ₂₂₄ H ₃₀₄ N ₆₄ O ₅₉ S	4869,4	4869,8	11,7	81%

Tableau 11 : Analyse par HPLC et spectrométrie de masse des composés **115** et **116** et rendements de couplage des fragments

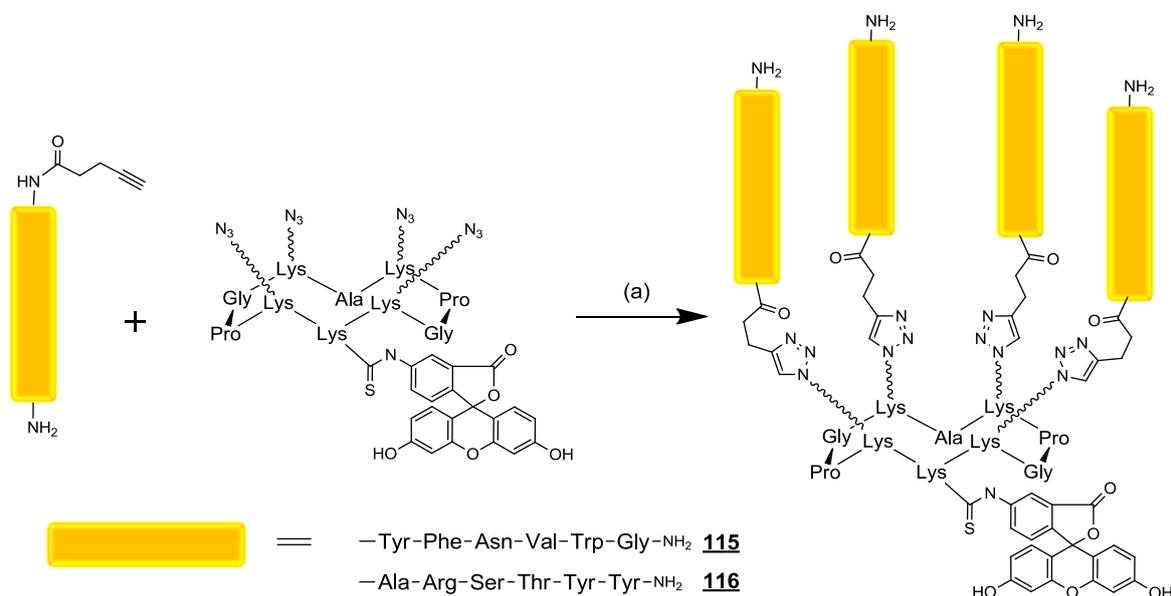


Figure 136 : Schéma de synthèse des assemblages finaux : Réactifs (a) CuSO₄, ascorbate de sodium, THPTA, tampon PBS (ph=7,4)/ACN ou DMF

VI.1.4. Evaluation des différents assemblages

La capacité d'adhésion des composés fluorescents synthétisés, protégés sur la fonction N-terminale, ou greffés sur l'extrémité C-terminale, a été déterminée sur des mêmes modèles de cellules exprimant CD20 (DAUDI et RL), et des cellules dépourvues de CD20 (JURKAT et THP1). Pour effectuer ces tests, les cellules ont été incubées avec les différents peptides **109** à **112**, **115** et **116**. Un anticorps anti-CD20 est utilisé comme contrôle. Après rinçage, la fluorescence des cellules immobilisées est quantifiée par cytométrie en flux. Les résultats obtenus avec les montages sont répertoriés dans les graphes suivants (Figure 137)

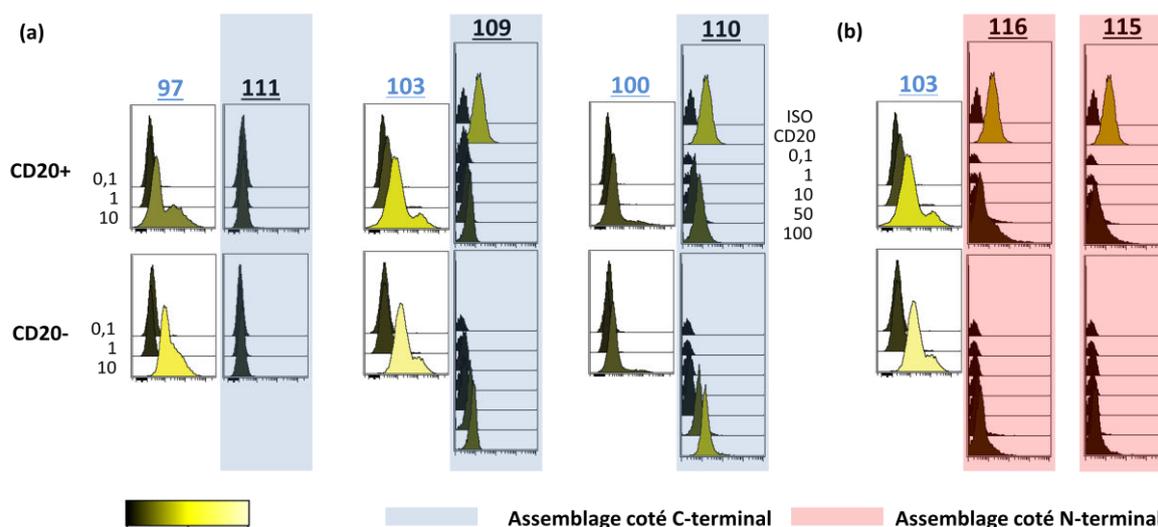


Figure 137 : Analyse FACS des composés **109** à **111**, **115** et **116** : (a) assemblage coté C-terminale avec l'extrémité N-terminale protégée (b) assemblage coté N-terminale, en comparaison avec les peptides déjà synthétisés

L'analyse des résultats révèle que les composés synthétisés, avec l'extrémité N-terminale protégée, ne semblent pas interagir avec les cellules DAUDI ou RL exprimant CD20. Étonnamment, il semble qu'au contraire, à des concentrations élevées, les composés **109** et **110** soient plus spécifiques de la lignée cellulaire THP1 utilisée comme référence (Figure 137a). Seul les composés **115** et **116** semblent se révéler un peu plus efficaces et montrent une meilleure spécificité pour les cellules CD20+ (Figure 137b). Le sens de présentation semble donc très important pour la reconnaissance de l'épitope.

Compte tenu de ces résultats, nous avons décidé d'arrêter la synthèse des composés multivalents avec les fragments linéaires et de synthétiser un composé tritopique possédant trois fragments différents afin de mimer de façon plus complète le site de reconnaissance. Les fragments nous semblant les plus intéressants seront de plus contraints sous forme cyclique et assemblés de façon multivalente sur le châssis moléculaire.

- **Synthèse d'un composé présentant 3 fragments importants à la reconnaissance de l'épitope, un mime de seconde génération**

Afin de greffer sur le châssis moléculaire 3 fragments différents, de façon spatialement contrôlée, nous avons utilisé plusieurs types de ligations chimiosélectives développées dans notre laboratoire¹⁴⁷.

¹⁴⁷ (b) Galibert, M.; Renaudet, O.; Dumy, P.; Boturyn, D., Access to Biomolecular Assemblies through One-Pot Triple Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew Chem Int Edit* **2011**, *50* (8), 1901-1904.

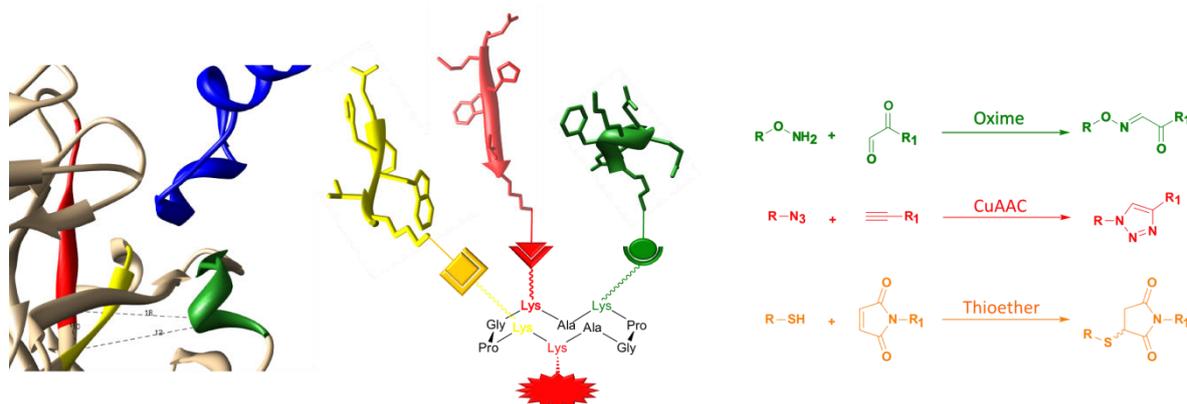


Figure 138 : Structure cristallographique de la partie CDR du rituximab et assemblage des trois fragments issus de H1, H2 et H3 sur le châssis moléculaire

En vue des études SPOT et de la structure PDB (protein data bank), issue de la cristallisation du rituximab avec son épitope, nous pouvons mettre en évidence trois fragments, semblant essentiels à la reconnaissance, présents sur les boucles lourdes H1, H2 et H3. Les distances calculées entre ces trois fragments sont comprises entre 10 et 18 angstrom. Ces distances sont en accord avec l'écartement que peut induire le châssis avec des espaceurs courts. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le châssis cyclodécapéptidique modifié par 3 fonctions chimiquement orthogonales sur la partie supérieure. La partie inférieure est protégée et peut être déprotégée sélectivement pour l'accroche d'un fluorophore afin de réaliser des tests d'adhésion cellulaires. De nombreuses synthèses préalables, de différents châssis moléculaires, nous ont permis d'étudier l'orthogonalité des différentes fonctions utilisables et leur stabilité relative (ligation thiol/maléimide ; oxime ; CuAAC ; amide).

L'introduction de la fonction maléimide, doit être réalisée après la synthèse en phase solide car cette fonction n'est pas stable en milieu basique lors de la déprotection des groupements fmoc par la pipéridine¹⁴⁸. Pour cela le châssis doit posséder deux groupements protecteurs orthogonaux sur deux lysines pour l'introduction du fluorophore et de la fonction maléimide. Les fonctions aldéhyde et alcyne, plus stables, sont elles, directement introduites au cours de la synthèse sur phase solide.

Dans un premier temps, l'utilisation du groupement protecteur Dde avait été testée. Cependant, une quantité importante d'hydrazine est nécessaire pour sa déprotection, ce qui induit la réduction des fonctions azotures et des réactions indésirables avec la fonction maléimide. De plus l'hydrazine étant difficile à éliminer du milieu réactionnel, il est difficile d'effectuer à la suite de la déprotection, une réaction de couplage entre la fonction amine et un ester activé. La totalité de la fonction ester activé réagit sur l'excès d'hydrazine restant dans le milieu. Suite à cela, nous avons décidé d'utiliser la fonction boc et la fonction alloc comme protections orthogonales des lysines de part et d'autre du cycle peptidique.

148. Marburg, S.; Neckers, A. C.; Griffin, P. R., Introduction of the Maleimide Function onto Resin-Bound Peptides: A Simple, High-Yield Process Useful for Discriminating among Several Lysines. *Bioconjugate Chem* **1996**, 7 (5), 612-616.

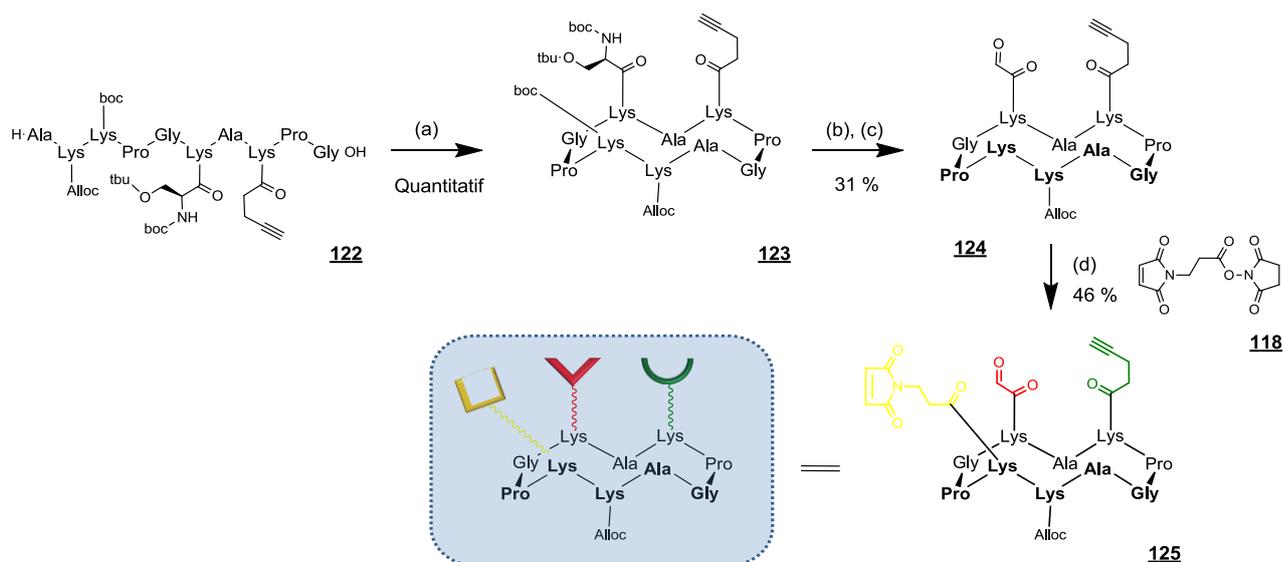


Figure 139 : Schéma de synthèse du châssis **125** : Réactifs (a) 1,2 éq. PyBOP, DIPEA, DMF (b) TFA/TIS/H₂O ; 95/2,5/2,5 (c) 20 éq. NaIO₄, H₂O (d) 2 éq. **118**, DIPEA, DMF

La synthèse du châssis est réalisée comme précédemment sur une résine chlorotrityle avec l'introduction successive des acides aminés modifiés **2** et **7**, et des lysines protégées par les groupes boc et alloc. Après cyclisation en milieu dilué, les fonctions boc et tBu sont éliminées par une solution d'acide trifluoroacétique. La sérine, greffée sur la lysine, peut alors subir une coupure oxydante par le périodate de sodium pour donner une fonction aldéhyde utilisable pour le couplage d'un fragment oxyamine par ligation oxime. Après purification par HPLC préparative, le groupement maléimide est introduit sur la fonction amine libre *via* l'utilisation d'un groupement activateur NHS préalablement préparé : le composé **118**. Le groupement maléimide n'étant que peu stable en milieu acide fort et lors de la déprotection du groupement alloc par une hydrogénation catalytique, il a été choisi de le conserver et de le déprotéger ultérieurement. On obtient ainsi le châssis fonctionnalisé pouvant servir à l'incorporation des 3 fragments différents (Figure 139).

Les fragments sélectionnées, issues des boucles H1, H2 et H3 sont greffés suivant leur profil de présentation d'après l'étude cristallographique. Pour cela ils sont modifiés, soit sur leur extrémité C-terminale, soit sur leur extrémité N-terminale par les fonctions complémentaires aux ligations (Figure 140).

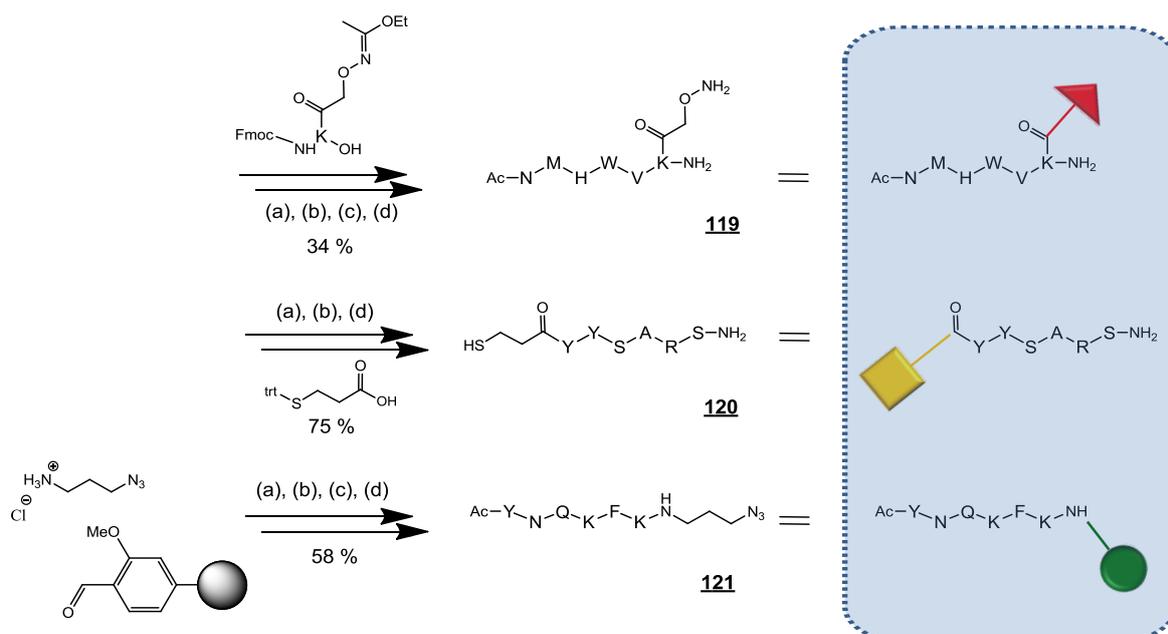


Figure 140 : Schéma de synthèse des fragments **119**, **120**, **121** : Réactifs (a) 2 équ. PyBOP, DIPEA, DMF (b) pipéridine 20%/DMF (c) Ac₂O/pyridine/DCM (d) TFA/TIS/H₂O ; 95/2,5/2,5

Les fragments sont synthétisés sur support solide selon les protocoles déjà présentés et obtenus avec des rendements moyens à bons après purification par HPLC préparative.

L'assemblage des fragments est réalisé en solution. Le couplage oxime est effectué en premier du fait de la réactivité possible de la fonction thiol sur un aldéhyde. Il est réalisé en milieu aqueux (0,1 % de TFA) en 2 heures avec un excellent rendement (81 %). Après purification par HPLC préparative, le produit obtenu est engagé dans la ligation du second fragment par ligation thiol/maléimide. La réaction est effectuée en tampon PBS (100 mM ; pH = 7,2) avec un léger excès (1,3 équiv.) de fragment **120**. On obtient le produit de couplage en une heure avec un excellent rendement de 77 %. La déprotection du groupement alloc présent sur la face inférieure du châssis est effectuée par une hydrogénation catalytique au palladium en présence d'un large excès de triphénylsilane comme fournisseur d'hydrure. La déprotection s'effectue en 30 minutes sous atmosphère inerte. On obtient ainsi le composé déprotégé avec un bon rendement après purification par HPLC préparative. Le fluorophore est alors introduit sur la face inférieure en utilisant le composé Cy5-Mono NHS commercial en une heure en milieu légèrement basique dans le DMF. Le contrôle du pH est important lors de cette étape afin de ne pas coupler le fluorophore sur les autres fonctions présentes sur les peptides déjà assemblés (histidine, tryptophane, tyrosine...). Après purification, le dernier fragment est assemblé par ligation CuAAc selon le protocole déjà employé en présence de THPTA. On obtient ainsi le composé final avec un rendement global de 2,6% pour 10 étapes de synthèse (Figure 142).

Malheureusement ce produit n'a pas pu être évalué dans des tests d'adhésion cellulaire du fait de sa faible solubilité dans les tampons utilisés.

- Synthèse des fragments contraint sous la forme cyclique et fonctionnalisé par une fonction alcyne

En parallèle à cette synthèse et toujours dans un but de mimer le site de reconnaissance de l'anticorps, nous avons choisi de cycliser les peptides les plus importants pour la reconnaissance de l'épitope et de les présenter sur un châssis moléculaire de façon multivalente. Pour cela, les peptides sont assemblés sur une résine chlorotrityle sensible à un milieu acide faible permettant de conserver l'ensemble des groupements protecteurs. Le peptide, totalement protégé, est alors cyclisé, en milieu hautement dilué, en présence d'un agent de couplage. La déprotection finale du peptide est réalisée par une solution concentré de TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5) ou TFA/TIS/H₂O/DIOD (92,5/2,5/2,5/2,5) lorsque des méthionines sont présentes. On obtient les produits **132** à **144** désirés avec des rendements corrects après purification par chromatographie.

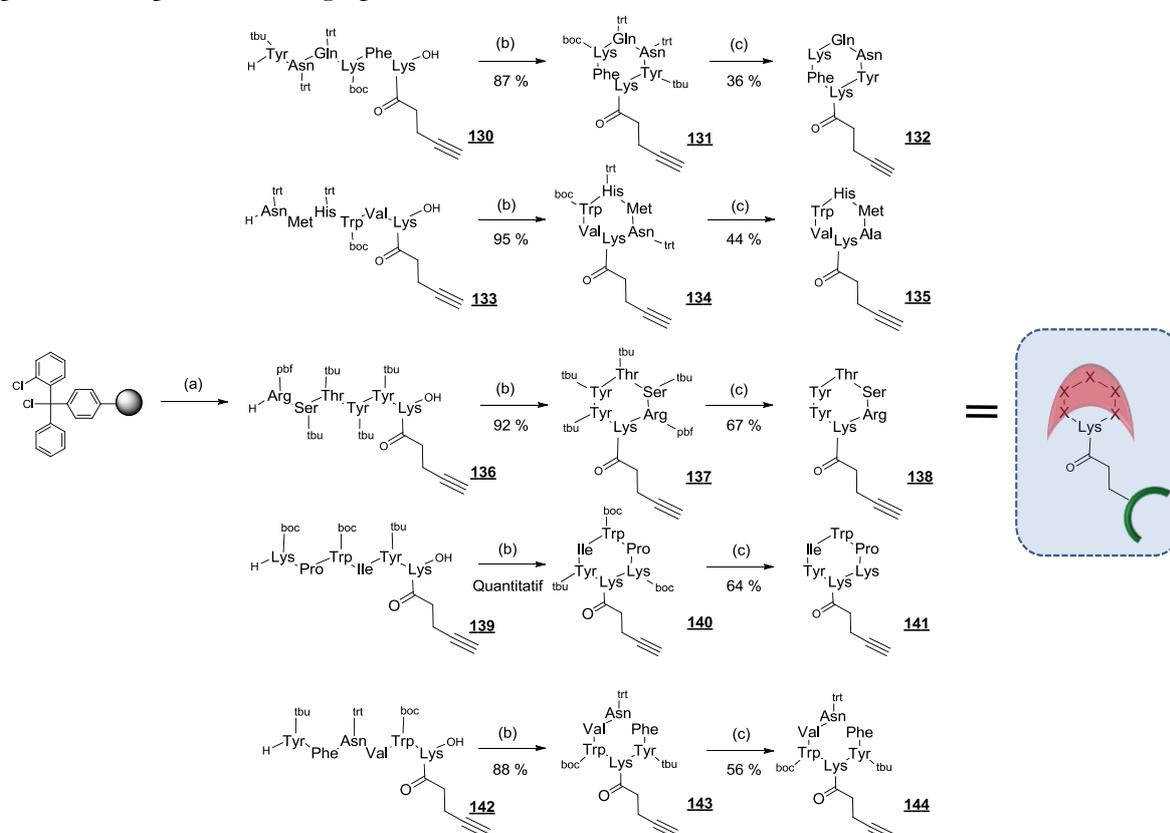


Figure 141 : Schéma de synthèse des fragments cycliques **132**, **135**, **138**, **141** et **144** : Réactifs (a) SPPS : 2 éq. PyBOP, 2éq. A.A, DIPEA, DMF / pipéridine 20%/DMF (b) 1,3 éq. PyBOP, DIPEA, DMF (c) TFA/TIS/H₂O ; 95/2,5/2,5

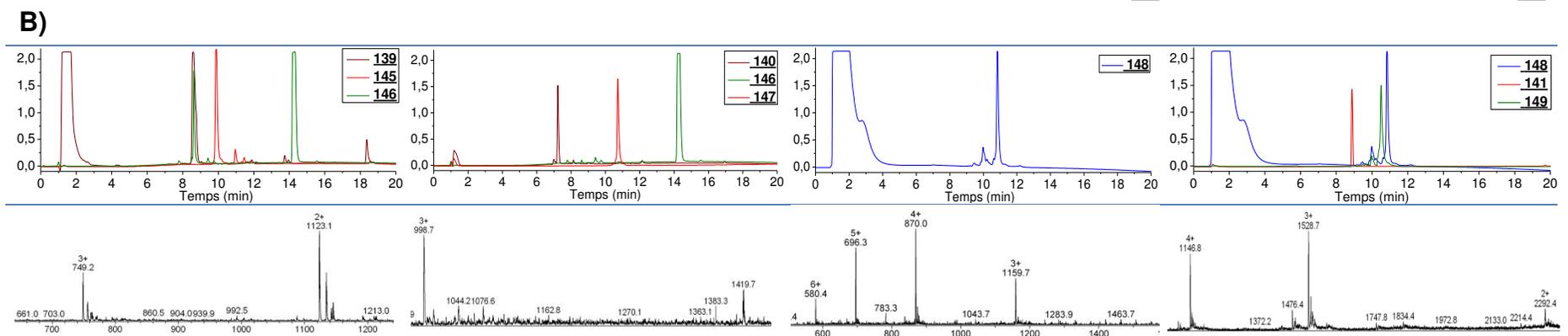
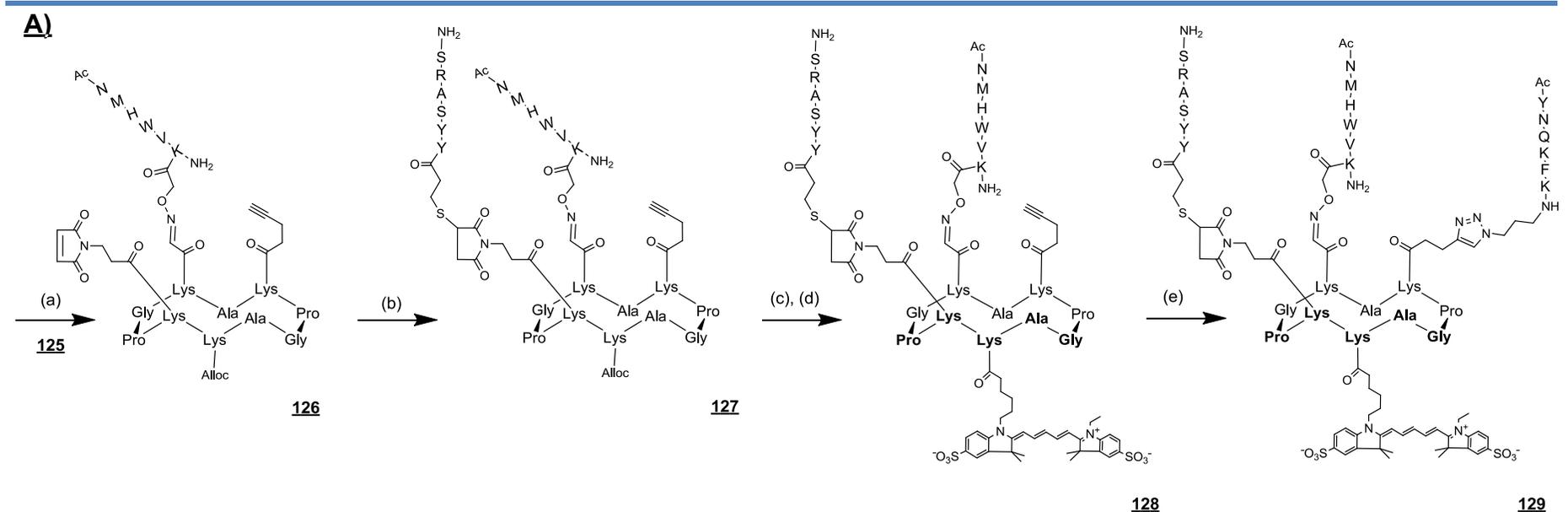


Figure 142 : A) Schéma de synthèse du composé **129** : Réactifs (a) 1,2 éq. **119**, TFA/H₂O ; 1/100 (b) 1,3 éq. **120**, tampon PBS (pH=7,2) (c) 0,05 éq. Pd(PH₃)₄, 100 éq. Ph₃SiH, DCM/DMF (d) 1,5 éq. Cy5-Mono NHS ester, DIPEA, DMF (e) 1,2éq **121**, 1 éq. CuSO₄, 5éq. NaAsc, 2éq. THPTA, tampon PBS/ACN ; B) Chromatogrammes HPLC et spectres de masse ESI+

• Assemblage des fragments cycliques sur le châssis moléculaire

L'assemblage des peptides cycliques **132**, **135**, **138**, **141** et **144**, est réalisé selon la méthode de CuAAC développée précédemment. Le greffage de quatre fragments sur le châssis est ainsi effectué en présence de CuSO_4 comme fournisseur de Cuivre I, d'ascorbate de sodium comme réducteur et de THPTA pour complexer le cuivre en solution et le stabiliser. La réaction est réalisée en deux heures à 45°C sous atmosphère inerte. On obtient ainsi les composés finaux **145** à **149** avec de bons rendements de couplage après purification HPLC compris entre 35 et 55 % (Figure 116).

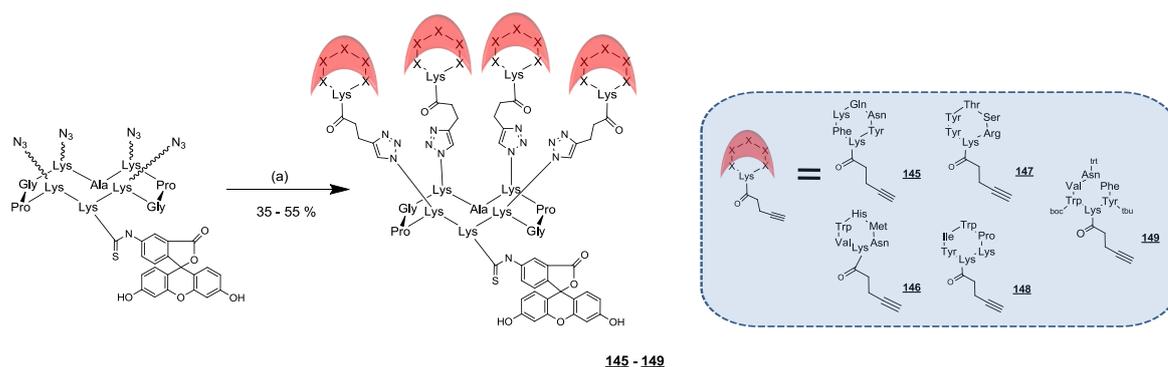


Figure 143 : Réactifs (a) 6 éq. composé **132**, **135**, **138**, **141** et **144**, 4 éq. CuSO_4 , 20 éq. NaAsc, 8 éq. THPTA, tampon PBS/ACN

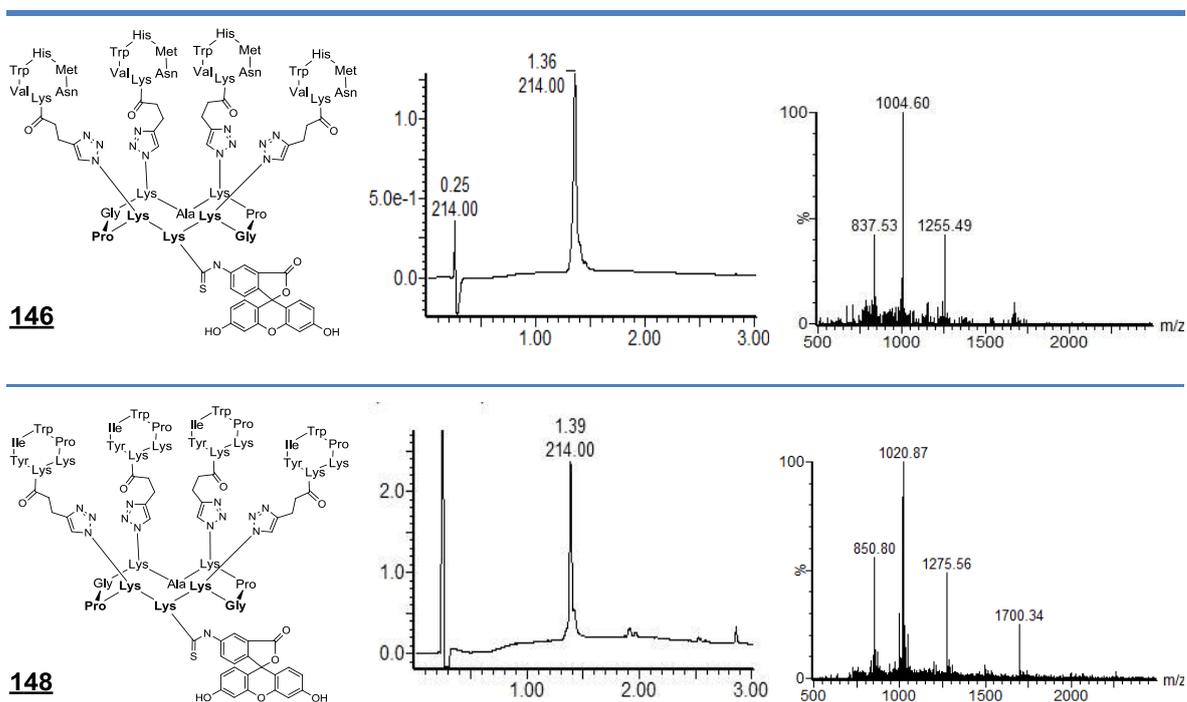


Figure 144 : Analyse HPLC et par spectrométrie de masse ESI+ des composés **146** et **148**

L'évaluation biologique par cytométrie en flux des produits **145** à **149** est actuellement en cours de réalisation par l'équipe du Prof. Jean-Jacques Fournié à Toulouse.

VI.2. Bilan des travaux

La dernière partie de mes travaux a été dédiée à la recherche de nouveaux ligands tumoraux en s'inspirant du mAb Rituximab. Dans cette approche, nous avons présenté la conception, la synthèse et l'évaluation biologique d'assemblages peptidiques mimant l'activité de reconnaissance de cet anticorps. Pour sélectionner les éléments responsables de la reconnaissance de l'antigène, une partie des travaux de thèse de Mathieu Galibert s'est portée sur la synthèse de petits fragments peptidiques de 6 et 12 résidus issus de la séquence du domaine variable du mAb. Cette synthèse a été rendu possible grâce à la technique SPOT qui permet de préparer simultanément différents peptides immobilisés sur membrane de cellulose. Après avoir effectué un test d'affinité avec l'antigène marqué à la cyanine5, plusieurs peptides présents sur les boucles CDR de l'anticorps L1, L2, L3, H1, H2 et H3 interagissant avec la cible ont pu être identifiés.

Les fragments peptidiques sélectionnés ont ensuite été assemblés sur le châssis moléculaire de façon multivalente *via* la ligation CuAAC. Pour cela une nouvelle méthode de synthèse a été développée permettant l'incorporation efficace de quatre fragments peptidiques sur le châssis *via* l'utilisation d'un ligand du cuivre I. 19 molécules ont été ainsi synthétisées en liant les fragments sélectionnés du côté C et N-terminale. Elles ont été évaluées par cytométrie en flux par des expériences d'adhésion cellulaire sur une lignée exprimant CD20. Cependant, l'étude biologique réalisée sur différentes souches de cellules a démontré que ces composés ne présentent peu voire pas de spécificité envers les cellules exprimant CD20. En effet, nos molécules étant composées de plusieurs fonctions amines protonnées à pH physiologique, il est probable que ces dernières adhèrent à la membrane cellulaire par interaction ionique. La protection des extrémités terminales des fragments a montré des améliorations lors des tests d'adhésion cellulaire. Deux molécules semblent être plus sélectives vis-à-vis des cellules exprimant CD20.

La conception d'un montage plus complexe comportant un site de reconnaissance discontinu a été réalisée afin de mimer au mieux le site de reconnaissance de l'anticorps. Cette étude a permis de montrer qu'il était possible de présenter de façon bien ordonnée sur un châssis moléculaire trois fragments peptidiques distincts *via* l'utilisation des ligations chimiosélectives oxime, CuAAC, thiol/maléimide et amide. Cependant la faible solubilité de l'assemblage réalisé n'a pas permis son étude par des expériences d'adhésion cellulaire. Enfin, du fait des résultats obtenus, dans une dernière partie nous avons choisi de synthétiser les fragments importants pour la reconnaissance sous leur forme cyclique afin de les contraindre et augmenter leur affinité envers l'antigène CD20. Ces peptides cycliques ont été assemblés de la même manière sur le châssis moléculaire de façon multivalente et les expériences d'adhésion cellulaire sont en cours de réalisation.

En fonction de ces résultats, nous avons comme projet de synthétiser des mimes plus complexes en présentant de façon discontinu plusieurs fragments cycliques différents. Une analyse bioinformatique de la structure cristalline du Rituximab permettra de mieux positionner et orienter les différents fragments sur le châssis. L'objectif de cette méthode est de se rapprocher au maximum des propriétés du mAb en réalisant un domaine de reconnaissance à la fois très sélectif et affiné envers la cible.

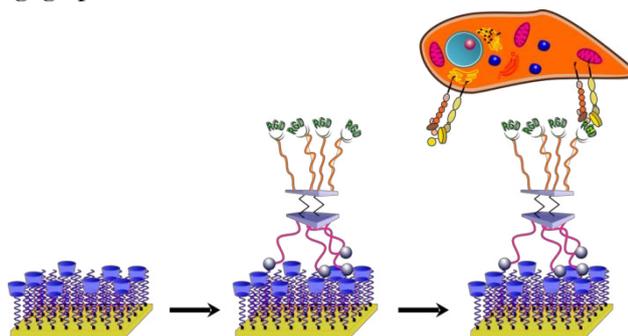
Conclusion et perspectives

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont été consacrés à la conception de vecteurs peptidiques pour des applications anticancéreuses en thérapie ciblée. Nos systèmes ont été élaborés à partir de châssis moléculaires cyclodécapeptidiques présentant des propriétés conformationnelles particulières. Les travaux antérieurs ont montré que ce type de châssis pouvait être utilisé en tant que support multivalent pour présenter des éléments de ciblage et délivrer des éléments de détection et/ou cytotoxique dans des cellules tumorales exprimant le récepteur ciblé *in vitro* et *in vivo*. Dans ce manuscrit, deux approches différentes ont été reportées. La première approche a été l'étude et le développement de nouveaux agents de détection des cellules tumorales. La seconde a été la mise au point, à partir des agents ciblant efficacement les tumeurs, des composés cytotoxiques utilisables en thérapie anticancéreuse. Dans ces deux stratégies, les systèmes de vecteurs sont constitués d'un domaine de reconnaissance (souvent assemblé sur la face supérieure du châssis cyclodécapeptidique) présentant un ou plusieurs ligands, et d'un module effecteur composé d'un élément de détection ou d'un composé cytotoxique, le tout assemblé sur le châssis moléculaire. Plusieurs procédures d'assemblages chimiosélectifs ont donc été élaborées, afin d'optimiser et de contrôler l'assemblage des différents édifices moléculaires. Dans l'optique de synthétiser ces vecteurs complexes, le gabarit cyclodécapeptidique a été modifié à façon dans le but de pouvoir assembler différentes biomolécules *via* des ligations chimiosélectives. Pour cela, différents partenaires, utilisables pour les différentes ligations chimiosélectives, et stables au cours de la synthèse peptidique ont été préparés et incorporés au sein des différentes biomolécules à assembler. Ces différents synthons ont permis l'assemblage jusqu'à quatre éléments différents sur le châssis moléculaire. Les différentes combinaisons des ligations oxime, thioéther et CuAAC, se sont montrées efficaces et compatibles avec nos composés peptidiques et les méthodes de couplages et de déprotections utilisées pour leur synthèse. Ces méthodologies de synthèse, développées au laboratoire nous ont ainsi permis de synthétiser de nouvelles molécules complexes utilisables en imagerie et en thérapie anticancéreuse.

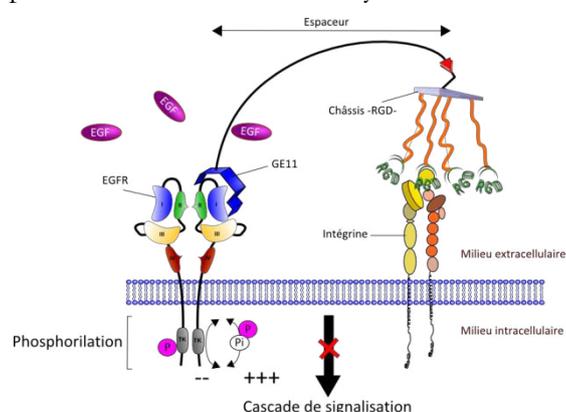
Nous avons montré, tout d'abord, que notre gabarit cyclodécapeptidique décoré par quatre ligands -RGD-, très sélectif et affiné des intégrines $\alpha_v\beta_3$, permettait *via* l'utilisation de radiotraceurs ou de fluorophores la visualisation efficace de la zone tumorale chez le petit animal. Aujourd'hui ces molécules ont montré un grand intérêt et sont en cours de développement pour la chirurgie anticancéreuse. Elles ont fait d'ailleurs l'objet récemment de trois publications dans la littérature pour l'étude et la visualisation post-opératoire des zones tumorales chez la souris¹⁴⁹.

149. Briat, A.; Wenk, C. H. F.; Ahmadi, M.; Claron, M.; Boturyn, D.; Josserand, V.; Dumy, P.; Fagret, D.; Coll, J. L.; Ghezzi, C.; Sancey, L.; Vuillez, J. P., Reduction of renal uptake of In-111-DOTA-labeled and A700-labeled RAFT-RGD during integrin $\alpha_v\beta_3$ targeting using single photon emission computed tomography and optical imaging. *Cancer Sci* **2012**, *103* (6), 1105-1110; 147. (a) Winn Aung, Z.-H. J., Zhao-hui Jin, Takako Furukawa, Michael Claron, Didier Boturyn, Chizuru Sogawa, Atsushi B. Tsuji, Hidekatsu Wakizaka, Toshimitsu Fukumura, Yasuhisa Fujibayashi, Pascal Dumy, Tsuneo Saga, Micro-Positron Emission Tomography/Contrast-Enhanced Computed Tomography Imaging of Orthotopic Pancreatic Tumor-Bearing Mice Using the $\alpha_v\beta_3$ integrin Tracer ⁶⁴Cu-labeled Cyclam-Raft-c(-RGDfK-)4. *Mol Imaging* **2013**, *12* (6); (b) Jin, Z.-H.; Furukawa, T.; Claron, M.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Fukumura, T.; Fujibayashi, Y.; Dumy, P.; Saga, T., Positron emission tomography imaging of tumor angiogenesis and monitoring of antiangiogenic efficacy using the novel tetrameric peptide probe Cu-64-cyclam-RAFT-c(-RGDfK-)(4). *Angiogenesis* **2012**, *15* (4), 569-580.

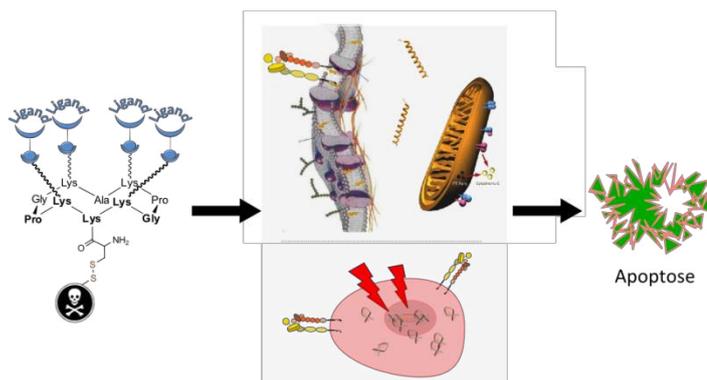
Dans un deuxième temps, et toujours dans le but de développer des méthodes de détections des cellules cancéreuses, nous nous sommes tournés vers le développement de nouvelles stratégies combinant l'assemblage tétravalent de ligand RGD sur le châssis avec d'une part d'autres techniques analytiques et d'autre part un deuxième ligand de ciblage. Le couplage de nos procédures de synthèse avec des méthodes analytiques comme la QCM-D ou la SPR ont montré de très bons résultats. Elles permettent la visualisation et la détection de façon efficace des cellules tumorales *via* la fonctionnalisation d'une surface d'or. Cette méthode permet de plus l'enrichissement d'un milieu complexe en cellules tumorales $\alpha_v\beta_3$ positive, grâce au relargage possible des cellules détectées.



D'un autre point de vue, nous avons essayé d'augmenter la capacité de ciblage de nos molécules *via* le greffage de façon covalente d'un autre ligand peptidique de détection. Celui-ci, à été choisi afin de cibler une deuxième particularité de la membrane cytoplasmique de la cellule tumorale. Pour cela, des molécules de hauts poids moléculaires ont été synthétisées et évaluées *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires. A ce jour, les études d'adhésion cellulaire n'ont pas montré un apport important du deuxième ligand de ciblage. Cependant, les premières expériences pourraient démontrer que grâce à celle-ci nous pourrions cibler la cellule tumorale par le ligand - RGD- et avoir des modifications de prolifération tumorales *via* l'inhibition ou l'activation des récepteurs VEGFR et/ou EGFR.

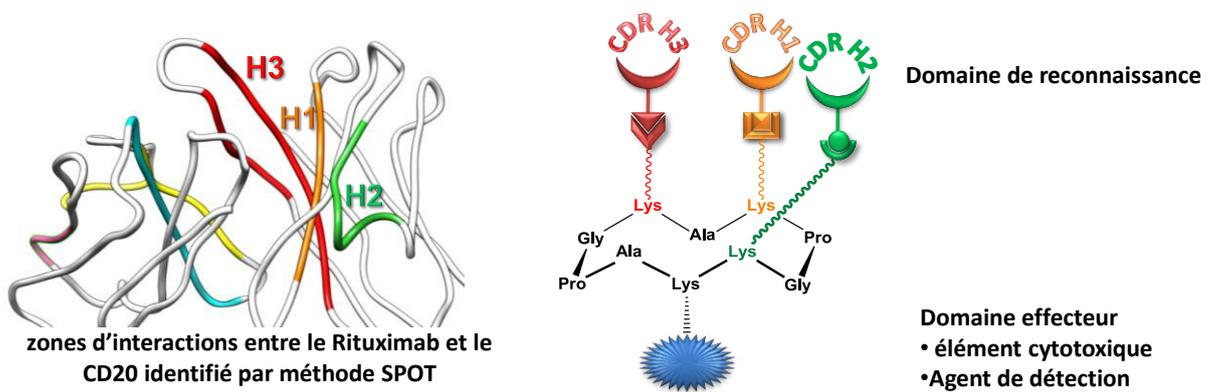


Ces molécules, ciblant efficacement les tumeurs et en particulierité le gabarit tétravalent en ligand -RGD-, ont pu dans un deuxième temps être utilisées pour la thérapie anticancéreuse. Deux projets ont ainsi été développés en couplant des éléments cytotoxiques sur la face inférieure du gabarit vecteur. Un peptide, dont le rôle est de perforer les mitochondrie et induire l'apoptose, ainsi qu'un acide nucléique « Dbait » mimant les cassures doubles brins de l'ADN, ont été couplés sur le châssis vecteur. Ces molécules ont montré de bons résultats *in vitro* et/ou *in vivo*. Notamment, le conjugué porocombo a un effet sur la réduction de la croissance tumorale *via* une mort cellulaire ciblée.



Enfin dans une dernière partie, l'ensemble des méthodologies de synthèse développées, ont été très utiles pour la conception d'assemblages peptidiques mimant l'activité de reconnaissance d'un anticorps monoclonal : le Rituximab. Au préalable une analyse par la technique SPOT du domaine variable du mAb Rituximab, décrite dans la thèse de Mathieu Galibert, a permis de déterminer des fragments peptidiques interagissant avec l'antigène. La plupart de ces segments sont issus des boucles CDR H1, H2 et H3 impliquées dans la reconnaissance de l'épitope. En comparant l'étude cristallographique et l'analyse SPOT, nous avons pu remarquer que ces deux techniques révélaient des zones d'interactions légèrement différentes entre le mAb et l'antigène. Il a donc été envisagé de synthétiser des molécules mimant le site de reconnaissance de l'anticorps en présentant de façon multivalente les fragments déterminés utiles à la reconnaissance. Plusieurs séries de molécules ont ainsi été développées *via* le couplage, sur un châssis cyclodécapeptidique, d'hexapeptides sélectionnés, sur l'extrémité C-terminale puis sur l'extrémité N-terminale et finalement de façon contrainte cyclique.

Cependant l'évaluation biologique de ces produits s'est montrée peu concluante dû à un manque de spécificité envers la cible. Les derniers résultats sembleraient néanmoins montrer que deux composés : le **145** et le **146**, pourraient avoir une affinité de reconnaissance de l'antigène CD20. Ces résultats restent à confirmer mais semblent encourageants pour la continuité du projet, l'objectif de cette étude étant de se rapprocher au maximum des propriétés du mAb en réalisant un domaine de reconnaissance à la fois très sélectif et affiné envers la cible. La conception d'un montage plus complexe comportant un site de reconnaissance discontinu a été réalisée et demande d'être mieux étudiée. Une analyse bioinformatique plus approfondie de la structure cristalline du Rituximab permettra de mieux positionner et orienter les différents fragments sur le châssis. Ainsi, une molécule combinant les fragments nous ayant fourni les meilleurs résultats devra être synthétisée dans le but d'obtenir une molécule synthétique ayant une spécificité de reconnaissance et une affinité la meilleure possible.



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

Finalement ces avancées synthétiques visent à développer des molécules complexes permettant de cibler des particularités cellulaires dans le but d'obtenir un traitement personnalisé pour une famille de patient : une thérapie ciblée.

VII. Partie Expérimentale

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.

VII.1. Materials and Equipments

VII.1.1. Reagents

Protected amino acids were obtained from Activo tec (Cambridge, UK), Bachem Biochimie SARL (Voisins-les-Bretonneux, France), France Biochem SA (Meudon, France), Merck Eurolab (Fontenay-sous-Bois, France) or Calbiochem-Novabiochem (Merck Biosciences - VWR, Limonest, France). PyBOP[®] was purchased from Calbiochem-Novabiochem. Rink-amide MBHA[®], FMPB resin were obtained from Calbiochem-Novabiochem and 2-chlorotriylchloride[®] resins from Advanced ChemTech Europe. Other reagents were obtained from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and Acros (Noisy-le-Grand, France). CyanineTM 5 Mono NHS ester was purchased from Amersham Biosciences (Orsay, France)

VII.1.2. Equipments

RP-HPLC analyses were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller, a Waters 2487 Dual Absorbance Detector and a Waters In-Line Degasser. The analytical column used was the Nucleosil 120 Å 3 µm C18 particles, 30 × 4 mm² operated at 1 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 20 min run time (classical 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 H₂O containing 0.1% TFA and solvent B of CH₃CN containing 9.9% H₂O and 0.1% TFA. Water was of Milli-Q quality and was obtained after filtration of distilled water through a Milli-Q[®] cartridge system. CH₃CN and TFA were of HPLC use quality.

RP-HPLC purifications were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller and a Waters 2487 Dual Absorbance Detector. Degassing of solvents was performed with 50 mL.min⁻¹ helium. The preparative column, Delta-PakTM 300 Å 15 µm C18 particles, 200 × 25 mm² was operated at 22 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 30 min run time. Solvents A and B were the same than the ones used in RP-HPLC analysis.

Electron spray ionization (ESI-MS) mass spectra were obtained on an Esquire 3000 (Bruker). The multiply charged data produced by the mass spectrometer on the m/z scale were converted to the molecular weight. NMR spectra were recorded on BRUKER Avance 300 spectrometers. Chemical shifts are expressed in ppm and calculated taking the solvent peak as an internal reference.

VII.2. General Procedures for Peptides Syntheses

VII.2.1. Syntheses of linear protected peptides by SPPS

Assembly of all linear protected peptides was performed manually or automatically by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl/ tertibutyl (Fmoc/tBu) protection strategy. In manual SPPS, the device consisted in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit. The latter allowed elimination of excess reagents and solvents under compressed air. Before use, the vessel was treated for 12 h (typically overnight) with $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ as lubricant to prevent resin beads from sticking to the glass inner wall during the synthesis. It was then carefully washed with CH_2Cl_2 until complete acid trace clearance. The 2-chlorotrityl resin was preloaded for 30 min in dry CH_2Cl_2 with $\text{N}\alpha$ -Fmoc-protected amino acid substituted at 1 mmol/g and capped with 6 mL of methanol/DIPEA/ CH_2Cl_2 (2/1/17) for 5 min and then one more time for 10 min. At the beginning of the synthesis and after each ether washing, the resin was washed and swollen twice with CH_2Cl_2 (20 mL/g resin) for 15 min and once with DMF (20 mL/g resin) for 15 min. Coupling reactions were performed using, relative to the resin loading, 1.5-2 eq. of $\text{N}\alpha$ -Fmoc-protected amino acid in situ activated with 1.5-2 eq. PyBOP and 3-4 eq. DIPEA in DMF (10 mL/g resin) for 30 min. The resin was then washed twice with DMF (20 mL/g resin) for 1 min and twice with CH_2Cl_2 (20 mL/g resin) for 1 min. The completeness of amino acid coupling reaction was checked by TNBS test. TNBS test required a solution of 1% trinitrobenzenesulfonic acid in DMF, a solution of DIPEA/DMF (1:9). Three drops of each solution were added to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was left at room temperature for 1 min. Remaining of free amino functions resulted in a red coloration of the resin beads (positive TNBS test). Coupling reaction with the protected amino acid should then be repeated until the beads remain colourless (negative TNBS test).

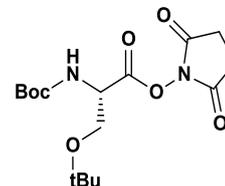
$\text{N}\alpha$ -Fmoc protecting groups were removed by treatment with piperidine/DMF (1:4) (10 mL/g resin) for 10 min. The process was repeated three times and the resin was further washed five times with DMF (10 mL/g resin) for 1 min. The completeness of the deprotection was checked by UV measurement. Indeed, Fmoc groups releasing afforded dibenzofulvene whose adduct with piperidine absorbs light in the UV range ($\lambda = 299 \text{ nm}$, $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Cleavage and washing solutions were thus together collected and the volume of the solution was adjusted to a known value (V) with MeOH. Automated peptide syntheses were performed on ABI 433 A1 Peptide Synthesizer (Applied Biosystems) or on Syro II Synthesizer (Biotage) using standard solid-phase methods.

VII.2.2. 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 (1.2 equiv) was added and the solution stirred at room temperature for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in a minimum of CH_2Cl_2 . Diethyl ether was added to precipitate peptides. They were then triturated and washed three times with diethyl ether to obtain crude materials that were used in the next step without further purification.

VII.2.3. Synthesis protocols

Boc-Ser(tBu)-N-hydroxysuccinimide ester

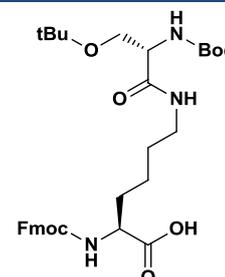
1

To a stirred solution of Boc-Ser(tBu)-OH (2.8 g, 10.7 mmol) and N-hydroxysuccinimide (1.8 g, 16 mmol) in AcOEt/dioxan (1:1, 100 mL) cooled in an ice bath was added DCC (2.2 g, 10.7 mmol). After 5 h stirring at room temperature, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite 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 NaHCO₃ (2 x 70 mL), water (2 x 70 mL) and brine (2 x 70 mL). The organic fraction was then dried over MgSO₄. Boc-Ser(tBu)-NHS 1 was obtained as a white powder after evaporation of the solvent (3.5 g, 9.8 mmol).

Yield: 98 %**RP-HPLC:** RT = 13.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₁₆H₂₆N₂O₇Calcd MW = 358.2 g.mol⁻¹Found MW = 359.3 g.mol⁻¹**¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):**

δ 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)

Fmoc-Lys[Boc-Ser(tBu)]-OH

2

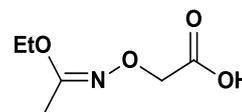
The above Boc-Ser(tBu)-NHS 1 (8.00 g, 22.3 mmol) in DMF (75 mL) was added dropwise over 30 min to a stirred suspension of finely powdered HCl-salt of Fmoc-lysine (1.17 g, 29.0 mmol) and DIPEA (2-4 equiv pH=9) in DMF (130 mL). After 5 h of reaction, the solvent was evaporated under vacuum and the remaining residue was dissolved in AcOEt (400 ml), followed by washing with a 10 % citric acid aqueous solution (70 ml), water (2 x 100 ml), and finally brine (100 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄ and evaporation under vacuum gave 2, as a white solid (11.85 g, 19.4mmol).

Yield: 87 %**RP-HPLC:** RT = 16.0 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₃₃H₄₅N₃O₈Calcd MW = 611.3 g.mol⁻¹Found MW = 611.2 g.mol⁻¹**¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):**

δ 7.68 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.55 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.33-7.18 (4H, m), 6.84 (1H, broad s), 6.25 (1H, broad d), 5.62 (1H, broad s), 4.34-4.06 (5H, m), 3.63 (1H, m), 3.36 (1H, m), 3.20-3.05 (2H, m), 1.84 (1H, m), 1.65 (1H, m), 1.47-1.32 (14H, m), 1.09 (9H, s)

2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetic Acid**3**

To a stirred solution of iodoacetic acid (9.00 g, 48.4 mmol) in water (19 mL) at 0°C was added aqueous NaOH (3.0 mL, 40% w/w). The resulting solution was allowed to heat to room temperature, whereafter ethyl *N*-hydroxyacetimidate (6.0 g, 58.3 mmol) was added followed by aqueous NaOH (4.5 mL, 40% w/w) and water (19 mL) (pH of solution >12). After 4.5 h of stirring at 80°C and cooling to room temperature, 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 were washed with brine (50 mL), dried over MgSO₄, and concentrated under vacuum, providing compound **3** as a yellow oil (5.69 g, 35.3 mmol).

**Yield: 73%**

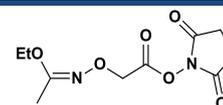
MS (ESI-MS, negative mode): C₆H₁₁NO₄
Calcd MW = 161.2 g.mol⁻¹
Found MW = 161.0 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):

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)

N*-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetate*4**

To a stirred solution of compound **3** (5.69 g, 35.3 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (5.28 g, 45.9 mmol) in ethyl acetate/dioxane (120 mL, 1:1) at 0°C was added DCC (7.28 g, 35.3 mmol). 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 NaHCO₃ (2x75 mL), water (75 mL), and brine (75 mL). The organic solution was dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum to yield **4** as a yellow solid (8.69 g, 33.7 mmol) which was used without further purification.

**Yield: 95%****MS (ESI-MS, positive mode):**

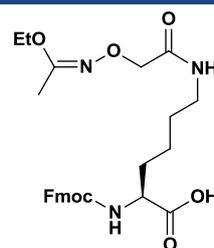
C₁₀H₁₄N₃O₇
Calcd MW = 258.1 g.mol⁻¹
Found MW = 258.3 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):

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).

Fmoc-Lys[*N*-EEI-Aoa]-OH**5**

To a stirred mixture of Fmoc-lysine,HCl salt (7.46 g, 20.3 mmol) and DIPEA (2-4 equiv pH=9)) in DMF (100 mL) at room temperature was added dropwise over 20 min a solution of the above-prepared NHS-ester **4** (4.35 g, 16.9 mmol) in DMF (40 mL). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIPEA. After 2 h of reaction, the reaction mixture was concentrated under vacuum providing an oily residue. After addition of Ethyl acetate (100 mL), the organic phase was washed with a 10 % citric acid aqueous solution (3 x 30mL). The organic phase was then washed with brine (100 mL), dried over MgSO₄, and evaporated under reduced pressure to yield the compound **5** as a light yellow powder (7.47 g, 14.6 mmol), which was used without further purification.

**Yield: 86 %****RP-HPLC:** RT = 14.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**

C₂₇H₃₃N₃O₇
Calcd MW = 511.2 g.mol⁻¹
Found MW = 511.3 g.mol⁻¹

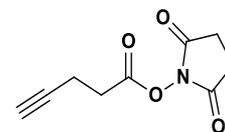
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.60 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.50 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 5.68 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.44 – 4.32 (m, 4H), 4.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.96 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.44 – 3.25 (m, 2H), 1.96 (s, 3H), 1.80 (s, 2H), 1.64 – 1.52 (m, 2H), 1.51 – 1.36 (m, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

4-Pentynoic acid succinimidyl ester

6

To a stirred solution of pent-4-ynoic acid (1 g, 10.2 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (1.53 g, 13.2 mmol) in ethyl acetate/dioxane (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (2.10 g, 10.2 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5h. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (300 mL), and the solution was washed with 5% aqueous NaHCO₃ (2 x 75 mL), water (75 mL), and brine (75 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. Recrystallization from CH₂Cl₂ / pentane afforded 6 as white solid which was used without further purification (1.95 g, 10 mmol).

**Yield: 98%****RP-HPLC:** RT = 6.0 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):**

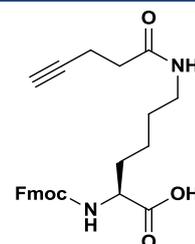
δ 2.03 (1H, t, *J* = 2.4 Hz), 2.60 (2H, td, *J* = 2.4, 7.0 Hz), 2.83 (4H, s), 2.87 (2H, t, *J* = 7.0 Hz)

¹³C NMR (68 MHz, CDCl₃):

δ 14.1, 25.6, 30.3, 69.6, 80.3, 167.1, 169.0.

Fmoc-Lys[*N*-4-Pentynoic acid]-OH7

To a stirred mixture of Fmoc-lysine,HCl salt (4.78 g, 13 mmol) and DIPEA (3.4 mL, 20 mmol) in dimethylformamide (50 mL) at room temperature was added dropwise over 10 min a solution of 6 (1.95 g, 10 mmol) in dimethylformamide (20 mL). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIPEA. After 2 h of reaction, the reaction mixture was concentrated under vacuum providing an oily residue. After addition of ethyl acetate (50 mL), the organic phase was washed with a concentrated citric acid solution (2 x 25 mL), water (25 mL), and brine (25 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. Precipitation from CH₂Cl₂ / pentane afforded the building block 7 as a white solid which was used without further purification (4 g, 9 mmol).

**Yield: 90%****RP-HPLC:** RT = 9.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 15 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₂₆H₂₈N₂O₅Calcd MW = 448.5 g.mol⁻¹Found MW = 449.1 g.mol⁻¹

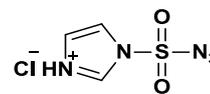
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.75 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.60 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.38 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 7.29 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.0 (1H, t, *J* = 5.6 Hz), 5.70 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 4.38-4.36 (3H, m), 4.12 (1H, t, *J* = 6.9 Hz), 3.19 (2H, m), 2.42 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 2.30 (2H, dt, *J* = 2.3, 7.0 Hz), 1.92 (1H, t, *J* = 2.4 Hz), 1.96 (3H, s), 1.81 (2H, m), 1.58 (2H, m), 1.45 (2H, m), 1.24 (3H, t, *J* = 7.1 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 173.9, 170.0, 156.1, 143.8, 143.7, 140.6, 127.6, 127.0, 125.2, 120.0, 83.7, 71.2, 65.6, 53.7, 46.6, 38.2, 34.2, 30.4, 28.6, 23.0, 14.2

Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride

8

Sulfuryl chloride (16.1 mL, 200 mmol) was added drop-wise to an ice-cooled suspension of NaN₃ (13.0g, 200 mmol) in MeCN (200 mL) and the mixture stirred overnight at room temperature. Imidazole (25.9 g, 380 mmol) was added portion-wise to the ice-cooled mixture and the resulting slurry stirred for 3 h at room temperature. The mixture was diluted with EtOAc (400 mL), washed with H₂O (2 × 400 mL) then saturated aqueous NaHCO₃ (2 × 400 mL), dried over MgSO₄ and filtered. A solution of HCl in EtOH [obtained by the drop-wise addition of AcCl (21.3 mL, 300 mmol) to ice-cooled dry ethanol (75 mL)] was added drop-wise to the filtrate under stirring, at 0°C, filtered and the filter cake washed with EtOAc (3 × 100 mL) to give **8** as colorless needles (26.4 g, 0.125 mmol).

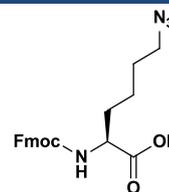
**Yield: 63%****MS (ESI-MS, positive mode):**C₃H₄ClN₅O₂SCalcd MW = 173.1 g.mol⁻¹Found MW = 173.0 g.mol⁻¹

NMR ¹H (400 MHz, D₂O): δ 9.53 (1 H, dd, J = 1.3, 1.6 Hz), 8.09 (1 H, dd, J = 1.6, 2.2 Hz), 7.68 (1H, dd, J = 1.3, 2.2 Hz)

Fmoc-azidonorleucine

9

To a stirred mixture of Fmoc-lysine.HCl salt (3.68 g, 10 mmol) and ZnCl₂ (0.070 g, 0.5 mmol) in MeOH/Water (8:2, 80 mL) at room temperature was added DIPEA (pH= 9-10) followed by imidazole-1-sulfonyl azide **8** (3.1 g, 15 mmol). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIPEA. The reaction mixture was stirred overnight and the pH was acidified to 2 using HCl 3M. The mixture was extracted with ethyl acetate (4 x 75 mL), then the combined organic phase were washed with brine (50ml), dried over anhydrous Mg₂SO₄, filtered and concentrated in order to obtain building block **9** as a yellowish oil which was used without further purification (3.58 g, 9.1 mmol).

**Yield: 91%**

RP-HPLC: RT = 14.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

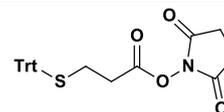
MS (ESI-MS, positive mode):C₂₆H₂₈N₂O₅Calcd MW = 394.4 g.mol⁻¹Found MW = 394.2 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.75 (2H, d, J = 7.4 Hz), 7.60 (2H, d, J = 7.4 Hz), 7.38 (2H, t, J = 7.4 Hz), 7.29 (2H, t, J = 7.4 Hz), 5.3 (1H, d), 4.2 (2H, d), 4.12 (1H, t, J = 6.9 Hz), 3.8 (1H, m), 3.2 (2H, t), 1.9-1.1 (6H, m)

3-(tritylthio)propanoic acid succinimidyl ester

10

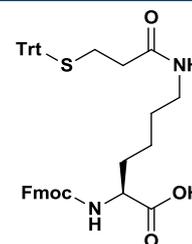
To a stirred solution of 3-(Tritylthio)propionic acid (6.96 g, 20 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (3.52 g, 30 mmol) in Dimethylformamide (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (4.11 g, 20 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5h. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under vacuum to obtain **10** as a white solid which was used without further purification (8.46 g, 19 mmol).

**Yield: 95%****MS (ESI-MS, positive mode):** C₂₆H₂₃O₄NSCalcd MW = 445.5 g.mol⁻¹Found MW = 445.6 g.mol⁻¹

NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.43-7.46 (6H, m), 7.20-7.33 (9H, m), 2.80 (4H, s), 2.54 (2H, t), 2.40 (2H, t)

3-(tritylthio)propanoic acid succinimidyl ester

11

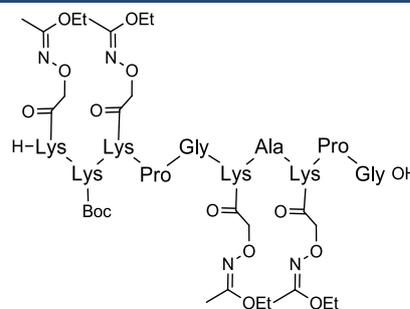


To a stirred mixture of Fmoc-lysine.HCl salt (5.25 g, 13 mmol) and DIPEA (2-4 equiv. pH=9) in dimethylformamide (50 mL) at room temperature was added dropwise over 10 min a solution of **10** (4.45 g, 10 mmol) in dimethylformamide (20 mL). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIPEA. After 2 h of reaction, the reaction mixture was concentrated under vacuum providing an oily residue. After addition of ethyl acetate (50 mL), the organic phase was washed with a 10% citric acid solution (2 x 25 mL), water (25 mL), and brine (25 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. Precipitation from CH₂Cl₂/ pentane afforded the building block **11** as a white solid which was used without further purification (4 g, 91 mmol).

Yield: 91%**RP-HPLC:** RT = 18.4 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₄₃H₄₂N₂O₅SCalcd MW = 698.9 g.mol⁻¹Found MW = 689.1 g.mol⁻¹**¹H NMR (400 MHz, DMSO):** δ 7.9-7.25 (23H, m), 4.33-4.23 (3H, m), 3.95 (1H, m), 3.03 (2H, m), 2.28 (2H, t, J = 7.6 Hz), 2.17 (2H, t, J = 7.5 Hz), 1.81-1.62 (2H, m), 1.48-1.31 (4H, m)**¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz):** δ 174.9, 170.7, 157.1, 145.4, 144.7, 141.6, 129.9, 128.9, 128.5, 127.9, 127.6, 126.2, 121.0, 66.9, 66.5, 54.6, 47.6, 39.2, 34.9, 31.3, 29.5, 28.4, 23.9

Linear RAFT4(Acetimidate)-NHoc

12

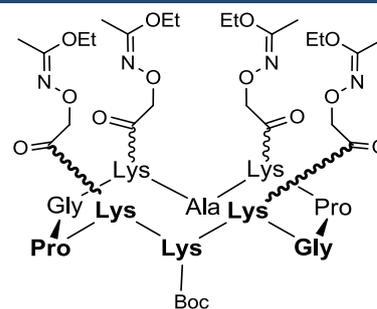


The linear decapeptide **12** was assembled on 2-chlorotritylchloride resin (350mg) using the general procedure and modified amino acid **5**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.9 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/1/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (550 mg, 321 μmol).

Yield: Quantitative**RP-HPLC:** RT = 14.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₆H₁₃₁N₁₉O₂₅Calcd MW = 1711.0 g.mol⁻¹Found MW = 1711.2 g.mol⁻¹

cRAFT4(Acetimidate)-NH_{Boc}**13**

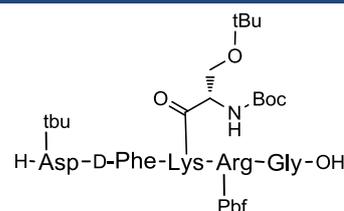
The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using the crude linear peptide **12** (550 mg, 321 μmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **13** as a light brown powder (521 mg, 307 μmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: 96%****RP-HPLC:** RT = 15.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₆H₁₂₉N₁₉O₂₄Calcd MW = 1693.0 g.mol⁻¹Found MW = 1692.9 g.mol⁻¹

H-D(tBu)-f-K(BocS(tBu))-R(Pbf)-G-OH

14

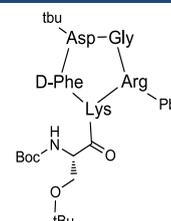
The linear peptide **14** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (1g) using the general procedure and modified amino acid **2**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.9 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFA/CH₂Cl₂ (1/99) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (1.02 g, 0.86 mmol).

**Yield: 97%****RP-HPLC:** RT = 15.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₅₆H₈₈N₁₀O₁₅SCalcd MW = 1173.5 g.mol⁻¹Found MW = 1173.1 g.mol⁻¹

c[-R(Pbf)-G-D(tBu)-f-K(BocS(tBu))-]

15

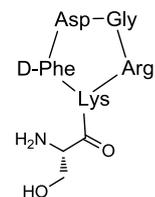
The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **14** (1.02 g, 0.86 mmol). Precipitation from Et₂O afforded the cyclic peptide **15** as a white powder (1.03 g, 0.86 mmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 16.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₅₆H₈₆N₁₀O₁₄SCalcd MW = 1155.4 g.mol⁻¹Found MW = 1155.2 g.mol⁻¹

c[-R-G-D-f-K(S)-]

16

Cyclopeptide **15** (1.03 g, 0.86 mmol). was dissolved in 30 mL of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and the precipitation with Et₂O afforded peptide **16** as a white solid powder (630 mg, 0.86 mmol). This crude material was used without further purification.



Yield: Quantitative

RP-HPLC: RT = 7,7 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₃₀H₄₆N₁₀O₉

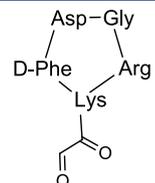
Calcd MW = 690.8 g.mol⁻¹

Found MW = 690.5 g.mol⁻¹

c[-R-G-D-f-K(COCHO)-]

17

Peptide **16** (100 mg, 144 μmol) and 10 equiv of NaIO₄ (310 mg, 1.44 mmol) were dissolved in water at 10⁻²M. The mixture was stirred for 30 min at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclopeptide **17** as a white powder (55 mg, 83 μmol).



Yield: 58%

RP-HPLC: RT = 7.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₂₉H₄₁N₉O₉

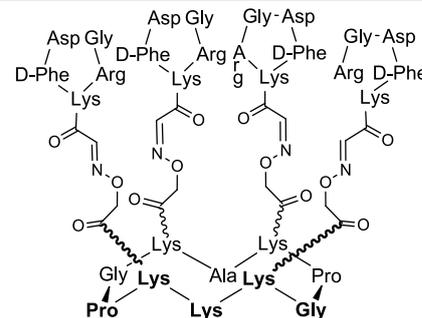
Calcd MW = 659.7 g.mol⁻¹

Found MW = 659.4 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-NH₂

18

Scaffold **13** (10 mg, 6.0 μmol) and 6 equiv of c[-RGDfK(COCHO)-] **17** (23.5 mg, 36 μmol) were dissolved in 1 mL of a TFA/H₂O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **18** as a white powder (10.5 mg, 2.7 μmol).



Yield: 45%

RP-HPLC: RT = 9.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

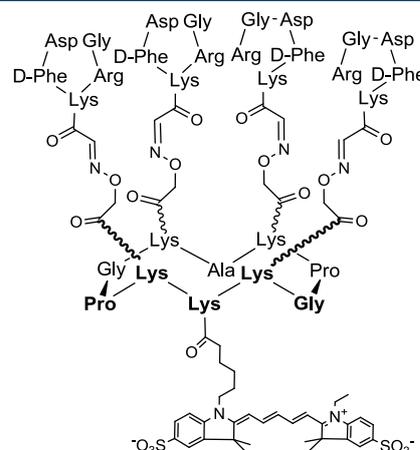
C₁₇₁H₂₅₃N₅₅O₅₀

Calcd MW = 3879.3 g.mol⁻¹

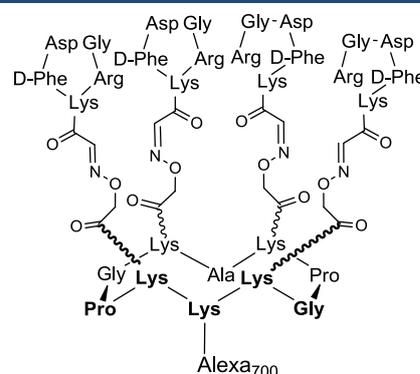
Found MW = 3879.1 g.mol⁻¹

RAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-Cy5**19**

Scaffold **18** (5 mg, 1.3 μmol) and 1.2 equiv of commercial Cy5-Mono-NHS-ester (1.5 mg, 1.57 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The solution pH was adjusted to 9 with DIPEA (2 μL , 11.5 μmol) The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **19** as a deep blue powder (4.8 mg, 1.06 μmol).

**Yield:** 82%**RP-HPLC:** RT = 12.4 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{204}\text{H}_{290}\text{N}_{57}\text{O}_{57}\text{S}_2$ Calcd MW = 4517.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 4517.6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ RAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-Alexa700**20**

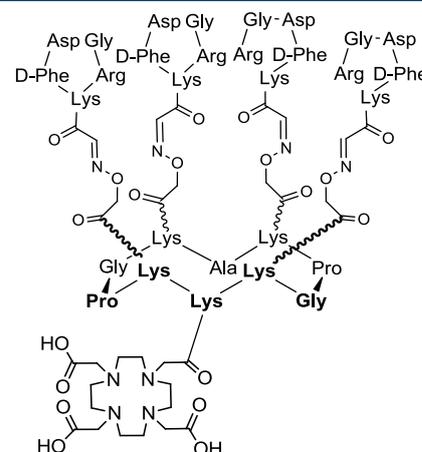
Scaffold **18** (7 mg, 1.8 μmol) and 1.2 equiv of commercial Alexa700-NHS-ester (M.W ~ 1400) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA (3 μL , 17.2 μmol) The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **20** as a deep purple powder (6.5 mg, 1.34 μmol).

**Yield:** 74%**RP-HPLC:** RT = 10.4 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**Found MW = 4849.6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime}-DOTA

21

Scaffold **18** (10 mg, 2.6 μmol) and 1.5 equiv of commercial DOTA-NHS-ester (3 mg, 3.94 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA (5 μL , 28 μmol) The mixture was stirred for 2 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **21** as a white powder (7.5 mg, 1.76 μmol).



Yield: 68%

RP-HPLC: RT = 9.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{187}\text{H}_{279}\text{N}_{59}\text{O}_{57}$

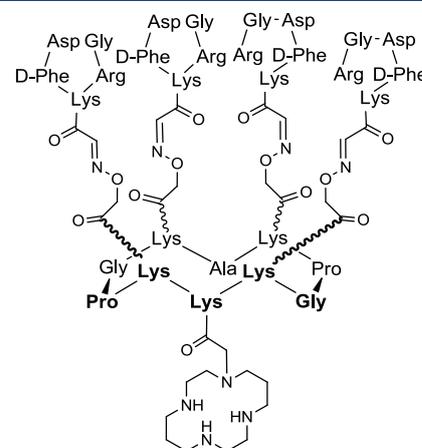
Calcd MW = 4265.7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 4265.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime}-Cyclam

22

Scaffold **18** (10 mg, 2.6 μmol) and 1.5 equiv of tris-boc-cyclam-NHS-ester (2.5 mg, 3.8 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA (5 μL , 28 μmol) The mixture was stirred for 2 h. After evaporation of the solvents, the product was precipitated into Et_2O . This crude material was then dissolved in a solution of TFA/TIS/ H_2O (95/2.5/2.5) for 1h. The product was finally purified by RP-HPLC to give compound **22** (7.7 mg, 1.9 μmol) as a white powder.



Yield: 72%

RP-HPLC: RT = 9.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{183}\text{H}_{277}\text{N}_{59}\text{O}_{51}$

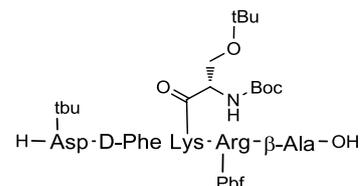
Calcd MW = 4119.6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 4119.3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

H-D(tBu)-f-K(BocS(tBu))-R(Pbf)-A-OH

23

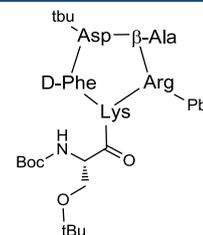
Linear peptide **23** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (1g) using the general procedure and modified amino acid **2**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-β-Ala-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.8 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFA/CH₂Cl₂ (1/99) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (950 mg, 0.8 mmol).

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 15.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₅₇H₉₀N₁₀O₁₅SCalcd MW = 1187.5 g.mol⁻¹Found MW = 1187.1 g.mol⁻¹

c[-R(Pbf)-A-D(tBu)-f-K(BocS(tBu))-]

24

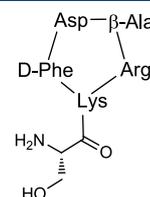
The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **23** (950 mg, 0.8 mmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **24** as a white powder (935 mg, 0.8 mmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 16.7 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₅₇H₈₈N₁₀O₁₄SCalcd MW = 1169.5 g.mol⁻¹Found MW = 1169.1 g.mol⁻¹

c[-R-A-D-f-K(S)-]

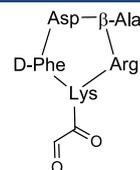
25

Cyclopeptide **24** (935 mg, 0.8 mmol) was dissolved in 30 mL of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and the precipitation with Et₂O afforded peptide **25** as a white solid powder (600 mg, 0.8 mmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 7.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₃₁H₄₈N₁₀O₉Calcd MW = 704.8 g.mol⁻¹Found MW = 705.3 g.mol⁻¹

c[-R-A-D-f-K(COCHO)-]

26



Peptide **25** (100 mg, 142 μmol) and 10 equiv of NaIO_4 (310 mg, 1.44 mmol) 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 **26** as a white powder (45 mg, 67 μmol).

Yield: 47%

RP-HPLC: RT = 7.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

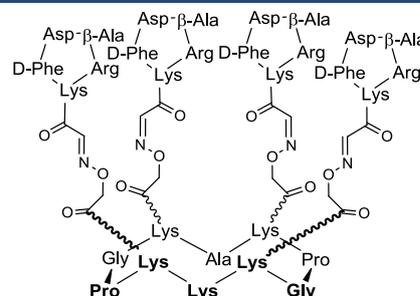
$\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{O}_9$

Calcd MW = 673.7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 674.0 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime-NH₂}

27



Scaffold **13** (10 mg, 6.0 μmol) and 6 equiv of c[-RADfK(COCHO)-] **26** (24.2 mg, 36 μmol) were dissolved in 1 mL of a TFA/ H_2O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **27** as a white powder (12.7 mg, 3.2 μmol).

Yield: 53%

RP-HPLC: RT = 9.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

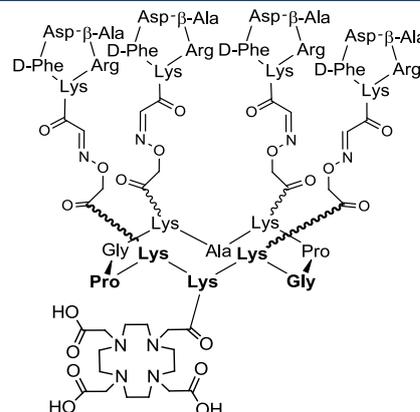
$\text{C}_{175}\text{H}_{261}\text{N}_{55}\text{O}_{50}$

Calcd MW = 3935.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 3935.3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RAFT4(c[-RADfK-])_{oxime-DOTA}

28



Scaffold **27** (12.7 mg, 3.2 μmol) and 1.6 equiv of commercial DOTA-NHS-ester (4 mg, 5.2 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with (6 μL , 34 μmol) The mixture was stirred for 1 h 30 and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **28** as a white powder (10 mg, 2.3 μmol).

Yield: 72%

RP-HPLC: RT = 9.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

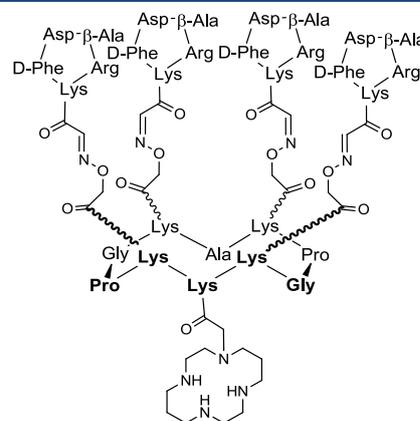
MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{191}H_{288}N_{59}O_{57}$
 Calcd MW = 4322.8 g.mol⁻¹
 Found MW = 4321.9 g.mol⁻¹

RAFT4(c[-RADfK-])_{oxime}-Cyclam

29

Scaffold **27** (10 mg, 2.6 μmol) and 1.5 equiv of tris-boc-cyclam-NHS-ester (2.5 mg, 3.8 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA (5 μL, 28 μmol). The mixture was stirred for 2 h. After evaporation of the solvents, the product was precipitated into Et₂O. This crude material was then dissolved in a solution of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) for 1h. The product was finally purified by RP-HPLC to give compound **29** (6.9 mg, 1.6 μmol) as a white powder.



Yield: 65%

RP-HPLC: RT = 9.7 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{187}H_{285}N_{59}O_{51}$
 Calcd MW = 4175.7 g.mol⁻¹
 Found MW = 4175.4 g.mol⁻¹

3-Azidopropyl acetate

30

A mixture of Ac₂O (7.4 g, 72 mmol) and Et₃N (7.3 g, 72 mmol) was added to 3-bromo-propanol (10 g, 72 mmol) dissolved in CH₂Cl₂ (60 mL) and stirred at room temperature for an hour. An aqueous solution of NaHCO₃ was added and the phases were separated. The organic layer was washed once more with aqueous NaHCO₃ and twice with brine. After drying with MgSO₄, the solvent was removed to obtain 3-bromopropyl acetate as colorless oil. Water (100 mL) and NaN₃ (144 mmol) were added and the resulting solution was stirred at 90°C overnight. The mixture was extracted with dichloromethane (3 x 100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to yield 3-azidopropyl acetate **30** as pale yellow oil (7.4 g, 52 mmol).

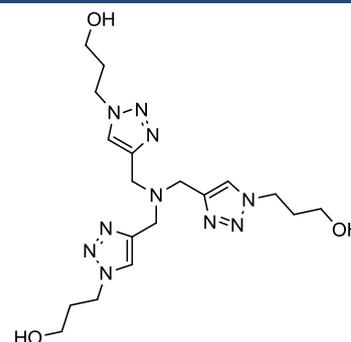


Yield: 72%

Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine

31

To a stirred solution of trispropargylamine (13 mmol) and 3 azidopropyl acetate **30** (7.4 g, 52 mmol) in THF (90 mL) under N₂ was added CuOAc (320 mg, 2.6 mmol) and the resulting solution was refluxed overnight under inert atmosphere. The mixture was then concentrated, dissolved in 50 mL of water, and stirred with Chelex resin (2 x 5 g) to remove copper ions. The solution was filtered, concentrated, and purified by flash chromatography (silica, 0-10% MeOH/CH₂Cl₂) to obtain protected THPTA (4.6 g, 8.3 mmol) as pale yellow oil. This material was treated with 5% MeONa in MeOH (40 mL) and the mixture was stirred at 4h at r.t. The solution was concentrated and the residue dried under high vacuum. The resulting pale yellow solid was dispersed in acetonitrile, sonicated to further break up the solid, filtered, washed with acetonitrile, and dried under vacuum to yield **31** (3.5 g, 8 mmol) as a white solid.



Yield: 61%

MS (ESI-MS, positive mode):C₁₈H₃₀N₁₀O₃Calcd MW = 434,5 g.mol⁻¹Found MW = 434.2 g.mol⁻¹**¹H NMR (400 MHz, DMSO):**

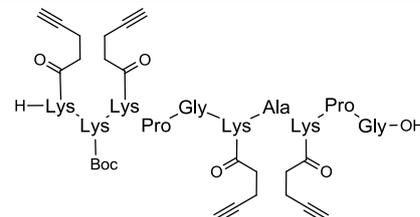
δ 8.03 (s, 3H), 4.68 (t, *J* = 4.95 Hz, 3H),
4.42 (t, *J* = 7.00 Hz, 6H), 3.63 (s, 6H),
3.40 (m, 6H), 1.97 (m, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ
143.4, 124.0, 57.5, 47.1, 46.6, 33.0.

Linear RAFT4(Alc)-NHBOc

32

Linear decapeptide **32** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (500mg) using the general procedure and modified amino acid **7**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.8 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFA/DCM (99/1) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (583 mg, 0.4 mmol).



Yield: Quantitative

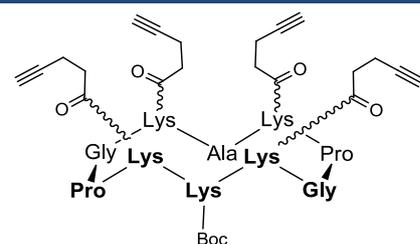
RP-HPLC: RT = 10.5 min (C18, 214 nm,
5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):C₇₂H₁₁₁N₁₅O₁₇Calcd MW = 1458,7 g.mol⁻¹Found MW = 1458,8 g.mol⁻¹

cRAFT4(Alc)-NHBOc

33

The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **32** (583 mg, 0.4 mmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **33** as a light brown powder (576 mg, 0.4 mmol). This crude material was used without further purification.



Yield: Quantitative

RP-HPLC: RT = 11.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{72}H_{109}N_{15}O_{16}$

Calcd MW = 1440,7 g.mol⁻¹

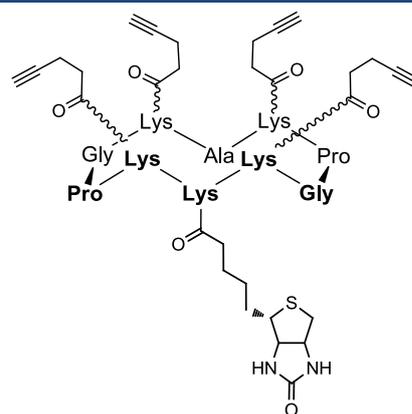
Found MW = 1440.8 g.mol⁻¹

cRAFT 4(Alc)-NH-Biotin

34

Scaffold **33** (30 mg, 20.8 μmol) was dissolved in 5 mL of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and the precipitation with Et₂O afforded deprotected peptide as a white solid powder.

This crude material and 1.5 equiv of Biotin-NHS-ester (10.5 mg, 30.8 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA (6 μL, 34 μmol). The mixture was stirred for 1 h 30 and the product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **34** as a white powder (26 mg, 16.6 μmol).



Yield: 80%

RP-HPLC: RT = 10.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{77}H_{115}N_{17}O_{16}S$

Calcd MW = 1566,9 g.mol⁻¹

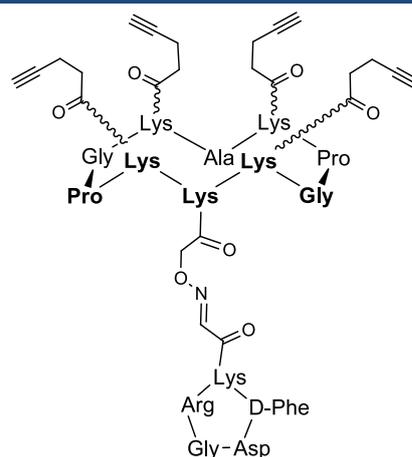
Found MW = 1567.1 g.mol⁻¹

cRAFT 4(Alc)-NH-c[-RGDFK-])_{oxime}

35

After deprotection of the boc group of scaffold **33** (30 mg, 20.8 μmol), 1 equiv of crude material and 1.5 equiv of **4** (8 mg, 32 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted at 9 with DIPEA (5 μL, 28 μmol). The mixture was stirred for 1 h 30 and the product was concentrated under reduced pressure. Precipitation with Et₂O afforded the crude peptide as a white solid powder.

To this crude precipitate was added 1.5 equiv of compound **17** (20mg, 30 μmol). The mixture was diluted in a TFA/H₂O (7/3) solution and the reaction was stirred 1h at r.t. The product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **35** as a white powder (29.0 mg, 14.1 μmol).



Yield: 68%

RP-HPLC: RT = 10.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{98}H_{143}N_{25}O_{24}$

Calcd MW = 2055.4 g.mol⁻¹

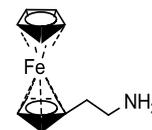
Found MW = 2055.4 g.mol⁻¹

2-Ferroceneethylamine

36

To 3 equiv of LiAlH_4 (250mg, 6.6 mmol), dissolved in 5 ml of dry THF at 0°C , were added 2 equiv of AlCl_3 (585 mg, 4.5 mmol), dissolved in 2ml of dry THF at 0°C in an ice bath. Ferroceneacetonitrile (0.5mg, 2.2 mmol), dissolved in 5 ml of THF, was added and the mixture was refluxed for two hours. After cooling, 20 ml of water was carefully added dropwise to decompose the excess of LiAlH_4 followed by 0.5 ml of a NaOH solution (10 M).

The mixture was diluted in 50 ml of Et_2O and filtered on a pad of celite. The filtrat was then extracted with Et_2O (4 x 20 ml). The combined organic layers were dried over MgSO_4 and evaporated to dryness to give a brown oil which was purified by chromatography ($R_f=0.3$ DCM/MeOH/Et₃N 94/3/3) to give the product **36** (250 mg, 1mmol)



Yield: 49%

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{FeN}$

Calcd MW = 229.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

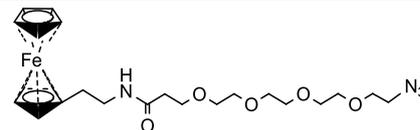
Found MW = 230.0 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2.48 (t, 2H), 2.81(t, 2H), 4.00 (s, 4H), 4.05 (s, 5H)

Fc-PEG(4)-N₃

37

To a stirred mixture of 2-Ferroceneethylenamine (46 mg, 200 μmol) in DMF (2 ml) was added dropwise over 10 min a solution of N_3 -PEG(4)-NHS (50 mg 130 μmol , purchased from IRIS Biotech GMBH) in DMF (1 ml) at room temperature. The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by additions of DIPEA. After 2 h of reaction, the product was directly purified by RP-HPLC affording the pure product Fc-PEG(4)-N₃ as a brown oil (42mg, 84 μmol)



Yield:64%

RP-HPLC: RT = 13.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{FeN}_4\text{O}_5$

Calcd MW = 502.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

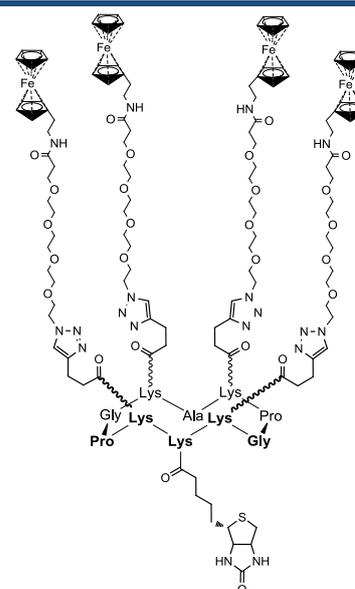
Found MW = 502.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT 4(Fc)_{click}-NH-Biotin

38

To a solution of **34** (10 mg, 6.4 μmol) and 5 equiv of **37** (16.1 mg, 32 μmol) in PBS Buffer (100mM)/ACN (7/3) (500 μL) was added a solution of CuSO_4 (2 mg, 8 μmol), THPTA **31** (7 mg, 16 μmol) and sodium ascorbate (8 mg, 40 μmol) in PBS buffer (500 μL). Both solutions were previously degassed under argon.

The reaction was stirred 2h at 40°C under argon and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure compound **38** as a light yellow powder (16.9 mg, 4.7 μmol)



Yield: 74 %

RP-HPLC: RT = 16.7 min (C18, 214 nm,

5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{169}H_{251}Fe_4N_{33}O_{36}S$

Calcd MW = 3575.5 g.mol⁻¹

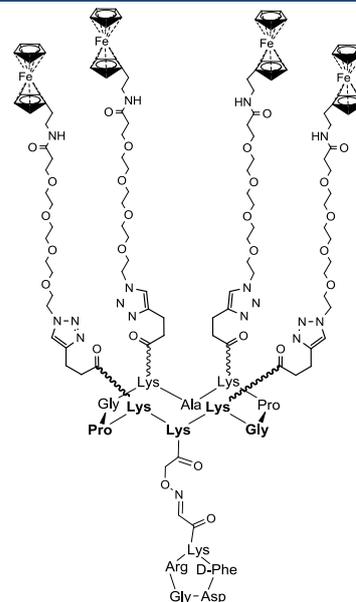
Found MW = 3574.8 g.mol⁻¹

cRAFT 4(Fc)_{click}-NH- c[-RGDFK-]_{oxime}

39

To a solution of **35** (10 mg, 4.8 μmol) and 5 equiv of **37** (12 mg, 24 μmol) in PBS Buffer (100mM)/ACN (7/3) (500 μL) was added a solution of CuSO₄ (2 mg, 8 μmol), THPTA **31** (7 mg, 16 μmol) and sodium ascorbate (8 mg, 40 μmol) in PBS buffer (500 μL). Both solutions were previously degassed under argon.

The reaction was stirred 2h at 40°C under argon and the product was directly purified by RP-HPLC affording the pure compound **39** as a light yellow powder (11.4 mg, 2.8 μmol)



Yield: 58%

RP-HPLC: RT = 15.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{190}H_{281}Fe_4N_{41}O_{44}$

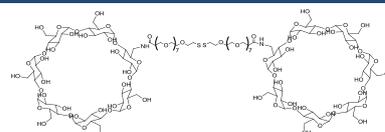
Calcd MW = 4067.0 g.mol⁻¹

Found MW = 4066.3 g.mol⁻¹

[CD-dPEG(7)-S]₂

40

Commercial 3A-Amino-3A-deoxy (2AS,3AS)-β-cyclodextrin (100 mg, 88 μmol) and commercial NHS-PEG(8)-SS-PEG(8)-NHS (40 mg, 36 μmol) were dissolved in 5 ml of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA. The mixture was stirred for 1 h 30 and the product was purified by automated flash chromatography (C₁₈, 3g, 0-100% H₂O/ACN) to give the pure compound **40** after lyophilisation (46 mg, 14.6 μmol).



Yield: 40 %

MS (ESI-MS, positive mode):

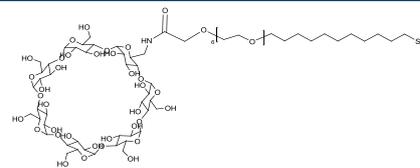
$C_{122}H_{212}N_2O_{86}S_2$

Calcd MW = 3147.1 g.mol⁻¹

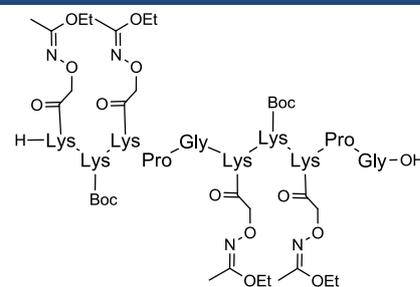
Found MW = 3147.8 g.mol⁻¹

[CD-dPEG(6)-C₁₁-SH]**41**

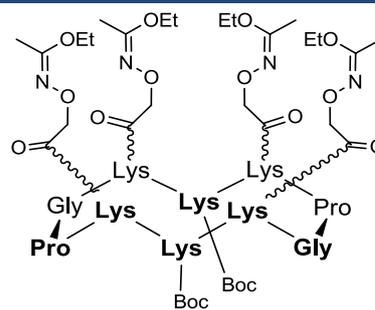
Commercial 3A-Amino-3A-deoxy (2AS,3AS)-beta-cyclodextrin (56.7 mg, 50 μmol) and commercial NHS-PEG(6)-C₁₁-SH (30 mg, 48 μmol) were dissolved in 5 ml of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA. The mixture was stirred for 1 h 30 and the product was purified by automated flash chromatography (C₁₈, 3g, 0-100% H₂O/ACN) to give the pure compound **41** after lyophilisation (28 mg, 17.0 μmol).

**Yield: 35 %****MS (ESI-MS, positive mode):**C₆₇H₁₁₉NO₄₂SCalcd MW = 1642,7 g.mol⁻¹Found MW = 1642.7 g.mol⁻¹Linear RAFT4(Acetimidate)-(NH₂Boc)₂**42**

Linear decapeptide **42** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (400mg) using the general procedure and modified amino acid **5**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using a AcOH/TFE/DCM (1/2/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (523 mg, 0.28 mmol).

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 14.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₈₄H₁₄₆N₂₀O₂₇Calcd MW = 1868.2 g.mol⁻¹Found MW = 1868.1 g.mol⁻¹cRAFT4(Acetimidate)-(NH₂Boc)₂**43**

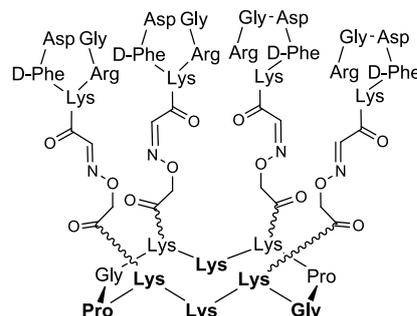
The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **42** (523 mg, 0.28 mmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **43** as a light brown powder (480 mg, 0.26 mmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: 94%****RP-HPLC:** RT = 16.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₈₄H₁₄₄N₂₀O₂₆Calcd MW = 1850.2 g.mol⁻¹Found MW = 1850.1 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-(NH₂)₂

44

Scaffold **43** (15 mg, 8.1 μmol) and 6 equiv of c[-RGDfK(COCHO)-] **17** (27 mg, 40 μmol) were dissolved in 1 mL of a TFA/H₂O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **44** as a white powder (13.4 mg, 3.4 μmol).



Yield: 42%

RP-HPLC: RT = 9,7 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₁₇₄H₂₆₀N₅₆O₅₀

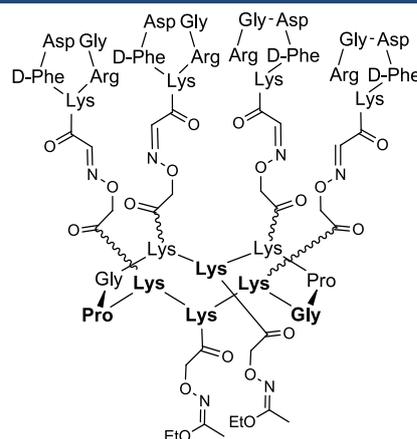
Calcd MW = 3936,4 g.mol⁻¹

Found MW = 3937.3 g.mol⁻¹

RAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-(NH. Acetimidate)₂

45

Scaffold **44** (13.4 mg, 3.4 μmol) and 5 equiv of **4** (4.2 mg, 17 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted at 9 with DIPEA (6 μL, 34 μmol) The mixture was stirred for 1 h 30 and the product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **45** as a white powder (8.4 mg, 2.0 μmol).



Yield: 59%

RP-HPLC: RT = 11,3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₁₈₆H₂₇₈N₅₈O₅₆

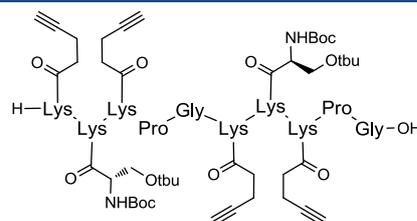
Calcd MW = 4222,6 g.mol⁻¹

Found MW = 4123,8 g.mol⁻¹

Linear RAFT4(Alc)-(NH-Ser(Boc-tbu))₂

46

Linear decapeptide **46** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (400mg) using the general procedure and modified amino acids **2** and **7**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.6 mmol/g. The peptide was released from the resin using a AcOH/TFE/DCM (1/2/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl



Yield: 92%

ether (420 mg, 0.22 mmol).

RP-HPLC: RT = 13.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

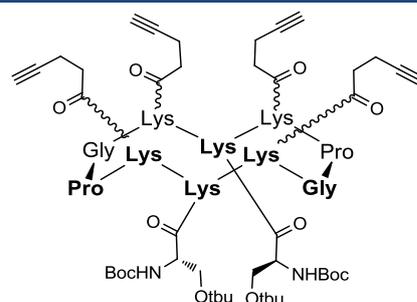
$C_{94}H_{152}N_{18}O_{23}$

Calcd MW = 1901.1 g.mol⁻¹

Found MW = 1901.4 g.mol⁻¹

cRAFT 4(Alc)-(NH-Ser(Boc-tbu))₂

47



The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **46** (420 mg, 0.22 mmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **47** as a light brown powder (415 mg, 0.22 mmol). This crude material was used without further purification.

Yield: Quantitative%

RP-HPLC: RT = 14.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

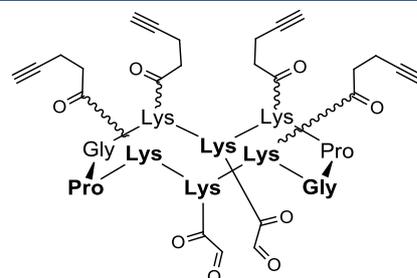
$C_{94}H_{150}N_{18}O_{22}$

Calcd MW = 1884,3 g.mol⁻¹

Found MW = 1844.5 g.mol⁻¹

cRAFT 4(Alc)-(COCHO)₂

48



Scaffold **47** (100 mg, 53 μmol) was dissolved in 5 mL of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and the precipitation with Et₂O afforded deprotected peptide as a white solid powder.

RP-HPLC: RT = 9.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min).

This crude material and 20 equiv of NaIO₄ (230 mg, 1.06 mmol) were dissolved in water at 10⁻²M. The mixture was stirred for 45 min at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclopeptide **48** as a white powder (17.5 mg, 11.6 μmol).

Yield: 22%

RP-HPLC: RT = 9.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{74}H_{108}N_{16}O_{18}$

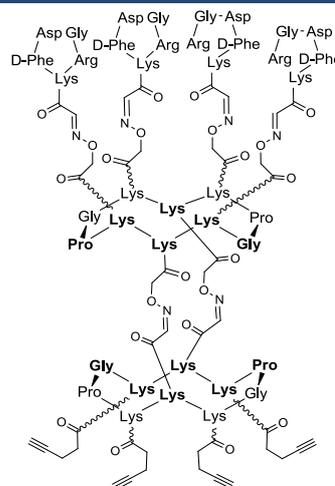
Calcd MW = 1508,8 g.mol⁻¹

Found MW = 1509.0 g.mol⁻¹

cRAFT4(Alc)-cRAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime}

49

To a stirred solution of scaffold **48** at 10^{-4} M (5 mg, 1.2 μ mol) in H₂O/ACN/TFA (4/4/2) (5 mL) at room temperature was added dropwise over 10 min a solution of the compound **45** (1.8 mg, 1.2 μ mol) in H₂O (1 mL). After 1 h of reaction, the reaction was lyophilised. The product was then purified by RP-HPLC affording pure conjugate **49** as a white powder (3.2 mg, 0.58 μ mol).



Yield: 48%

RP-HPLC: RT = 11.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₂₅₂H₃₇₀N₇₄O₇₀

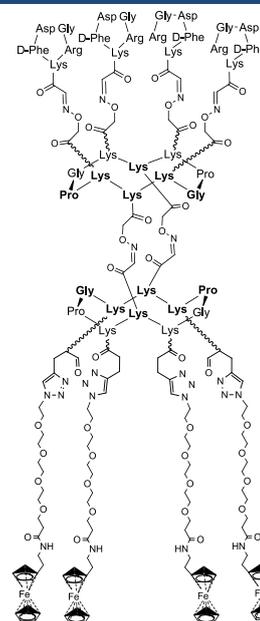
Calcd MW = 5556,2 g.mol⁻¹

Found MW = 5556.8 g.mol⁻¹

cRAFT4(Fc)_{click}-cRAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime}

50

To a solution of **49** (1 mg, 0.18 μ mol) and 6 equiv of **37** (0.6 mg, 1.2 μ mol) in PBS Buffer (100mM)/ACN (7/3) (200 μ L) was added a solution of CuSO₄ (0.1 mg, 0.4 μ mol), THPTA **31** (0.35 mg, 0.8 μ mol) and sodium ascorbate (0.4 mg, 2 μ mol) in PBS buffer (100 μ L). Both solutions were previously degassed under argon. The reaction was stirred for 2h at 30°C under Argon and the product was directly purified by RP-HPLC affording the pure compound **50** as a light yellow powder (0.1 mg, 13 nmol)



Yield: Low

RP-HPLC: RT = 15.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₃₄₄H₅₀₈Fe₄N₉₀O₉₀

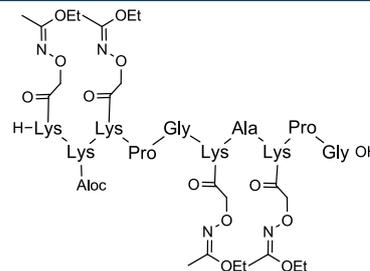
Calcd MW = 7567.8 g.mol⁻¹

Found MW = 7566.5 g.mol⁻¹

Linear RAFT4(Acetimidate)-NHAloc

51

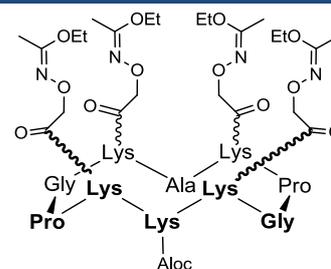
The linear decapeptide **51** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (1.5 g) using the general procedure and modified amino acid **5**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using a AcOH/TFE/DCM (1/2/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (1.78 g, 1.05 mmol).

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 13.0 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₅H₁₂₇N₁₉O₂₅Calcd MW = 1694,9 g.mol⁻¹Found MW = 1695.7 g.mol⁻¹

cRAFT 4(Acetimidate)-NHAloc

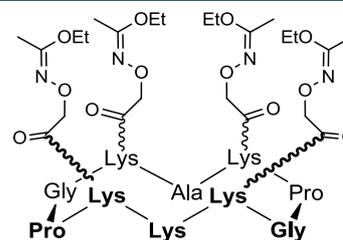
52

The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using the crude linear peptide **51** (1.78 g, 1.05 mmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **52** as a light brown powder (1.76 g, 1.05 mmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 14.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₅H₁₂₅N₁₉O₂₄Calcd MW = 1676,9 g.mol⁻¹Found MW = 1678.3 g.mol⁻¹cRAFT 4(Acetimidate)-NH₂

53

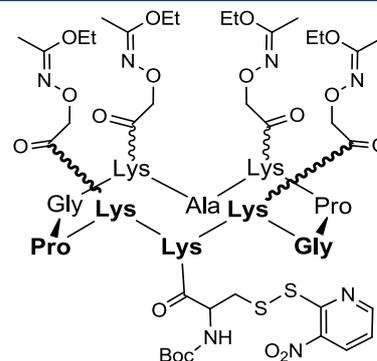
Peptide **52** (1.76 g, 1.05 mmol) was dissolved in 100 ml of anhydrous CH₂Cl₂/DMF (1/1) under argon. 50 equiv of phenylsilane and 0.2 equiv of Pd(PPh₃)₄ were added under argon. The reaction was stirred under argon for 30 min at room temperature. The mixture was treated with 6ml of methanol before solvent removal under reduced pressure. The deprotected peptide **53** was obtained as a brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (1.57 g, 0.99 mmol).

**Yield: 94%****RP-HPLC:** RT = 13.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₁H₁₂₀N₁₉O₂₂Calcd MW = 1591,8 g.mol⁻¹Found MW = 1592.8 g.mol⁻¹

cRAFT 4(Acetimidate)-NH-Boc-CysNpys

54

Scaffold **53** (1.57 g, 0.99 mmol), 2 equiv of Boc-Cys(Npys)-OH (750 mg, 2 mmol) and 2 equiv of PyBop (1.04 g, 2 mmol) were dissolved in 5 mL of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. Peptide **54** was obtained as a dark brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (1.85 g, 0.95 mmol).



Yield: 96%

RP-HPLC: RT = 16.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

 $C_{84}H_{136}N_{22}O_{27}S_2$

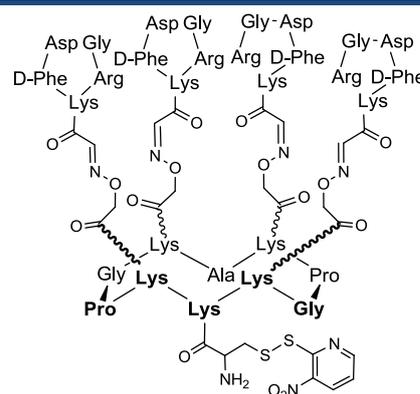
Calcd MW = 1950,2 g.mol⁻¹

Found MW = 1950.2 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime}-NH-CysNpys

55

Scaffold **54** (30 mg, 15.4 μmol) and 6 equiv of c[-RGDFK(COCHO)-] **17** (61 mg, 92.4 μmol) were dissolved in 2 mL of a TFA/H₂O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **55** as a white powder (29.3 mg, 7.1 μmol).



Yield: 46%

RP-HPLC: RT = 10.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

 $C_{179}H_{260}N_{58}O_{53}S_2$

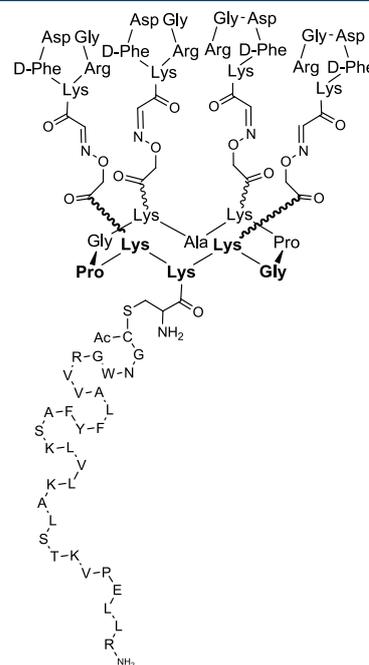
Calcd MW = 4136.5 g.mol⁻¹

Found MW = 4137.7 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-NH-Cys-poro4953

56

Compound **55** (2 mg, 0.48 μmol) and JMV4953 (2 mg, 0.49 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF/PBS (pH 4.8) (3/1) under argon. The reaction mixture was stirred for 5 min at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min) affording compound **56** as a white powder (50 μg , 6.7 nmol).



Yield: <5%

RP-HPLC: RT = 15.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{340}\text{H}_{523}\text{N}_{99}\text{O}_{90}\text{S}_2$

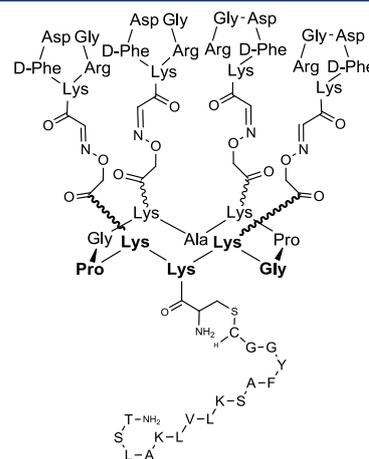
Calcd MW = 7501.7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 7503.7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-NH-Cys-poro5089

57

Compound **55** (4 mg, 0.96 μmol) and JMV5089 (2.3 mg, 1.15 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF/PBS (pH 4.8) (3/1) under argon. The reaction mixture was stirred for 5 min at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min) affording compound **57** as a white powder (2.1 mg, 0.37 μmol).



Yield: 38%

RP-HPLC: RT = 11.0 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{250}\text{H}_{381}\text{N}_{75}\text{O}_{71}\text{S}_2$

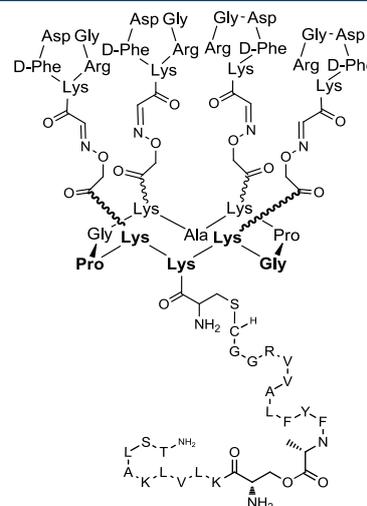
Calcd MW = 5637.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 5638.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-NH-Cys-poro5119s

58

Compound **55** (10 mg, 2.42 μmol) and JMV5119 (6.8 mg, 2.43 μmol) were dissolved in 500 μL of ACN/PBS (pH 4.8) (1/3) under argon. The reaction mixture was stirred for 5 min at r.t under argon. The product was purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min) affording compound **58** as a white powder (8.4 mg, 1.33 μmol).



Yield: 55%

RP-HPLC: RT = 11.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{284}H_{436}N_{84}O_{77}S_2$

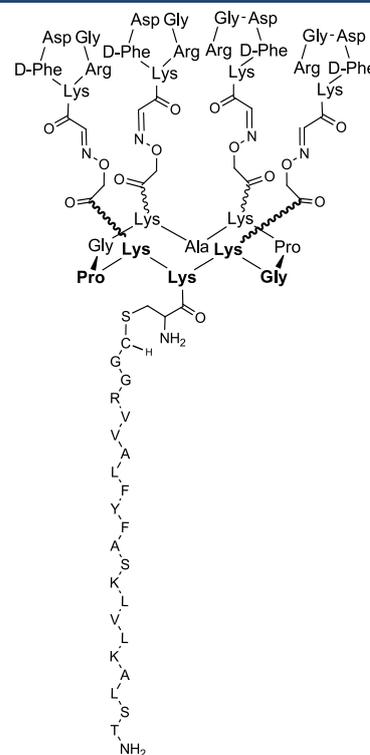
Calcd MW = 6323,3 g.mol⁻¹

Found MW = 6325.3 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-NH-Cys-poro5119

59

Compound **58** (2 mg, 0.32 μmol) was dissolved in 500 μL of PBS/ACN (pH 7.4) (3/1) under argon. The reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The product was purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min) affording compound **59** as a white powder (1.2 mg, 0.19 μmol).



Yield: 60%

RP-HPLC: RT = 14.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{284}H_{436}N_{84}O_{77}S_2$

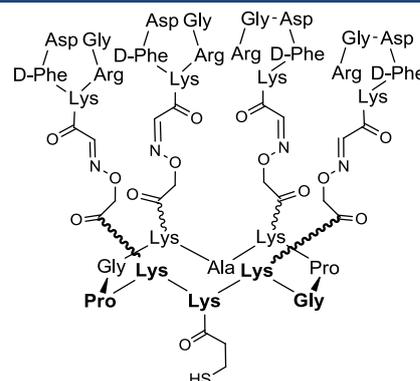
Calcd MW = 6323,3 g.mol⁻¹

Found MW = 6325.3 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDFK-]_{oxime})-SH

60

Scaffold **18** (15 mg, 3.9 μmol) and 1.5 equiv of 3-(tritylthio)propanoic acid succinimidyl ester **10** (2.6 mg, 5.8 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA. The mixture was stirred for 1 h. Precipitation from Et₂O afforded cyclic protected peptide as a light brown powder (16.2 mg, 3.9 μmol). This crude material was directly dissolved in 1ml of a solution of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) and stirred for 30 min. The product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **60** as a white powder (11.6 mg, 2.9 μmol).



Yield: 74%

RP-HPLC: RT = 9.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{174}H_{257}N_{55}O_{51}S$

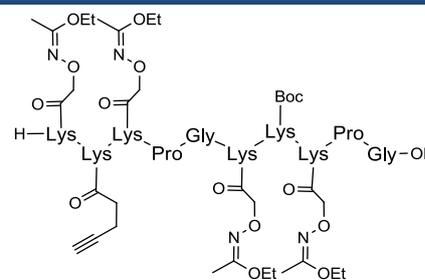
Calcd MW = 3967.4 g.mol⁻¹

Found MW = 3967.4 g.mol⁻¹

Linear RAFT4(Acetimidate)-(NHAlcyne)(NHBoc)

61

Linear decapeptide **61** was assembled on 2-chlorotritylchloride resin (500 mg) using the general procedure and modified amino acid **5** and **7**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.6 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/1/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (554 mg, 0.3 mmol).



Yield: Quantitative

RP-HPLC: RT = 15.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{84}H_{140}N_{20}O_{25}$

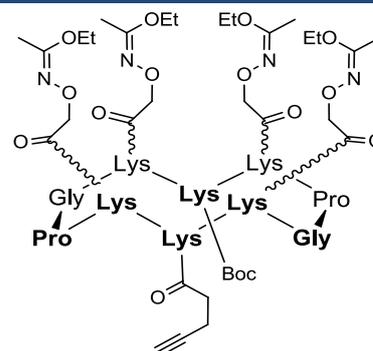
Calcd MW = 1848.2 g.mol⁻¹

Found MW = 1848.1 g.mol⁻¹

cRAFT4(Acetimidate)-(NHAlcyne)(NHBoc)

62

The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **61** (554 mg, 0.3 mmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **62** as a light brown powder (550 mg, 0.3 μmol). This crude material was used without further purification.



Yield: Quantitative

RP-HPLC: RT = 15.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₈₄H₁₄₀N₂₀O₂₅

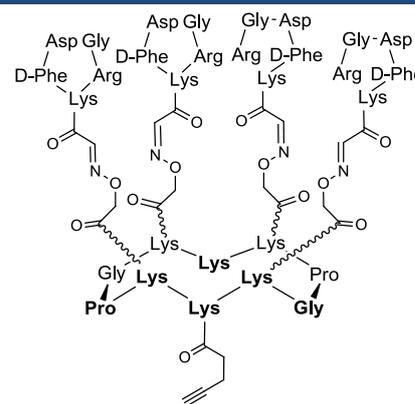
Calcd MW = 1830.2 g.mol⁻¹

Found MW = 1830.1 g.mol⁻¹

RAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-(NHAlcyne)(NH₂)

63

Scaffold 62 (20 mg, 10.9 μmol) and 6 equiv of c[-RGDfK(COCHO)-] **17** (43 mg, 65.6 μmol) were dissolved in 1 mL of a TFA/H₂O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **63** as a white powder (16.6 mg, 4.1 μmol).



Yield: 38%

RP-HPLC: RT = 10.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₁₇₉H₂₅₅N₅₆O₅₁

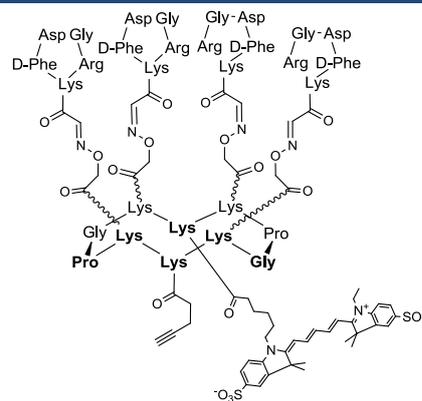
Calcd MW = 4016.4 g.mol⁻¹

Found MW = 4016.7 g.mol⁻¹

RAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime}-(NHAlcyne)(NHCy5)

64

Peptide **63** (3.0 mg, 0.75 μmol) was dissolved in 100 μL of anhydrous DMF and the pH adjusted with DIPEA to pH 9. The solution was added to Cy5 Mono NHS Ester (0.71 mg, 0.93 μmol) and stirred for 2 h at room temperature. The product was then purified by RP-HPLC affording fluorescent peptide **64** as a deep blue solid powder (2.0 mg, 0.43 μmol).



Yield: 60%

RP-HPLC: RT = 10.7 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{212}\text{H}_{301}\text{N}_{58}\text{O}_{58}\text{S}_2$

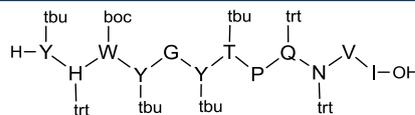
Calcd MW = 4654.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 4655.5 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

H-GE11(Prot)-OH

65

Linear peptide **65** was assembled on 2-chlorotriethylchloride[®] resin (300 mg) using the general procedure and automatised synthesis. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Ile-OH) was performed manually following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.6 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/1/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a white powder after precipitation, triturating, washing with diethyl ether and lyophilisation (470 mg, 0.18 mmol).



Yield: quantitative

RP-HPLC: RT = 24.0 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{153}\text{H}_{179}\text{N}_{17}\text{O}_{21}$

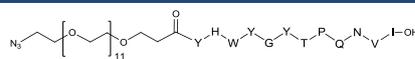
Calcd MW = 2592.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 2593.6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

N₃-dPEG(11)-GE11-OH

66

To a stirred mixture of **65** (30 mg, 11.6 μmol) in DMF (1 ml) was added in one portion a solution of N₃-PEG(11)-NHS (15 mg 20.3 μmol , purchased from IRIS Biotech GMBH) in DMF (1 ml) at room temperature. The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by additions of DIPEA. After 2 h of reaction, the solvents were evaporated under reduced pressure. To this mixture was added 1 ml of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) deprotected solution. The reaction was stirred for 1h30. The product was purified by RP-HPLC affording peptide **66** as a white powder (11.3 mg, 5.2 μmol).



Yield: 45%

RP-HPLC: RT = 11.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{102}\text{H}_{148}\text{N}_{20}\text{O}_{32}$

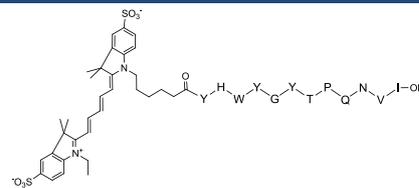
Calcd MW = 2166.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 2166.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Cy5-GE11-OH

67

To a stirred mixture of **65** (12 mg, 4.6 μmol) in DMF (1 ml) at pH=9, was added commercial Cy5-mono-NHS-ester in one portion (4.2 mg 5.6 μmol). After 2 h of reaction, the solvents were evaporated under reduced pressure. To this mixture was added 1 ml of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) deprotected solution. The reaction was stirred 1h30. The product was purified by RP-HPLC affording the peptide **67** as a dark blue powder (4.8 mg, 2.2 μmol).



Yield: 48%

RP-HPLC: RT = 10.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₁₀₈H₁₃₄N₁₉O₂₆S₂⁻

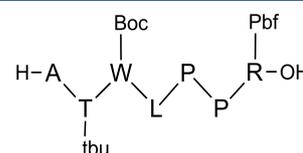
Calcd MW = 2178.5 g.mol⁻¹

Found MW = 2178.9 g.mol⁻¹

H-ATWLPPR(Prot)-OH

68

Linear peptide **68** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (300 mg) using the general procedure and automatised synthesis. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) was performed manually following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.5 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFA/DCM (1/99) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a white powder after precipitation, triturating, washing with diethyl ether and lyophilisation (190 mg, 0.15 mmol).



Yield: Quantitative

RP-HPLC: RT = 15.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₆₃H₉₆N₁₁O₁₄S

Calcd MW = 1263.6 g.mol⁻¹

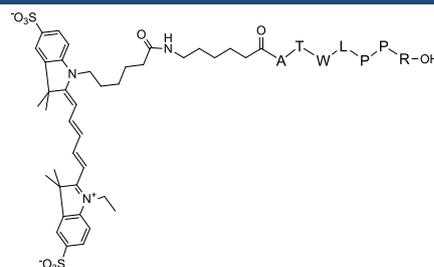
Found MW = 1264.0 g.mol⁻¹

Cy5-Ahx-ATWLPPR-OH

69

To a stirred mixture of uncleaved **68** (~10% bead) in DMF (10 ml) at pH=9, was added in one portion 2 equiv of Fmoc-Ahx-OH and 2 equiv of PyBop. After 30 min of coupling, washing with DMF and deprotection of the Fmoc group, the peptide was released from the resin using a TFA/DCM (1/99) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a white powder after precipitation with diethyl ether (20 mg, 15 μmol).

To 1/4 of this crude material (5 mg, 3.7 μmol) in DMF (1 ml) at pH=9, was added commercial Cy5-mono-NHS-ester in one portion (3.4 mg 4.5 μmol). After 2 h of reaction, the solvents were evaporated under reduced pressure. To this mixture was added 1 ml of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) deprotecting solution. The reaction was stirred 1h30. The product was purified by RP-HPLC affording the peptide **69** as a dark blue powder (3.5 mg, 2.2 μmol).



Yield: 60%

RP-HPLC: RT = 10.4 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₇₉H₁₀₉N₁₄O₁₇S₂

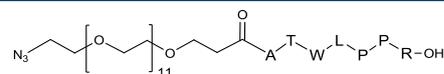
Calcd MW = 1591.0 g.mol⁻¹

Found MW = 1591.6 g.mol⁻¹

N₃-dPEG(11)-ATWLPPR-OH

70

To a stirred mixture of **68** (20 mg, 15.8 μmol) in DMF (1 ml) was added in one portion a solution of N₃-PEG(11)-NHS (15 mg 20.3 μmol, purchased from IRIS Biotech GMBH) in DMF (1 ml) at room temperature. The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by additions of DIPEA. After 2 h of reaction, the solvents were evaporated under reduced pressure. To this mixture was added 1 ml of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) deprotected solution. The reaction was stirred for 1h30. The product was purified by RP-HPLC affording peptide **70** as a white powder (14.6 mg, 10.0 μmol).



Yield: 63%

RP-HPLC: RT = 11.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₆₇H₁₁₂N₁₄O₂₂

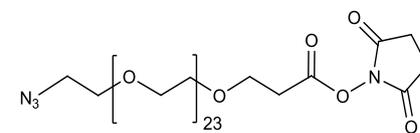
Calcd MW = 1465.7 g.mol⁻¹

Found MW = 1466.1 g.mol⁻¹

N₃-dPEG(24)-CONHS

71

To a stirred mixture of N₃-PEG(24)-COOH (50mg, 42.6 μmol) in AcOEt/dioxane (1/1, 1 mL) at room temperature was added 1.5 equiv of NHS (7.5 mg, 65 μmol) followed by 1 equiv of DCC (10 mg, 44 μmol). The reaction mixture was stirred overnight. The mixture was filtrated on a pad of celite and purified over C18 silica after evaporation of the solvents to yield compound **71** as a white powder (42.2 mg, 33.2 μmol).



Yield: 78%

MS (ESI-MS, positive mode):

C₅₅H₁₀₄N₄O₂₈

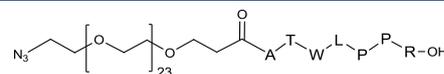
Calcd MW = 1269.4 g.mol⁻¹

Found MW = 1269.6 g.mol⁻¹

N₃-dPEG(24)-ATWLPPR-OH

72

To a stirred mixture of **68** (15 mg, 11.9 μmol) in DMF (500 μl) was added in one portion a solution of N₃-PEG(24)-NHS **71** (18 mg, 14.2 μmol) in DMF (500 μl) at room temperature. The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by additions of DIPEA. After 2 h of reaction, the solvents were evaporated under reduced pressure. To this mixture was added 1 ml of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) deprotecting solution. The reaction was stirred for 1h30. The product was purified by RP-HPLC affording peptide **72** as a white powder (10 mg, 5.0 μmol).



Yield: 42%

RP-HPLC: RT = 11.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₉₁H₁₅₇N₁₄O₃₄

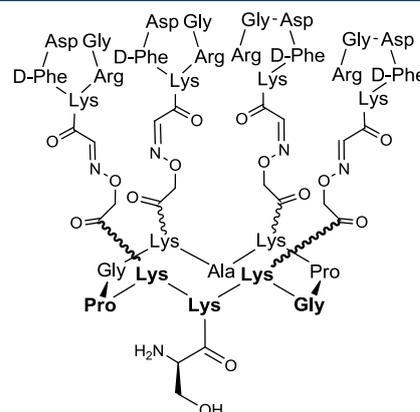
Calcd MW = 1991.3 g.mol⁻¹

Found MW = 1991.5 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-(**boc-Ser-tbu**)**73**

Scaffold **18** (10 mg, 2.6 μmol) and 2 equiv of **1** (2 mg, 5.6 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA (3 μL , 17.2 μmol) The mixture was stirred for 1 h and the product was precipitated with ether affording the crude conjugate as a light yellow powder (RP-HPLC: RT = 10.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)).

To this crude compound was added 1 ml of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) deprotecting solution. The reaction was stirred 1h30. The product was precipitated with ether affording peptide **73** as a white powder (10.7 mg, 2.6 μmol).

**Yield: Quantitative**

RP-HPLC: RT = 10.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

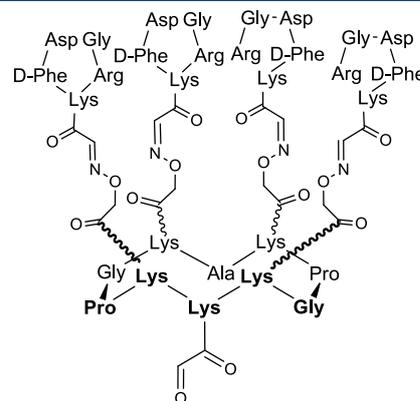
C₁₈₃H₂₇₄N₅₆O₅₄

Calcd MW = 4122.6 g.mol⁻¹

Found MW = 4123.3 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-(**CHOCHO**)**74**

Scaffold **73** (10.7 mg, 2.6 μmol) and 20 equiv of NaIO₄ (11 mg, 52 μmol) were dissolved in water at 10⁻²M. The mixture was stirred for 45 min at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing scaffold **74** as a white powder (7.6 mg, 1.9 μmol).

**Yield: 73%**

RP-HPLC: RT = 9.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

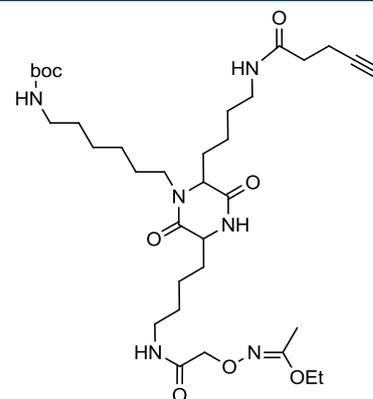
C₁₇₃H₂₅₃N₅₅O₅₂

Calcd MW = 3935.3 g.mol⁻¹

Found MW = 3936.5 g.mol⁻¹

dicetopipérazine

75



Product prepared in E. Dufour's thesis

RP-HPLC: RT = 11.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

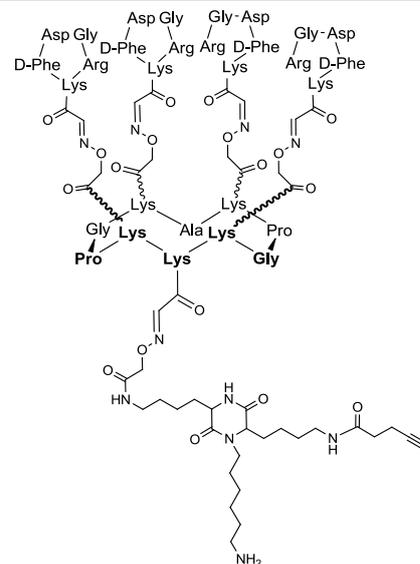
$C_{29}H_{49}N_6O_6$

Calcd MW = 577.7 $g \cdot mol^{-1}$

Found MW = 577.7 $g \cdot mol^{-1}$

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-dicéto_{oxime}-NH₂-alc

76



Scaffold **74** (7.6 mg, 1.9 μmol) and 1.2 equiv of dicetopipérazine **75** (1.5 mg, 2.2 μmol) were dissolved in 250 μL of a TFA/H₂O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **76** as a white powder (5.0 mg, 1.1 μmol).

Yield: 58%

RP-HPLC: RT = 10.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{198}H_{295}N_{61}O_{56}$

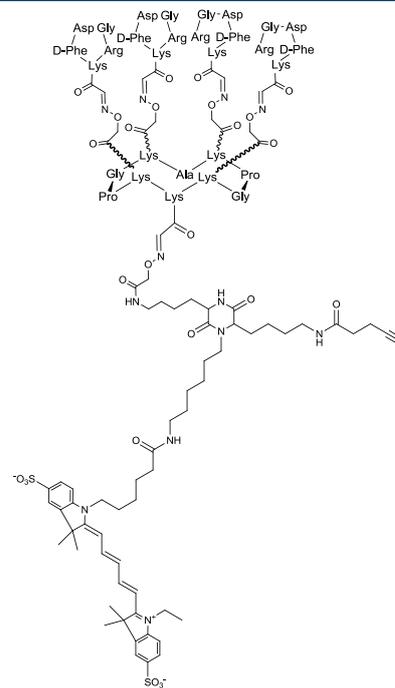
Calcd MW = 4425.9 $g \cdot mol^{-1}$

Found MW = 4426.6 $g \cdot mol^{-1}$

cRAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime}-dicéto_{oxime}-NHCy5-alc

77

Scaffold **76** (5.0 mg, 1.1 μmol) and 1.4 equiv of commercial Cy5-Mono-NHS-ester (1.5 mg, 1.57 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted at 9 with DIPEA (1 μL , 6 μmol) The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **77** as a deep blue powder (4.0 mg, 0.8 μmol).



Yield: 73%

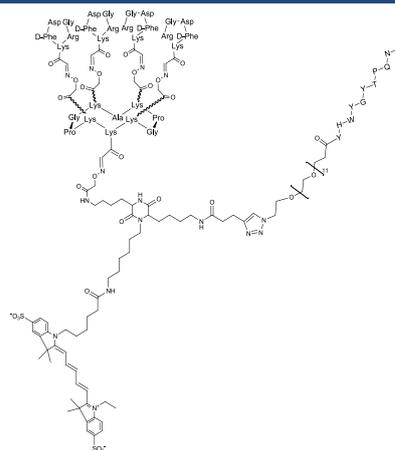
RP-HPLC: RT = 10.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

 $\text{C}_{231}\text{H}_{332}\text{N}_{63}\text{O}_{63}\text{S}_2$
Calcd MW = 5063.7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 5064.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ cRAFT4(c[-RGDFK-])_{oxime}-dicéto_{oxime}-NHCy5-dPEG(11)GEE11_{click}

78

To a solution of **77** (1 mg, 0.2 μmol) and 1.4 equiv of **66** (0.6 mg, 0.27 μmol) in PBS Buffer (100mM)/ACN (7/3) (200 μL) was added a solution of CuSO_4 (0.1 mg, 0.4 μmol), THPTA **31** (0.35 mg, 0.8 μmol) and sodium ascorbate (0.4 mg, 2 μmol) in PBS buffer (100 μL). Both solutions were previously degassed under argon. The reaction was stirred for 2h at 30°C under argon and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure compound **78** as a dark blue powder (1.2 mg, 0.16 μmol).



Yield: 80%

RP-HPLC: RT = 11.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

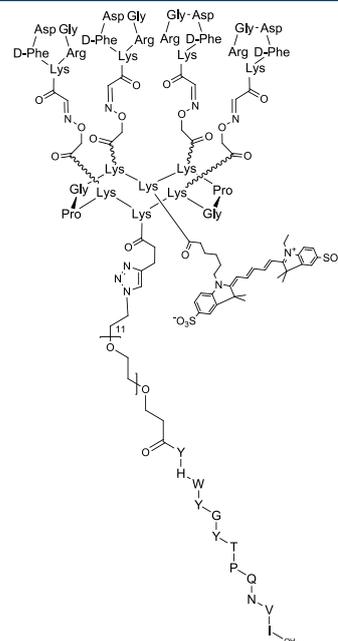
 $\text{C}_{334}\text{H}_{482}\text{N}_{83}\text{O}_{95}\text{S}_2$
Calcd MW = 7230.7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 7231.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-(dPEG(11)-GE11)_{click}-(NHCy5)

79

To a solution of **64** (1.2 mg, 0.25 μmol) and 1.2 equiv of **66** (0.7 mg, 0.3 μmol) in PBS Buffer (100mM)/ACN (7/3) (200 μL) was added a solution of CuSO_4 (0.1 mg, 0.4 μmol), THPTA **31** (0.35 mg, 0.8 μmol) and sodium ascorbate (0.4 mg, 2 μmol) in PBS buffer (100 μL). Both solutions were previously degassed under argon.

The reaction was stirred for 2h at 30°C under argon and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure compound **79** as a dark blue powder (1.2 mg, 0.18 μmol).



Yield: 72%

RP-HPLC: RT = 11.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{314}\text{H}_{449}\text{N}_{78}\text{O}_{90}\text{S}_2$

Calcd MW = 6820.7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

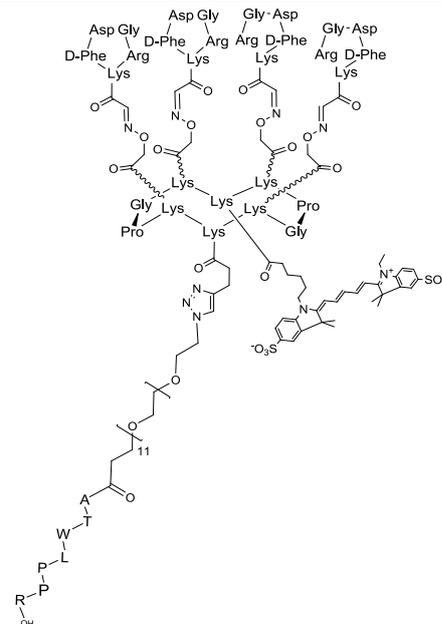
Found MW = 6821.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-(dPEG(11)-ATWLPPR)_{click}-(NHCy5)

80

To a solution of **64** (1.7 mg, 0.37 μmol) and 1.2 equiv of **70** (0.8 mg, 0.5 μmol) in PBS Buffer (100mM)/ACN (7/3) (200 μL) was added a solution of CuSO_4 (0.1 mg, 0.4 μmol), THPTA **31** (0.35 mg, 0.8 μmol) and sodium ascorbate (0.4 mg, 2 μmol) in PBS buffer (100 μL). Both solutions were previously degassed under argon.

The reaction was stirred for 2h at 30°C under argon and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure compound **80** as a dark blue powder (0.8 mg, 0.13 μmol).



Yield: 35%

RP-HPLC: RT = 11.3 min (C18, 214 nm,

5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{279}H_{413}N_{72}O_{80}S_2$

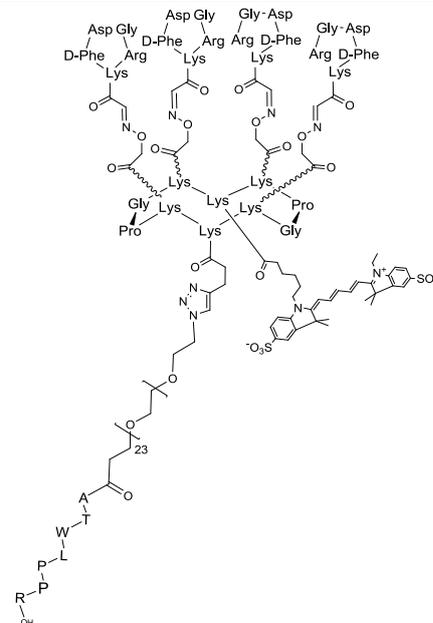
Calcd MW = 6120.0 g.mol⁻¹

Found MW = 6121.1 g.mol⁻¹

cRAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-(dPEG(24)-ATWLPPR)_{click}-(NHCy5)

81

To a solution of **64** (2.3 mg, 0.5 μmol) and 1.2 equiv of **72** (1.5 mg, 0.75 μmol) in PBS Buffer (100mM)/ACN (7/3) (200 μL) was added a solution of CuSO₄ (0.1 mg, 0.4 μmol), THPTA **31** (0.35 mg, 0.8 μmol) and sodium ascorbate (0.4 mg, 2 μmol) in PBS buffer (100 μL). Both solutions were previously degassed under argon. The reaction was stirred for 2h at 30°C under argon and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure compound **81** as a dark blue powder (2 mg, 0.3 μmol).



Yield: 60%

RP-HPLC: RT = 11.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{303}H_{461}N_{72}O_{92}S_2$

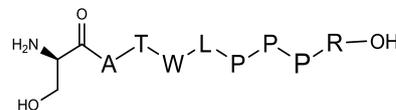
Calcd MW = 6648.6 g.mol⁻¹

Found MW = 6651.2 g.mol⁻¹

H-SATWLPPR-OH

82

Linear decapeptide **82** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (300 mg) using the general procedure and automatised synthesis. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) was performed manually following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.5 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a white powder after precipitation, triturating, washing with diethyl ether and lyophilisation (150 mg, 0.15 mmol).



Yield: Quantitative

RP-HPLC: RT = 1.12 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{48}H_{73}N_{13}O_{12}$

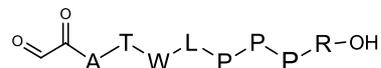
Calcd MW = 1024.1 g.mol⁻¹

Found MW = 1024.4 g.mol⁻¹

CHO-ATWLPPR-OH

83

Peptide **82** (150 mg, 0.15 mmol) and 10 equiv of NaIO₄ (321 mg, 1.5 mmol) were dissolved in water at 10⁻²M. The mixture was stirred for 20 min at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing peptide **83** as a white powder (50.6 mg, 51 μmol).



Yield: 34%

RP-HPLC: RT = 1.16 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₄₇H₆₈N₁₂O₁₂

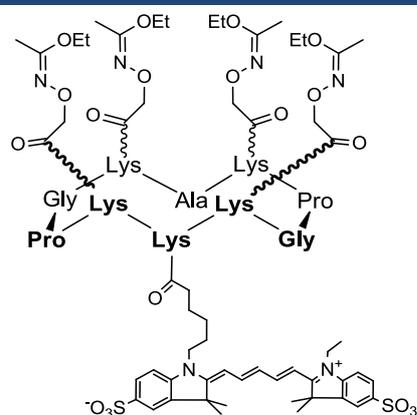
Calcd MW = 993.1 g.mol⁻¹

Found MW = 993.8 g.mol⁻¹

RAFT4(Acetimidate)-NHCy5

84

Scaffold **53** (6.7 mg, 4.2 μmol) and 1 equiv of commercial Cy5-Mono-NHS-ester (4 mg, 4.2 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA (4 μL, 23 μmol) The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **84** as a deep blue powder (6.1 mg, 2.7 μmol).



Yield: 64%

RP-HPLC: RT = 2.11 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₁₀₄H₁₅₈N₂₁O₂₉S₂⁻

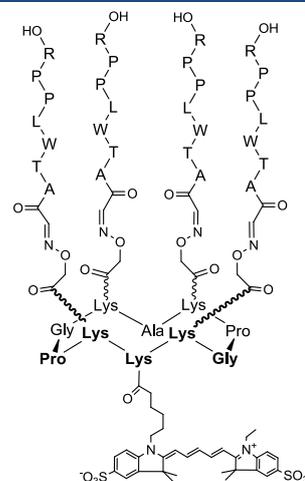
Calcd MW = 2230,6 g.mol⁻¹

Found MW = 2230.6 g.mol⁻¹

RAFT4(ATWLPPR)-NHCy5

85

Scaffold **84** (3 mg, 1.3 μmol) and 6 equiv of Ald-ATWLPPR-OH **83** (8.0 mg, 8.0 μmol) were dissolved in 1 mL of a TFA/H₂O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **85** as a dark blue powder (4.0 mg, 0.7 μmol).



Yield: 53%

RP-HPLC: RT = 1.40 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

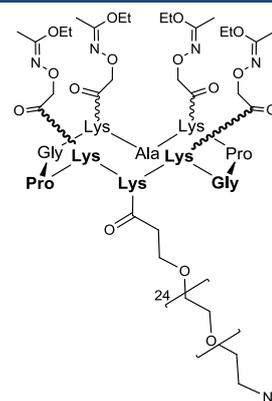
$C_{256}H_{370}N_{65}O_{65}S_2$

Calcd MW = 5462,2 g.mol⁻¹

Found MW = 5463.6 g.mol⁻¹

RAFT4(Acetimidate)-NH.dPEG(24)-N₃

86



Scaffold **53** (20 mg, 12.5 μmol) and 1.2 equiv of **71** (20 mg, 15.7 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA. The mixture was stirred for 1 h and the product precipitated in ether affording conjugate **86** as a light yellow powder (30 mg, 10.7 μmol).

Yield: 86%

RP-HPLC: RT = 15.0 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

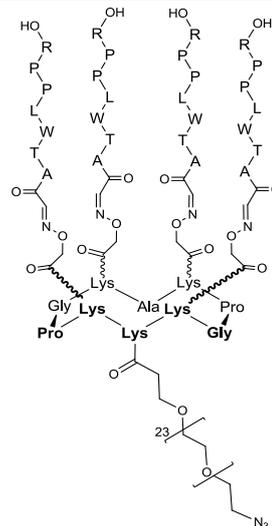
MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{124}H_{224}N_{22}O_{48}$

Calcd MW = 2791.2

RAFT4(ATWLPPR)_{oxime}-NH.dPEG(24)-N₃

87



Scaffold **86** (5 mg, 1.8 μmol) and 6 equiv of Ald-ATWLPPR-OH **83** (11 mg, 11.1 μmol) were dissolved in 1 mL of a TFA/H₂O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **87** as a white powder (3.0 mg, 0.5 μmol).

Yield: 28%

RP-HPLC: RT = 12.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{274}H_{432}N_{66}O_{83}$

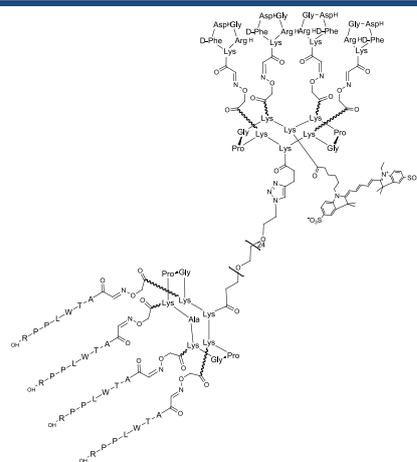
Calcd MW = 5978.7 g.mol⁻¹

Found MW = 5974.9 g.mol⁻¹

RAFT4(c[-RGDfK-])_{oxime}-(NHCy5)-(RAFT4(ATWLPPR)_{oxime})_{click}

88

To a solution of **64** (1 mg, 0.21 μ mol) and 1 equiv of **87** (1.3 mg, 0.22 μ mol) in PBS Buffer (100mM)/ACN (7/3) (200 μ L) was added a solution of CuSO₄ (0.1 mg, 0.4 μ mol), THPTA **31** (0.35 mg, 0.8 μ mol) and sodium ascorbate (0.4 mg, 2 μ mol) in PBS buffer (100 μ L). Both solutions were previously degassed under argon. The reaction was stirred for 2h at 35°C under argon and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure compound **88** as a dark blue powder (0.8 mg, 75 nmol).



Yield: 35%

RP-HPLC: RT = 11.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₄₈₆H₇₃₃N₁₂₄O₁₄₁S₂

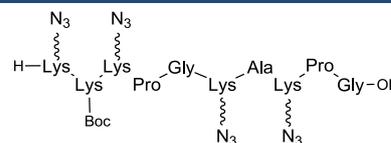
Calcd MW = 10633.1 g.mol⁻¹

Found MW = 10632.9 (+18) g.mol⁻¹

Lin-RAFT(4N₃)-Boc

89

Linear decapeptide **89** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (500 mg) using the general procedure and modified amino acid **9**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFA/DCM (1/99) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (435 mg, 0.35 mmol).



Yield: Quantitative

RP-HPLC: RT = 12.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₅₂H₈₇N₂₃O₁₃

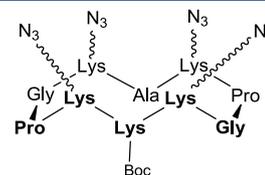
Calcd MW = 1242.4 g.mol⁻¹

Found MW = 1242.9 g.mol⁻¹

c-RAFT(4N₃)-Boc

90

The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **89** (435 mg, 0.35 mmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **90** as a light brown powder (400 mg, 0.32 mmol). This crude material was used without further purification.



Yield: 91%

RP-HPLC: RT = 14.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₅₂H₈₅N₂₃O₁₂

Calcd MW = 1224.4 g.mol⁻¹

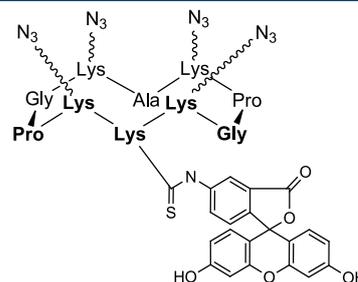
Found MW = 1224.9 g.mol⁻¹

c-RAFT(4N₃)-NHFluorescein

91

Scaffold **90** (200 mg, 0.16 mmol) was dissolved in 5 mL of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and the precipitation with Et₂O afforded deprotected peptide as a white solid powder.

This crude material and 1.5 equiv of commercial Fluorescein isothiocyanate (94 mg, 0.24 mmol) were dissolved in 2 mL of DMF. The pH of the solution was adjusted at 9 with DIPEA. The mixture was stirred for 1 h 30 and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **91** as an orange powder (133 mg, 87.8 μmol).



Yield: 55%

RP-HPLC: RT = 14.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₆₈H₈₈N₂₄O₁₅S

Calcd MW = 1513.7 g.mol⁻¹

Found MW = 1514.0 g.mol⁻¹

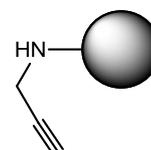
General procedure for C-Terminal modification

- Hexapeptide synthesis

Propargylamine modified resin

92

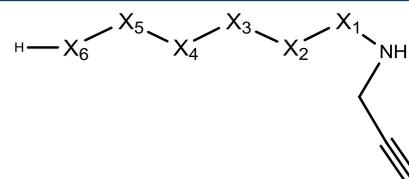
To a commercially available aldehyde resin FMPB (4-(4-formyl-3-methoxyphenoxy)butyl), (1 g, loading 0.74 mmol/g) in 20 ml MeOH/DMF (1/1) were added 10 equivalents of both propargylamine and NaBH₃CN. Additionally, 10 equivalents of AcOH were added. After gently stirring the mixture for 2.5 h at 80 ° C, the resin was washed successively with DMF, DCM and MeOH and dried^[142].



C-Term alkyne peptide

93

The linear hexapeptides were assembled on propargylamine modified resin (300 mg, loading 0.5 mmol/g) using the general procedure and automated synthesis. The peptides were released from the resin using a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a white or light yellow powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether.



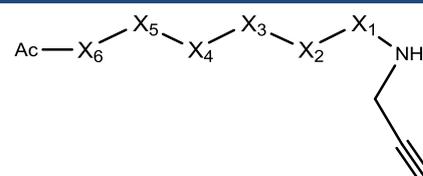
Yield: 50-85%

Acetyl-C-Term alkyne peptide

94

The linear hexapeptides were assembled on propargylamine modified resin (300 mg, loading 0.5 mmol/g) using the general procedure and automated synthesis. The resins were then treated 2x30 min with a solution of Ac₂O/pyridine/DCM (1/2/7) and washed with DCM (3 x 10 ml).

The peptides were released from the resin using a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a white or light yellow powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether.



Yield: 50-85%

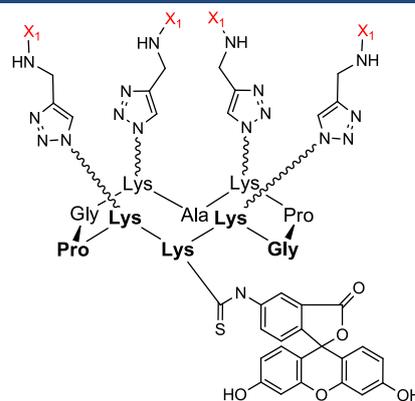
RAFT(4XXXXXX-)-NHFluo

95

To a solution of **91** (5 mg, 3.3 μmol) and 6 equiv C-term modified peptide in PBS Buffer (100mM)/ACN (7/3) or PBS Buffer (100mM)/DMF (7/3) (500 μL) was added a solution of CuSO_4 (1 mg, 4 μmol), THPTA **31** (3.5 mg, 8 μmol) and sodium ascorbate (4 mg, 20 μmol) in PBS buffer (100 μL). Both solutions were previously degassed under argon.

The reaction was stirred for 1-3h at 45°C under Argon. The products were obtained as a dark orange powder after purification by RP-HPLC.

Note: Preliminary compounds ^{*M.W} were synthesised with low yield using microwaves and no THPTA **31**.



Products	Sequence	Molecular Formula	Calcd MW	Found MW	RP-HPLC	Rdt
	$X_1 =$		M (g.mol ⁻¹)	M (g.mol ⁻¹)	min	
96	H-Val-Pro-Val-Arg-Phe-Ser-	C ₂₁₂ H ₃₁₂ N ₆₄ O ₄₃ S	4477.3	4477.5	10.2	22% ^{*M.W}
97	H-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Arg-Ser-	C ₂₁₂ H ₂₈₈ N ₆₄ O ₅₅ S	4645.1	4645.1	9.4	34% ^{*M.W}
98	H-Ser-Tyr-Ile-His-Trp-Phe-	C ₂₅₆ H ₃₁₂ N ₆₄ O ₄₇ S	5069.8	5069.8	9.6	28% ^{*M.W}
99	H-Tyr-Phe-Asn-Val-Trp-Gly-	C ₂₄₀ H ₂₉₂ N ₆₀ O ₄₇ S	4801.4	4802.3	11.5	35%
100	H-Trp-Phe-Gln-Gln-Lys-Pro-	C ₂₄₄ H ₃₂₄ N ₆₈ O ₄₇ S	4993.8	4994.0	10.2	12% ^{*M.W}
101	H-His-Trp-Phe-Gln-Gln-Lys	C ₂₄₈ H ₃₂₄ N ₇₆ O ₄₇ S	5153.9	5255.2	10.3	14%
102	H-Val-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Arg-	C ₂₂₀ H ₃₀₄ N ₆₄ O ₅₁ S	4693.3	4693.4	10.8	53%
103	H-Ala-Arg-Ser-Thr-Tyr-Tyr-	C ₂₁₆ H ₂₉₆ N ₆₄ O ₅₅ S	4701.2	4700.0	9.7	74 %
104	H-Lys-Pro-Trp-Ile-Tyr-Ala-	C ₂₄₀ H ₃₂₄ N ₆₀ O ₄₃ S	4769.7	4770.7	9.9	8%
105	H-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Lys-	C ₂₃₆ H ₃₃₆ N ₇₂ O ₅₁ S	5029.8	5030.2	9.9	Non isolé
106	H-Pro-Lys-Pro-Trp-Ile-Tyr-	C ₂₄₈ H ₃₃₂ N ₆₀ O ₄₃ S	4873.8	4875.2	11.1	63%
107	H-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-	C ₂₂₄ H ₃₀₄ N ₆₄ O ₅₅ S	4805.4	4805.4	9.9	83%
108	H-Asn-Met-His-Trp-Val-Lys-	C ₂₂₈ H ₃₂₀ N ₇₂ O ₄₃ S ₅	4917.9	4918.9	10.3	74%
109	Ac-Ala-Arg-Ser-Thr-Tyr-Tyr-	C ₂₁₆ H ₂₉₆ N ₆₄ O ₅₅ S	4701.2	4700.0	10.2	56%
110	Ac-Trp-Phe-Gln-Gln-Lys-Pro-	C ₂₅₂ H ₃₃₂ N ₆₈ O ₅₁ S	5161.9	5163.5	12.4	61%
111	Ac-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Arg-Ser-	C ₂₂₀ H ₂₉₆ N ₆₄ O ₅₉ S	4813.3	4813.6	10.4	38% ^{*M.W}
112	Ac-Tyr-Phe-Asn-Val-Trp-Gly-	C ₂₄₈ H ₃₀₀ N ₆₀ O ₅₁ S	4969.6	4969.9	11.4	42%

General procedure for N-Terminal modification

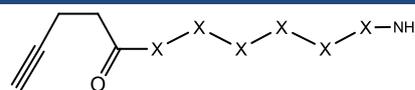
- Hexapeptide synthesis

N-Term alkyne peptide

113

The linear hexapeptides were assembled on Rink amide resin (300 mg, loading 0.5 mmol/g) using the general procedure and automated synthesis. The resins were then treated 30 min with a solution containing 2 equiv of pentynoic acid 2 equiv of PyBop and DIPEA (pH=9).

The peptides were released from the resin using a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) cleavage solution. The linear protected peptide was



Yield: 40-80%

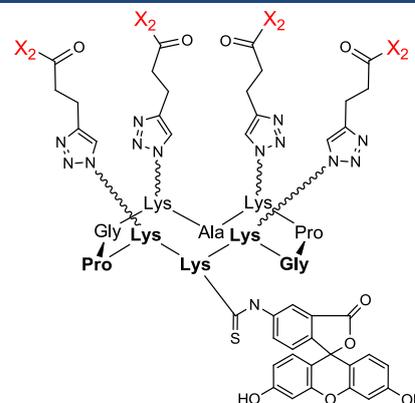
obtained as a white or light yellow powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether.

RAFT(4-XXXXXX-NH₂)-NHFluo

114

To a solution of **91** (5 mg, 3.3 μmol) and 6 equiv N-term modified peptide in PBS Buffer (100mM)/ACN (7/3) or PBS Buffer (100mM)/DMF (7/3) (500 μL) was added a solution of CuSO₄ (1 mg, 4 μmol), THPTA **31** (3.5 mg, 8 μmol) and sodium ascorbate (4 mg, 20 μmol) in PBS buffer (100 μL). Both solutions were previously degassed under argon.

The reaction was stirred for 1-3h at 45°C under argon. The products were obtained as a dark orange powder after purification by RP-HPLC.



Yield: XX%

RP-HPLC: RT = 14.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

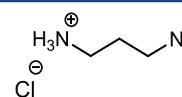
C₈₈H₁₁₂N₁₆O₁₉S

Products	Sequence	Molecular Formula	Calcd MW	Found MW	RP-HPLC	Rdt
	X ₂ =		M (g.mol ⁻¹)	M (g.mol ⁻¹)		
115	- Tyr-Phe-Asn-Val-Trp-Gly-NH ₂	C ₂₄₈ H ₃₀₀ N ₆₀ O ₅₁ S	4969.6	4970.0	11.5	66%
116	- Ala-Arg-Ser-Thr-Tyr-Tyr-NH ₂	C ₂₂₄ H ₃₀₄ N ₆₄ O ₅₉ S	4869.4	4869.8	11.7	81%

3-azidopropan-1-aminium chloride

117

To a stirred mixture of 3-Bromo-propan-1-amine (3 g, 21.7 mmol) in DMF (100 ml) was added NaN₃ (14.1 g, 217 mmol) and the resulting solution was stirred at 90°C overnight. The solvent was evaporated under vacuum and the remaining residue was dissolved in DCM (50 ml), followed by washing with 5% NaHCO₃ (2 x 25 ml), water (2 x 25 ml), and finally brine (100 mL). To the organic fraction was then added 10 ml of HCl 10% and the aqueous fraction was lyophilized to give compound **117** as white crystals (1.8 g, 13.2 mmol)



Yield: 61%

MS (ESI-MS, positive mode):

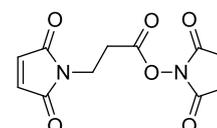
C₃H₉N₄Cl

Calcd MW = 136.4 g.mol⁻¹

Succinimido 3-maleimido-propionate

118

β-Alanine (2.7 g, 30 mmol) was added to a solution of maleic anhydride (2.9 g, 30 mmol) in 30 ml of DMF and the mixture was stirred for 2h. The resulting solution was cooled in an ice bath and N-hydroxysuccinimide (4.2 g, 37 mmol) was added followed by DCC (12.3 g, 63 mmol). After 5min, the ice bath was removed and



Yield: 64%

the solution was vigorously stirred overnight. The white precipitate formed was filtered, washed with 5 ml of DMF and the filtrate was poured onto ice. The white precipitate formed in the water was filtered, washed with 10ml of H₂O and dried in vacuum to give succinimido 3-maleimido-propionate **118** (4.5g, 17.1 mmol).

MS (ESI-MS, positive mode):

C₁₁H₁₀N₂O₆
 Calcd MW = 266.2 g.mol⁻¹
 Found MW = 266.6 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, DMSO):

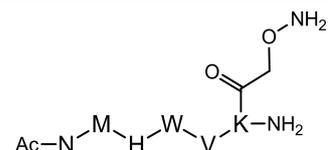
δ 7.04 (s, 2H), 3.74 (t, J = 7 Hz, 2H),
 3.04 (t, J = 7 Hz, 2H), 2.79 (s, 4H)

Ac-NMHWK(OH₂)-NH₂

119

Linear hexapeptides **119** was assembled on Rink amide resin (300 mg, loading 0.5 mmol/g) using the general procedure, modified amino acid **5** and automated synthesis. The resins were then treated 2x30 min with a solution of Ac₂O/pyridine/DCM (1/2/7, 10ml) and washed with DCM (3 x 10 ml).

The peptide was released from the resin using a TFA/TIS/H₂O/DIOD/MeONH₂ (92.5/2.5/2.5/2.5/20 equiv) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a white powder after purification by RP-HPLC and lyophilisation (48 mg, 51.7 μmol).



Yield: 34%

RP-HPLC: RT = 8.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

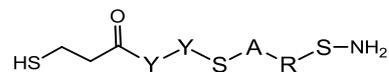
C₄₁H₆₁N₁₃O₁₀S
 Calcd MW = 928.1 g.mol⁻¹
 Found MW = 928.5 g.mol⁻¹

HS-YYSARS-NH₂

120

Linear hexapeptide **120** was assembled on Rink amide resin (300 mg, loading 0.5 mmol/g) using the general procedure and automated synthesis. The resins were then treated 30 min with a solution containing 2 equiv of 3-(Tritylthio)propionic acid, 2 equiv of PyBop and DIPEA (pH=9).

The peptide was released from the resin using a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained after purification by RP-HPLC as a white powder (94 mg, 112.8 μmol).



Yield: 75%

RP-HPLC: RT = 8.4 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

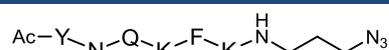
C₃₆H₅₂N₁₀O₁₁S
 Calcd MW = 832.9 g.mol⁻¹
 Found MW = 832.2 g.mol⁻¹

Ac-YNQFK-N₃

121

Linear hexapeptide **121** was assembled on azido modified resin (see the protocol **92** for modification of the resin with **117**) (300 mg, loading 0.4 mmol/g) using the general procedure and automated synthesis. The resins were then treated 2x30 min with a solution of Ac₂O/pyridine/DCM (1/2/7) and washed with DCM (3 x 10 ml).

The peptides were released from the resin using a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained after purification by RP-HPLC as a white powder (66 mg, 69.4 μmol).



Yield: 58%

RP-HPLC: RT = 8.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

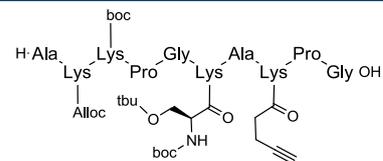
MS (ESI-MS, positive mode):

C₄₄H₆₆N₁₄O₁₀
 Calcd MW = 951.1 g.mol⁻¹
 Found MW = 951.7 g.mol⁻¹

Lin-RAFT(Alc-Ser(boc-tbu)-boc-Alloc)

122

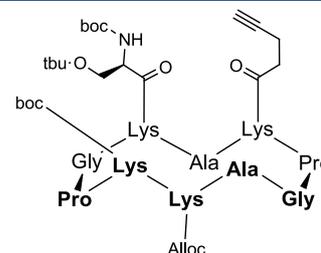
Linear decapeptide **122** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (500 mg) using the general procedure and modified amino acid **2** and **7**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFA/DCM (1/99) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (520 mg, 0.35 mmol).

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 12.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₀H₁₁₇N₁₅O₂₀Calcd MW = 1488.8 g.mol⁻¹Found MW = 1489.4 g.mol⁻¹

cRAFT(Alc-Ser(boc-tbu)-boc)-Alloc

123

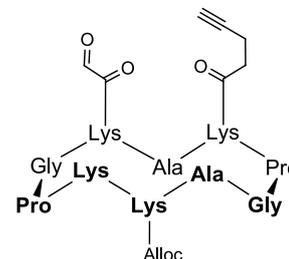
The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **122** (520 mg, 0.35 mmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **123** as a light brown powder (515 mg, 0.35 mmol). This crude material was used without further purification.

**Yield: Quantitative****RP-HPLC:** RT = 14.0 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₇₀H₁₁₅N₁₅O₁₉Calcd MW = 1470.8 g.mol⁻¹Found MW = 1471.4 g.mol⁻¹

cRAFT(Alc-Ald-NH2)-Alloc

124

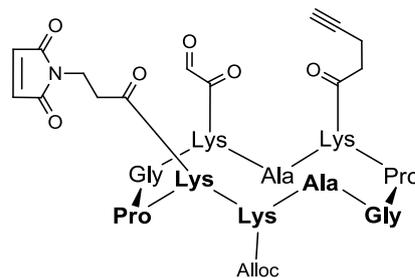
Scaffold **123** (515 mg, 0.35 mmol) was dissolved in 30 mL of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and the precipitation with Et₂O afforded crude deprotected peptide as a white solid powder (400 mg, 0.33 mmol). To this crude material, dissolved in water at 10⁻²M, were added 10 equiv of NaIO₄ (700 mg, 3.27 mmol). The mixture was stirred for 40 min at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclopeptide **124** as a white powder (132 mg, 0.11 mmol).

**Yield: 31%****RP-HPLC:** RT = 14.0 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):**C₅₅H₈₆N₁₄O₁₅Calcd MW = 1183.4 g.mol⁻¹Found MW = 1182.7 (+18) g.mol⁻¹

cRAFT(Alc-Ald-mal)-Alloc

125

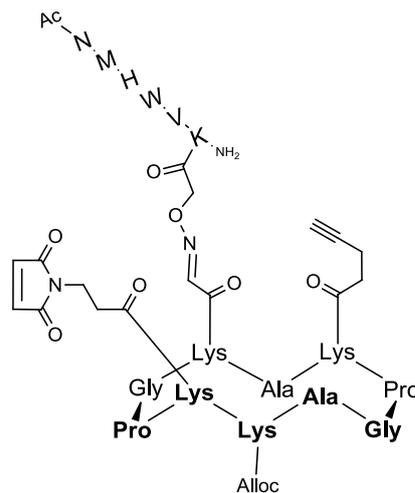
Scaffold **124** (132 mg, 0.11 mmol) and 1.5 equiv of Succinimido 3-maleimido-propionate **128** (45 mg, 0.17 mmol) were dissolved in 2 mL of DMF. The pH of the solution was adjusted at 9 with DIPEA. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **125** as a white powder (67.5 mg, 50.6 μmol).

**Yield: 46%****RP-HPLC:** RT = 9.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{70}\text{H}_{113}\text{N}_{15}\text{O}_{20}$ Calcd MW = 1334.5 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 1334.8 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT(Alc-H2-mal)-NHAlloc

126

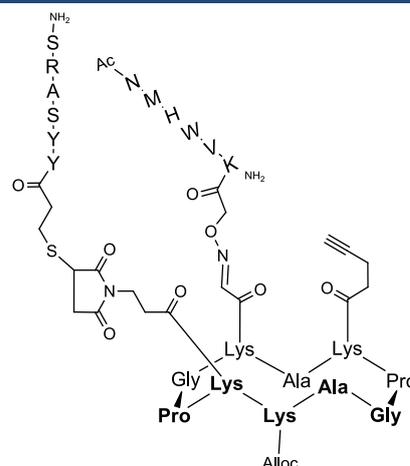
Scaffold **125** (10 mg, 7.5 μmol) and 1.3 equiv of modified peptide **119** (9.1 mg, 9.8 μmol) were dissolved in 1 mL of a TFA/ H_2O (1/9) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **126** as a white powder (13.7 mg, 6.1 μmol).

**Yield: 81%****RP-HPLC:** RT = 14.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{103}\text{H}_{150}\text{N}_{28}\text{O}_{27}\text{S}$ Calcd MW = 2244.6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 2245.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT(Alc-H2-H1)-NHAlloc

127

Scaffold **126** (13.7 mg, 6.1 μmol) and 1.3 equiv of modified peptide **120** (6.6 mg, 7.9 μmol) were dissolved in 1 mL of a PBS buffer (100mM, pH=7.4). The mixture was stirred for 30 min and the product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **127** as a white powder (14.4 mg, 4.7 μmol).

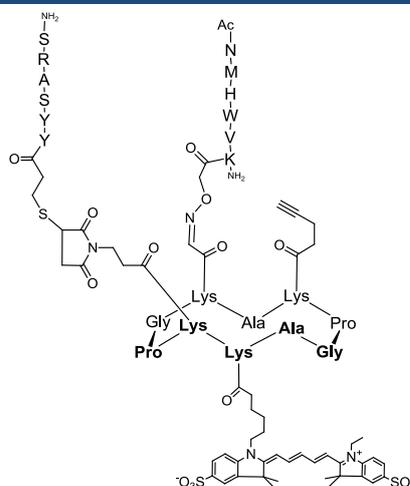
**Yield: 77%****RP-HPLC:** RT = 10.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{139}\text{H}_{202}\text{N}_{38}\text{O}_{38}\text{S}_2$ Calcd MW = 3077.5 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 3078.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT(Alc-H2-H1)-NHCy5

128

Scaffold **127** (14.4 mg, 4.7 μmol) was dissolved in 2 ml of anhydrous $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (1/1) under argon. 50 equiv of phenylsilane and 0.2 equiv of $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ were added under argon. The reaction was stirred under argon for 45 min at room temperature. The mixture was treated with 1 ml of methanol before evaporation of the solvents under reduced pressure. The crude deprotected scaffold was obtained as a brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (**RP-HPLC:** RT = 9.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)).

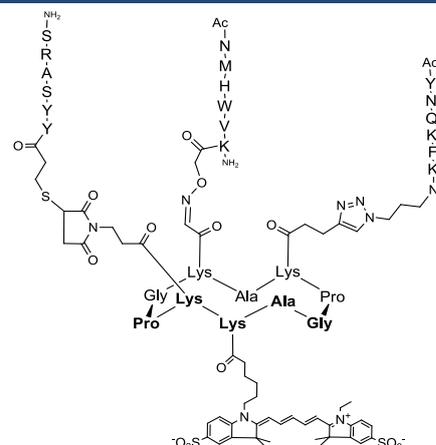
This crude material and 1.2 equiv of commercial Cy5-Mono-NHS-ester (5.4 mg, 5.6 μmol) were dissolved in 500 μL of DMF. The pH of the solution was adjusted at 9 with DIPEA (2 μL , 11.5 μmol). The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording the pure conjugate **128** as a deep blue powder (8.0 mg, 2.2 μmol).

**Yield: 47%****RP-HPLC:** RT = 10.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{168}\text{H}_{235}\text{N}_{40}\text{O}_{43}\text{S}_4$ Calcd MW = 3631.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 3632.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT(H3-H2-H1)-NHCy5

129

To a solution of **128** (3 mg, 0.8 μmol) and 1.2 equiv C-term modified peptide **121** (1mg, 1 μmol) in PBS Buffer (100mM)/ACN (7/3) or PBS Buffer (100mM)/DMF (7/3) (500 μL) was added a solution of CuSO_4 (1 mg, 4 μmol), THPTA **31** (3.5 mg, 8 μmol) and sodium ascorbate (4 mg, 20 μmol) in PBS buffer (100 μL). Both solutions were previously degassed under argon. The reaction was stirred for 2 h at 45°C under Argon. The product was obtained as a dark blue powder after purification by RP-HPLC (2.3mg, 0.5 μmol).



Yield: 62%

RP-HPLC: RT = 10.4 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{213}\text{H}_{303}\text{N}_{53}\text{O}_{53}\text{S}_4$

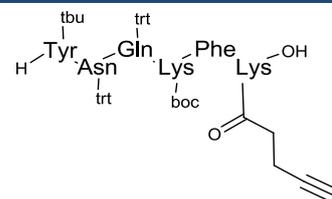
Calcd MW = 4582.3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 4584.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Protected H-YNQKFK(alc)-OH

130

The linear hexapeptide **130** was assembled on 2-chlorotriethylchloride[®] resin (300 mg) using the general procedure and modified amino acid **7**. The anchoring of the first amino acid **7** was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.5 mmol/g. The peptide was released from the resin using an AcOH/TFE/DCM (1/2/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (232 mg, 0.15 mmol).



Yield: Quantitative

RP-HPLC: RT = 19.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{70}\text{H}_{117}\text{N}_{15}\text{O}_{20}$

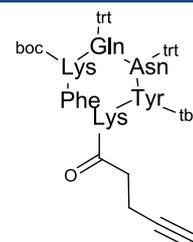
Calcd MW = 1547.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 1547.7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Protected c[-YNQKFK(alc)-]

131

The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **130** (232 mg, 0.15 mmol) and HATU as coupling agent. Precipitation from Et_2O afforded cyclic peptide **131** as a light brown powder (200 mg, 0.13 mmol). This crude material was used without further purification.



Yield: 87%

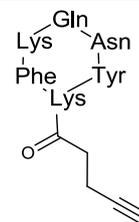
RP-HPLC: RT = 20.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{91}H_{104}N_{10}O_{12}$
 Calcd MW = 1529.9 g.mol⁻¹
 Found MW = 1529.7 g.mol⁻¹

c[-YNQKFK(alc)-]

132



Cyclic peptide **131** (200 mg, 0.13 mmol) was dissolved in 10 mL of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and purified by RP-HPLC, affording pure compound **132** (41.6 mg, 46.8 μmol) as a white powder.

Yield: 36%

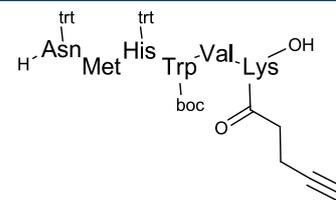
RP-HPLC: RT = 9.0 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{44}H_{60}N_{10}O_{10}$
 Calcd MW = 889.0 g.mol⁻¹
 Found MW = 889.6 g.mol⁻¹

Protected H-NMHWVK(alc)-OH

133



Linear hexapeptide **133** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (300 mg) using the general procedure and modified amino acid **7**. The anchoring of the first amino acid **7** was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.5 mmol/g. The peptide was released from the resin using an AcOH/TFE/DCM (1/2/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (222 mg, 0.15 mmol).

Yield: Quantitative

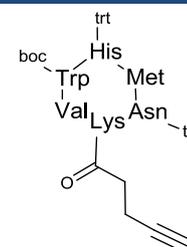
RP-HPLC: RT = 18.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{85}H_{95}N_{11}O_{11}S$
 Calcd MW = 1478,8 g.mol⁻¹
 Found MW = 1478.9 g.mol⁻¹

Protected c[-NMHWVK(alc)-]

134



The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **133** (222 mg, 0.15 mmol) and HATU as coupling agent. Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **134** as a light brown powder (210 mg, 0.14 mmol). This crude material was used without further purification.

Yield: 95%

RP-HPLC: RT = 19.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

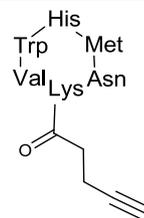
$C_{85}H_{93}N_{11}O_{10}S$

Calcd MW = 1460,8 g.mol⁻¹

Found MW = 1461.2 g.mol⁻¹

c[-NMHWVK(alc)-]

135



Cyclic peptide **134** (210 mg, 0.14 mmol) was dissolved in 10 mL of a TFA/TIS/H₂O/DIOD (92.5/2.5/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and purified by RP-HPLC, affording pure compound **135** (53.8 mg, 61.6 μmol) as a white powder.

Yield: 44%

RP-HPLC: RT = 1.37 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

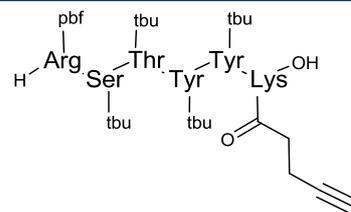
$C_{42}H_{57}N_{11}O_8S$

Calcd MW = 876,0 g.mol⁻¹

Found MW = 876.5 g.mol⁻¹

Protected H-RSTYYK(alc)-OH

136



Linear hexapeptide **136** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (300 mg) using the general procedure and modified amino acid **7**. The anchoring of the first amino acid **7** was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.5 mmol/g. The peptide was released from the resin using an AcOH/TFE/DCM (1/2/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (194 mg, 0.14 mmol).

Yield: 94%

RP-HPLC: RT = 19.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

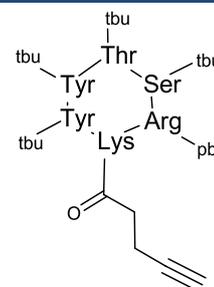
$C_{71}H_{108}N_{10}O_{15}S$

Calcd MW = 1373.8 g.mol⁻¹

Found MW = 1373.5 g.mol⁻¹

Protected c[-RSTYYK(alc)-]

137



The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **136** (194 mg, 0.14 mmol) and HATU as coupling agent. Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **137** as a light brown powder (174 mg, 0.128 mmol). This crude material was used without further purification.

Yield: 92%

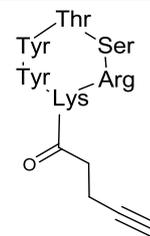
RP-HPLC: RT = 21.4 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{71}H_{106}N_{10}O_{14}S$
 Calcd MW = 1355.8 g.mol⁻¹
 Found MW = 1355.6 g.mol⁻¹

C[-RSTYYK(alc)-]

138



Cyclic peptide **137** (174 mg, 0.128 mmol) was dissolved in 10 mL of a TFA/TIS/H₂O/DIOD (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 purified by RP-HPLC, affording pure compound **138** (75 mg, 85.8 μmol) as a white powder.

Yield: 67%

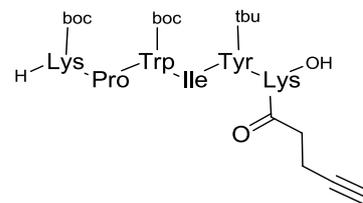
RP-HPLC: RT = 9.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{42}H_{53}N_{10}O_{11}$
 Calcd MW = 873.9 g.mol⁻¹
 Found MW = 873.6 g.mol⁻¹

Protected H-KPWIYK(alc)-OH

139



Linear hexapeptide **139** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (300 mg) using the general procedure and modified amino acid **7**. The anchoring of the first amino acid **7** was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.5 mmol/g. The peptide was released from the resin using an AcOH/TFE/DCM (1/2/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (172 mg, 0.147 mmol).

Yield: 98%

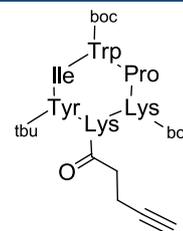
RP-HPLC: RT = 1.85 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{62}H_{91}N_9O_{13}$
 Calcd MW = 1170,4 g.mol⁻¹
 Found MW = 1170.8 g.mol⁻¹

Protected c[-KPWIYK(alc)-]

140



The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **139** (172 mg, 0.147 mmol) and HATU as coupling agent. Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **140** as a light brown powder (170 mg, 0.147 mmol). This crude material was used without further purification.

Yield: Quantitative

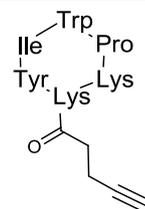
RP-HPLC: RT = 2.49 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{62}H_{89}N_9O_{12}$
 Calcd MW = 1152.4 g.mol⁻¹
 Found MW = 1152.8 g.mol⁻¹

c[-KPWIYK(alc)-]

141



Cyclic peptide **140** (170 mg, 0.147 mmol) was dissolved in 10 mL of a TFA/TIS/H₂O/DIOD (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 purified by RP-HPLC, affording pure compound **141** (84 mg, 94 μmol) as a white powder.

Yield: 64%

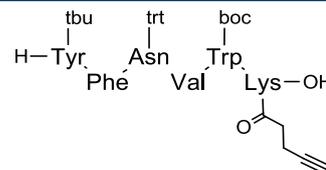
RP-HPLC: RT = 1.41 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{48}H_{62}N_9O_8$
 Calcd MW = 893.1 g.mol⁻¹
 Found MW = 896.6 g.mol⁻¹

Protected H-YFNVWK(alc)-OH

142



Linear hexapeptide **142** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (300 mg) using the general procedure and modified amino acid **7**. The anchoring of the first amino acid **7** was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.5 mmol/g. The peptide was released from the resin using an AcOH/TFE/DCM (1/2/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (200 mg, 0.15 mmol).

Yield: Quantitative

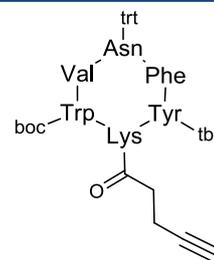
RP-HPLC: RT = 18.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{77}H_{91}N_9O_{12}$
 Calcd MW = 1334.6 g.mol⁻¹
 Found MW = 1334.9 g.mol⁻¹

Protected c[-YFNVWK(alc)-]

143



The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **142** (200 mg, 0.15 mmol) and HATU as coupling agent. Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **143** as a light brown powder (174 mg, 0.132 mmol). This crude material was used without further purification.

Yield: 88%

RP-HPLC: RT = 20.7 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

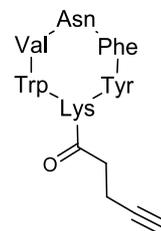
MS (ESI-MS, positive mode):

$C_{77}H_{89}N_9O_{11}$
 Calcd MW = 1316.6 g.mol⁻¹

Found MW = 1316.9 g.mol⁻¹

c[-YFNVWK(alc)-]

144



Cyclic peptide **143** (174 mg, 0.132 mmol) was dissolved in 10 mL of a TFA/TIS/H₂O/DIOD (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 purified by RP-HPLC, affording pure compound **144** (68 mg, 74 μmol) as a white powder.

Yield: 56%

RP-HPLC: RT = 1.70 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

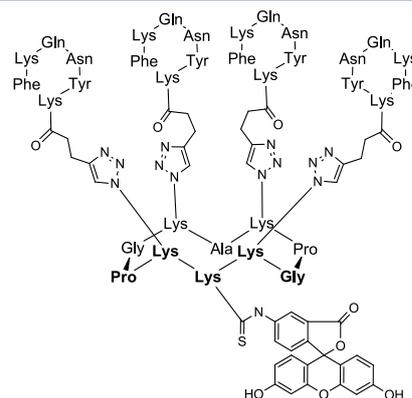
C₄₉H₅₉N₉O₉

Calcd MW = 918.1 g.mol⁻¹

Found MW = 918.6 g.mol⁻¹

cRAFT(4c[-YNQKFK(alc)-])-NHFluo

145



To a solution of **91** (3 mg, 2.0 μmol) and 6 equiv of cyclic peptide **132** (10.7 mg, 12 μmol) in PBS Buffer (100mM)/DMF (7/3) (500 μL) was added a solution of CuSO₄ (1 mg, 4 μmol), THPTA **31** (3.5 mg, 8 μmol) and sodium ascorbate (4 mg, 20 μmol) in PBS buffer (200 μL). Both solutions were previously degassed under argon. The reaction was stirred for 2h at 45°C under argon. Product **145** was obtained as an orange powder after purification by RP-HPLC (5.4 mg, 1.06 μmol).

Yield: 53%

RP-HPLC: RT = 14.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₂₄₄H₃₂₈N₆₄O₅₅S

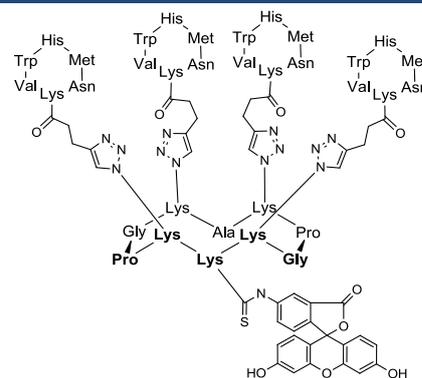
Calcd MW = 5069.8 g.mol⁻¹

Found MW = 5075.5 g.mol⁻¹

cRAFT(4c[-NMHWVK(alc)-])-NHFluo

146

To a solution of **91** (2 mg, 1.3 μmol) and 6 equiv of cyclic peptide **135** (7.0 mg, 8 μmol) in PBS Buffer (100mM)/DMF (7/3) (500 μL) was added a solution of CuSO_4 (1 mg, 4 μmol), THPTA **31** (3.5 mg, 8 μmol) and sodium ascorbate (4 mg, 20 μmol) in PBS buffer (200 μL). Both solutions were previously degassed under argon. The reaction was stirred for 2h at 45°C under argon. Product **146** was obtained as an orange powder after purification by RP-HPLC (2.9 mg, 0.58 μmol).



Yield: 45%

RP-HPLC: RT = 1.36 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{236}\text{H}_{316}\text{N}_{68}\text{O}_{47}\text{S}_5$

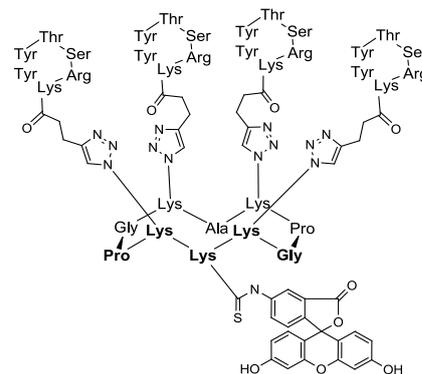
Calcd MW = 5017.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 5033.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (+0)

cRAFT(4c[-RSTYYK(alc)-])-NHFluo

147

To a solution of **91** (2 mg, 1.3 μmol) and 6 equiv of cyclic peptide **138** (6.8 mg, 7.8 μmol) in PBS Buffer (100mM)/DMF (7/3) (500 μL) was added a solution of CuSO_4 (1 mg, 4 μmol), THPTA **31** (3.5 mg, 8 μmol) and sodium ascorbate (4 mg, 20 μmol) in PBS buffer (200 μL). Both solutions were previously degassed under argon. The reaction was stirred for 2h at 45°C under argon. Product **147** was obtained as an orange powder after purification by RP-HPLC (2.2 mg, 0.44 μmol).



Yield: 34%

RP-HPLC: RT = 1.25 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

$\text{C}_{236}\text{H}_{320}\text{N}_{64}\text{O}_{59}\text{S}$

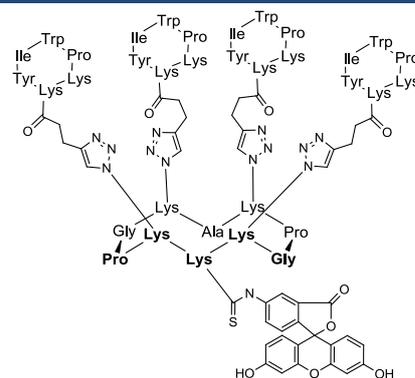
Calcd MW = 5029.6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Found MW = 5030.5 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT(4c[-KPWIYK(alc-)]-NHFluo

148

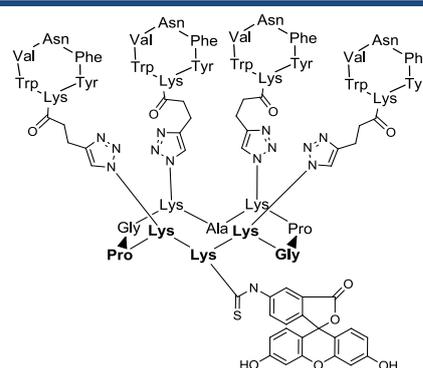
To a solution of **91** (2 mg, 1.3 μmol) and 6 equiv of cyclic peptide **141** (7.0 mg, 7.8 μmol) in PBS Buffer (100mM)/DMF (7/3) (500 μL) was added a solution of CuSO_4 (1 mg, 4 μmol), THPTA **31** (3.5 mg, 8 μmol) and sodium ascorbate (4 mg, 20 μmol) in PBS buffer (200 μL). Both solutions were previously degassed under argon. The reaction was stirred for 2h at 45°C under argon. Product **148** was obtained as an orange powder after purification by RP-HPLC (2.8 mg, 0.54 μmol).

**Yield: 41%****RP-HPLC:** RT = 1.39 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{260}\text{H}_{348}\text{N}_{60}\text{O}_{47}\text{S}$ Calcd MW = 5098.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 5098.3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

cRAFT(4c[-YFNVWK(alc-)]-NHFluo

149

To a solution of **91** (2 mg, 1.3 μmol) and 6 equiv of cyclic peptide **144** (7.2 mg, 7.8 μmol) in PBS Buffer (100mM)/DMF (7/3) (500 μL) was added a solution of CuSO_4 (1 mg, 4 μmol), THPTA **31** (3.5 mg, 8 μmol) and sodium ascorbate (4 mg, 20 μmol) in PBS buffer (200 μL). Both solutions were previously degassed under argon. The reaction was stirred for 2h at 45°C under argon. Product **149** was obtained as an orange powder after purification by RP-HPLC (3.6 mg, 0.69 μmol).

**Yield: 53%****RP-HPLC:** RT = 1.93 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.7 min)**MS (ESI-MS, positive mode):** $\text{C}_{264}\text{H}_{324}\text{N}_{60}\text{O}_{51}\text{S}$ Calcd MW = 5186.0 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Found MW = 5186.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

VII.3. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring

VII.3.1. Materials and methods

A QCM-D E4 system, equipped with four flow chambers (custom made by Q-Sense, Sweden) was used. Au-coated ($d_{Au} = 100$ nm) AT-cut single quartz crystals (Q-Sense, Sweden) with 5 MHz resonant frequency were used for experiments.

VII.3.2. Reagents used for QCM-D measurements

PEG-thiol and PEG disulfide were purchased from Polypure (Norway) and Iris biotech (Germany). Streptavidin was purchased from Sigma Aldrich. Working buffer was HEPES ((4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)) (pH=7.4 containing HEPES 10 mM (Fisher Scientific) and NaCl 150mM (Sigma-Aldrich) dissolved in mQ water). 2% SDS (sodium dodecyl sulfate, from Sigma-Aldrich) solution made in mQ water was used to clean the gold quartz crystals. mQ water was obtained from a Milli-Q Purelab UHQ (Elga) with a resistivity of 18.2 M Ω /cm.

VII.3.3. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring: technique

Quartz Crystal Microbalance (QCM) is based on the inverse piezoelectric effect discovered by Curies in the late 19th century: application of voltage results in mechanical deformation of the material. Alternating applied voltage leads to a cyclical deformation, resulting in an oscillatory motion. If the frequency of the applied voltage matches the crystal's resonance frequency (or multiples thereof called overtones), a standing wave is generated inside the crystal. There are several ways to perform QCM experiments. Our experiments were based on the "ring-down" scheme developed by *Rodahl et al.*, referred to as Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring (QCM-D), where the external driving voltage is turned off intermittently and the oscillations are left to decay freely. Given that quartz is piezoelectric, a voltage is generated during these decaying mechanical oscillations. This signal is recorded, also yielding two parameters per overtone, the resonance frequency, f_n , and the dissipation, D_n , (n = type of overtone = 3, 5, 7, 9, 11 and 13). The approach requires that the quartz crystal is coated with electrodes (typically Au or SiO₂). Data were fitted according to **Sauerbrey** equation, which can be used to obtain adsorbed masses, m_f , also known as areal mass density, in the case of homogeneous, quasi-rigid films with low thickness, provided the ratio $\Delta D_n / (\Delta f_n / n) \ll 4 \times 10^{-7}$ Hz⁻¹ for a 5 MHz crystal.

$$m_f = -C (\Delta f_n / n)$$

VII.3.4. QCM-D measurements on PEG-SAM: Protocol

QCM-D measurements were performed at 24°C and were made in flow mode using 10mM HEPES buffer (pH 7.4) as the medium. The buffer was previously degassed in order to avoid bubble formation in

the QCM-D flow chamber. The quartz crystal was mounted on a microfluidic module (provided with QCM-D E4 system, Q-Sense, Sweden) and fixed on the QCM-D flow chamber. The starting and ending of the module were fixed with tubings, one end of which was inserted in the solutions used in the experiment while the other end was connected to a peristaltic pump. The pump was used to drive forward the fluid movement inside the microfluidic module.

VII.3.4.1. *Functionalization of gold quartz crystals*

Before been used Au quartz crystals were rinsed with mQ water and then drying with nitrogen (N₂) gas. To activate them UV-Ozone (O₃) treatment was done for 10 minutes (UV_Ozone cleaner, Jelight Company). They were functionalized by dipping them overnight in a solution of the desired mixture of PEGs. PEG disulfide (or thiol) 0.5 mM and CD-PEG-disulfide (or thiol) 0.5 mM were dissolved in water (or absolute ethanol). To obtain PEG-SAM functionalized surface, the Au quartz crystal was dipped in 600µL of the above solution and kept overnight at room temperature in an adsorption cell. The next day, the functionalized quartz crystal was taken out from the adsorption cell and rinsed with absolute ethanol ten times to stabilize the PEG-SAM and HEPES buffer.

VII.3.4.2. *QCM-D experiments*

The PEG-SAM was rinsed with HEPES buffer for 10 minutes inside the flow chamber. After stabilization of the frequency, peptide compounds, SAV or cells could be injected on the surface at the desired concentrations at a flow rate between 20 and 50 µl/min. Between each injection a rinsing step of about 10 minutes was performed with HEPES buffer. Q-tools software was used to read and to analyse the output data and Origin to plot the shifts in frequency and in dissipation over the time.

VII.3.4.3. *Cleaning of flow chamber*

For the cleaning part, mQ water was flowed through the chamber for 10 minutes. Then a detergent – 2% SDS – was allowed to flow for 10 minutes, followed by flowing of mQ water for 5 minutes to clean out the detergent from the chamber. Absolute ethanol was then injected for 2 minutes. Finally, mQ water was again flowed for another 10 minutes to finish the cleaning procedure of the flow chamber. The rate of flow of each component for the cleaning process was 100-200 µl/min.

VII.3.4.4. *Regeneration of Au quartz crystal*

The last part of the experiment was to remove all the materials from the Au quartz crystal and regenerate the surface for some other experiment, if necessary. After cleaning the flow chamber, the quartz crystal was taken out from it and dipped in 2% SDS solution and ultrasonicated for 5 minutes. The quartz crystal was taken out from the 2% SDS solution and dipped in absolute ethanol and ultrasonicated for 10 minutes. After that, the quartz crystal was washed properly with mQ water and dried under flow of N₂ gas. UV-O₃ treatment was done for 10 minutes on the dry quartz crystal to complete the regeneration process.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. (a) Hanahan, D.; Weinberg, Robert A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646-674; (b) Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
2. Kohler, M.; Bauknecht, T.; Grimm, M.; Birmelin, G.; Kommos, F.; Wagner, E., Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in human ovarian carcinomas. *Eur J Cancer* **1992**, *28A* (8-9), 1432-7.
3. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* **2000**, *65* (1-2), 271-284.
4. (a) Matsumura, Y.; Maeda, H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy - Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. *Cancer Res* **1986**, *46* (12), 6387-6392; (b) Maeda, H., Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. *J Control Release* **2012**, *164* (2), 138-144.
5. Allen, T. M., Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2* (10), 750-763.
6. Oxvig, C.; Springer, T. A., Experimental support for a β -propeller domain in integrin α -subunits and a calcium binding site on its lower surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95* (9), 4870-4875.
7. Xiong, J.-P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R.; Scott, D. L.; Joachimiak, A.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A., Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin α V β 3. *Science* **2001**, *294* (5541), 339-345.
8. (a) Manakan, B. S.; Zent, R., Integrin Structure and Function, Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer. *Springer science* **2010**, *Chapter 2*; (b) Stupack, D. G.; Cheresch, D. A., Integrins and Angiogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology*, Academic Press: 2004; Vol. Volume 64, pp 207-238.
9. Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E., Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **1984**, *309* (5963), 30-33.
10. Leahy, D. J.; Aukhil, I.; Erickson, H. P., 2.0 Å Crystal Structure of a Four-Domain Segment of Human Fibronectin Encompassing the RGD Loop and Synergy Region. *Cell* **1996**, *84* (1), 155-164.
11. (a) Aumailley, M.; Gurrath, M.; Müller, G.; Calvete, J.; Timpl, R.; Kessler, H., Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *Febs Lett* **1991**, *291* (1), 50-54; (b) Pfaff, M.; Tangemann, K.; Müller, B.; Gurrath, M.; Müller, G.; Kessler, H.; Timpl, R.; Engel, J., Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins. *J Biol Chem* **1994**, *269* (32), 20233-8.
12. (a) Goodman, S. L.; Hölzemann, G.; Sulyok, G. A. G.; Kessler, H., Nanomolar Small Molecule Inhibitors for α V β 6, α V β 5, and α V β 3 Integrins. *J Med Chem* **2002**, *45* (5), 1045-1051; (b) Eskens, F. A. L. M.; Dumez, H.; Hoekstra, R.; Perschl, A.; Brindley, C.; Böttcher, S.; Wynendaele, W.; Dreves, J.; Verweij, J.; van Oosterom, A. T., Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins α V β 3 and α V β 5 in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* **2003**, *39* (7), 917-926.
13. Stupp, R.; Ruegg, C., Integrin Inhibitors Reaching the Clinic. *J Clin Oncol* **2007**, *25* (13), 1637-1638.

14. Xiong, J.-P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A., Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin $\alpha V\beta 3$ in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. *Science* **2002**, *296* (5565), 151-155.
15. Haubner, R.; Wester, H.-J.; Weber, W. A.; Mang, C.; Ziegler, S. I.; Goodman, S. L.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Kessler, H.; Schwaiger, M., Noninvasive Imaging of $\alpha V\beta 3$ Integrin Expression Using 18F-labeled RGD-containing Glycopeptide and Positron Emission Tomography. *Cancer Res* **2001**, *61* (5), 1781-1785.
16. (a) Wu, Y.; Zhang, X.; Xiong, Z.; Cheng, Z.; Fisher, D. R.; Liu, S.; Gambhir, S. S.; Chen, X., microPET Imaging of Glioma Integrin $\alpha V\beta 3$ Expression Using 64Cu-Labeled Tetrameric RGD Peptide. *J Nucl Med* **2005**, *46* (10), 1707-1718; (b) Dumont, R. A.; Deininger, F.; Haubner, R.; Maecke, H. R.; Weber, W. A.; Fani, M., Novel 64Cu- and 68Ga-Labeled RGD Conjugates Show Improved PET Imaging of $\alpha V\beta 3$ Integrin Expression and Facile Radiosynthesis. *J Nucl Med* **2011**, *52* (8), 1276-1284.
17. Liu, Z.; Niu, G.; Wang, F.; Chen, X., 68Ga-labeled NOTA-RGD-BBN peptide for dual integrin and GRPR-targeted tumor imaging. *Eur J Nucl Med Mol I* **2009**, *36* (9), 1483-1494.
18. Wang, L.; Shi, J.; Kim, Y.-S.; Zhai, S.; Jia, B.; Zhao, H.; Liu, Z.; Wang, F.; Chen, X.; Liu, S., Improving Tumor-Targeting Capability and Pharmacokinetics of 99mTc-Labeled Cyclic RGD Dimers with PEG4 Linkers. *Mol Pharmaceut* **2008**, *6* (1), 231-245.
19. (a) Dall'Angelo, S.; Zhang, Q.; Fleming, I. N.; Piras, M.; Schweiger, L. F.; O'Hagan, D.; Zanda, M., Efficient bioconjugation of 5-fluoro-5-deoxy-ribose (FDR) to RGD peptides for positron emission tomography (PET) imaging of [small alpha]v[small beta]3 integrin receptor. *Org Biomol Chem* **2013**; (b) Selvaraj, R.; Liu, S.; Hassink, M.; Huang, C.-w.; Yap, L.-p.; Park, R.; Fox, J. M.; Li, Z.; Conti, P. S., Tetrazine-trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of integrin $\alpha V\beta 3$ targeted PET tracer based on a cyclic RGD peptide. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, *21* (17), 5011-5014.
20. Arap, W.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E., Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. *Science* **1998**, *279* (5349), 377-380.
21. Chang, M.-W.; Lo, J.-M.; Juan, H.-F.; Chang, H.-Y.; Chuang, C.-Y., Combination of RGD Compound and Low-Dose Paclitaxel Induces Apoptosis in Human Glioblastoma Cells. *Plos One* **2012**, *7* (5), e37935.
22. Dal Pozzo, A.; Ni, M.-H.; Esposito, E.; Dallavalle, S.; Musso, L.; Bargiotti, A.; Pisano, C.; Vesci, L.; Bucci, F.; Castorina, M.; Foderà, R.; Giannini, G.; Aulicino, C.; Penco, S., Novel tumor-targeted RGD peptide-camptothecin conjugates: Synthesis and biological evaluation. *Bioorgan Med Chem* **2010**, *18* (1), 64-72.
23. Ellerby, H. M.; Arap, W.; Ellerby, L. M.; Kain, R.; Andrusiak, R.; Rio, G. D.; Krajewski, S.; Lombardo, C. R.; Rao, R.; Ruoslahti, E.; Bredesen, D. E.; Pasqualini, R., Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* **1999**, *5* (9), 1032-8.
24. (a) Sugahara, K. N.; Teesalu, T.; Karmali, P. P.; Kotamraju, V. R.; Agemy, L.; Girard, O. M.; Hanahan, D.; Mattrey, R. F.; Ruoslahti, E., Tissue-Penetrating Delivery of Compounds and Nanoparticles into Tumors. *Cancer Cell* **2009**, *16* (6), 510-520; (b) Ye, Y.; Zhu, L.; Ma, Y.; Niu, G.; Chen, X., Synthesis and evaluation of new iRGD peptide analogs for tumor optical imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21* (4), 1146-1150.
25. Herbst, R. S., Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* **2004**, *59* (2, Supplement), S21-S26.
26. Madhus, I. H.; Stang, E., Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J Cell Sci* **2009**, *122* (19), 3433-3439.
27. Ferguson, K. M.; Berger, M. B.; Mendrola, J. M.; Cho, H.-S.; Leahy, D. J.; Lemmon, M. A., EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Molecular Cell* **2003**, *11* (2), 507-517.

28. Rocha-Lima, C. M.; Soares, H. P.; Raez, L. E.; Singal, R., EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control* **2007**, *14* (3), 295-304.
29. Ferrara, N.; Mass, R. D.; Campa, C.; Kim, R., Targeting VEGF-A to Treat Cancer and Age-Related Macular Degeneration. *Annual Review of Medicine* **2007**, *58* (1), 491-504.
30. (a) Hoeben, A.; Landuyt, B.; Highley, M. S.; Wildiers, H.; Van Oosterom, A. T.; De Bruijn, E. A., Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev* **2004**, *56* (4), 549-580; (b) Holmes, K.; Roberts, O. L.; Thomas, A. M.; Cross, M. J., Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* **2007**, *19* (10), 2003-2012.
31. Ellis, L. M., The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* **2006**, *5* (5), 1099-1107.
32. Pan, Q.; Chanthery, Y.; Liang, W.-C.; Stawicki, S.; Mak, J.; Rathore, N.; Tong, R. K.; Kowalski, J.; Yee, S. F.; Pacheco, G.; Ross, S.; Cheng, Z.; Le Couter, J.; Plowman, G.; Peale, F.; Koch, A. W.; Wu, Y.; Bagri, A.; Tessier-Lavigne, M.; Watts, R. J., Blocking Neuropilin-1 Function Has an Additive Effect with Anti-VEGF to Inhibit Tumor Growth. *Cancer Cell* **2007**, *11* (1), 53-67.
33. <http://www.arktherapeutics.com/main/products.php?content=nrp1>.
34. Jarvis, A.; Allerston, C. K.; Jia, H.; Herzog, B.; Garza-Garcia, A.; Winfield, N.; Ellard, K.; Aqil, R.; Lynch, R.; Chapman, C.; Hartzoulakis, B.; Nally, J.; Stewart, M.; Cheng, L.; Menon, M.; Tickner, M.; Djordjevic, S.; Driscoll, P. C.; Zachary, I.; Selwood, D. L., Small Molecule Inhibitors of the Neuropilin-1 Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) Interaction. *J Med Chem* **2010**, *53* (5), 2215-2226.
35. <http://www.biooncology.com/therapeutic-targets/cd20>
36. (a) Stashenko, P.; Nadler, L. M.; Hardy, R.; Schlossman, S. F., Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *The Journal of Immunology* **1980**, *125* (4), 1678-85; (b) Stashenko, P.; Nadler, L. M.; Hardy, R.; Schlossman, S. F., Expression of cell surface markers after human B lymphocyte activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **1981**, *78* (6), 3848-3852.
37. van Meerten, T.; Hagenbeek, A., CD20-Targeted Therapy: The Next Generation of Antibodies. *Semin Hematol* **2010**, *47* (2), 199-210.
38. Glennie, M. J.; French, R. R.; Cragg, M. S.; Taylor, R. P., Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* **2007**, *44* (16), 3823-3837.
39. Schwaber, J.; Cohen, E. P., Human x Mouse Somatic Cell Hybrid Clone secreting Immunoglobulins of both Parental Types. *Nature* **1973**, *244* (5416), 444-447.
40. Kohler, G.; Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495-497.
41. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Monoclonals-gl.png>
42. Padlan, E. A., Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* **1994**, *31* (3), 169-217.
43. (a) Ravetch, J. V.; Bolland, S., IgG Fc Receptors. *Annual Review of Immunology* **2001**, *19* (1), 275-290; (b) Rus, H.; Cudrici, C.; Niculescu, F., The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res* **2005**, *33* (2), 103-112.
44. Nelson, A. L.; Dhimolea, E.; Reichert, J. M., Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (10), 767-774.
45. Gerber, D. E., Targeted therapies: A new generation of cancer treatments. *American Family Physician* **2008**, *77* (3), 311-319.
46. McLaughlin, P.; Grillo-Lopez, A. J.; Link, B. K.; Levy, R.; Czuczman, M. S.; Williams, M. E.; Heyman, M. R.; Bence-Bruckler, I.; White, C. A.; Cabanillas, F.; Jain, V.; Ho, A. D.; Lister, J.; Wey, K.; Shen, D.; Dallaire, B. K., Rituximab chimeric Anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* **1998**, *16* (8), 2825-2833.

47. Gürcan, H. M.; Keskin, D. B.; Stern, J. N. H.; Nitzberg, M. A.; Shekhani, H.; Ahmed, A. R., A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* **2009**, *9* (1), 10-25.
48. (a) Czuczman, M. S.; Koryzna, A.; Mohr, A.; Stewart, C.; Donohue, K.; Blumenson, L.; Bernstein, Z. P.; McCarthy, P.; Alam, A.; Hernandez-Ilizaliturri, F.; Skipper, M.; Brown, K.; Chanan-Khan, A.; Klippenstein, D.; Loud, P.; Rock, M. K.; Benyunes, M.; Grillo-Lopez, A.; Bernstein, S. H., Rituximab in combination with fludarabine chemotherapy in low-grade or follicular lymphoma. *J Clin Oncol* **2005**, *23* (4), 694-704; (b) Vose, J. M.; Link, B. K.; Grossbard, M. L.; Czuczman, M.; Grillo-Lopez, A.; Gilman, P.; Lowe, A.; Kunkel, L. A.; Fisher, R. I., Phase II study of rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **2001**, *19* (2), 389-397.
49. (a) Jefferis, R., Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8* (3), 226-234; (b) <http://www.healthvalue.net/actionantiCD20engl.html>
50. (a) Lonberg, N., Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotech* **2005**, *23* (9), 1117-1125; (b) Adams, G. P.; Weiner, L. M., Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotech* **2005**, *23* (9), 1147-1157; (c) Hoogenboom, H. R., Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotech* **2005**, *23* (9), 1105-1116.
51. http://www.roche.com/research_and_development/innovation_and_technologies/biotechnology/production.htm
52. Faraji, A. H.; Wipf, P., Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17* (8), 2950-62.
53. Albanese, A.; Tang, P. S.; Chan, W. C. W., The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. In *Annual Review of Biomedical Engineering, Vol 14*, Yarmush, M. L., Ed. 2012; Vol. 14, pp 1-16.
54. Fonseca, S. B.; Pereira, M. P.; Kelley, S. O., Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv Drug Deliver Rev* **2009**, *61* (11), 953-964.
55. Said Hassane, F.; Saleh, A. F.; Abes, R.; Gait, M. J.; Lebleu, B., Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2010**, *67* (5), 715-26.
56. Hotchkiss, R. S.; McConnell, K. W.; Bullok, K.; Davis, C. G.; Chang, K. C.; Schwulst, S. J.; Dunne, J. C.; Dietz, G. P. H.; Baehr, M.; McDunn, J. E.; Karl, I. E.; Wagner, T. H.; Cobb, J. P.; Coopersmith, C. M.; Piwnicka-Worms, D., TAT-BH4 and TAT-Bcl-x(L) peptides protect against sepsis-induced lymphocyte apoptosis in vivo. *J Immunol* **2006**, *176* (9), 5471-5477.
57. Santra, S.; Yang, H.; Stanley, J. T.; Holloway, P. H.; Moudgil, B. M.; Walter, G.; Mericle, R. A., Rapid and effective labeling of brain tissue using TAT-conjugated CdS: Mn/ZnS quantum dots. *Chemical Communications* **2005**, (25), 3144-3146.
58. (a) Alves, I. D.; Goasdoue, N.; Correia, I.; Aubry, S.; Galanth, C.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Chassaing, G., Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2008**, *1780* (7-8), 948-959; (b) Jiao, C.-Y.; Delaroché, D.; Burlina, F.; Alves, I. D.; Chassaing, G.; Sagan, S., Translocation and Endocytosis for Cell-penetrating Peptide Internalization. *J Biol Chem* **2009**, *284* (49), 33957-33965.
59. (a) Waehler, R.; Russell, S. J.; Curiel, D. T., Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **2007**, *8* (8), 573-587; (b) Parato, K. A.; Senger, D.; Forsyth, P. A. J.; Bell, J. C., Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5* (12), 965-976.

60. (a) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L., Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J Am Chem Soc* **2002**, *124* (50), 14922-14933; (b) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E., Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction. *Angew Chem Int Edit* **2006**, *45* (15), 2348-2368.
61. (a) Simons, K.; Ikonen, E., Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, *387* (6633), 569-572; (b) Maheshwari, G.; Brown, G.; Lauffenburger, D. A.; Wells, A.; Griffith, L. G., Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J Cell Sci* **2000**, *113* (10), 1677-1686.
62. (a) Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **1963**, *85* (14), 2149-2154; (b) Merrifield, R. B., Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1985**, *24* (10), 799-810.
63. Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F., Amino Acid-Protecting Groups. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (6), 2455-2504.
64. Hackenberger, C. P. R.; Schwarzer, D., Chemoselective Ligation and Modification Strategies for Peptides and Proteins. *Angew Chem Int Edit* **2008**, *47* (52), 10030-10074.
65. (a) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clarklewis, I.; Kent, S. B. H., Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **1994**, *266* (5186), 776-779; (b) Dawson, P. E.; Kent, S. B. H., Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annual Review of Biochemistry* **2000**, *69*, 923-960.
66. (a) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T., Staudinger ligation: A peptide from a thioester and azide. *Org Lett* **2000**, *2* (13), 1939-1941; (b) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T., High-yielding Staudinger ligation of a phosphinothioester and azide to form a peptide. *Org Lett* **2001**, *3* (1), 9-12; (c) Soellner, M. B.; Dickson, K. A.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T., Site-specific protein immobilization by Staudinger ligation. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (39), 11790-11791.
67. Knapp, S.; Darout, E., New reactions of selenocarboxylates. *Org Lett* **2005**, *7* (2), 203-206.
68. Shangguan, N.; Katukojvala, S.; Greenburg, R.; Williams, L. J., The reaction of thio acids with azides: A new mechanism and new synthetic applications. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (26), 7754-7755.
69. (a) Bode, J. W.; Fox, R. M.; Baucom, K. D., Chemoselective amide ligations by decarboxylative condensations of N-alkylhydroxylamines and alpha-ketoacids. *Angew Chem Int Edit* **2006**, *45* (8), 1248-1252; (b) Pusterla, I.; Bode, J. W., The Mechanism of the α -Ketoacid-Hydroxylamine Amide-Forming Ligation. *Angew Chem Int Edit* **2012**, *51* (2), 513-516; (c) Pattabiraman, V. R.; Ogunkoya, A. O.; Bode, J. W., Chemical Protein Synthesis by Chemoselective α -Ketoacid-Hydroxylamine (KAHA) Ligations with 5-Oxaproline. *Angew Chem Int Edit* **2012**, *51* (21), 5114-5118.
70. (a) Dheur, J.; Ollivier, N.; Vallin, A.; Melnyk, O., Synthesis of Peptide Alkylthioesters Using the Intramolecular N,S-Acyl Shift Properties of Bis(2-sulfanylethyl)amido Peptides. *J Org Chem* **2011**, *76* (9), 3194-3202; (b) Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhida, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O., Bis(2-sulfanylethyl)amino Native Peptide Ligation. *Org Lett* **2010**, *12* (22), 5238-5241.
71. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem* **2002**, *67* (9), 3057-3064.
72. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Edit* **2002**, *41* (14), 2596-+.
73. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Edit* **2001**, *40* (11), 2004-+.
74. (a) Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G., Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angew Chem Int Edit* **2009**, *48*

- (52), 9879-9883; (b) Michaels, H. A.; Zhu, L., Ligand-Assisted, Copper(II) Acetate-Accelerated Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem-Asian J* **2011**, *6* (10), 2825-2834; (c) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. *Org Lett* **2004**, *6* (17), 2853-2855.
75. Kumar, A.; Li, K.; Cai, C., Anaerobic conditions to reduce oxidation of proteins and to accelerate the copper-catalyzed "Click" reaction with a water-soluble bis(triazole) ligand. *Chemical Communications* **2011**, *47* (11), 3186-3188.
76. Diez-Gonzalez, S., Well-defined copper(i) complexes for Click azide-alkyne cycloaddition reactions: one Click beyond. *Catal Sci Technol* **2011**, *1* (2), 166-178.
77. Wang, W.; Hong, S. L.; Tran, A.; Jiang, H.; Triano, R.; Liu, Y.; Chen, X.; Wu, P., Sulfated Ligands for the Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem-Asian J* **2011**, *6* (10), 2796-2802.
78. (a) Zameo, S.; Vauzeilles, B.; Beau, J.-M., Direct composition analysis of a dynamic library of imines in an aqueous medium. *Eur J Org Chem* **2006**, (24), 5441-5444; (b) Herrmann, A., Dynamic mixtures and combinatorial libraries: imines as probes for molecular evolution at the interface between chemistry and biology. *Org Biomol Chem* **2009**, *7* (16), 3195-3204; (c) Ludlow, R. F.; Liu, J.; Li, H.; Roberts, S. L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S., Host-guest binding constants can be estimated directly from the product distributions of dynamic combinatorial libraries. *Angew Chem Int Edit* **2007**, *46* (30), 5762-5764.
79. Forget, D.; Boturn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P., Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates: Chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Chem-Eur J* **2001**, *7* (18), 3976-3984.
80. (a) Ollivier, N.; Olivier, C.; Gouyette, C.; Huynh-Dinh, T.; Gras-Masse, H.; Melnyk, O., Synthesis of oligonucleotide-peptide conjugates using hydrazone chemical ligation. *Tetrahedron Lett* **2002**, *43* (6), 997-999; (b) Dirksen, A.; Dawson, P. E., Rapid Oxime and Hydrazone Ligations with Aromatic Aldehydes for Biomolecular Labeling. *Bioconjugate Chem* **2008**, *19* (12), 2543-2548.
81. (a) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N., Thiol-Ene Click Chemistry. *Angew Chem Int Edit* **2010**, *49* (9), 1540-1573; (b) Sumerlin, B. S.; Vogt, A. P., Macromolecular Engineering through Click Chemistry and Other Efficient Transformations. *Macromolecules* **2010**, *43* (1), 1-13.
82. Mezo, G.; Mihala, N.; Andreu, D.; Hudecz, F., Conjugation of epitope peptides with SH group to branched chain polymeric polypeptides via Cys(Npys). *Bioconjugate Chem* **2000**, *11* (4), 484-491.
83. de Araujo, A. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Seitz, O.; Alexandrov, K.; Waldmann, H., Diels-Alder ligation of peptides and proteins. *Chem-Eur J* **2006**, *12* (23), 6095-6109.
84. Akaji, K.; Teruya, K.; Akaji, M.; Aimoto, S., Synthesis of cyclic RGD derivatives via solid phase macrocyclization using the Heck reaction. *Tetrahedron* **2001**, *57* (12), 2293-2303.
85. (a) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A., Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjugate Chem* **2008**, *19* (12), 2297-2299; (b) Devaraj, N. K., Advancing Tetrazine Bioorthogonal Reactions through the Development of New Synthetic Tools. *Synlett* **2012**, (15), 2147-2152; (c) Yang, J.; Seckute, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K., Live-Cell Imaging of Cyclopropene Tags with Fluorogenic Tetrazine Cycloadditions. *Angew Chem Int Edit* **2012**, *51* (30), 7476-7479.
86. (a) Mutter, M.; Vuilleumier, S., A Chemical Approach to Protein Design—Template-Assembled Synthetic Proteins (TASP. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1989**, *28* (5), 535-554; (b) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G., Template assembled synthetic proteins (TASP) as functional mimetics of proteins. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1996**, *35* (13-14), 1482-1485.

87. Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M., Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates: An NMR and restrained molecular dynamics investigation. *Biopolymers* **1996**, *39* (3), 297-308.
88. Peluso, S.; Ruckle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M., Crystal structure of a synthetic cyclodecapeptide for template-assembled synthetic protein design. *Chembiochem* **2001**, *2* (6), 432-437.
89. Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M., A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron Lett* **1995**, *36* (8), 1255-1258.
90. (a) Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D., One-Pot Approach to Well-Defined Biomolecular Assemblies by Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew Chem Int Edit* **2009**, *48* (14), 2576-2579; (b) Galibert, M.; Renaudet, O.; Dumy, P.; Boturyn, D., Access to Biomolecular Assemblies through One-Pot Triple Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew Chem Int Edit* **2011**, *50* (8), 1901-1904.
91. Bossu, I.; Sulc, M.; Krenek, K.; Dufour, E.; Garcia, J.; Berthet, N.; Dumy, P.; Kren, V.; Renaudet, O., Dendri-RAFTs: a second generation of cyclopeptide-based glycoclusters. *Org Biomol Chem* **2011**, *9* (6), 1948-1959.
92. Murat, P.; Cressend, D.; Spinelli, N.; Van der Heyden, A.; Labbe, P.; Dumy, P.; Defrancq, E., A Novel Conformation ally Constrained Parallel G Quadruplex. *Chembiochem* **2008**, *9* (16), 2588-2591.
93. Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J., Control of Amyloid β -Peptide Protofibril Formation by a Designed Template Assembly. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (17), 2699-2702.
94. Garanger, E.; Boturyn, D.; Coll, J. L.; Favrot, M. C.; Dumy, P., Multivalent RGD synthetic peptides as potent $\alpha(V)\beta(3)$ integrin ligands. *Org Biomol Chem* **2006**, *4* (10), 1958-1965.
95. Sancey, L.; Garanger, E.; Foillard, S.; Schoehn, G.; Hurbin, A.; Albiges-Rizo, C.; Boturyn, D.; Souchier, C.; Grichine, A.; Dumy, P.; Coll, J.-L., Clustering and Internalization of Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ With a Tetrameric RGD-synthetic Peptide. *Mol Ther* **2009**, *17* (5), 837-843.
96. (a) Boturyn, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P., Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (18), 5730-5739; (b) Garanger, E.; Boturyn, D.; Jin, Z. H.; Dumy, P.; Favrot, M. C.; Coll, J. L., New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol Ther* **2005**, *12* (6), 1168-1175.
97. Schraaa, A. J.; Kok, R. J.; Berendsen, A. D.; Moorlag, H. E.; Bos, E. J.; Meijer, D. K. F.; de Leij, L.; Molema, G., Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting. *J Control Release* **2002**, *83* (2), 241-251.
98. Keramidas, M.; Josserand, V.; Righini, C. A.; Wenk, C.; Faure, C.; Coll, J. L., Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model. *British Journal of Surgery* **2010**, *97* (5), 737-743.
99. Foillard, S.; Sancey, L.; Coll, J.-L.; Boturyn, D.; Dumy, P., Targeted delivery of activatable fluorescent pro-apoptotic peptide into live cells. *Org Biomol Chem* **2009**, *7* (2), 221-224.
100. Mery, E.; Jouve, E.; Guillermet, S.; Bourgoignon, M.; Castells, M.; Golzio, M.; Rizo, P.; Delord, J. P.; Querleu, D.; Couderc, B., Intraoperative fluorescence imaging of peritoneal dissemination of ovarian carcinomas. A preclinical study. *Gynecol Oncol* **2011**, *122* (1), 155-162.
101. Dimastromatteo, J.; Riou, L. M.; Ahmadi, M.; Pons, G.; Pellegrini, E.; Broisat, A.; Sancey, L.; Gavrillina, T.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Fagret, D.; Ghezzi, C., In vivo molecular imaging of myocardial angiogenesis using the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin-targeted tracer Tc-99m-RAFT-RGD. *J Nucl Cardiol* **2010**, *17* (3), 435-443.

102. Haubner, R.; Wester, H. J.; Burkhart, F.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Weber, W.; Goodman, S. L.; Kessler, H.; Schwaiger, M., Glycosylated RGD-containing peptides, tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics. *J Nucl Med* **2001**, *42* (2), 326-336.
103. Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P., 1-ethoxyethylidene, a new group for the stepwise SPPS of aminooxyacetic acid containing peptides. *J Org Chem* **2008**, *73* (3), 983-991.
104. (a) Jin, Z.-H.; Furukawa, T.; Galibert, M.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Fukumura, T.; Saga, T.; Dumy, P.; Fujibayashi, Y., Noninvasive visualization and quantification of tumor $\alpha V\beta 3$ integrin expression using a novel positron emission tomography probe, 64Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK)-4. *Nucl Med Biol* **2011**, *38* (4), 529-540; (b) Galibert, M.; Jin, Z. H.; Furukawa, T.; Fukumura, T.; Saga, T.; Fujibayashi, Y.; Dumy, P.; Boturyn, D., RGD-cyclam conjugate: Synthesis and potential application for positron emission tomography. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20* (18), 5422-5425.
105. Briat, A.; Wenk, C. H. F.; Ahmadi, M.; Claron, M.; Boturyn, D.; Josserand, V.; Dumy, P.; Fagret, D.; Coll, J. L.; Ghezzi, C.; Sancey, L.; Vuillez, J. P., Reduction of renal uptake of In-111-DOTA-labeled and A700-labeled RAFT-RGD during integrin $\alpha(v)\beta(3)$ targeting using single photon emission computed tomography and optical imaging. *Cancer Sci* **2012**, *103* (6), 1105-1110.
106. Machida, S.; Saga, Y.; Takei, Y.; Mizuno, I.; Takayama, T.; Kohno, T.; Konno, R.; Ohwada, M.; Suzuki, M., Inhibition of peritoneal dissemination of ovarian cancer by tyrosine kinase receptor inhibitor SU6668 (TSU-68). *Int J Cancer* **2005**, *114* (2), 224-229.
107. Jin, Z.-H.; Furukawa, T.; Claron, M.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Fukumura, T.; Fujibayashi, Y.; Dumy, P.; Saga, T., Positron emission tomography imaging of tumor angiogenesis and monitoring of antiangiogenic efficacy using the novel tetrameric peptide probe (64Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK)-) (4). *Angiogenesis* **2012**, *15* (4), 569-80.
108. Bain, C. D.; Whitesides, G. M., Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the length of the alkyl chain. *J Am Chem Soc* **1989**, *111* (18), 7164-7175.
109. Prime, K. L.; Whitesides, G. M., Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. *J Am Chem Soc* **1993**, *115* (23), 10714-10721.
110. (a) Ludden, M. J. W.; Ling, X. Y.; Gang, T.; Bula, W. P.; Gardeniers, H. J. G. E.; Reinhoudt, D. N.; Huskens, J., Multivalent Binding of Small Guest Molecules and Proteins to Molecular Printboards inside Microchannels. *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14* (1), 136-142; (b) Huskens, J., Multivalent interactions at interfaces. *Curr Opin Chem Biol* **2006**, *10* (6), 537-543; (c) Mulder, A.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N., Multivalency in supramolecular chemistry and nanofabrication. *Org Biomol Chem* **2004**, *2* (23), 3409-3424; (d) de Jong, M. R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N., Influencing the binding selectivity of self-assembled cyclodextrin monolayers on gold through their architecture. *Chem-Eur J* **2001**, *7* (19), 4164-4170.
111. Huskens, J.; Mulder, A.; Auletta, T.; Nijhuis, C. A.; Ludden, M. J. W.; Reinhoudt, D. N., A model for describing the thermodynamics of multivalent host-guest interactions at interfaces. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (21), 6784-6797.
112. Dubacheva, G. V.; Van der Heyden, A.; Dumy, P.; Kaftan, O.; Auzely-Velty, R.; Coche-Guerente, L.; Labbe, P., Electrochemically Controlled Adsorption of Fc-Functionalized Polymers on beta-CD-Modified Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2010**, *26* (17), 13976-13986.
113. Dubacheva, G. V.; Galibert, M.; Coche-Guerente, L.; Dumy, P.; Boturyn, D.; Labbe, P., Redox strategy for reversible attachment of biomolecules using bifunctional linkers. *Chemical Communications* **2011**, *47* (12), 3565-3567.

114. Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B., Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach. *Physica Scripta* **1999**, *59* (5), 391-396.
115. Green, N. M., Avidin. *Advances in protein chemistry* **1975**, *29*, 85-133.
116. Seifert, M.; Rinke, M. T.; Galla, H.-J., Characterization of Streptavidin Binding to Biotinylated, Binary Self-Assembled Thiol Monolayers-Influence of Component Ratio and Solvent. *Langmuir* **2010**, *26* (9), 6386-6393.
117. Domi, Y.; Yoshinaga, Y.; Shimazu, K., Characterization and Optimization of Mixed Thiol-Derivatized beta-Cyclodextrin/Pentanethiol Monolayers with High-Density Guest-Accessible Cavities. *Langmuir* **2009**, *25* (14), 8094-8100.
118. GARANGER, É., Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie *Thèse : Chimie-Biologie, Université Joseph Fourier* **2005**.
119. Ellerby, H. M.; Arap, W.; Ellerby, L. M.; Kain, R.; Andrusiak, R.; Del Rio, G.; Krajewski, S.; Lombardo, C. R.; Rao, R.; Ruoslahti, E.; Bredesen, D. E.; Pasqualini, R., Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* **1999**, *5* (9), 1032-1038.
120. Foillard, S.; Jin, Z.-H.; Garanger, E.; Boturyn, D.; Favrot, M.-C.; Coll, J.-L.; Dumy, P., Synthesis and Biological Characterisation of Targeted Pro-Apoptotic Peptide. *Chembiochem* **2008**, *9* (14), 2326-2332.
121. Suzuki, M.; Youle, R. J.; Tjandra, N., Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization. *Cell* **2000**, *103* (4), 645-654.
122. Adams, J. M.; Cory, S., The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **2007**, *26* (9), 1324-1337.
123. Oltersdorf, T.; Elmore, S. W.; Shoemaker, A. R.; Armstrong, R. C.; Augeri, D. J.; Belli, B. A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T. L.; Dinges, J.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Kitada, S.; Korsmeyer, S. J.; Kunzer, A. R.; Letai, A.; Li, C.; Mitten, M. J.; Nettesheim, D. G.; Ng, S.; Nimmer, P. M.; O'Connor, J. M.; Oleksijew, A.; Petros, A. M.; Reed, J. C.; Shen, W.; Tahir, S. K.; Thompson, C. B.; Tomaselli, K. J.; Wang, B.; Wendt, M. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H., An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **2005**, *435* (7042), 677-681.
124. Valero, J. G.; Sancey, L.; Kucharczak, J.; Guillemin, Y.; Gimenez, D.; Prudent, J.; Gillet, G.; Salgado, J.; Coll, J.-L.; Aouacheria, A., Bax-derived membrane-active peptides act as potent and direct inducers of apoptosis in cancer cells. *J Cell Sci* **2011**, *124* (4), 556-564.
125. Quanz, M.; Berthault, N.; Roulin, C.; Roy, M.; Herbette, A.; Agrario, C.; Alberti, C.; Josserand, V.; Coll, J.-L.; Sastre-Garau, X.; Cosset, J.-M.; Larue, L.; Sun, J.-S.; Dutreix, M., Small-Molecule Drugs Mimicking DNA Damage: A New Strategy for Sensitizing Tumors to Radiotherapy. *Clin Cancer Res* **2009**, *15* (4), 1308-1316.
126. Quanz, M.; Chassoux, D.; Berthault, N.; Agrario, C.; Sun, J.-S.; Dutreix, M., Hyperactivation of DNA-PK by Double-Strand Break Mimicking Molecules Disorganizes DNA Damage Response. *Plos One* **2009**, *4* (7), e6298.
127. Devun, F.; Bousquet, G.; Biau, J.; Herbette, A.; Roulin, C.; Berger, F.; Sun, J.-S.; Robine, S.; Dutreix, M., Preclinical study of the DNA repair inhibitor Dbait in combination with chemotherapy in colorectal cancer. *J Gastroenterol* **2012**, *47* (3), 266-275.
128. (a) Coquery, N.; Pannetier, N.; Farion, R.; Herbette, A.; Azurmendi, L.; Clarencon, D.; Bauge, S.; Josserand, V.; Rome, C.; Coll, J.-L.; Sun, J.-S.; Barbier, E. L.; Dutreix, M.; Remy, C. C., Distribution and Radiosensitizing Effect of Cholesterol-Coupled Dbait Molecule in Rat Model of Glioblastoma. *Plos One* **2012**, *7* (7), e40567; (b) Berthault, N.; Maury, B.; Agrario, C.; Herbette, A.; Sun, J. S.; Peyrieras, N.; Dutreix, M., Comparison of distribution and activity of nanoparticles with short interfering DNA (Dbait) in various living systems. *Cancer Gene Ther* **2011**, *18* (10), 695-706.

129. Li, Z.; Zhao, R.; Wu, X.; Sun, Y.; Yao, M.; Li, J.; Xu, Y.; Gu, J., Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *The FASEB Journal* **2005**, *19* (14), 1978-1985.
130. Song, S.; Liu, D.; Peng, J.; Sun, Y.; Li, Z.; Gu, J.-R.; Xu, Y., Peptide ligand-mediated liposome distribution and targeting to EGFR expressing tumor in vivo. *Int J Pharmaceut* **2008**, *363* (1-2), 155-161.
131. Binetruy-Tournaire, R.; Demangel, C.; Malavaud, B.; Vassy, R.; Rouyre, S.; Kraemer, M.; Plouet, J.; Derbin, C.; Perret, G.; Mazie, J. C., Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *Embo J* **2000**, *19* (7), 1525-1533.
132. Starzec, A.; Vassy, R.; Martin, A.; Lecouvey, M.; Di Benedetto, M.; Crepin, M.; Perret, G. Y., Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life sciences* **2006**, *79* (25), 2370-2381.
133. Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thornas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M. L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., A peptide competing with VEGF(165) binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release* **2006**, *111* (1-2), 153-164.
134. Starzec, A.; Ladam, P.; Vassy, R.; Badache, S.; Bouchemal, N.; Navaza, A.; du Penhoat, C. H.; Perret, G. Y., Structure–function analysis of the antiangiogenic ATWLPPR peptide inhibiting VEGF165 binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPPR/neuropilin-1 complex. *Peptides* **2007**, *28* (12), 2397-2402.
135. Polyak, M. J.; Deans, J. P., Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood* **2002**, *99* (9), 3256-3262.
136. Perosa, F.; Favoino, E.; Caragnano, M. A.; Dammacco, F., Generation of biologically active linear and cyclic peptides has revealed a unique fine specificity of rituximab and its possible cross-reactivity with acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b precursor. *Blood* **2006**, *107* (3), 1070-1077.
137. Binder, M.; Otto, F.; Mertelsmann, R.; Veelken, H.; Trepel, M., The epitope recognized by rituximab. *Blood* **2006**, *108* (6), 1975-1978.
138. Du, J.; Wang, H.; Zhong, C.; Peng, B.; Zhang, M.; Li, B.; Huo, S.; Guo, Y.; Ding, J., Structural Basis for Recognition of CD20 by Therapeutic Antibody Rituximab. *J Biol Chem* **2007**, *282* (20), 15073-15080.
139. Frank, R., SPOT-Synthesis - An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **1992**, *48* (42), 9217-9232.
140. Reineke, U.; Volkmer-Engert, R.; Schneider-Mergener, J., Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. *Curr Opin Biotech* **2001**, *12* (1), 59-64.
141. Laune, D.; Molina, F.; Ferrieres, G.; Mani, J. C.; Cohen, P.; Simon, D.; Bernardi, T.; Piechaczyk, M.; Pau, B.; Granier, C., Systematic exploration of the antigen binding-activity of synthetic peptides isolated from the variable regions of immunoglobulins. *J Biol Chem* **1997**, *272* (49), 30937-30944.
142. Ten Brink, H. T.; Meijer, J. T.; Geel, R. V.; Damen, M.; Löwik, D. W. P. M.; van Hest, J. C. M., Solid-phase synthesis of C-terminally modified peptides. *J Pept Sci* **2006**, *12* (11), 686-692.
143. Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H., CuI-Catalyzed Alkyne–Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *Eur J Org Chem* **2006**, *2006* (1), 51-68.
144. (a) Kappe, C. O., Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43* (46), 6250-6284; (b) de la Hoz, A.; Diaz-Ortiz, A.; Moreno, A., Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem Soc Rev* **2005**, *34* (2), 164-178.

145. Jonathan Collins, M. J. C. J., Sandeep K Singh, Grace Vanier, Hillary Merriweather, Alicia Douglas, Zachary J Cox, Recent developments in microwave enhanced solid phase peptide synthesis. *4th international peptide symposium, 7th Australian peptide conference and 2nd Asia-pacific international peptide symposium* **2007**.
146. Marburg, S.; Neckers, A. C.; Griffin, P. R., Introduction of the Maleimide Function onto Resin-Bound Peptides: A Simple, High-Yield Process Useful for Discriminating among Several Lysines. *Bioconjugate Chem* **1996**, *7* (5), 612-616.
147. (a) Winn Aung, Z.-H. J., Zhao-hui Jin, Takako Furukawa, Michael Claron, Didier Boturyn, Chizuru Sogawa, Atsushi B. Tsuji, Hidekatsu Wakizaka, Toshimitsu Fukumura, Yasuhisa Fujibayashi, Pascal Dumy, Tsuneo Saga, Micro-Positron Emission Tomography/Contrast-Enhanced Computed Tomography Imaging of Orthotopic Pancreatic Tumor-Bearing Mice Using the $\alpha\beta 3$ integrin Tracer ^{64}Cu -labeled Cyclam-Raft-c(-RGDfK)-4. *Mol Imaging* **2013**, *12* (6); (b) Jin, Z.-H.; Furukawa, T.; Claron, M.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Fukumura, T.; Fujibayashi, Y.; Dumy, P.; Saga, T., Positron emission tomography imaging of tumor angiogenesis and monitoring of antiangiogenic efficacy using the novel tetrameric peptide probe Cu-64-cyclam-RAFT-c(-RGDfK)-(4). *Angiogenesis* **2012**, *15* (4), 569-580.